

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID  
FACULTAD DE CIENCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR

ESTUDIOS SOBRE LA LOCALIZACIÓN Y TRÁFICO DE LOS TRANSPORTADORES  
DE LAS SINAPSIS GLUTAMATÉRGICAS  
SNAT2, SNAT5 Y GLT1

María Inmaculada González González

Junio de 2007

MEMORIA PRESENTADA POR LA LICENCIADA  
MARÍA INMACULADA GONZÁLEZ GONZÁLEZ  
PARA OPTAR AL GRADO DE  
DOCTORA EN CIENCIAS

DIRECTOR DE ESTA TESIS:

Dr. FRANCISCO ZAFRA GÓMEZ

CODIRECTOR DE ESTA TESIS:

Dr. CECILIO GIMÉNEZ MARTÍN

Madrid, Junio de 2007.

Este trabajo ha sido realizado en el Departamento de Biología Molecular/Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa” (C.S.I.C.-U.A.M.) en la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de Madrid.





INDICE:

	<b>Páginas:</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	<b>11</b>
<b>I. 1. LA TRANSMISIÓN DEL IMPULSO NERVIOSO.</b>	<b>11</b>
<b>I. 2. TRANSMISIÓN GLUTAMATÉRGICA.</b>	<b>12</b>
<b>I. 2. 1. Diversidad molecular de los receptores de glutamato.</b>	<b>13</b>
<b>I. 2. 2. Receptores de NMDA.</b>	<b>13</b>
<b>I. 2. 3. Transportadores de glutamato de alta afinidad.</b>	<b>14</b>
<b>I. 2. 4. Distribución de los transportadores de glutamato de alta afinidad.</b>	<b>16</b>
<b>I. 2. 5. Regulación de GLT-1.</b>	<b>17</b>
<b>I. 3. EL CICLO GLUTAMATO-GLUTAMINA.</b>	<b>18</b>
<b>I. 3. 1. Los transportadores de baja afinidad.</b>	<b>18</b>
<b>I. 4. PAPEL DE LAS PROTEÍNAS CON DOMINIOS PDZ EN LA ORGANIZACIÓN DE LA SINAPSIS.</b>	<b>19</b>
<b>I. 4. 1. Dominios PDZ.</b>	<b>19</b>
<b>I. 4. 2. La proteína de anclaje PSD95.</b>	<b>20</b>
<b>I. 5. REGULACIÓN DEL TRÁFICO DE LOS TRANSPORTADORES DE GLUTAMATO.</b>	<b>21</b>
<b>I. 5. 1. La ubiquitilación como modificación postraduccional.</b>	<b>21</b>
<b>I. 5. 2. La ubiquitin ligasa Nedd 4.2.</b>	<b>23</b>
<b>I. 5. 3. Ubiquitilación y tráfico de proteínas transmembrana.</b>	<b>24</b>
<b>II. OBJETIVOS.</b>	<b>29</b>
<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS.</b>	<b>33</b>
<b>III. 1. CULTIVOS CELULARES.</b>	<b>33</b>

III. 1. 1.	Cultivos primarios de neuronas.	33
III. 1. 2.	Cultivo de células COS7 y MDCK.	33
III. 1. 3.	Transfección de células mediante lipofección.	33
I. 2.	ANTICUERPOS.	34
III. 2. 1.	Producción y purificación de anticuerpos policlonales.	34
III. 2. 2.	Biotinilación del anticuerpo anti-GLT1b.	34
III. 2. 3.	Anticuerpos comerciales y cedidos	34
III. 3.	Construcciones de cDNA.	35
III. 4.	Determinación de la concentración proteica.	36
III. 5.	Electroforesis e inmunodetección (Inmunotransferencia).	36
III. 6.	Aislamiento de sinaptosomas.	36
III. 7.	Preparación de P2/P3 de cerebro de rata.	37
III. 8.	Ensayos de inmunoprecipitación en cultivos celulares.	37
III. 9.	Ensayos de inmunoprecipitación en tejido.	37
III. 10.	Tratamientos con activadores e inhibidores.	37
III. 11.	Purificación de proteínas de fusión.	38
III. 12.	Ensayo de <i>pull down</i> .	38
III. 13.	Purificación de la proteína 6X HIS-TAG.	38
III. 14.	Detección de las interacciones de GLT1b con dominios PDZ.	39
III. 15.	Análisis de la matriz de anticuerpos.	39
III. 16.	Técnicas de inmunofluorescencia en células cultivada.	39
III. 17.	Técnicas de inmunohistoquímica.	40
III. 18.	Técnicas de microscopía óptica y confocal.	40
III. 19.	Técnicas de microscopía electrónica.	41
III. 20.	Ensayo de $\beta$ -galactosidasa.	41
III. 21.	Ensayo de transporte de glutamato en células COS7.	41
III. 22.	Ensayo de marcaje de superficie celular con reactivos unidos a biotina.	42

III. 23.	Internación del transportador mediante marcaje de superficie con biotina.	43
III. 24.	Procesamiento de los datos y análisis densitométrico.	43
III. 25.	Experimentos de marcaje metabólico (Pulso y caza).	43
III. 26.	Herramientas bioinformáticas.	44
III. 27.	RT-PCR y PCR cuantitativa.	44
III. 28.	RNA de interferencia.	45
V.	RESULTADOS	49
	 I PARTE: ESTUDIO SOBRE LA DISTRIBUCIÓN DE LOS TRANSPORTADORES DE GLUTAMINA Y GLUTAMATO EN EL SNC.	49
IV. 1.	Producción de anticuerpos policlonales contra algunos transportadores de las sinapsis glutamatérgicas.	49
IV. 1. 1	Caracterización de anticuerpos policlonales.	49
IV. 1. 1. 1.	Anticuerpos anti-GLT1b.	49
IV. 1. 1. 2.	Anticuerpos anti-SNAT5.	51
IV. 1. 1. 3.	Anticuerpos anti-SNAT2.	53
V. 2.	ESTUDIO DE LA DISTRIBUCIÓN DE LOS MIEMBROS DE LA FAMILIA SNAT EN EL CEREBRO DE RATA.	54
IV. 2. 1.	Distribución de SNAT5.	54
IV. 2. 1. 1.	Distribución regional de SNAT5 en el cerebro mediante inmunquímica.	54
IV. 2. 1. 2.	Distribución de SNAT5 mediante microscopía óptica de baja resolución.	55
IV. 2. 1. 3.	Comparación de los patrones de distribución de SNAT5 y vGLUT1.	58

IV. 2. 1. 4.	Localización de SNAT5 en astrocitos por microscopía óptica a alta resolución.	58
IV. 2. 1. 5.	Análisis ultraestructural de la distribución de SNAT5.	61
IV. 2. 2.	Distribución de SNAT2 (ATA2)	66
IV. 2. 2. 1.	Distribución regional de SNAT2 en tejidos mediante inmunoquímica.	66
IV. 2. 2. 2.	Distribución regional de SNAT2 por microscopía de baja resolución.	66
IV. 2. 2. 3.	Distribución celular y subcelular de SNAT2 por microscopía óptica de alta resolución.	68
IV. 2. 2. 4.	Análisis ultraestructural de la distribución de SNAT2.	74
	<b>II PARTE: ESTUDIO SOBRE LA LOCALIZACIÓN Y EL TRÁFICO DEL TRANSPORTADOR DE GLUTAMATO GLT1.</b>	<b>76</b>
IV. 3.	<b>ANCLAJE DE GLT1b EN LA MEMBRANA PLASMÁTICA.</b>	<b>76</b>
IV. 3. 1.	Búsqueda de proteínas que interaccionan con GLT1b.	76
IV. 3. 2.	GLT1b interacciona con PSD95.	78
IV. 3. 3.	Caracterización de la interacción entre PSD95 y GLT1.	79
IV. 3. 4.	Determinación de los dominios PDZ de PSD95 que intervienen en la interacción con GLT1b.	80
IV. 3. 5.	PSD95 forma un puente entre GLT1b y NMDAr.	81
IV. 3. 6.	PSD95 incrementa la actividad de transporte de GLT1b.	81
IV. 3. 7.	PDS95 promueve el aumento de la densidad de transportador en la membrana plasmática.	83
IV. 3. 8.	La coexpresión con PSD95 no altera la inserción de GLT1b en la membrana.	83
IV. 3. 9.	La coexpresión con PSD95 inhibe la endocitosis de GLT1b.	83
IV. 3. 10.	Interacción de GLT1b y PSD95 en cultivos primarios: La localización específica de GLT1b en cultivos primarios no depende del ETCI terminal.	84

IV. 3. 11.	GLT1b y PSD95 colocalizan en cultivos primarios.	87
IV. 3. 12.	GLT1b se expresa en dendritas y en astrocitos del cerebro de rata.	89
IV. 4.	FORMACIÓN DE HETEROLIGÓMEROS ENTRE GLT1a Y GLT1b.	91
IV. 4. 1.	GLT1a también interacciona con PSD95 y NMDAR.	91
IV. 4. 2.	GLT1a y GLT1b forman heteroligómeros.	92
IV. 4. 3.	GLT1a requiere a GLT1b para interactuar con PSD95.	95
IV. 4. 4.	Colocalización de GLT1a, GLT1b y PSD95 en cultivos primarios.	96
	III. PARTE: REGULACIÓN DEL TRÁFICO DE GLT1a POR UBIQUITILACIÓN.	98
IV. 5. 1.	Degradación lisosomal vs proteasomal.	98
IV. 5. 2.	Implicación del proteasoma en la biosíntesis de GLT1a.	100
IV. 5. 3.	GLT1a se ubiquitila en sistemas de expresión heterólogos.	103
IV. 5. 4.	GLT1a se ubiquitina en cerebro.	104
IV. 5. 5.	El efecto de TPA sobre la ubiquilación de GLT1 se debe a la activación de PKC.	105
IV. 5. 6.	GLT1 se ubiquitina en la membrana plasmática.	106
IV. 5. 7.	El bloqueo de la endocitosis promueve la acumulación de GLT1a ubiquitilado en la membrana plasmática.	107
IV. 5. 8.	La eliminación de las lisinas de la cola C-terminal de GLT1a bloquea la endocitosis promovida por TPA	110
IV. 5. 9.	La activación de PKC promueve la endocitosis pero no la degradación de GLT1a.	113
IV. 5. 10.	La ubiquitin ligasa Nedd4-2 podría participar en la ubiquilación de GLT1a.	115
IV. 5. 11.	La coexpresión de Nedd4-2 incrementa la ubiquitilación y la degradación de GLT1.	116
IV. 5. 12.	Nedd4-2 interacciona con GLT1.	117

IV. 5. 13.	El silenciamiento de Nedd4-2 mediante RNAi disminuye la ubiquitilación de GLT1a y su degradación.	118
IV. 5. 14.	La eliminación de las lisinas de los extremos N y C-terminal de GLT1a bloquea la degradación promovida por Nedd4.2	119
V	DISCUSIÓN.	125
V. 1.	Localización de miembros de la familia SNAT.	125
V. 2.	Localización e interacciones de GLT1b.	128
V. 3.	Interacción con PSD-95.	129
V. 4.	Formación de heteroligómeros	131
V. 5.	Tráfico y ubiquitilación de GLT1a.	132
VI.	CONCLUSIONES.	139
	RESUMEN.	143
VII.		
VIII.	BIBLIOGRAFIA.	147
IX.	ANEXO	159
	Publicaciones.	

## **ABREVIATURAS**

<b>AMPA</b>	Ácido amino-3-hidroxi-5-metilsoxazol-4-propiónico
<b>ATPasa</b>	Adenosín trifosfatasa
<b>BSA</b>	Seroalbúmina bovina
<b>cDNA</b>	Ácido desoxirribonucleico complementario
<b>COS</b>	Células epiteliales de riñón de mono verde
<b>CFTR</b>	Regulador transmembrana de la fibrosis quística
<b>DAT</b>	Transportador de dopamina
<b>DIV</b>	Días in vitro
<b>DMEM</b>	Medio Eagle modificado por Dulbeco
<b>DMSO</b>	Dimetil sulfóxido
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>DTT</b>	Ditiotreitol
<b>EAAT</b>	Transportador de aminoácidos excitadores
<b>ECL</b>	Enhanced chemiluminescence
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiamino tetraacético
<b>ENaC</b>	Canal de sodio epitelial
<b>ERAD</b>	Degradación asociada al retículo endoplásmico
<b>FCS</b>	Suero fetal de ternera
<b>FRET</b>	Fluorescence Resonance Energy Transfer
<b>GABA</b>	Ácido gamma amino butírico
<b>GAT</b>	Transportador de GABA
<b>GLT1</b>	Transportador de glutamato
<b>GFP</b>	Proteína verde fluorescente
<b>GLYT</b>	Transportador de glicina
<b>GST</b>	Glutation-S-transferasa

<b>HA</b>	Hemaglutinina
<b>HBS</b>	Tampón salino HEPES
<b>HEPES</b>	Ácido (N-[2-Hidroxietil]piperazine-N'-[etanosulfónico])
<b>Nedd4</b>	Neuronal precursor cell-expressed developmentally down-regulated gene 4
<b>NET</b>	Transportador de norepinefrina
<b>NMDA</b>	N-metil-D-aspartato
<b>PBS</b>	Solución salina tamponada con fosfato
<b>PBS/Ca/Mg</b>	PBS suplementado con Ca <sup>2+</sup> y Mg <sup>2+</sup>
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>PDZ</b>	Postsynaptic density 95/Disc large/Zonula occludens-1
<b>PKC</b>	Proteína quinasa C
<b>PMSF</b>	Fenil metil sulfonil fluoruro
<b>PMA</b>	Forbol 12-miristato 13-acetato
<b>PSD</b>	Densidad postsináptica
<b>RNA<sub>m</sub></b>	Ácido ribonucleico mensajero
<b>SDS</b>	Dodecil sulfato sódico
<b>SDS-PAGE</b>	Electroforesis en gel de poliacrilamida
<b>SEM</b>	Error estándar de la media
<b>SH3</b>	Homólogo 3 a Src
<b>SNAT</b>	Synaptic neutral aminoacid transporter
<b>SNC</b>	Sistema nervioso central
<b>TPA</b>	12-O-tetradecanoilforbol 13-acetato
<b>TRIS</b>	Trihidroximetilaminometano
<b>vGLUT</b>	Transportador de glutamato vesicular

## **I. INTRODUCCIÓN.**



## I. 1. LA TRANSMISIÓN DEL IMPULSO NERVIOSO.

La sinapsis es una diferenciación morfológica y funcional que permite el flujo de información interneuronal. Está constituida por la terminación de un axón, que se ensancha para formar el botón presináptico; en aposición se encuentra la membrana del cuerpo celular o de una dendrita de otra neurona, lo que constituye el elemento postsináptico. Entre la membrana presináptica y la postsináptica existe un espacio denominado hendidura sináptica que tiene una anchura de 20 a 50nm. En la mayor parte de las sinapsis químicas la comunicación entre neuronas se realiza a través de sustancias químicas conocidas como neurotransmisores.

Los neurotransmisores se almacenan en vesículas en el terminal nervioso y son liberados por la fusión de estas vesículas con la membrana plasmática, en una región especializada llamada zona activa. Este proceso de fusión es dependiente de calcio y se halla acoplado a la entrada de este catión a través de los canales dependientes de voltaje. De este modo, la liberación de neurotransmisores responde en primer lugar a la despolarización de la membrana plasmática, situación que permite la apertura de los canales y la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de los mismos y, finalmente, desencadena la exocitosis del neurotransmisor. Los neurotransmisores pueden ser excitadores o inhibidores; los neurotransmisores excitadores producen la despolarización de la neurona postsináptica aumentando la permeabilidad para  $\text{Na}^+$ , mientras que los neurotransmisores inhibidores generan un potencial postsináptico inhibitorio, es decir, hiperpolarizan la neurona aumentando selectivamente la permeabilidad para  $\text{Cl}^-$ . La neurona integra señales excitadoras e inhibitorias y si la suma resultante de todos los efectos sobrepasa el umbral de excitación, la neurona genera un potencial de acción.

La mayor parte de los neurotransmisores son retirados del espacio sináptico mediante la actuación de transportadores específicos acoplados al potencial electroquímico de distintos iones como  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ . Estos transportadores se encuentran localizados en la membrana de las neuronas presinápticas, en las postsinápticas y/o en las células de glía adyacentes. Los transportadores de neurotransmisores cumplen una doble función, por una parte, constituyen el mecanismo más importante para la terminación de la transmisión sináptica y, por otra, aseguran la disponibilidad de niveles adecuados y constantes del neurotransmisor en el interior de la neurona presináptica.

Los neurotransmisores, una vez liberados desde terminal nervioso, difunden a través de la hendidura sináptica e interaccionan con sitios específicos en los receptores postsinápticos y, en algunos casos presinápticos, es decir, receptores ubicados en membrana de la misma neurona que los ha liberado o autorreceptores.

El neurotransmisor interacciona mediante afinidad química con la proteína receptora, y esta unión provoca un cambio conformacional del que resulta la apertura del canal y la translocación de iones en función de sus gradientes electroquímicos. El resultado final es la conversión de una señal química en una señal eléctrica. En otros casos la unión al ligando comporta la activación de segundos mensajeros. De esta manera, se inicia una cascada bioquímica capaz de promover cambios drásticos y perdurables en la fisiología de la célula.

## I. 2. TRANSMISIÓN GLUTAMATÉRGICA.

El glutamato es el principal neurotransmisor excitador dentro del sistema nervioso central de mamíferos. Sus efectos excitadores fueron descritos en los años 50, al observar que su aplicación tópica sobre la corteza cerebral producía actividad convulsiva (Hayashi ,1952). Aunque en un principio se restringió su papel al de mediador en los procesos de señalización sináptica rápida, actualmente se ha establecido su implicación en aspectos relevantes al normal funcionamiento del cerebro tales como la cognición, la memoria y el aprendizaje. (Miyamoto 2006).

La acción sináptica del glutamato comienza cuando éste es liberado a la hendidura sináptica gracias a la fusión de vesículas sinápticas cargadas de neurotransmisor con la membrana plasmática de una neurona presináptica. Una vez en la hendidura sináptica, el glutamato difunde hasta alcanzar receptores específicos y activarlos. Tras la actuación sobre sus receptores, el glutamato es recapturado por transportadores específicos presentes en la membrana plasmática neuronal y astrocítica que terminan la neurotransmisión glutamatérgica y evitan los denominados procesos de excitotoxicidad asociados a una sobreestimulación de los receptores de glutamato. Se conocen cinco transportadores de alta afinidad para el glutamato, todos dependientes de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ , que se incluyen en la familia génica SLC1 y que se denominan EAAT1 (o GLAST; Storck et al., 1992; Tanaka et al., 1993), EAAT2 (o GLT1; Pines et al., 1992), EAAT3 (o EACC1; Kanai and Hediger, 1992), EAAT4 (Fairman et al., 1995) y EAAT5 (Arriza et al., 1997).

Desde un punto de vista cuantitativo, el más importante es EAAT2 que se encuentra enriquecido en los astrocitos. Una vez en el interior de los astrocitos, el glutamato puede ser transformado a glutamina gracias a la acción del enzima glutamina sintasa. La glutamina, cuya presencia en el fluido extracelular no da lugar a fenómenos de excitotoxicidad puesto que no activa a los receptores de glutamato, regresa a la neurona presináptica dónde puede ser transformada a glutamato, reponiendo así el reservorio de neurotransmisor en las neuronas y completando el ciclo glutamato-glutamina.

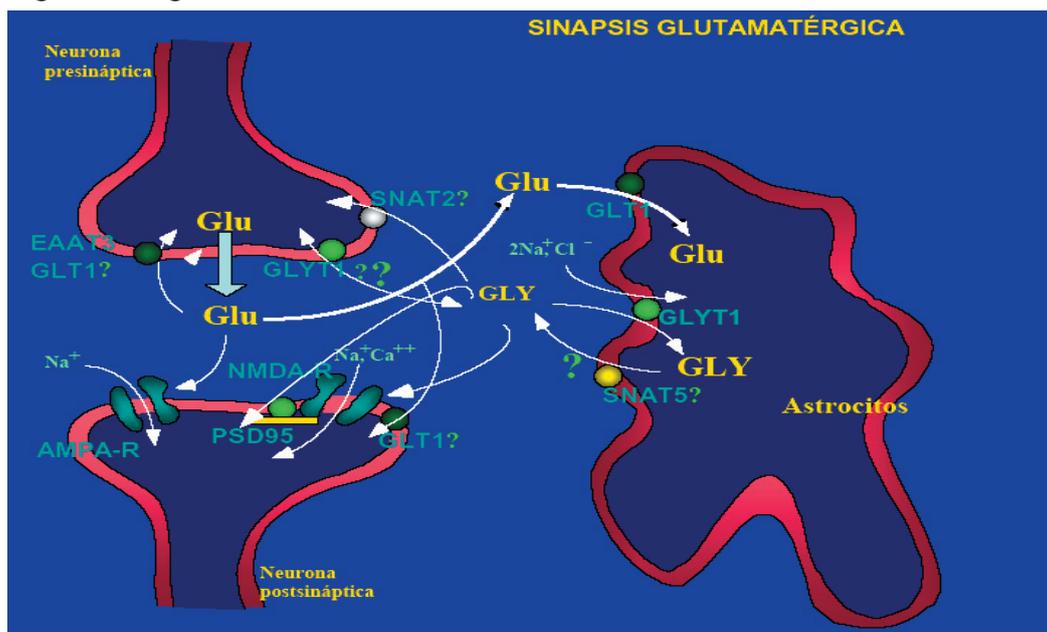


Fig. 1. Esquema de una sinápsis glutamatérgica.

### **I. 2. 1. Diversidad molecular de los receptores de glutamato.**

El ácido glutámico, ejerce su acción mediante su interacción con diversas proteínas receptoras. Clásicamente, los receptores de glutamato se han dividido en dos grupos generales: 1) aquellos que forman canales iónicos, o ionotrópicos, y 2) ligados a proteínas G, o metabotrópicos. Los receptores de tipo ionotrópico se han subdividido en tres clases según sus propiedades farmacológicas: los de  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico (AMPA), los de kainato y los de N-metil-D-aspartato (NMDA).

Los receptores de AMPA están formados por cuatro tipos de subunidades denominadas GluR1/-2/-3/-4 (o GluA/-B/-C/-D9 (Hollmann y Heinemann, 1994), mientras que cinco subunidades, GluR5/-6/-7 y KA-1/-2 parecen ser las responsables de la formación de los receptores de kainato. Hasta el momento han sido identificadas cinco subunidades del receptor de NMDA en el cerebro de rata y de ratón, y se han aislado la mayoría de sus homólogos en humano. La secuencia de aminoácidos de estas cinco subunidades difiere significativamente de la de las subunidades de los receptores de AMPA y kainato, y pueden ser clasificadas en dos subfamilias, denominadas en la rata como NMDAR1 (NR1) y NMDAR2. Existen cuatro miembros en la familia NR2 denominados NR2A, NR2B, NR2C, NR2D, dos miembros para la familia NR3, denominados NR3A y NR3B mientras que sólo existe un miembro para la familia de NR1 (Paoletti P. et al., 2007).

La estructura primaria de las distintas subunidades de los receptores de glutamato ionotrópicos sugiere una topología común. A partir de estudios de hidrofobicidad, se cree que estas subunidades presentan un largo dominio N-terminal extracelular, cuatro segmentos hidrofóbicos (M1-M4) y un dominio C-terminal intracelular. Los segmentos M1, M3 y M4 son segmentos transmembranas, mientras que el segmento M2 está insertado en la membrana en forma de horquilla que delimita el poro acuoso.

### **I. 2. 2. Receptores de NMDA.**

El receptor de NMDA forma un canal catiónico operado por ligando que permite la permeación de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  y presenta una serie de propiedades que los distinguen de otros canales iónicos dependientes de ligando. En primer lugar, estos receptores son bloqueados por concentraciones fisiológicas de  $\text{Mg}^{2+}$ . En segundo lugar, los receptores de NMDA son altamente permeables al  $\text{Ca}^{2+}$ . La entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  desencadena importantes procesos celulares, tales como el fenómeno plástico conocido como la potenciación a largo plazo (LTP), un modelo celular de memoria y aprendizaje. Sin embargo, la estimulación prolongada de los receptores de NMDA provoca una entrada excesiva de  $\text{Ca}^{2+}$  al interior de la célula capaz de causar la muerte neuronal por excitotoxicidad. En tercer lugar, el receptor de NMDA es el único receptor conocido que requiere la unión simultánea de dos agonistas, glutamato y glicina, para una apertura eficaz del canal. Para que tenga lugar la máxima activación del receptor, se requiere aparentemente la unión de dos moléculas de glutamato y dos de glicina. Las constantes cinéticas de activación, desactivación y desensibilización para el receptor NMDA son considerablemente más lentas que las de los otros receptores de glutamato. Las constantes de desactivación para ambos agonistas difieren en los receptores de NMDA dependiendo del tipo de subunidad NR2 que incluyan.

### I. 2. 3. Transportadores de glutamato de alta afinidad.

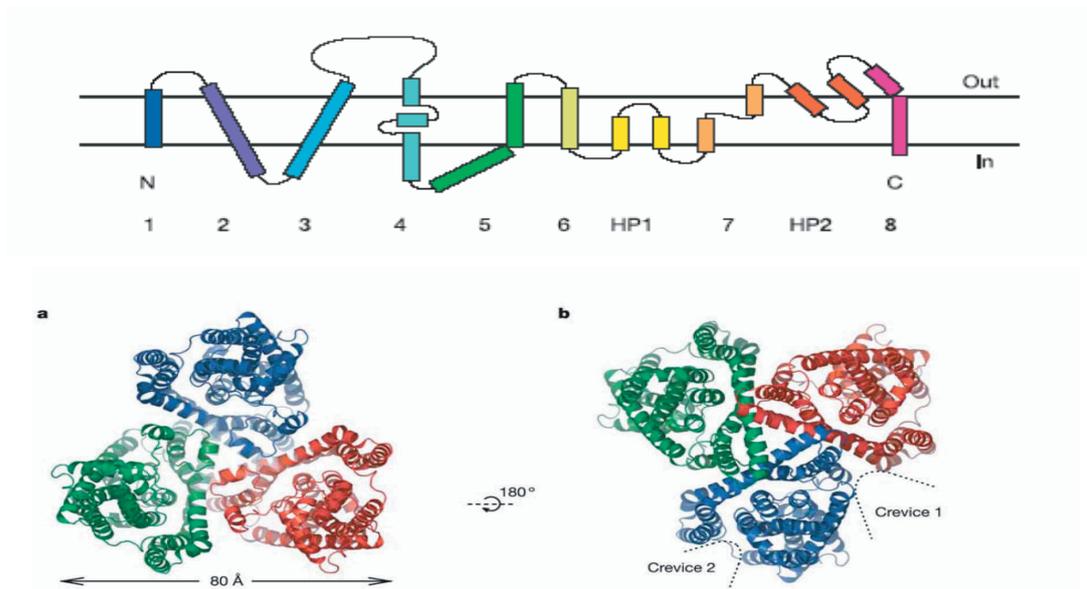
Los cinco transportadores de la familia génica SLC1 son responsables de la recaptura del neurotransmisor glutamato liberado tras la despolarización de neuronas glutamatérgicas, aunque GLT1 es responsable de hasta el 90 % del transporte de glutamato de SNC (Danbolt, 2001). Todos los miembros de esta familia transportan L-glutamato y L-aspartato como sustratos de alta afinidad ( $K_m$  [Glu] < 100  $\mu$ M). Los transportadores eucarióticos catalizan el simporte electrogénico de glutamato con dos o tres iones de sodio y un protón, y el antiporte de un ión de potasio (Barbour et al., 1988). Existe además una corriente no acoplada debida al flujo de iones cloruro asociada a dos miembros de la familia, EAAT4 y EAAT5 (Arriza. et al., 1997).

	N-Terminal	Referencia; especie	C-Terminal
mGLT1	MASTEGANNMP	(Utsunomiya-Tate et al., 1997), ratón.	DECKVTLAANKSADCSVEEEPWKREK
mGLT1A	MSVANNMP	(Utsunomiya-Tate et al., 1997), ratón.	DECKVTLAANKSADCSVEEEPWKREK
mGLT1B	MSVANNMP	(Utsunomiya-Tate et al., 1997), ratón.	DECKVFPFLDIETCI
GLT1a	MASTEGANNMP	(Pines et al., 1992), rata.	DECKVTLAANKSADCSVEEEPWKREK
GLT1b	MASTEGANNMP	(Schmitt et al., 2002), rata.	DECKVFPFLDIETCI
GLT1c	Sin determinar	(Rauen et al., 2004), rata.	DECKSLHYVEYQSWV
EAAT2	MASTEGANNMP	(Arriza et al., 1994), humano.	DECKVTLAANKSADCSVEEEPWKREK

**Fig. 2.** Variantes de procesamiento alternativo del transportador de glutamato GLT1.

GLT1 es, cuantitativamente, el miembro más importante, siendo el responsable del 90% del transporte de glutamato dentro del SNC. Esta proteína posee además variantes de “splicing” o procesamiento alternativo. A partir del transcrito primario de GLT1 derivan varios mRNAs maduros por splicing alternativo que dirigirán la síntesis de diversas isoformas de la proteína (ver fig. 2): mGLT-1A (Utsunomiya-Tate., 1997), mGLT1B (Utsunomiya-Tate, 1997), en ratón, rGLT1A (Pollard et al., 2000), GLT1b (Schmitt et al., 2002) y GLT1c (Rauen et al., 2004) en rata. De las variantes murinas, tanto la isoforma A como B se poseen un extremo amino terminal que difiere del descrito para la proteína original (mGLT1) y que también se ha

descrito en rata (rGLT1A), mGLT1B se diferencia además en los once últimos aminoácidos del extremo carboxilo terminal (ver fig 2). La secuencia C-terminal presente en mGLT1B se conserva en la variante de ratón GLT1b. Por último, la isoforma GLT1c se diferencia tanto en la región amino como en la carboxilo terminal de la proteína original (GLT1a). El ortólogo humano de esta isoforma se denomina EAAT2.



**Fig. 3.** Estructura del homólogo bacteriano de GLT1.

La resolución de la estructura tridimensional basada en el transportador homólogo del procarionte *Pyrococcus horikoshii* revela la existencia de ocho segmentos transmembrana (TM1-8) en  $\alpha$ -hélice y dos horquillas helicoidales (HPs 1-2), tanto en extremo N-terminal como el C-terminal son intracelulares (Yernool et al. 2004).

Las propiedades de movilidad electroforética de los transportadores de glutamato, con la aparición en los geles de varias bandas de movilidad variable sugirieron que estas proteínas podrían formar oligómeros. Estudios posteriores en extractos de tejido nervioso fresco expuestos a la acción de agentes químicos entrecruzantes, y más recientemente estudios de microscopía electrónica y difracción de rayos X demostraron la naturaleza oligomérica de estos transportadores (Haugeto et al., 1996; Dehnes et al., 1998). Los estudios de microscopía electrónica en muestras criofracturadas de EAAC1 expresado en oocitos de *Xenopus laevis* sugiere que EAAC1 forma una estructura pentámerica en la membrana plasmática con una sección transversa de  $48 \pm 5$  nm<sup>2</sup>. Por otra parte, la resolución mediante difracción por rayos X de la estructura del homólogo bacteriano de GLT1 muestra una disposición triangular con un monómero en cada uno de los vértices del trímero (Yernool et al, 2004).

Los diferentes miembros de la familia de transportadores no parecen formar complejos oligoméricos entre ellos, a pesar de que al menos dos de ellos, GLAST y GLT1, se expresan en de modo solapante.

#### **I. 2. 4. Distribución de los transportadores de glutamato de alta afinidad.**

Todos los miembros de la familia de transportadores de glutamato de alta afinidad se expresan en el cerebro, excepto EAAT5 que sólo se expresa en retina (Arriza et al., 1997).

GLAST es el transportador de glutamato principal en el cerebelo (Lehre y Danbolt, 1998), el oído interno (Furness y Lehre, 1997; Takumi et al., 1997), órganos circunventriculares (Berger y Hediger, 2000) y en la retina (Derouiche 1995). Respecto a su distribución dentro del SNC, GLAST se localiza en células astrogiales a lo largo de todo el SNC, incluyendo retina, y en astrocitos fibrosos de la sustancia blanca (Chaudhry et al., 1995; Lehre et al., 1995; Schmitt et al., 1997).

Rothstein y sus colaboradores demostraron que EAAC1 está presente en varios tipos de neuronas, incluyendo neuronas GABAérgicas (Rothstein et al., 1994). EAAC1 se expresa además en astrocitos del córtex y la sustancia blanca (Conti et al., 1998). La localización ultraestructural de EAAC1 es predominantemente citoplasmática y perisináptica (Domenercq and Matute 1999; Kugler and Schmitt, 1999). En la retina, EAAC1 se localiza en células horizontales, células amacrinas, células ganglionares y en los conos de las células bipolares (Rauen et al., 1999).

La expresión de EAAT4 está restringida a las células de Purkinje de la capa molecular cerebelar (Yamada et al., 1996) y es muy reducida aunque detectable en el cerebro anterior (Dehnes et al., 1998).

GLT1 es cuantitativamente el transportador de glutamato con mayor representación en el cerebro anterior. Predomina en todas regiones del sistema nervioso central de mamíferos excepto aquéllas en las que GLAST es el transportador mayoritario. Presenta altos niveles de expresión en el hipocampo y el cerebelo (Chaudhry et al., 1995; Lehre et al., 1995). GLT1 está presente en la mayoría de los astrocitos en el neocórtex, estriado, tálamo, así como en los astrocitos fibrosos de la sustancia blanca (Lehre et al., 1995). La glándula pituitaria y los órganos sensoriales circunventriculares no expresan GLT1 (Berger and Hediger, 2000). En la retina GLT1 se expresa en neuronas (células bipolares y fotorreceptores), mientras que las células gliales (células de Müller y astrocitos) no la expresan (Rauen and Kanner, 1994; Euler y Wassle, 1995; Rauen, 2000).

Varios grupos han descrito la presencia de RNAm que codifica para GLT1 en neuronas y astrocitos del sistema nervioso central (Torp et al., 1997; Berger y Hediger, 1998). El estudio mediante técnicas de hibridación *in situ* usando sondas específicas dirigidas contra los 3'-UTR de GLT1 (GLT1a y GLT1b) revela un patrón de distribución celular similar en neuronas y astrocitos del sistema nervioso central. La comparación de la intensidad de marcaje en astrocitos muestra diferencias regionales para GLT1a, mientras que la expresión del RNAm de GLT1b es más uniforme. Así, la expresión de RNAm de GLT1a en astrocitos es mayor en la capa de las neuronas piramidales de CA1 del hipocampo que en la capa molecular. En cambio, no existen tales diferencias de expresión para GLT1b. Mediante técnicas inmunocitoquímicas se observa un alto grado de expresión de GLT1a en los astrocitos de la capa celular de neuronas piramidales en consonancia con los niveles de RNAm descritos (Sullivan et al., 2004).

También existen diferencias en la distribución subcelular de GLT1a y GLT1b. En astrocitos,

el RNAm de GLT1a se localiza principalmente en los procesos, mientras que GLT1b se concentra en el cuerpo celular. Tales diferencias se reflejan a nivel proteico. Mediante el uso de anticuerpos específicos para GLT1a (denominado  $\alpha$  en este estudio) y para GLT1b (denominado GLT1v), se ha descrito la presencia de GLT1a en regiones distales de los procesos astrocíticos y más proximales para GLT1b (Sullivan et al., 2004).

La expresión del RNAm de GLT-1 en neuronas es detectable en diversos subgrupos en el hipocampo (CA3), el córtex cerebral (capas II-VI) (Berger et al., 2005), el tálamo, el núcleo olfatorio anterior y el núcleo olivar (Berger y Hediger, 1998). La distribución del RNAm para ambas isoformas en neuronas es similar pero los niveles RNAm de GLT1a son mayores que los de GLT1b. Mediante técnicas de microscopía electrónica usando anticuerpos específicos contra el extremo amino terminal de GLT1a/b y contra el carboxilo terminal de GLT1a se ha detectado la presencia de GLT1a en neuronas del hipocampo (Chen et al., 2004). GLT1a está presente axones que forman sinápsis asimétricas y en algunas espinas y dendritas. Respecto a GLT1b, los autores no pudieron concluir su estudio por falta de especificidad del anticuerpo dirigido contra el extremo carboxilo terminal de la isoforma b. GLT1b se expresa en neuronas en cultivo (Chen et al., 2002) y en neuronas retinales (Schmitt et al., 2002). Existe, además una fuerte inducción de la expresión de GLT1b en neuronas después de un episodio hipóxico o en esclerosis lateral amiotrofica (Pow et al., 2004; Maragakis et al., 2004).

### **I. 2. 5. Regulación de GLT-1.**

La actividad de GLT-1 se regula por la acción de varias quinasas y segundos mensajeros entre los que se encuentran: el ácido araquidónico (Dunlop et al., 1999), los radicales libres, PI3K (fosfatidil-inositol 3 quinasa), PKA y PKC (Guillet et al., 2005). Sin embargo, los efectos de PKC sobre la actividad de GLT-1 son variables según el sistema experimental. Por ejemplo, la activación de PKC causa un incremento en la actividad cuando GLT-1 se expresa de manera transitoria en células HeLa transfectadas con el virus vaccinia (Casado et al., 1993) pero no tiene efecto en HeLa transfectadas de manera estable o en otras líneas periféricas (Tan et al., 1999). En una línea celular que expresa de manera endógena la variante humana de GLT-1 (el retinoblastoma humano Y-79), la activación de PKC conlleva una disminución en la actividad al aumentar el valor de la  $K_m$  para el transporte (Crosson CE. et al., 1999). En un estudio preliminar, la activación de PKC causó una disminución de la actividad en células MDCK (Madin-Darby Canine Kidney) transfectadas de manera estable para GLT-1 (Dunlop et al., 1999). Tales estudios sugieren que el efecto de la activación PKC sobre podría ser dependiente del nivel de expresión del transportador y/o de la presencia de otras proteínas celulares que no se expresan de manera constitutiva en todas las células. Un estudio más reciente, en el que utilizan dos sistemas modelo, co-cultivos primarios de neuronas y astrocitos y células de glioma C6, muestra que en ambos sistemas, la activación de PKC con ésteres de forbol causa una disminución en los niveles de GLT-1 presentes en la membrana plasmática (Kalandadze et al., 2002). Los autores de este trabajo identifican un dominio de 43 aminoácidos (residuos 475-517) en el extremo carboxilo terminal de GLT-1 que es necesario para la redistribución de GLT-1 inducida por PKC.

La mutación en un residuo no conservado de serina en la posición 486 parcialmente atenúa pero no elimina completamente el efecto de PKC sobre GLT-1. En un trabajo posterior del mismo laboratorio se demuestra la interacción entre GLT-1 y la isoforma  $\alpha$  de PKC en células de glioma C6 y en sinaptosomas de cerebro de rata (González et al., 2005). Así mismo, la activación de esta isoforma de PKC promueve la endocitosis regulada del transportador de glutamato GLT-1.

### **I. 3. ELCICLO GLUTAMATO-GLUTAMINA.**

El glutamato liberado en los terminales nerviosos ha de ser retirado eficientemente de la hendidura sináptica debido a su neurotoxicidad. Una vez en el interior celular, el glutamato puede ser usado para propósitos metabólicos como la síntesis proteica o el metabolismo energético, o bien reciclarse para la neurotransmisión. La acción de los transportadores de alta afinidad antes mencionados introducen gran parte del glutamato liberado en las células de glía las cuales lo convertirán en glutamina gracias al enzima glutamina sintetasa. La glutamina puede ser devuelta a las neuronas glutamatérgicas (también a las GABAérgicas) que recuperan finalmente el glutamato que liberaron gracias a la transformación de la glutamina en glutamato por deaminación de la glutamina mediante el enzima neuronal glutaminasa (Kvamme et al., 1988). Se completa así un ciclo intercelular entre neuronas y glía, conocido como ciclo glutamato-glutamina (Broer y Brookes, 2001; Patel et al., 2003). En este ciclo son necesarios al menos dos transportadores adicionales, uno en las células de glía con capacidad para exportar glutamina al espacio extracelular, y otro neuronal con capacidad para recapturar esta glutamina para la neurona. En los últimos años se han clonado varios transportadores, que ahora constituyen la familia génica SLC38, con capacidad para catalizar estos pasos. Estos son los transportadores SN1 (o SNAT3), SN2 (o SNAT5), ATA1 (o SNAT1) y ATA2 (o SNAT2) (Chaudry 1999).

#### **I. 3. 1. Los transportadores de baja afinidad.**

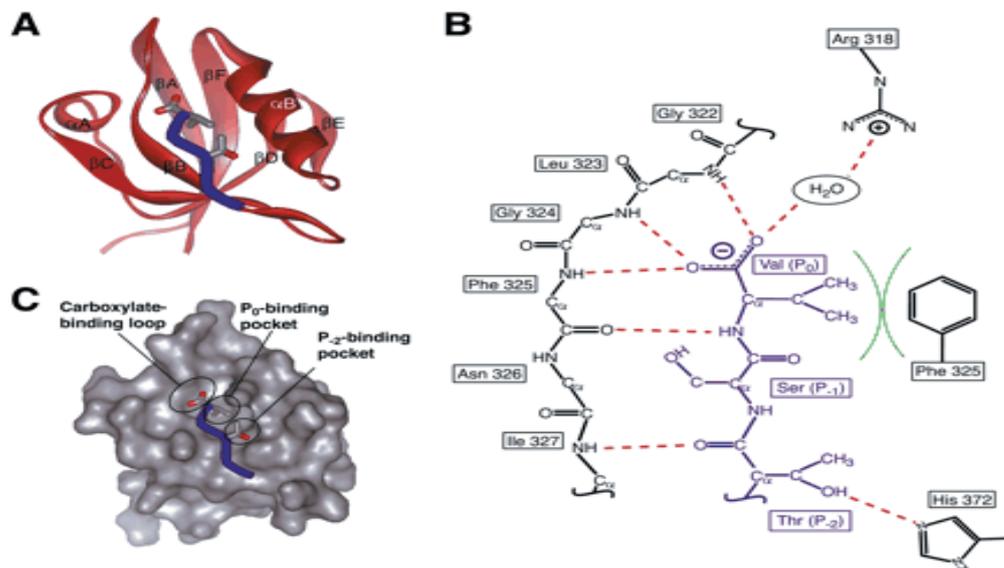
Estos transportadores tienen una especificidad de sustrato menor que los transportadores de alta afinidad y, aparte de glutamina, transportan otros aminoácidos neutros como alanina, serina y el aminoácido neuroactivo glicina. SNAT3 se localiza en las células de glía en las proximidades de las neuronas GABA-érgicas, con capacidad para promover el flujo de glutamina desde las células de glía (Chaudry, 1999; Boulland et al., 2002). Por otra parte, ATA1 (también denominado GlnT) fue identificado inicialmente como el transportador neuronal de glutamina. Sin embargo, estudios inmunohistoquímicos recientes lo sitúan no sólo en las neuronas, sino también en la glía (Varoqui et al., 2000; Melone et al., 2004). Además, está restringido al cuerpo celular y a las dendritas proximales, pero no se ha encontrado ni en los axones ni en los terminales en donde, según el modelo teórico, debería estar localizado el transportador de glutamina del ciclo glutamato-glutamina. Por otra parte, SNAT5 tiene unas propiedades y un mecanismo semejantes a SNAT3, mientras que SNAT2 es similar a SNAT1 (Mackenzie y Erickson, 2004). Sin embargo, al comienzo de esta Tesis únicamente se conocía la distribución de sus mRNAs pero no la de las proteínas. Es muy interesante el hecho de que SNAT5, que al igual que SNAT3 es capaz de catalizar el flujo de glutamina, prefiere como sustrato a la glicina, por lo que es

concebible el que pueda contribuir a la regulación de la concentración de glicina en el entorno de las sinapsis glutamatérgicas por eflujo desde la glía. Como se detalla más abajo, estudios de nuestro laboratorio incluidos en esta Tesis indican que, en efecto, SNAT5 se localiza en células de glía próximas a las sinapsis glutamatérgicas. Sin embargo, sus propiedades como transportador de glicina están por clarificar. En cuanto al otro transportador, SNAT2, tampoco se conocía su distribución inmunohistoquímica por lo que no se podía vislumbrar en qué medida podría participar en el ciclo glutamato-glutamina.

## I. 4. PAPEL DE LAS PROTEÍNAS CON DOMINIOS PDZ EN LA ORGANIZACIÓN DE LA SINAPSIS.

### I. 4. 1. Dominios PDZ.

Las uniones sinápticas son estructuras altamente especializadas en la transmisión eficaz de la señal sináptica desde la neurona presináptica a la postsináptica. En el botón postsináptico existe una zona activa electrondensa denominada densidad postsináptica (PSD) formada por diversas proteínas, como los filamentos de actina y las proteínas de “andamiaje” que juegan un papel importante en la organización, estructura y función de las uniones sinápticas. Muchas de las proteínas de este complejo multiproteico poseen un motivo estructural común: los dominios PDZ.



**Fig. 4.** Estructura de los dominios de interacción proteína-proteína PDZ.

Los dominios PDZ fueron inicialmente identificados como elementos comunes presentes en la estructura de tres proteínas PSD95, Dlg y ZO-1. Estos dominios son módulos de interacción proteína-proteína compuesto de dos  $\alpha$ -hélices y seis láminas  $\beta$ . La cavidad formada entre la segunda lámina  $\beta$  y las segunda  $\alpha$ -hélice permite la interacción específica con los motivos consenso de interacción presentes en el extremo carboxilo terminal de las proteínas diana. Los dominios en PDZ se han clasificado en tres clases de acuerdo al motivo consenso c-terminal que reconocen (Bezprozvanny y Maximov, 2001a): la clase I de dominios PDZ interacciona con la

secuencia consenso S/T-XV/I/L, las clase II de dominios PDZ reconoce el motivo  $\Phi$ -X- $\Phi$  y la clase III de dominios PDZ interacciona con el motivo  $\Phi$ -X-C ( $\Phi$  representa un aminoácido hidrofóbico y voluminoso y X cualquier residuo aminoacídico). Sin embargo, algunos dominios PDZ son capaces de reconocer más de una clase de motivos C-terminales El motivo consenso descrito en el extremo carboxilo de GLT1b (TCI) coincide con el motivo consenso descrito para los dominios de clase I.

Se ha establecido que muchas proteínas de membrana dentro del sistema nervioso central son estabilizadas en su localización gracias a la interacción con proteínas de anclaje como las que contienen dominios PDZ. Esto incluye al transportador de GABA (Perego et al., 1999), glicina (Cubelos et al., 2005) y los receptores de glutamato. ( O'Brien 1998). La hipótesis de que los transportadores de glutamato pudieran estar anclados a proteínas que mantienen su localización ha ganado terreno tras el descubrimiento de que tanto GLT1b como EAAT5 presentan en sus extremos carboxilos terminales un motivo de interacción con dominios PDZ.

La localización diferencial de algunos de los transportadores de glutamato sugiere que estas proteínas podrían estar de algún modo ancladas al citoesqueleto: a) EAAT4 presenta altos niveles de expresión en aquéllas regiones de membrana de las células de Pankinje orientadas hacia la glía mientras que en la membrana sináptica y perisináptica los niveles son bajos o inexistentes (Dehnes et al.,1998). b) la expresión de GLT1 y GLAST en astrocitos parece depender de la estructura vecina, así las regiones de membrana orientadas hacia el neuropilo presentan grandes concentraciones de GLT1 y GLAST, mientras que las orientadas hacia el endotelio capilar por ejemplo, presentan concentraciones muy bajas. La distribución intracelular de GLT1a y b también presenta diferencias localizándose GLT1a en regiones distales mientras que GLT1b se localiza más próximo al soma celular (Pow et al., 2004).

#### **I. 4. 2. La proteína de anclaje PSD95.**

Entre las proteínas con motivos PDZ, las proteínas de la superfamilia MAGUK (membrane-associated-guanylate kinase homologues) juegan un papel central en la organización de la sinapsis ya que anclan a diversos receptores, transportadores y canales iónicos y los acoplan a las vías intracelulares de transducción de señal (Tomita et al., 2001; Sheng y Sala, 2001). Entre ellas están PSD-95, SAP97, SAP102, PSD-93 o CASK. Las proteínas MAGUK presentan entre uno y tres dominios PDZ en su extremo amino, un dominio SH3 y un dominio guanilato kinasa. Entre otras, las proteínas MAGUK interaccionan con los receptores de glutamato. Así por ejemplo, PSD-95 interacciona a través de dominios PDZ con la subunidad GluR6 del receptor de kainato (Tomita et al., 2001; Sheng y Sala, 2001) y con las subunidades NR1 (-ESDV) y NR2 (-ESEV) del receptor de NMDAR. En concreto, en las sinápsis maduras los receptores enriquecidos en NR2A interaccionan con PSD95 y se localizan principalmente en la densidad postsináptica, mientras que los receptores que contienen la subunidad NR2B interaccionan con SAP102 y se localizan de manera predominante en regiones perisinápticas o extrasinápticas (Van Zundert et al, 2004). Tanto PSD95 como SAP-102, mejor conocidos por su presencia en la PSD, se expresan también en los axones.

corticales, cerebelares y la retina (Koulen et al., 1998) y en porciones no sinápticas de las dendritas y espinas (Aoki et al., 2001).

Los NMDAR que se localizan en las densidades postsinápticas, están estructuralmente organizados en un gran complejo de señalización macromolecular compuesto de proteínas de anclaje y proteínas adaptadoras que unen físicamente el receptor a quinasas, fosfatasa y otras moléculas de señalización (Kim y Sheng, 2004; Washburn, 2005; Prybylowski, 2005). Las proteínas de anclaje no sólo regulan el tráfico y anclaje en las regiones sinápticas, también regulan la función del receptor. La sobreexpresión de PSD-95 promueve la formación de “clusters” o agrupaciones de NMDAR (Sheng et al., 1996) acelera la maduración de las sinápsis excitadoras (El-Husseini et al., 2000), reduce la desensibilización del receptor (Li, 2003); en sistemas heterólogos la expresión de PSD95 aumenta el rango de apertura del canal de NMDAR, estimula la inserción del receptor e inhibe la internalización del mismo aumentando la permanencia del receptor en membrana (Zukin et al., 2004; Roche et al., 2004). De manera similar, PSD-95 suprime la internalización del canal de potasio Kv1.4 (Jugloff et al., 2000), del transportador de glicina GLYT1 (Cubelos et al., 2005) y atenúa la internalización inducida por agonista del receptor  $\beta$ 1-adrenérgico (Hu et al., 2000).

PSD-95 también participan en interacciones con proteínas implicadas en procesos de transducción de señales acoplados a los receptores de glutamato. Así, PSD-95 y SAP97 interactúan, entre otras, con la proteína de anclaje de la quina A (AKAP79/150), una proteína de anclaje para la proteína quina A (PKA), la proteína quina C (PKC) y la fosfatasa dependiente de  $Ca^{2+}$ /calmodulina (PP2B) (Colledge et al., 2000). De este modo PSD-95 regula la actividad de las proteínas de membrana con las que interactúa mediante la modulación de procesos tales como la liberación de estas proteínas a la superficie celular, la endocitosis, la localización subcelular, la composición de subunidades y la conexión con cascadas de señalización intracelular.

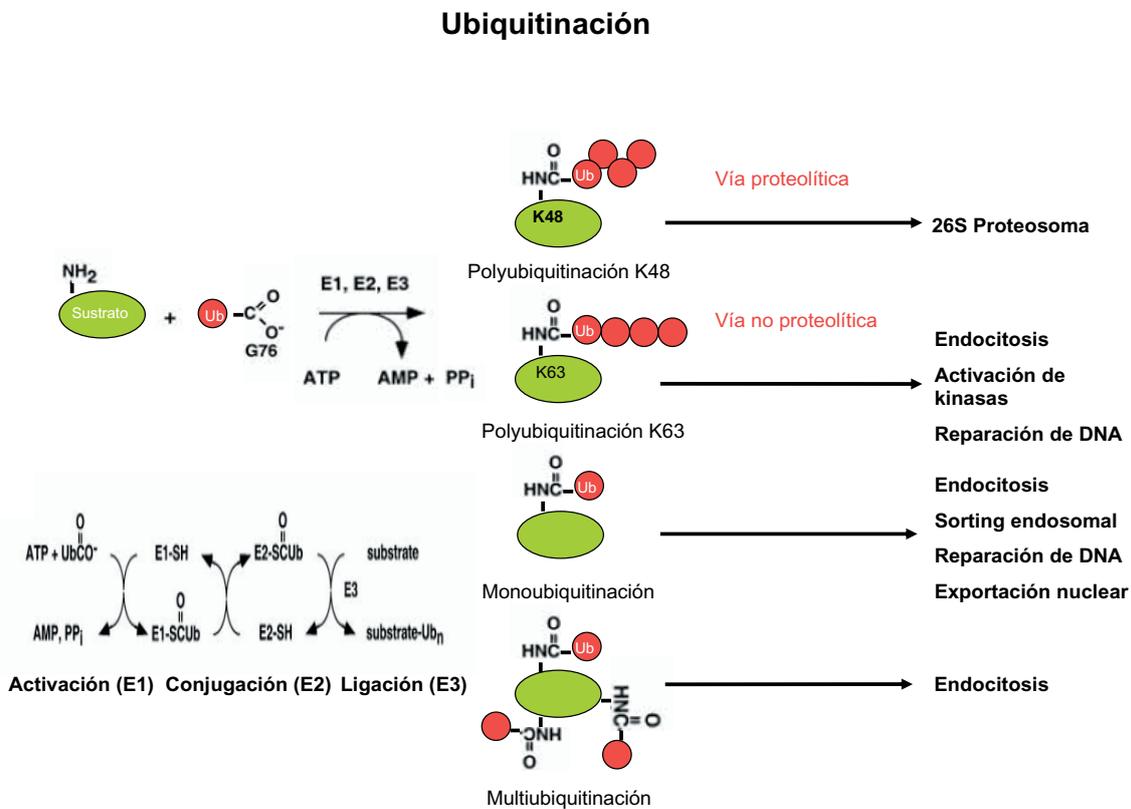
## **I. 5. REGULACIÓN DEL TRÁFICO DE LOS TRANSPORTADORES DE GLUTAMATO POR UBIQUITILACIÓN.**

Varios estudios han mostrado la implicación de los procesos de ubiquitilación en la regulación de proteínas del sistema nervioso central. El sistema ubiquitina regula la estabilidad y el tráfico de numerosas proteínas presinápticas y postsinápticas. Así, en la región presináptica la ubiquitilación regula procesos tales como el desarrollo y tamaño de la sinapsis, el reciclaje de vesículas y la liberación de neurotransmisores. En las neuronas postsinápticas, la ubiquitina se ha visto implicada en regulación de la endocitosis y reciclaje de los receptores de glutamato, el tamaño de la espina y la plasticidad sináptica.

### **I. 5. 1. La ubiquitilación como modificación postraduccional.**

La ubiquitilación (o ubiquitinación o ubiquitinilación) de proteínas es una modificación postraduccional que comprende la unión covalente del polipéptido de 76 aminoácidos de ubiquitina

o cadena de poliubiquitina, son selectivamente conducidos a la proteasa dependiente de ATP conocida como proteosoma 26S, sin embargo, ciertos sustratos marcados con una o varias ubiquitinas son conducidos a procesos de endocitosis hacia el compartimento lisosomal donde son finalmente degradados (Urbe, 2005) (fig 5).



**Fig. 5.** Esquema de la reacción de ubiquitinación y su relación con las vías proteolíticas y no proteolíticas.

El proceso de ubiquitinación se lleva a cabo mediante la acción secuencial de tres enzimas. La enzima E1 activa la molécula de ubiquitina mediante una reacción dependiente de ATP que forma un enlace tioéster entre la cisteína presente en su sitio activo y el extremo C-terminal de la molécula de ubiquitina. La ubiquitina activada se transfiere a la cisteína del sitio activo de una enzima E2 y, a veces, al sitio activo de una ligasa E3. En la última reacción, catalizada por una E2 con ayuda de la E3 o directamente por la E3, se forma un enlace isopeptídico entre el extremo C-terminal de la molécula de ubiquitina y en grupo  $\epsilon$ -amino de un residuo de lisina de la proteína diana. La generación de cadenas de multiubiquitina es a menudo (no siempre) mediado por la unión repetida de ubiquitina en las lisina 48 de otra ubiquitina o de una cadena creciente de ubiquitinas (D'Azzo et al. 2005) (fig. 5).

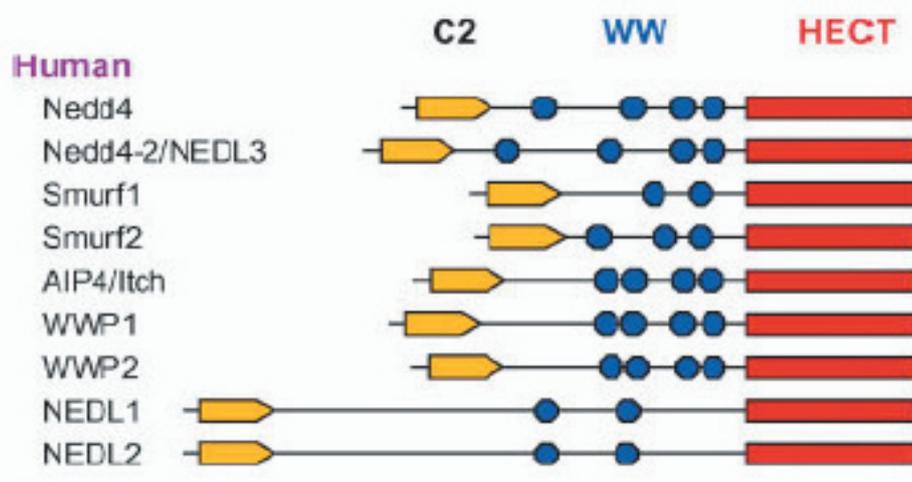
Puesto que la ubiquitinación puede determinar finalidades diferentes, la manera en la que la maquinaria celular interpreta la señal covalente de ubiquitina depende en algunos casos de factores adicionales tales como el modo de unión de la molécula de ubiquitina a la proteína diana. Así, los sustratos destinados al proteosoma 26S son habitualmente marcados con cadenas de ubiquitina unidas a través de la lisina 48, mientras que las cadenas de ubiquitina unidas a

a través de la lisina 63 están implicadas en las vías de señalización no proteolíticas. Además de la poliubiquitilación, existen diferentes patrones de ubiquitilación implicados en el acceso a las vías de regulación no proteolíticas. Así, la monoubiquitilación, la multiubiquitilación y la poliubiquitilación a través de la lisina 63 promueven efectos tan diversos como la regulación de la transcripción génica, la reparación del DNA, la endocitosis y la regulación del tráfico de proteínas (Urbe, 2005) (fig. 5)

Puesto que el reconocimiento de los sustratos para su ubiquitilación está gobernado por la presencia y accesibilidad de secuencias primarias o estructurales en el sustrato, conocidas como señales de ubiquitilación, que son reconocidas por las diferentes E3 ligasas, estas enzimas juegan un papel clave en la determinación de la especificidad de los sustratos a través del reconocimiento de las proteínas diana. Existen dos grandes familias de ubiquitin ligasas: las proteínas con dominios RING-finger, y la familia de ligasas con dominios HECT, familia a la que pertenece Nedd (Ardley, 2005).

### I. 5. 2. La ubiquitin ligasa Nedd 4.2.

La familia de Nedd4/Rsp5p pertenece a la superfamilia de enzimas con dominios HECT, que catalizan la ubiquitilación directa del sustrato. Todos los miembros de la familia poseen un extremo N-terminal variable, un dominio C2, de 2 a 4 dominios WW y un dominio C-terminal HECT. Los dominios C2, son dominios de unión a fosfolípidos, inositol fosfato y proteínas activados por  $Ca^{2+}$ . Se ha demostrado que este dominio está implicado en la localización de Nedd4 en la membrana plasmática en respuesta a la elevación de  $Ca^{2+}$  intracelular (Ardley, 2005). El dominio WW es un módulo de interacción con secuencias ricas en prolinas o motivos PPXY que permite el reconocimiento de estas secuencias presentes en las proteínas diana. Finalmente el dominio HECT es el responsable de la acción catalítica de la ubiquitin ligasa intracelular (Ardley, 2005). En mamíferos, se han descrito nueve miembros para esta familia además de varias isoformas derivadas del procesamiento alternativo (Itani, 2003).



**Fig. 6.** Esquema de los dominios de las ubiquitin ligasas de la familia HECT.

Los miembros de la familia Nedd4 están implicados en diversos procesos celulares como la regulación del tráfico celular, la estabilidad y la señalización de varias proteínas de membrana. El sustrato mejor caracterizado de Nedd4 son los canales de sodio epiteliales (ENaC) cuya ubiquitilación conduce a la internalización y degradación del canal (Snyder, 2005) a través de la vía lisosomal.

La ubiquitilación de ENaC requiere la localización de Nedd4 en la membrana plasmática, vía su dominio C2, y depende del reconocimiento de los motivos PPXY de ENaC a través de los dominios WW de Nedd. Sin embargo, existen numerosos sustratos de la familia Nedd4 que carecen de motivos de interacción canónicos por lo que se ha sugerido la presencia de proteínas adaptadoras o accesorias que medien en estos procesos (Shcherbik, 2002). La regulación de los miembros de la familia Nedd4 mediante interacción con otras proteínas o a través de modificaciones postraduccionales, como la fosforilación y la localización subcelular, promueve la diversificación de las funciones y los sustratos regulados por estas ligasas. Así, la fosforilación es una señal que a menudo precede a la ubiquitilación, tanto sobre la ubiquitin ligasa (ej, Cbl) como sobre el sustrato (ej, Eps15, Hrs), lo que indica que las dos modificaciones están en estrecha cooperación en la célula. Recientemente se ha descrito que Nedd4-2 es fosforilado en respuesta a la activación de las quinasas inducibles por glucocorticoides (SGKs) y que esta fosforilación interfiere en la disminución de la actividad, dependiente de Nedd4.2 de varios miembros de la familia de transportadores de glutamato de alta afinidad, entre los que se incluye GLT1 (Boehmer et al 2003 a, b; Boehmer et al., 2006).

La regulación de las proteínas Nedd4 mediante modificaciones postraduccionales, como la fosforilación, la localización subcelular, y la interacción con otras proteínas, que pueden actuar como adaptadores o proteínas accesorias, está muy poco estudiada. Además, existe un número de sustratos conocidos de la familia Nedd4 que carecen de motivos de interacción canónicos, el papel de las proteínas adaptadoras puede ser importante.

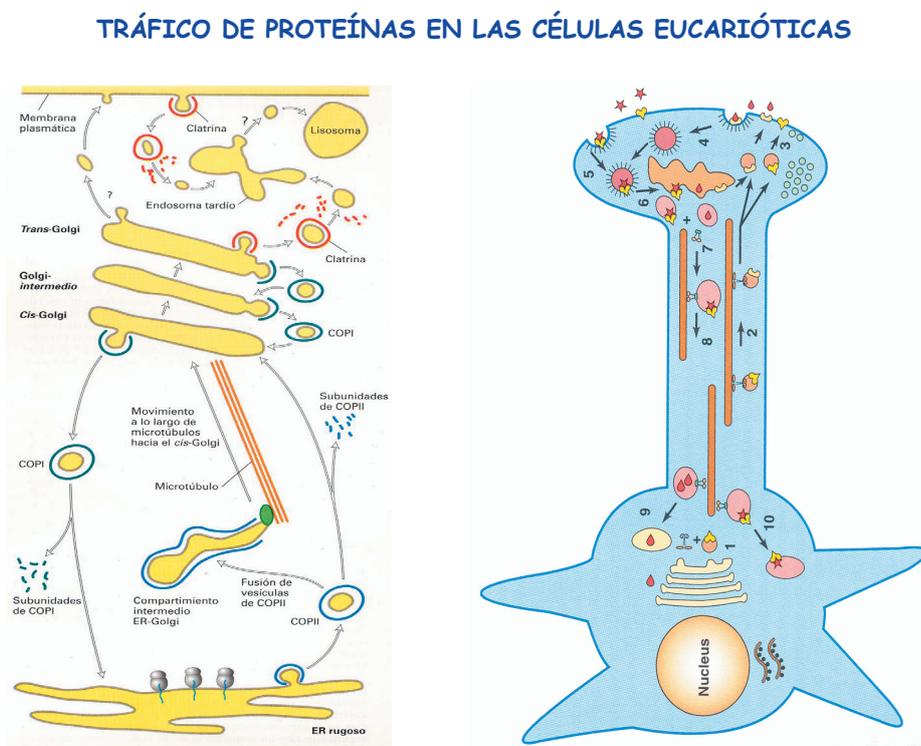
Se cree que Nedd conduce a ENaC a endocitosis en lugar de al proteosoma. La sobreexpresión de Nedd4 lleva a la inhibición de la actividad mediante la reducción del número de canales presentes en la membrana plasmática (Zhou et al, 2007).

### **I. 5. 3. Ubiquitilación y tráfico de proteínas transmembrana.**

Una de las primeras funciones no proteolíticas de la ubiquitilación, fue su implicación en los procesos de endocitosis en levaduras (Volland et al., 1994). En mamíferos, numerosas proteínas transmembrana, entre los que se incluyen receptores, canales y transportadores, son ubiquitiladas. La ubiquitilación juega un papel decisivo en los procesos de endocitosis, reciclaje, y degradación, a menudo lisosomal, de estas proteínas, que en última instancia regula la función de estas proteínas en la membrana plasmática.

Se ha demostrado que la ubiquitilación no sólo actúa como señal de endocitosis en determinados sustratos, sino que además puede afectar en la elección de la vía de endocitosis de estos sustratos. Así, la asociación del receptor del factor de crecimiento  $\beta$  (TGF- $\beta$ r) con la ubiquitin ligasa Smad7-Smurf2, conduce a una rápida internalización a través de la vía dependiente de caveolina

que finaliza en la degradación del receptor (Kavsak et al., 2000). Sin embargo, la internalización a través de la vía dependiente de clatrina de TGF- $\beta$ r permite la asociación con SARA (Smart Anchor for Receptor Activation) en el compartimento endosomal promoviendo la señalización dependiente de este receptor (Di Guglielmo et al., 2003). La regulación dependiente de ubiquitina de las proteínas transmembrana no ocurre sólo mediante actuación directa sobre estas proteínas sino también sobre sus proteínas asociadas. Se ha demostrado que el sistema de ubiquitilación tiene un papel indirecto sobre la regulación de la endocitosis de los receptores AMPA. Así, el tratamiento de neuronas de hipocampo en cultivo con AMPA o NMDA induce una rápida internalización de los GluRs, en un efecto dependiente del proteosoma. Esta internalización es mediada por la degradación de proteínas asociadas como PSD95 o Shank y no sobre el receptor en sí mismo (Colledge y Snyder, 2003).



**Fig. 6.** Esquema del tráfico de proteínas en células eucariotas.

Además de la regulación de los procesos de endocitosis, la ubiquitilación tiene un papel en la degradación de proteínas de secreción y proteínas transmembrana que son sintetizadas en el retículo endoplásmico. Cuando las chaperonas moleculares detectan plegamientos anómalos en estas proteínas, son seleccionadas para un proceso de degradación asociado al retículo endoplásmico denominado ERAD (ER-associated degradation). En este proceso, las proteínas con plegamientos anómalos son retrotranslocadas al citoplasma donde son sustrato de ubiquitin ligasas que las señalan para su degradación proteosomal (Yoshida, 2007).



## **II. OBJETIVOS.**



El glutamato es el principal neurotransmisor excitador dentro del sistema nervioso central de mamíferos. La señal química transmitida por el glutamato liberado de la neurona presináptica se transforma en una señal eléctrica en la neurona postsináptica tras la activación de los diferentes tipos de receptores de glutamato. Tras la actuación del neurotransmisor, los sistemas de transporte de glutamato de alta afinidad capturan el glutamato sinápticamente liberado, dando fin a la señalización química mediada por el neurotransmisor. Esta función es realizada principalmente por GLT1, aunque en ciertas sinapsis otros transportadores juegan un papel importante. Una vez capturado, el glutamato es transformado a glutamina en el interior de los astrocitos. Para que la glutamina regrese a la neurona presináptica, donde será transformada a glutamato permitiendo el mantenimiento de la reserva de neurotransmisor, es necesaria la participación de otros sistemas de transporte. La salida de glutamina de la glía y la entrada en las neuronas podría implicar a transportadores de la familia SNAT. Además uno de los subtipos de receptores de glutamato, el receptor de NMDA, requiere de un coagonista, la glicina, cuyos niveles se controlan básicamente por el transportador de glicina GLYT1 y quizá también por miembros de la familia SNAT.

En esta Tesis se abordan diferentes aspectos de la biología celular y molecular de varios de los sistemas de transporte mencionados. Los objetivos concretos de la misma son los siguientes:

1. Localización mediante técnicas inmunohistoquímicas de los transportadores del sistema de baja afinidad SNAT2 y SNAT5 en el sistema nervioso central.
2. Caracterización de la distribución celular de la isoforma de los transportadores de glutamato de alta afinidad GLT1b.
3. Estudio de la interacción del transportador de glutamato GLT1b con proteínas de la sinapsis que contienen dominios PDZ.
4. Determinar el papel de la oligomerización de las isoformas GLT1a y GLT1b en la interacción con proteínas sinápticas.
5. Análisis de la regulación del tráfico de GLT1 por los sistemas de ubiquitilación.



### **III. MATERIALES Y MÉTODOS.**



### **III. 1. Cultivos celulares.**

#### **III. 1. 1. Cultivos primarios de neuronas.**

Las ratas Wistar de 16 días de gestación se sacrificaban por dislocación cervical tras exposición a atmósfera de CO<sub>2</sub>. Los fetos se extraían y se diseccionaban en HBSS (Invitrogen) para extraerles la corteza. El tejido era disgregado con papaína (kit de digestión Worthington) y las células se centrifugaban durante cinco minutos a 900 rpm, el precipitado se resuspendía en el medio de siembra (50 ml NB de Invitrogen, 1 ml B27 de Invitrogen, 120 µl de glutamina 200 mM, 50 µl de gentamicina 50 mg/ml, 50 µl de una mezcla de estreptamicina 10% y penicilina G 10<sup>5</sup>U/ml y 5% de suero de ternera fetal). Las células se pl aqueaban a una densidad de 3 x 10<sup>5</sup> células/cm<sup>2</sup> en placas de cultivo previamente tratadas con poli-L-lisina 10 µM (Sigma, USA) durante una noche. Tras 4 h en el incubador se añadía 1 vol. del mismo medio de cultivo pero omitiendo el suero. Los cultivos se mantenían a 37°C y 7% de CO<sub>2</sub> durante 14 a 21 días con cambios de la mitad del medio de cultivo cada dos días.

#### **III. 1. 2. Cultivo de células COS7 y MDCK.**

La línea celular COS-7 (American Type Culture Collection) proviene de fibroblastos de riñón de mono verde africano, resultó de la transformación de la línea CV-1 con un virus defectivo de SV40, dando lugar a la línea celular que expresa constitutivamente el antígeno T. La línea celular MDCK (Madin-Darby canine kidney) proviene de epitelio renal de perro. Ambas líneas celulares cultivaban en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con suero de ternera fetal al 10% y se mantenían a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>.

#### **III. 1. 3. Transfección de células mediante lipofección.**

Las células COS-7 y MDCK tienen un crecimiento rápido, con una duplicación cada 24 horas aproximadamente, de forma que se realizan subcultivos cada 48-72 horas. Una vez las células han alcanzado el crecimiento exponencial, a partir del subcultivo número 5, pueden ser transfectadas con una eficiencia elevada. La eficiencia de la transfección descendía notablemente a partir de los 30 pases, tras los cuales las células eran desechadas. La expresión de los genes transfectados era muy reproducible cuando las transfecciones se llevaban a cabo con células sembradas al 30% de confluencia, un día antes de ser transfectadas, en placas de cultivo de 100 mm. Para las transfecciones se utilizaban 4 µg de DNA de plásmido por placa de 100 mm (2 µg si el soporte es una placa de 60 mm) al 60-70% de confluencia. La transfección se realizaba usando el sistema comercial de lipofección Lipofectamina Plus (Gibco) (para las células COS o lipofectamina 2000 (para MDCK). Las células se incubaban con una mezcla que contiene el DNA y los lípidos en DMEM sin suero durante 3 horas a 37°C y 7% de CO<sub>2</sub>. Transcurrido este tiempo se cambiaba el medio por DMEM con 10% de suero bovino fetal. Las células transfectadas se subcultivaban en el soporte adecuado, según su posterior uso, 24 horas tras la transfección, siendo utilizadas 48 ó 72 horas después de la misma.

La transfección conjunta de dos DNAs (co-transfección) se llevaba a cabo con el mismo

abordaje que la transfección de un único DNA, manteniendo constante los  $\mu\text{g}$  de DNA total adecuados para el soporte a usar.

Los cultivos primarios de neuronas se transfectaban con lipofectamina 2000 siguiendo las instrucciones del fabricante.

## **III. 2. Anticuerpos.**

### **III. 2.1. Producción y purificación de anticuerpos policlonales.**

Los anticuerpos policlonales se produjeron inmunizando conejos con proteínas de fusión en los que el péptido inmunógeno se fusionaba a la Glutathion-S-transferasa utilizando técnicas de clonado. Para el suero 401 se utilizó una proteína de fusión con los 11 aminoácidos del extremo C-terminal de GLT1b. Para los sueros Ab1 y Ab2 se utilizó una proteína de fusión con los 38 aminoácidos del extremo N-terminal de SNAT5. Para los sueros Ab11 y Ab12 se utilizó una proteína de fusión con los 48 residuos del extremo N-terminal de SNAT2. La inmunización se realizó en conejos MDL Nueva Zelanda (Navarra, España), con 200  $\mu\text{l}$  de proteína de fusión en 0.8 ml de agua, emulsionada con el coadyuvante de Freund completo e inyectada intradérmicamente; o en cobayas, utilizando la mitad de emulsión que en los conejos. Los animales fueron reinmunizados cada dos semanas con la proteína de fusión que en esta ocasión había sido emulsionada con el adyuvante de Freund incompleto y se inyectaba subcutáneamente. Tras varias inmunizaciones (normalmente cinco) se extrajeron los sueros y en caso necesario los anticuerpos se purificaron por columnas de afinidad (Zafra et al., 1995b). La proteína de fusión unida a GST y la propia proteína GST en una solución de Na-HEPES, pH 8.0 se acoplaron a columnas de Affi-Gel 15 siguiendo las instrucciones del fabricante. El suero generado por el conejo contra la proteína de fusión se pasó en primer lugar por la columna que tenía adsorbida la proteína GST y posteriormente por la columna que contenía la proteína de fusión. Tras la elución los anticuerpos fueron estabilizados con BSA (1mg/ml) y  $\text{NaN}_3$  (mg/ml).

### **III. 2.2. Biotinilación del anticuerpo anti-GLT1b.**

El anticuerpo anti-GLT1b se dializó durante una noche frente a tampón borato 0,1M de pH 8,8. Seguidamente se sometía a la reacción de biotinilación con 250  $\mu\text{g}$  de éster de succinimida-biotina (Pierce) por mg de anticuerpo, durante 4 horas a temperatura ambiente. Finalmente, el anticuerpo se dializó frente a PBS.

### **III. 2.3. Anticuerpos comerciales y cedidos**

Los anticuerpos secundarios unidos a biotina o peroxidasa eran de Amersham y los unidos a fluoróforos eran de Molecular Probes. El anticuerpo anti-HA era de DABCO (Berkeley Antibody Company), el anticuerpo anti-GFP de Invitrogen. El anticuerpo para la detección de MAP 2 era de Abcam. Los anticuerpos policlonales contra los transportadores vesiculares de glutamato, VGLUT1 y VGLUT2 y del transportador de glutamato GLT1a eran de Chemicon

International. El anticuerpo monoclonal frente sinaptofisina y frente a PSD95 eran de Oncogen. La identificación de la subunidad NR1 del receptor NMDA se realizó mediante anticuerpos monoclonales de BD Transduction, para la identificación NMDAR2A se utilizó un anticuerpo policlonal de Chemicon. El anticuerpo para la detección de ubiquitina era de Santa Cruz Biotechnology.

### III. 3. Construcciones de cDNA.

Las construcciones de cDNA se llevaron a cabo mediante el método de mutagénesis dirigida por técnicas de PCR (Higuchi, 1990). GLT1b se obtuvo usando el clon de rata de GLT1a en pBluescript-KS como molde (cedido por el Dr. B. Kanner). Los 22 aminoácidos del extremo C-terminal de GLT1a fueron sustituidos por los 11 aminoácidos de GLT1b usando el oligonucleótido en 3' CTCGAGTCATATGCAGGTCTCGATATCCAGGAATGGGAAAGGTACCTTGCACTCATCTATTAC. El oligonucleótido en 5' fue GGGATCCCCATGGCATCAACCGAGGGTGCC. Los productos de PCR fueron clonados primero en el vector de expresión pGEM-T y subclonados en las dianas de restricción *Bam* HI/*Xho* I de pCDNA3. GST-GLT1bCt y GST-GLT1bdel fueron clonadas mediante PCR en pGEX-5x (Pharmacia), con GLT1 y GLT1del como moldes. Para SNAT2 y SNAT5 generamos fragmentos de 144pb mediante PCR usando como moldes los clones completos respectivos y los oligonucleótidos GGATCCGCATGAAGAAGACCGAAATGGG en 5' y TCAGTTTTTCGGGGTCCACGTCGGC en 3' para SNAT2 y GGATCCGGATGAAATGCAGGAACCAAAGATG en 5' y TCAGAACTGGACAGGTTTCTCCAG en 3' para SNAT5. Los productos de PCR se clonaron en el vector pGEM-T easy y se subclonaron en pGEX-5.3. Los dominios PDZ de PSD95 se amplificaron mediante PCR usando una construcción con el epítipo myc fusionado a PSD95 de rata (cedido por el Dr. J. Hell) como molde y los siguientes oligonucleótidos: GGATCCATGGACTGTCTCTGTATAG y CTCGAGCTGGGGTTTCCGGCGCATG para el dominio 1, GGATCCATGGAGATCAAACCTCATC y CTCGAGCTTGCCACAGGGGAGTAGC para el dominio 2, y GGATCCCTGCTGGGGGAGGAAGAC y CTCGAGCTTCGCAAGGATGCAGTCCC para el dominio 3. Los productos de PCR fueron clonados en las dianas *Bam*HI/*Xho*I de pGEX-5x. El cDNA del extremo C<sub>1</sub> de GLT1b fue clonado en el vector pTRC-HisA en las dianas de restricción *Bgl* II/*Eco* RI, esta construcción se utilizó en la purificación de la proteína mediante columna de níquel. Finalmente, el vector de expresión para Nedd4.2-YFP fue construido por amplificación mediante PCR de Nedd4.2 de ratón, y clonado en 5' de YFP que, a su vez, había sido previamente clonado en los sitios *Bam*HI/*Eco*RI de pCDNA3. Como molde se usó el clon MGC:78116 que había sido comprado en Geneservice (UK). En el oligonucleótido reverso utilizado para su amplificación (AGATCTATCCACACCTTCGAAGCCTTG) se había eliminado la señal de parada y se había introducido una diana *Bgl*II en fase de lectura correcta con la diana *Bam*HI en la que estaba clonada YFP.

#### **III. 4. Determinación de la concentración proteica.**

La concentración de proteínas se determinaba mediante el método de Bradford (BioRad), con suero bovino como estándar. La cantidad de anticuerpos purificados se estimó en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 280 nm usando IgG bovinas como estándar.

#### **III. 5. Electroforesis e inmunodetección (*Inmunotransferencia*).**

Las muestras eran separadas según su masa molecular por electroforesis realizada en minigeles (Sistema de electroforesis MiniProtean3, BioRad) de poliacrilamida (7,5% acrilamida y 0,2% de bisacrilamida) y SDS al 10% en condiciones reductoras (Laemmli, 1970). Las muestras aplicadas en minigeles se someten durante 3 h a una corriente constante de 25 mV en tampón de electroforesis (Tris-HCl 25 mM pH 7,5, glicina 192 mM, SDS al 0,1%). Tras la electroforesis las proteínas se transfieren a una membrana de transferencia Immobilon-P (Millipore), previamente incubada en metanol, mediante un sistema de electrotransferencia semi-seca (Life-Technologies) a 1,2 mA/cm<sup>2</sup> durante 35 minutos en un tampón que contiene metanol al 20% y 100 mM Tris-HCl pH 7,4. La unión inespecífica de proteínas se eliminaba incubando los filtros con tampón de bloqueo (leche desnatada en polvo al 5% en NaCl 150 mM y Tris-HCl 10 mM pH 7,4) durante 2 horas a temperatura ambiente. Las membranas se incubaban a 4°C toda la noche con los anticuerpos primarios adecuados diluidos en tampón de bloqueo. Posteriormente, las membranas se lavaban varias veces e incubaban con el anticuerpo secundario (anti-IgG de conejo, cobaya o ratón) unido a peroxidasa y diluido 1:6000 en tampón de bloqueo. Las bandas se visualizaban con el reactivo de quimioluminiscencia ECL (Amersham Bioscience), las exposiciones se realizaban en placas de autorradiografía (Afga Curix RP2) y se analizaban densitométricamente

#### **III. 6. Aislamiento de sinaptosomas.**

El cerebro de una rata adulta, sacrificada por dislocación cervical, era homogeneizado en solución de sacarosa 0,32M y centrifugado durante 2 minutos a 5000 rpm, en el rotor SS-34 de una centrífuga SORVALL. El sobrenadante se volvió a centrifugar a 11000 rpm durante 12 minutos a 4°C y el precipitado obtenido (P2) se resuspendía en solución de sacarosa. El P2 se depositaba sobre un gradiente de Percoll (5-15-25%) y, tras una centrifugación de 15 minutos a 12000 rpm, la banda sinaptosomal quedaba situada entre los porcentajes 15 y 25 de Percoll. La banda se aislaba y se centrifugaba a 12000 rpm durante 15 minutos. El precipitado era lavado en una solución de 0,14 M NaCl, 5 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1,2 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 5 mM NaHCO<sub>3</sub>, 10 mM glucosa y 20 mM HEPES-NaOH, pH 7,4, y finalmente era resuspendido a una concentración de 10 mg/ml.

### **III. 7. Preparación de P2/P3 de cerebro de rata.**

Se sacrificaron ratas Wistar de tres meses por el método de dislocación cervical. Tras la extracción y disección del cerebro del animal, el tejido se homogeneizaba en buffer RSB (Tris-HCl 10mM pH 7,4, NaCl 100mM, MgCl<sub>2</sub> 2,5 mM) a 4°C al que se le añadía PMSF 0,4mM. Las muestras se centrifugaban a 900 x g durante 10 min a 4°C, se obtenía un sobrenadante (S1) y un pellet (P1) que se descartaba, el S1 se centrifugaba a 140.000g durante 60 min a 4°C para obtener una fracción mitocondria/microsomal (P2/P3). El precipitado así obtenido se resuspendía en RSB más 0,5% de Tritón X-100. Tras determinar la concentración de proteína total de todas las muestras, siguiendo el método previamente descrito, se añadían 30 µl de tampón de carga Laemmli (0,065 M Tris, 10% glicerol, 2,3% SDS, 100 mM DTT, 0,01% azul de bromofenol) a cada muestra y se hervían durante 3 minutos.

### **III. 8. Ensayos de inmunoprecipitación en cultivos celulares.**

Las células transfectadas eran solubilizadas en una solución de lisis (50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 1% Triton X-100, 100 mM NaCl y 1 mM EDTA) durante 30 minutos a 4°C. Tras la centrifugación, el precipitado insoluble era eliminado y los sobrenadantes se incubaban con los anticuerpos correspondientes durante 2 horas. Después se añadían 40 µl de una suspensión de bolas unidas a proteína A (Sigma) y la mezcla se incubaba durante 1 hora a temperatura ambiente y con agitación rotatoria. Las bolas se lavaban cinco veces con solución de lisis fría. Finalmente se añadían 50 µl de tampón de carga Laemmli. Las muestras se calentaron a 92°C durante 3 minutos para disociar la unión de las proteínas a las bolas y posteriormente se sometieron a electroforesis seguida inmunotransferencia como se ha descrito en III.5.

### **III. 9. Ensayos de inmunoprecipitación en tejido.**

El cerebro de una rata adulta, sacrificada por dislocación cervical, era homogenizado en una solución de lisis (50 mM Tris- HCl, pH 7,8, 1% Nodidet P40, 0,1% SDS, 0,5% deoxicolato, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,1 mM DTT) añadiendo 10 ml por gramo de tejido, durante 30 minutos a 4°C. Tras una centrifugación a 5.000 rpm, el precipitado insoluble era eliminado y los sobrenadantes incubados con los anticuerpos correspondientes durante toda la noche a 4°C. Después se añadían 40 µl de una suspensión proteína A sefarosa (Sigma) y la mezcla se incubaba durante 2 horas a 4°C y con agitación rotatoria. Las bolas se lavaban cinco veces con PBS frío. Finalmente, se añadían 25 µl de tampón de carga Laemmli. Las muestras se hervían durante 5 minutos para disociar la unión de las proteínas a las bolas. Por último, se sometían a electroforesis seguida inmunotransferencia como se describe en III.5.

### **III. 10. Tratamientos con activadores e inhibidores.**

Las células transfectadas o los homogeneizados de cerebro de rata en solución (50 mM Tris-HCl, pH 7,8, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,1 mM DTT) se incubaron durante durante los tiempos adecuados en medio DMEM 10% FCS conteniendo los distintos tratamientos en las

concentraciones que a continuación se detallan: TPA 0.02-1  $\mu\text{M}$  (Calbiochem), estaurosporina 1  $\mu\text{M}$  (Calbiochem), monensina 10  $\mu\text{M}$  (Calbiochem), MG-132 15  $\mu\text{M}$  (Calbiochem), clasto-lactacistina  $\beta$ -lactona 10  $\mu\text{M}$  (Calbiochem), cicloheximida 50 mg/ml (Sigma) o su vehículo como control. Todos los reactivos se preparan en el momento de su uso a partir de soluciones concentradas 100 veces. Los posibles efectos tóxicos en cultivos celulares fueron analizados mediante un ensayo XTT (Sigma). Ningún tratamiento mostró toxicidad en los tiempos y concentraciones usados en los experimentos.

### III. 11. Purificación de proteínas de fusión.

Para la purificación de las proteínas de fusión utilizadas para la generación de anticuerpos policlonales y para los ensayos de *pull down*, se transformaban cultivos bacterianos de *E. Coli* BL21 (servicio de fermentación CBMSO) con construcciones previamente detalladas en el vector de expresión bacteriano pGEX-5x. La expresión de esta proteína de fusión en el cultivo era inducida con IPTG 1 mM (Boehringer) durante 5 horas a 37°C. Tras la inducción, las bacterias se sedimentaban mediante centrifugación y se lisaban en tampón de lisis (PBS suplementado con EDTA 10 mM, lisozima 0,2 mg/ml (Boehringer) y PMSF 0,4 mM. Después de una incubación en hielo de 20 minutos, se añadió DTT 5 mM y Triton X-100 al 0,1%, y el lisado se incubaba en hielo nuevamente durante 10 minutos. Tras esta incubación, el lisado era sonificado y centrifugado a 7800 g durante 15 minutos. El sobrenadante contenía la proteína de fusión, que era purificada en una columna de glutation-Sefarosa (Pharmacia) según el siguiente protocolo: a la columna equilibrada con PBS se le añadía el sobrenadante y posteriormente se lavaba con 10 volúmenes de PBS. La proteína de fusión se eluía con tampón 50 mM Tris-HCl, pH 8,0 que contenía 10 mM glutation (Sigma). La purificación de GST control se realizaba de forma análoga partiendo de bacterias transformadas con el vector pGEX-2 sin inserto.

### III. 12. Ensayo de *pull down*.

Las células COS-7 transfectadas con los vectores de expresión de las diferentes proteínas se solubilizaban en 50mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.5% Triton X-100, 100mM NaCl y 1 mM EDTA durante 30 minutos a 4°C. El material solubilizado, obtenido tras centrifugación a 14000 rpm durante 15 minutos, se preincubaba con 100  $\mu\text{l}$  de bolas de glutation-agarosa al 50% (v/v) durante 1 hora con rotación en la noria a 4°C. Tras una centrifugación los sobrenadantes se transferían a un tubo limpio y se incubaban con GST o la proteína de fusión con GST adecuada durante la noche con rotación constante a 4°C. Posteriormente, las bolas fueron lavadas cinco veces con solución de lisis fría y se les añadía 25  $\mu\text{l}$  de tampón de carga Laemmli. Las muestras se calentaban a 92°C durante 3 minutos y luego se sometían a una electroforesis seguida de inmunotransferencia como se describe en III.5.

### III. 13. Purificación de la proteína 6X HIS-TAG.

El extremo carboxilo terminal de GLT1b fue clonado en fase con un péptido de 6 histidinas, la proteína de fusión resultante se denominó His-GLT1<sub>Ct</sub>. La expresión de esta proteína en un

cultivo bacteriano de *E. coli* BL21 era inducida con IPTG 1mM durante 5 horas a 37°C. Tras la inducción las bacterias se centrifugaban y se lisaban (con lisozima (10 mg/ml), imidazol 10 mM e inhibidores de proteasas) durante 30 minutos a 4°C. Posteriormente, la muestra se sonicaba para favorecer la solubilización. Tras centrifugar a 14000 rpm a 4°C durante 30 minutos, el sobrenadante se pasaba por una columna de níquel (Ni-NTA de QIAGEN), equilibrada con anterioridad. Tras lavar la columna con una solución compuesta por 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 25 mM imidazol, 600 mM NaCl, glicerol 10% y 0,1% Triton X-100. La proteína era eluída mediante una solución de imidazol 250 mM en NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM y NaCl 300 mM.

### III. 14. Detección de las interacciones de GLT1b con dominios PDZ.

La detección de las interacciones de GLT1 con dominios PDZ de diferentes proteínas, se realizó utilizando una membrana comercial (TranSignal PDZ Domain Arrays de Panomics, USA). El extracto bacteriano que contenía la proteína His-GLT1<sub>Ct</sub> obtenido según lo indicado en el apartado anterior, se diluyó 1:1 en solución de resuspensión y se incubó con una membrana de Immobilon que previamente había sido bloqueada. Tras una incubación de una hora con el extracto proteico, la membrana se lavaba y pasaba a ser incubada con un anticuerpo secundario dirigido contra la cola de histidinas. Tras los oportunos lavados, la presencia de His-GLT1<sub>Ct</sub> se visualizó mediante un procedimiento de quimioluminiscencia (ECL). Las soluciones de bloqueo, resuspensión y lavado utilizadas en el ensayo, fueron proporcionadas por el fabricante.

### III. 15. Análisis de la matriz de anticuerpos.

Los sinaptosomas de cerebro de rata aislados siguiendo el procedimiento anteriormente descrito eran solubilizados en la solución de extracción (120 mM NaCl, 25 mM KCl, 2 mM EGTA, 2 mM EDTA, 0,1 mM DTT, 15 mM Tris-HCl, pH 7,5, 0,5% Triton X-100, 10 mg/ml leupeptina, 0,5 mM PMSF) durante 30 minutos al 4°C. Tras una centrifugación a 10000 x g, 15 minutos se tomaba la parte solubilizada que se diluía hasta una concentración final de 5 mg/ml con solución de extracción con BSA 1%. Posteriormente la membrana de nylon (Antibody Array<sup>TM</sup> de Hypromatrix) que contenía 400 anticuerpos (Signal transduction array) se incubaba con el extracto de sinaptosomas durante 1 hora, tras lavar y se incubaba con un anticuerpo biotinilado contra GLT1b. La inmunoreactividad se visualizó por un procedimiento de detección de estreptavidina-peroxidasa y ECL como en las inmunotransferencias.

### III. 16. Técnicas de inmunofluorescencia en células cultivadas.

Las células eran cultivadas sobre cubreobjetos que se habían tratado previamente con poli-L-lisina. Las células eran transfectadas con los vectores de expresión para la proteína de interés como se describe en III.1.3. Tras 48 horas las células se lavaban en PBS y se fijaban con 2% PFA en PBS o metanol a -20°C durante 20 minutos. Tras un segundo lavado con PBS las células se bloqueaban durante una hora, con 10% FCS y 0,02% de digitonina en PBS para permeabilizarlas. A continuación, las células eran incubadas durante la noche a 4°C con el anticuerpo diluido en PBS con 0,1% FCS y 0,02% digitonina. Tras 3 lavados con PBS, se añadía el anticuerpo

secundario conjugado con un fluoróforo (Alexa 488, Alexa 555, Alexa 594 o Alexa 647), dejando la incubación durante 1 hora a temperatura ambiente. Las células se lavaban tres veces con PBS y se montaban con Vectashield (Vector, Burlingame, CA, U.S.A.) para su observación al microscopio. En todos los ensayos de inmunofluorescencia se realizaron paralelamente controles con las células no transfectadas, con las células transfectadas sin permeabilizar y con las células transfectadas omitiendo el primer anticuerpo.

### **III. 17. Técnicas de inmunohistoquímica.**

Las ratas Wistar adultas eran anestesiadas profundamente con pentobarbital (100 mg/Kg) y profundidas a través del ventrículo izquierdo, vía aorta, con solución fijadora que tenía 4% ó 0.5% de paraformaldehído en 0,1M fosfato sódico, pH 7,4. Con anterioridad se había pasado una solución de dextrano 70 (MW=70000) en la misma solución pero sin fijador. El atrio derecho se cortó permitiendo que la sangre del animal se eliminara del tejido. El paso de líquidos se realizó a una velocidad de 50 ml/min mediante la utilización de una bomba peristáltica.

El cerebro fue postfijado en la misma solución durante la noche y almacenado a 4°C en una solución que contenía un 10% de la concentración del fijador usada en 0,1M fosfato sódico.

El tejido se cortó con vibrátomo o criostato (en este caso el tejido se había crioprotegido previamente en sacarosa al 30%), las secciones se almacenaban en 0.1M fosfato sódico con azida al 0,05% durante tres semanas como máximo.

Los cortes se incubaron en primer lugar con etanolamina 1M en tampón fosfato sódico 0,1M, tras lavar con solución A (0,135 M NaCl y 0,01M fosfato sódico), se bloquearon por incubación en la solución B (0,3M NaCl, 0,1M Tris-HCl pH 7,4) con 10% (v/v) suero de ternera. Posteriormente se incubaron con el anticuerpo primario diluido en la solución C (solución B con 1% suero de ternera) (5-10 µg/µl).

Las secciones se lavaban (3 X) y se incubaban durante una hora con un anticuerpo secundario biotinilado en la solución C. Tras lavar con solución A (3 X), se realizaba una última incubación con estreptavidina-peroxidasa en la solución C. Después las secciones se lavaban en solución A y se incubaron durante 6 minutos en 0,1M fosfato sódico con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,1 mg/ml) y diaminobenzidina (DAB) (0,5 mg/ml). La reacción se paraba mediante lavados con 0,1M fosfato sódico. El Triton X-100 (0,1%) se incluyó sólo cuando se especifica.

### **III. 18. Técnicas de microscopía óptica y confocal.**

Para microscopía óptica las secciones teñidas con DAB se montaban con glicerol-gelatina. Las áreas del cerebro fueron identificadas basándonos en el atlas de neuroanatomía de Paxinos y Watson (1982). Para el doble marcaje inmunohistoquímico las secciones eran tratadas con anticuerpos secundarios acoplados a fluoróforos: Alexa 488, Alexa 555, Alexa 594 o Alexa 647 y la inmunofluorescencia fue visualizada en un Axioscop2 (Zeiss) acoplado a una cámara digital o al microscopio confocal Microradiance (BioRad).

### III. 19. Técnicas de microscopía electrónica.

Las secciones teñidas mediante la técnica de inmunoperoxidasa se trataban con osmio (30-45 min, 10 mg/ml en 0,1M fosfato sódico), y se lavaban con 0,1M fosfato sódico. La muestra se deshidrataba pasándola por etanol de diferentes grados (50%, 70%, 80%, 96% y 100%) y óxido de propileno, para ser embebida finalmente en TAAB 812. De la pieza inicial de 40  $\mu\text{m}$  se cortaban secciones ultrafinas. Las secciones fueron contrastadas (10 mg/ml acetato de uranilo durante 10-15 min y 3 mg/ml citrato de plomo 1-2 min) y examinadas al microscopio electrónico Jeol 1010. En los ensayos se realizaron paralelamente controles en los que el anticuerpo primario era sustituido por IgG preinmunes.

### III. 20. Ensayo de $\beta$ -galactosidasa.

Como control de la eficiencia de transfección se usó el plásmido pSV-BGalactosidasa (Promega). 24 horas después de transfectadas las células, se lavaban con PBS y se solubilizaban con 100  $\mu\text{l}$  de tampón de lisis (Glicilglicina 25 mM, pH 7,8, Tritón X-100 0,5%, DTT 1mM). Los restos celulares se eliminaron por centrifugación en microfuga (15.000 x g) durante 2 minutos. El sobrenadante se transfirió a una placa Nunc<sup>TM</sup> de ELISA-RIA de 96 pocillos (0,32  $\text{cm}^2$ ), se añadía un volumen de tampón ( $\text{MgCl}_2$  2mM,  $\text{NaPO}_4$  120 mM,  $\text{NaHPO}_4$  80 mM,  $\beta$ -mercaptoetanol 100 mM, ONPG 1,33 mg/ml). La placa se incubaba a 37 °C durante 25-30 minutos y cuando los pocillos habían adquirido color amarillo se paraba la reacción con un volumen de metanol al 95%; la absorbancia se midió en un lector de placas de ELISA Dynatech MR5000 y se representaba normalizando con los datos de concentración de proteína.

### III. 21. Ensayo de transporte de glutamato en células COS7.

El día anterior al ensayo de transporte las células control (transfectadas únicamente con el vector pcDNA3) y/o células que expresaban las proteínas objeto de estudio, se plaqueaban por debajo de la confluencia máxima en placas de 24 pocillos (Nunc). Los ensayos se realizaban a 37°C y por triplicado para cada condición experimental. Tras eliminar el medio de cultivo, las células se lavaban con una solución salina HBS ( $\text{NaCl}$  150 mM, HEPES-Tris 10 mM,  $\text{MgSO}_4$  1 mM,  $\text{CaCl}_2$  1 mM,  $\text{KCl}$  5 mM y glucosa 10 mM) atemperada a 37°C. A continuación las células se incubaban durante los tiempos indicados con 300  $\mu\text{l}$  de una solución de transporte que contenía [2-<sup>3</sup>H]-glutamato (1.6 TBq/mmol; PerkinElmer Life Sciences) diluida en HBS. El transporte se detenía mediante lavado con 750  $\mu\text{l}$  de HBS. Las células se lisaban con 250  $\mu\text{l}$  de  $\text{NaOH}$  0,2 N utilizándose una alícuota de cada pocillo para la determinación de la concentración de proteínas mediante el ensayo de Bradford (BioRad) y otra para la determinación de [2-<sup>3</sup>H]-glutamato en el contador de centelleo líquido (LKB 1219 Rackbeta).

Todos los medios usados en los ensayos de transporte eran preparados el mismo día de su utilización para evitar contaminaciones. En todos los experimentos el transporte de glutamato

se obtenía por sustracción de la acumulación inespecífica de glutamato por células COS-7 transfectadas únicamente con el vector pcDNA3 (células control) a los valores obtenidos de transporte por células que expresaban el cDNA de los transportadores.

### III. 22. Ensayo de marcaje de superficie celular con reactivos unidos a biotina.

El marcaje de superficie por biotilación es una herramienta muy útil para el marcaje selectivo de proteínas expresadas en membrana plasmática. En esta técnica se usan reactivos derivados de la biotina, todos unidos a un éster *N*-hidroxisuccinimida (NHS), que forma enlaces tipo amida con grupos amino libres. Puesto que son reactivos impermeables reaccionan con los grupos  $\Sigma$ -amino de residuos de lisina expuestos al medio extracelular. La técnica se basa en la alta afinidad de la avidina por biotina que permite separar las proteínas integrales de membrana biotiladas de aquellas que residen en el citoplasma o en compartimentos subcelulares que no han sido marcadas. Los transportadores de neurotransmisores presentan bucles extracelulares que contienen múltiples residuos de lisina y son susceptibles de ser biotilados.

Las células COS-7 se cultivaban hasta un 70% de confluencia en una placa de 12 pocillos (Nunc). Cada pocillo se lavaba tres veces con PBS que contenía 0.1 mM  $\text{CaCl}_2$  y 1 mM  $\text{MgCl}_2$  ( $\text{PBS}^{2+}$ ) y se incubaba con Sulfo-NHS-Biotina (2.5 mg/ml) (Pierce) en  $\text{PBS}^{2+}$  durante 20 minutos a 4°C, temperatura que bloquea la internación. Tras la incubación, las células se lavaban con L-lisina 100 mM en  $\text{PBS}^{2+}$  durante 40 minutos a 4°C, para bloquear la biotina que no hubiera reaccionado, después se levantaban con una solución de NaCl 150mM y Tris-HCl 50 mM pH 7.4 que contiene inhibidores de proteasas (PMSF 0,4 mM y pepstatina 4  $\mu\text{M}$ ). Las células se lisaban con un tampón de lisis (NaCl 150 mM, Tris-HCl 50 mM pH 7,4, EDTA 5 mM, Triton-X al 1%, SDS al 0,1%, deoxicolato sódico 0,25%, PMSF 0,4 mM, pepstatina 4  $\mu\text{M}$ ) durante 30 minutos a 4°C. Parte del lisado se reservaba para su análisis mediante electroforesis e inmunodetección. El resto del lisado se incubaba con estreptavidina-agarosa durante 2 h a temperatura ambiente con agitación rotatoria. Las partículas de agarosa se sedimentaban por centrifugación y se lavaban cinco veces con el tampón de lisis. Finalmente, las proteínas unidas a la estreptavidina-agarosa se eluía con tampón de carga Laemmli (0,065 M Tris, 10% glicerol, 2,3% SDS, 100 mM DTT, 0,01% azul de bromofenol) durante 10 minutos a 80°C. Estas muestras se analizaban mediante SDS-PAGE e inmunodetección (*Western Blot*) y análisis densitométrico. En las condiciones descritas la detección correspondía a la proteína presente en la superficie celular, no detectándose marcaje de proteínas intracelulares control como calnexina y actina.

En los experimentos en los que se aislaba la fracción de proteína de membrana y la fracción intracelular, la proteína era unida a estreptavidina, eluida (92°C 5 minutos 1% SDS) y se diluida hasta una concentración final de SDS del 0,1%, tras lo que se inmunoprecipitaba con anticuerpos específicos según lo descrito. Los sobrenadantes obtenidos tras la incubación con estreptavidina y por tanto libres de proteína biotilada, se sometían a inmunoprecipitación.

**III. 23. Internación del transportador mediante marcaje de superficie con biotina.**

Las células COS-7, transfectadas 72 horas antes, se cultivaban hasta un 70% de confluencia en una placa de 12 pocillos (Nunc). Cada pocillo se lavaba tres veces con PBS<sup>2+</sup> a 4°C y se mantenía a esta temperatura durante 15 minutos. Se incubaban con Sulfo-NHS-SS-Biotina (2,0 mg/ml) (Pierce) en PBS completo durante 30 minutos a 4°C. La unión de este reactivo a la biotina a través de un puente disulfuro ofrece la ventaja de su posible separación por agentes reductores. Tras la biotilación, las células se lavaban con PBS<sup>2+</sup> suplementado con BSA 0,2% (para bloquear la biotina que no hubiera reaccionado) y glucosa 0,18% (PBS<sup>2+</sup>/B/g) y se mantenían a 4°C durante 45 minutos. Para determinar la proteína inicial de superficie, parte de las células se lisaban en este punto. Para iniciar la endocitosis, las células se incuban a 37°C en DMEN en presencia/ausencia del agente inductor de endocitosis durante distintos tiempos (TPA o vehículo). La endocitosis se detenía lavando 3 veces con PBS<sup>2+</sup>/B/g a 4°C. La biotina residual de la superficie celular se eliminaba incubando las células 2 veces durante 25 minutos con tampón NT [MesNa 50 mM (Sigma), NaCl 150 mM, Tris-HCl 20 mM pH 8,8, EDTA 1 mM, BSA 0,2% y glucosa 0,18%] preparado inmediatamente antes de su uso. Este tampón contenía el agente reductor MesNa, que no puede atravesar la membrana plasmática. En nuestras condiciones, el marcaje residual tras el tratamiento con MesNa es de alrededor del 10%. Este marcaje residual se estimaba en células que no habían sido incubadas a 37° para iniciar la endocitosis. Las células se lisaban como previamente se ha descrito y se sometían a inmunoprecipitación e inmunotransferencia.

**III. 24. Procesamiento de los datos y análisis densitométrico.**

Para las determinaciones densitométricas se cuantifican las bandas visualizadas por el método de detección de quimioluminiscencia ECL en un densitómetro GS-710 Calibrated Imaging Densitometer de BioRad con el programa Quantity One usando exposiciones de película que se encontraban en el rango lineal. Los errores estándar de experimentos de marcaje de superficie se calculan tras la densitometría de al menos tres experimentos realizados hasta por triplicado.

**III. 25. Experimentos de marcaje metabólico (Pulso y caza).**

Las células COS, previamente transfectadas con la construcción deseada, se cultivaban hasta un 100% de confluencia en una placa p60. Una vez retirado el medio se incubaban con medio DMEN sin metionina ni cisteína durante 1 hora a 37°C. Las células se marcaban durante 30 minutos con 0,25 mCi/ml [<sup>35</sup>S] metionina/cisteína (Redivue, Promix, Amersham) a 37°C y se cazaban a distintos tiempos en DMEM 10% FCS. Posteriormente eran lisadas e inmunoprecipitadas. Una vez separadas las muestras por electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida, el gel era fijado y tratado con el reactivo fluorográfico Amplify (Amersham). El gel se secaba y se exponía durante 4 días a -70°C. La incorporación de <sup>35</sup>S en los lisados se determinaba mediante precipitación con TCA de las proteínas solubilizadas.

### III. 26. Herramientas bioinformáticas.

\*CLUSTALW: Programa que contiene una base de datos que permite comparar múltiples secuencias de DNA o de proteína y muestra el mejor alineamiento posible entre ellas. Además, indica los residuos conservados, el grado de conservación de los mismos y permite la construcción de árboles filogenéticos.

Acceso en la dirección: <http://www.ebi.ac.uk/clustalw/index.html>

\*MEDLINE Entrez: Es una base de datos de publicaciones que pertenece a la *Nacional Library of Medicine* (NLM). Dispone de información bibliográfica de biomedicina.

Acceso en la dirección: <http://www.ncbi.nlm.gov/entrez/query.fcgi>

\*BLAST (*Basic Local Alignment Tools*): Programa que encuentra en las bases de datos secuencias de proteínas y DNA. Permite identificar una secuencia dada con las secuencias de la base de datos y muestra una lista de los alineamientos más satisfactorios.

Acceso desde la dirección: <http://www.ncbi.nlm.gov/BLAST>

\*OLIGOCALC: Programa que a partir de una secuencia de oligonucleótido dada calcula la temperatura de anillamiento, el porcentaje G/C y peso molecular del oligonucleótido.

Acceso desde la dirección: <http://www.basic.nwu.edu/biotools/oligocalc.html>

\*pDRAW32 DNA analysis: Aplicación que muestra ediciones de secuencia y mapas de restricción de proteínas.

Acceso desde la dirección: <http://www.acaclone.com>

\*Amplify. Programa informático que simula una amplificación por PCR usando una secuencia de nucleótidos molde y las secuencias de nucleótidos de los cebadores. Permite localizar y calcular la estabilidad de la hibridación de los cebadores en la secuencia molde, optimizar la estabilidad de la hibridación, detectar la posible aparición de reacciones inespecíficas, como la dimerización de cebadores, y calcular el tamaño del fragmento de PCR a obtener.

### III. 27. RT-PCR y PCR cuantitativa.

La extracción del mRNA de los cultivos celulares transfectados transitoriamente se realizaba con el sistema de purificación de RNA de Roche. Los ensayos de RT-PCR y PCR cuantitativa fueron realizados por el servicio de genómica del CBMSO. Los oligonucleótidos usados para la RT-PCR de calnexina fueron: gtgggcctatgtgaagctg en 5' y tatagggagtcttgcgtggaat en 3'; para b-actina: actgctctggctcctagcac en 5' y ccaccgatccacacagagta en 3'; y para Nedd4.2: agcatcttaaacccaatgac en 5' y tccaagtggatctctcttcc en 3'. Las sondas usadas en la PCR cuantitativa pertenecían a una librería de ratón (Universal ProbeLibrary) para Nedd4-2 se usó la sonda 52, para  $\beta$ -actina la sonda 48 y para calnexina la sonda 49.

**III. 28. RNA de interferencia.**

El RNA de interferencia se preparó según establece el manual de usuario del kit XtremeGENE siRNA Dicer (Roche). En primer lugar se amplificó por PCR el fragmento de Nedd4.2 comprendido entre las bases 2904 y 3190 del clon de Nedd.42 de ratón (NM031881), usando unos oligonucleótidos que contenían la secuencia del promotor de T7 en su extremo 5' y cuyas secuencias son: GCGTAATACGACTCACTATAGGGAGATTTATTAAGGGCTT TGCCTG y GCGTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGAAGGCTCCAGCGTCCGG A continuación se preparó el RNA de doble banda correspondiente a ese segmento de Nedd4.2 (dsRNA), para lo que el fragmento de PCR se transcribió in vitro durante 4 horas a 37°C, usando la RNA polimerasa de T7. El anillamiento de las hebras sentido y antisentido se consiguió por calentamiento a 95°C (5 min) seguido de enfriamiento a RT (10 min) y de precipitación con isopropanol. Por último, el dsRNA se digirió con el enzima Dicer (16h a 37°C) que fragmenta el dsRNA en varios siRNAs, que se purificaban en minicolumnas por adsorción (incluidas en el kit). Los cultivos celulares se plaqueaban al 20% de confluencia y se transfectaban usando el reactivo de transfección X-treme (Roche) con la mezcla de siRNAs purificados, según el protocolo del fabricante. Tras 48 horas, las células se volvían a transfectar con los vectores de expresión de GLT1a según el protocolo descrito en III.1.3. El análisis de la inhibición de la expresión de Nedd4.2 se determinó transcurridas 96 horas desde la transfección con el RNAi.



#### **IV. RESULTADOS.**



## **IV. ESTUDIO SOBRE LA DISTRIBUCIÓN DE LOS TRANSPORTADORES DE GLUTAMINA Y GLUTAMATO EN EL SNC.**

### **IV. 1. Producción de anticuerpos policlonales contra algunos transportadores de las sinapsis glutamatérgicas.**

Para iniciar el estudio sobre la biología molecular y celular de los transportadores de las sinapsis glutamatérgicas, objeto de esta Tesis, era necesario disponer de anticuerpos específicos que nos permitieran la visualización de dichas proteínas, bien en técnicas bioquímicas, bien en técnicas inmunohistoquímicas. Aunque existían anticuerpos comerciales contra la isoforma GLT1a del transportador de glutamato, este no era el caso para la isoforma GLT1b ni para los transportadores putativos de glutamina SNAT2 y SNAT5. Además la distribución de estas proteínas era desconocida (SNAT2 y SNAT5) u era objeto de controversia (GLT1b). Por tanto, el primer paso de esta Tesis ha sido el desarrollo de anticuerpos policlonales específicos contra estas tres proteínas y un estudio sobre su localización en el SNC de la rata. Para ello se utilizó la técnica de inmunización con proteínas de fusión obtenidas mediante la adición por técnicas de DNA recombinante de péptidos de estos tres transportadores al extremo carboxilo de la proteína glutatión-S-transferasa (GST). Para SNAT2 se fusionaron 48 aminoácidos del extremo amino-terminal a GST (GST-SNAT2Nt), mientras que la construcción generada para SNAT5 contenía los 38 residuos del extremo N-terminal (GST-SNAT5Nt) y para GLT1b se utilizaron los 11 aminoácidos del extremo C-terminal que no son comunes con GLT1a, obteniendo una proteína de fusión denominada GST-GLT1bCt. Los productos de fusión fueron expresados en *Escherichia coli* y purificados mediante cromatografía de afinidad utilizando como ligando glutatión inmovilizado. Con cada una de las proteínas de fusión purificadas se inmunizaron animales según los protocolos estándar de inmunización.

#### **IV. 1. 1. Caracterización de anticuerpos policlonales.**

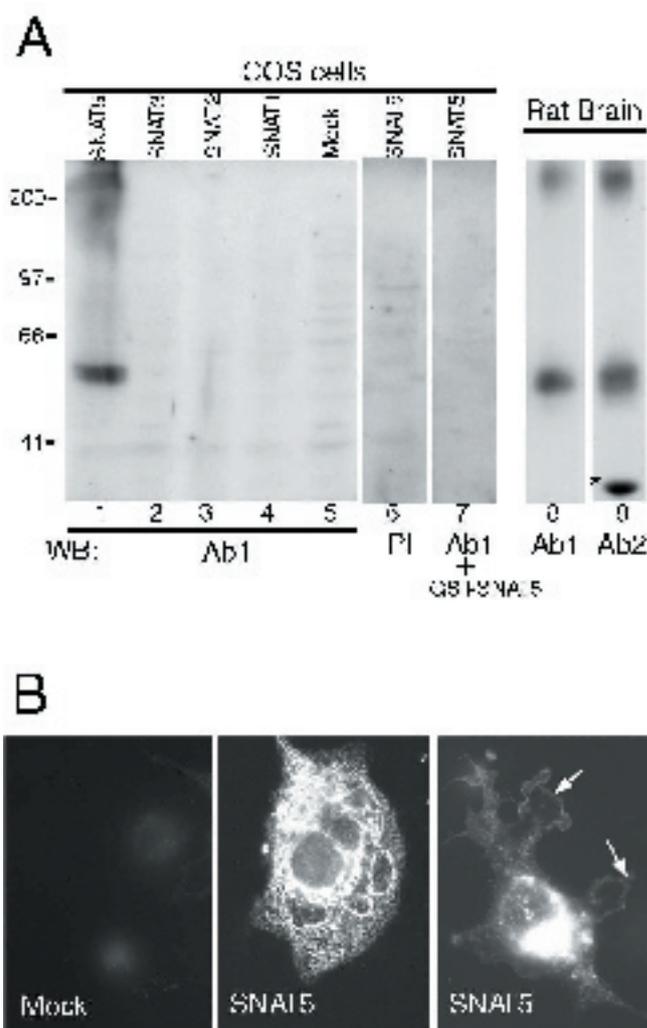
##### **IV. 1. 1. 1. Anticuerpos anti-GLT1b.**

Para la isoforma GLT1b se generó un antisuero inmunizando un conejo con la proteína de fusión GLT1bCt-GST. La especificidad del antisuero obtenido (Ab401) fue analizada mediante ensayos de inmunofluorescencia e inmunotransferencia. El antisuero produjo el patrón de bandas múltiples esperado para GLT1b: una banda de 60 kDa que corresponde al monómero y varias bandas de alto peso molecular que corresponden a agregados de la proteína. No se observaron bandas en extractos de células COS7 transfectadas con un vector de expresión para GLT1a o transfectadas con el vector vacío (mock) (fig. 7A). En experimentos de inmunofluorescencia, se transfectaron células COS7 con YFP-GLT1b y YFP-GLT1a y se incubaron con el antisuero. La inmunoreactividad fue apreciable sólo en las células transfectadas con YFP-GLT1b y no en aquéllas transfectadas con GLT1a o no transfectadas (fig. 7 B). Además el patrón de inmunoreactividad en células transfectadas con YFP-GLTb fue idéntico al patrón generado por la fluorescencia del epítipo YFP fusionado a GLT1b. Tanto en los ensayos de inmunofluorescencia como en las inmunotransferencias, la preincubación del antisuero con un exceso de la proteína de fusión GLT1bCt-GST produce la pérdida total de la inmunoreactividad (datos no mostrados).



#### IV. 1. 1. 2. Anticuerpos anti-SNAT5.

Para el transportador SNAT5 se generaron dos antisueros policlonales mediante la inmunización de dos cobayas con la proteína de fusión GST-SNAT5Nt. Los antisueros derivados de los animales inmunizados (denominados Ab1 y Ab2) se probaron en ensayos de inmunotransferencia en células COS7 previamente transfectadas con un vector de expresión para SNAT5 y en tejido de cerebro de rata. En el análisis de los extractos celulares derivados de COS7 transfectadas para SNAT5, el suero inmune Ab1 reconoció una banda de 50-55 kDa que se corresponde con la masa molecular prevista para SNAT5. Además, Ab1 reconoció también una proteína de 200 kDa que podría corresponder a un agregado tetramérico del transportador (fig. 8). La especificidad de esta banda se confirmó cuando el Ab1 no reconoció proteínas derivadas de un extracto de células COS7 transfectadas con el vector de expresión vacío (mock), o que habían sido transfectadas con transportadores de la familia SLC38 y, por tanto, estrechamente relacionados con SNAT5: SNAT3 (carril 2), SNAT1 (carril 4), o SNAT2 (carril 3) (fig. 8A, carriles 2-5). Ni el suero preinmune (fig. 8A carril 6), ni el suero inmune pre-adsorbido con la proteína de fusión GST-SNAT5Nt (fig. 8A carril 7) reconocieron específicamente a SNAT5.



**Fig. 8. A-B).** Caracterización del suero inmune anti-SNAT5. **A)** Inmunotransferencia de extractos crudos en SDS de células COS transfectadas con vectores de expresión para SNAT5 (carriles 1, 6, 7), SNAT3 (carril 2), SNAT2 (carril 3), SNAT1 (carril 4), o el vector de expresión vacío (Mock, carril 5), así como extractos crudos en SDS de la fracción de membrana de cerebro de rata (carriles 8-9); 15 µg proteína/carril. Las inmunotransferencias fueron incubadas con el antisero Ab1 (Ab1), suero preinmune (PI), Ab1 pre-adsorbido con GST-SNAT5Nt (Ab1+GST-SNAT5), o Ab2 (Ab2) como se indica. La detección del anticuerpo unido se realizó mediante quimioluminiscencia (ECL). La banda inespecífica aparece sólo con el Ab2 en cerebro de rata (asterisco, carril 9). **B)** Inmunofluorescencia de células COS7 transfectadas con el vector vacío (Mock) o con un vector de expresión SNAT5 (SNAT5). Como se puede observar, en algunas células la mayor parte de la inmunofluorescencia se detecta en el compartimento intracelular (panel central), pero en otras células la inmunofluorescencia está presente en la membrana plasmática (panel derecho señalado con una flecha).

En los ensayos realizados en tejido de cerebro de rata, el Ab1 de nuevo reconoció la proteína de 50-55 kDa así como el agregado de 200 kDa (fig. 8A, carril 8). Mientras que en suero Ab2 produjo resultados similares a los obtenidos con el suero Ab1 en células COS7 transfectadas (datos no mostrados), en homogenado de tejido de rata reconoció una proteína de 30 kDa además de la proteína específica de 50 kDa y su agregado de 200 kDa (fig. 8 B, panel izquierdo). La naturaleza de esta banda no está clara, si bien su ausencia en los extractos derivados de COS7 transfectadas para SNAT5 indica que probablemente sea el resultado de una reacción cruzada no específica con una proteína del tejido nervioso de rata. Este antisuero no funcionó adecuadamente en los experimentos inmunohistoquímicos por lo que fue descartado.

La especificidad del antisuero Ab1 también se probó en ensayos inmunocitoquímicos. No se detectó inmunoreactividad inespecífica en células no transfectadas (fig. 8, panel izquierdo), y la señal específica de inmunofluorescencia fue evidente en células transfectadas con el vector de expresión para SNAT5 (fig. 8). La presencia de inmunoreactividad es mayoritaria en el compartimento intracelular (fig. 8 B, panel central), si bien en muchas células es posible observar la presencia de proteína en la membrana plasmática (fig. 8B, panel derecho). En los experimentos controles en los que el antisuero había sido previamente preadsorbido con el antígeno No se observó inmunofluorescencia (datos no mostrados).

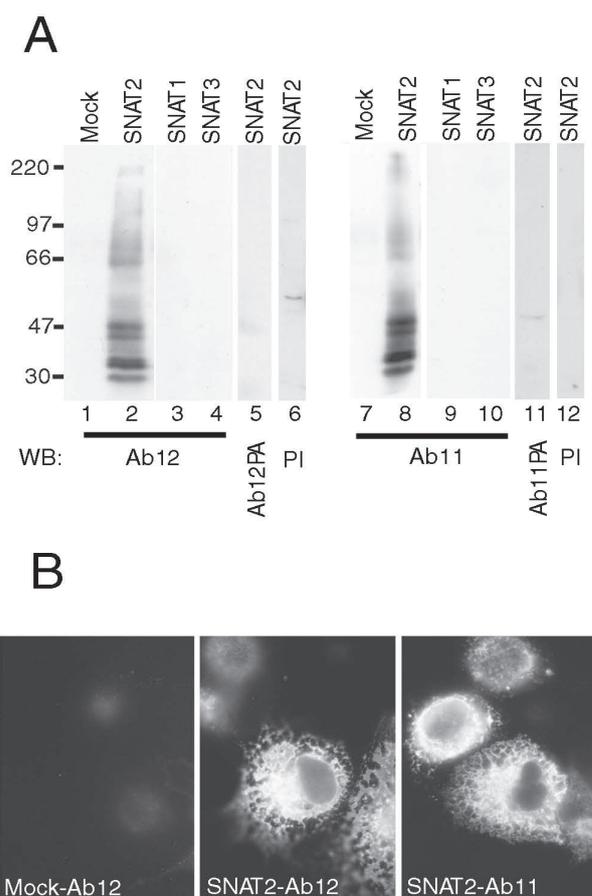
#### **IV. 1. 1. 3. Anticuerpos anti-SNAT2.**

Contra el transportador SNAT2 se generaron dos antisueros policlonales mediante la inmunización de dos cobayas con la proteína de fusión GST-SNAT2Nt. Los antisueros derivados de los animales inmunizados (denominados Ab11 y Ab12) fueron purificados por cromatografía de afinidad en dos pasos. En la primera cromatografía se utilizó como ligando GST inmovilizado, los anticuerpos así obtenidos se descartaron, y el suero inmune libre de anticuerpos contra GST se sometió a una segunda cromatografía en la que se usó el epítipo inmune como ligando (GST-SNAT5Nt). Una vez purificados los sueros inmunes fueron probados en inmunotransferencias de tejido de rata y extractos de células COS7 transfectadas con un vector de expresión para SNAT2. Los anticuerpos derivados de ambos sueros (Ab11 y Ab12) reconocían patrones complejos de bandas idénticos entre sí y específicos para SNAT2 ya que tales patrones no se producían ni en los extractos de células no transfectadas (fig. 9A carriles 1 y 7), ni con el suero preinmune (fig.9 carriles 6 y 12).

La masa teórica para el transportador SNAT2 es de 55 kDa, sin embargo, como la movilidad electroforética de proteínas hidrofóbicas en SDS-PAGE es a menudo mayor que la esperada, creemos que la banda de 47 kDa corresponde a SNAT2. Dado que la proteína contiene dos secuencias consenso de glicosilación en el tercer bucle extracelular, es posible que las bandas difusas de alto peso molecular sean resultado de un proceso de glicosilación de la proteína nativa. Algunas de estas bandas de alto peso molecular podrían además representar agregados de formas de menor tamaño de la proteína, una característica común en proteínas transmembrana hidrofóbicas. Las formas de menor tamaño, 43, 35 y 30 kDa, podrían representar productos incompletos de síntesis, aunque el hecho de que aparezcan como bandas definidas sugiere que

podrían representar productos proteolíticos del procesamiento de SNAT2 en sitios específicos de corte cuando son expresadas en células COS.

El antisuero generado contra SNAT2 no mostró inmunoreactividad frente a extractos de células COS7 transfectadas con los vectores de expresión de los transportadores SNAT1 o SNAT3 (fig. 9A carriles 3, 9 y 10) lo que apoya la especificidad del antisuero para SNAT2. Además, la inmunoreactividad en las inmunotransferencias se eliminó mediante preincubación de los anticuerpos anti-SNAT2 con un exceso de proteína de fusión GST-SNAT2 inmovilizada (fig. 9 A carriles 5 y 11).



**Fig. 9. A-B)** Caracterización del suero inmune anti-SNAT2. **A)** Inmunotransferencia de proteínas solubilizadas con SDS a partir de células COS transfectadas con vectores de expresión para SNAT2 (carriles 2, 5, 6, 8, 11, 12), SNAT1 (carriles 3 y 9), SNAT3 (carriles 4 y 10), o el vector de expresión vacío (Mock, carriles 1 y 7). 15  $\mu$ g de proteína se sometieron a SDS-PAGE seguido de electrotransferencia. Las inmunotransferencias fueron incubadas con los anticuerpos purificados Ab11 (Ab11), Ab12 (Ab12), o con los anticuerpos Ab11 y Ab12 preadsorbido con los antígenos (Ab12PA, Ab11PA) o con suero preinmune (PI). La detección del anticuerpo unido se realizó mediante quimioluminiscencia (ECL). **B)** Inmunofluorescencia de células COS7 transfectadas con el vector vacío (Mock) o con vector de expresión SNAT2 (SNAT2) e incubadas con los anticuerpos Ab11 o Ab12 (como se indica). Como se puede observar, la inmunofluorescencia se detecta en el compartimento intracelular.

La especificidad del antisuero se confirmó además mediante técnicas de microscopía de fluorescencia. No se detectó inmunoreactividad en células no transfectadas (fig. 9 B panel izquierdo), mientras que ambos antisueros produjeron una fuerte inmunofluorescencia en células transfectadas con los vectores de expresión para SNAT2 (fig. B, panel central y derecho). Las proteínas reconocidas por los antisueros en estas células residían principalmente en el compartimento intracelular. No hubo inmunofluorescencia presente en los experimentos control en los que se usó antisuero preadsorbido con el antígeno (datos no mostrados).

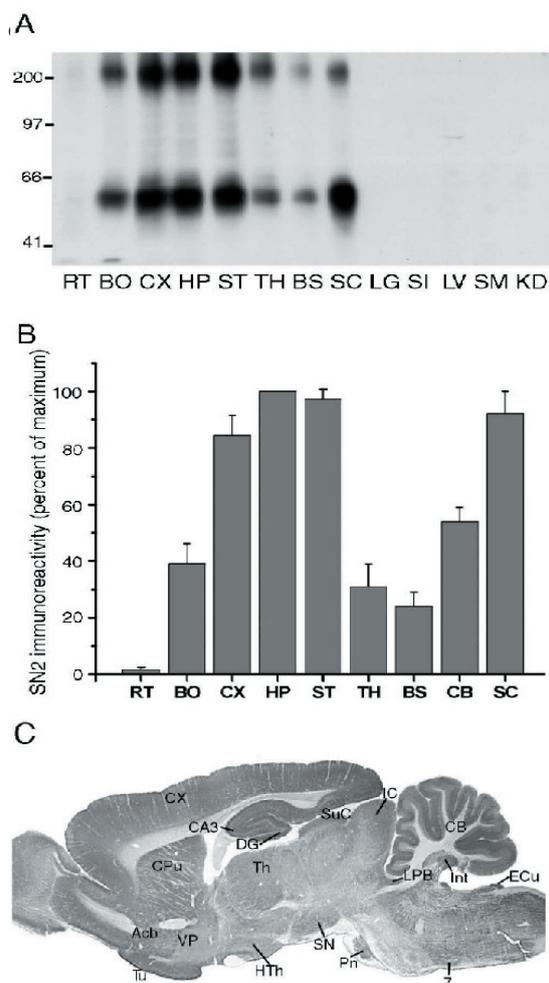
## IV. 2. ESTUDIO DE LA DISTRIBUCIÓN DE LOS MIEMBROS DE LA FAMILIA SNAT EN CEREBRO DE RATA.

La determinación precisa de los sitios en los que se expresa una proteína es un aspecto importante que se debe resolver para comprender la función de dicha proteína. Puesto que la distribución de SNAT5 y SNAT2 en el cerebro era desconocida, se realizaron en colaboración con los doctores Francisco Zafra y Beatriz Cubelos, una serie de experimentos de inmunquímica e inmunohistoquímicos, a diferentes niveles de resolución.

### IV. 2. 1. DISTRIBUCIÓN DE SNAT5.

#### IV. 2. 1. 1. Distribución regional de SNAT5 en el cerebro mediante inmunquímica.

La distribución regional del transportador SNAT5 fue analizada en primer lugar mediante cuantificación de la inmunotransferencia de fracciones crudas de membrana de varias regiones del SNC (fig. 10 A). Se observó una variación regional considerable en los niveles de expresión de SNAT5, con niveles altos en el neocórtex, el hipocampo, el estriado y la médula espinal. En el cerebro anterior y el tálamo se detectaron niveles menores y, sorprendentemente, no se detectó inmunoreactividad en los extractos derivados del tejidos periféricos como el hígado o el estómago, a pesar de la demostración previa de la presencia de RNAm para SNAT5 en tales

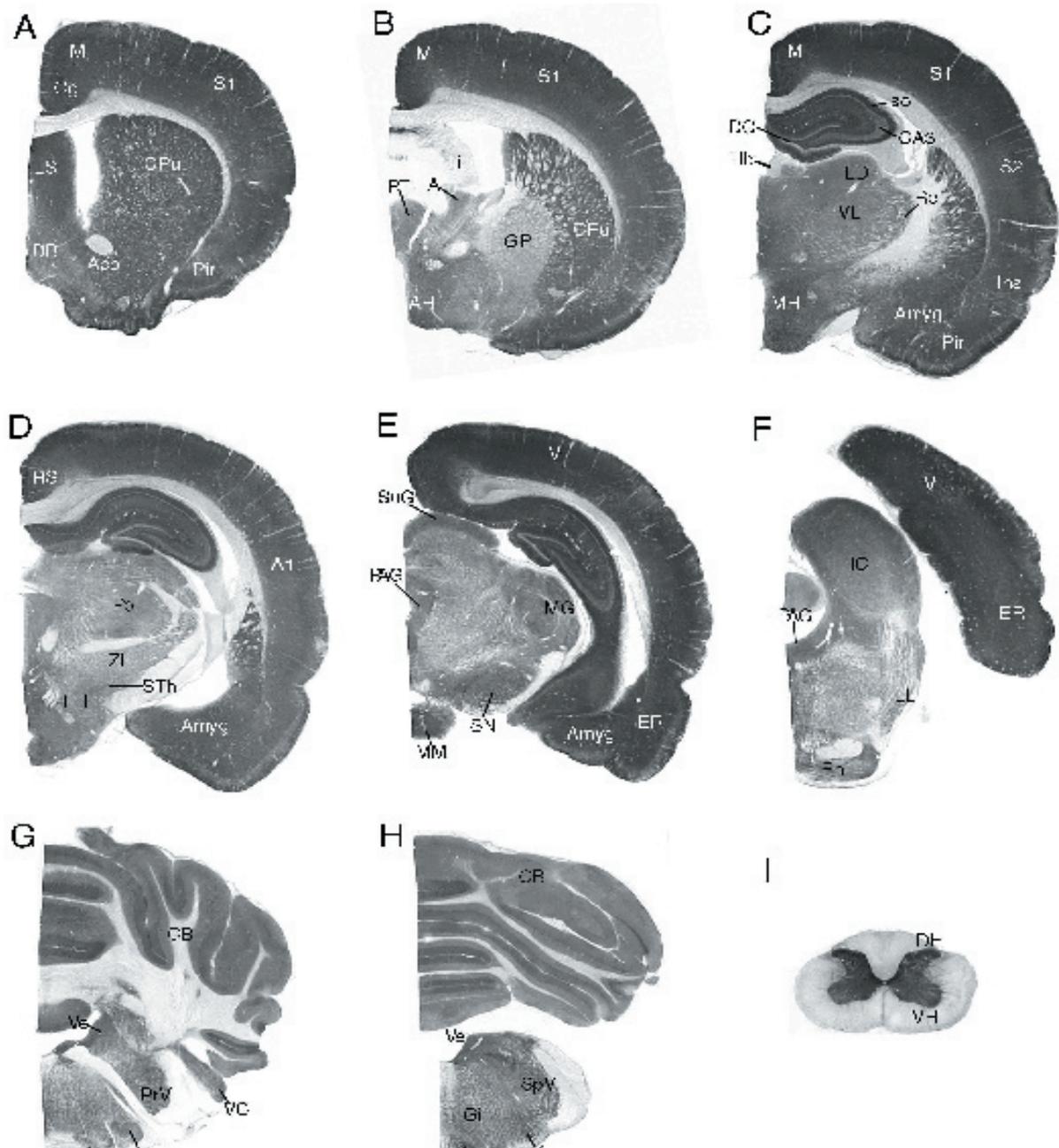


**Fig. 10. A-C)** Distribución regional de SNAT5 en el SNC y órganos periféricos. **A)** 20  $\mu$ g de una fracción cruda de membrana derivada de los tejidos indicados se inmunotransfirió y se incubó con el anticuerpo Ab1. Los tejidos analizados son: retina (RT), bulbos olfativos (OB), neocórtex (CX), hipocampo (HP), cuerpo estriado (ST), tálamo/hipotálamo (TH), tallo cerebral (BS), médula espinal (SC), pulmón (LG), intestino delgado (SI), hígado (LV), estómago (SM), o riñón (KD). **B)** Cuantificación de la inmunoreactividad detectada para SNAT5 (porcentaje del valor máximo  $\pm$  SEM) en diferentes regiones del SNC de rata obtenidas mediante análisis densitométrico de al menos tres membranas independientes. **C)** Localización inmunohistoquímica de SNAT5 en una sección parasagital. Amplificación de la sección (40  $\mu$ m) teñida con Ab1 (1:250) en presencia de 0.2% Tritón X-100 y visualizada con inmunoperoxidasa. 7, núcleo facial; Acb, núcleo *accumbens*; CA3, área CA3 del hipocampo; CB, cerebelo; CPU, caudado-putamen; CX, neocórtex; DG, giro dentado; Ecu, núcleo cuneado externo; Hth, hipotálamo; IC, colículo inferior; Int, núcleos cerebeloso interpuesto; LPB, núcleo lateral parabrancial; Pn, núcleo pontino; SN, sustancia negra; SuC, colículo superior; Th, tálamo; Tu, tubérculo olfativo; VP, *pallidum ventral*.

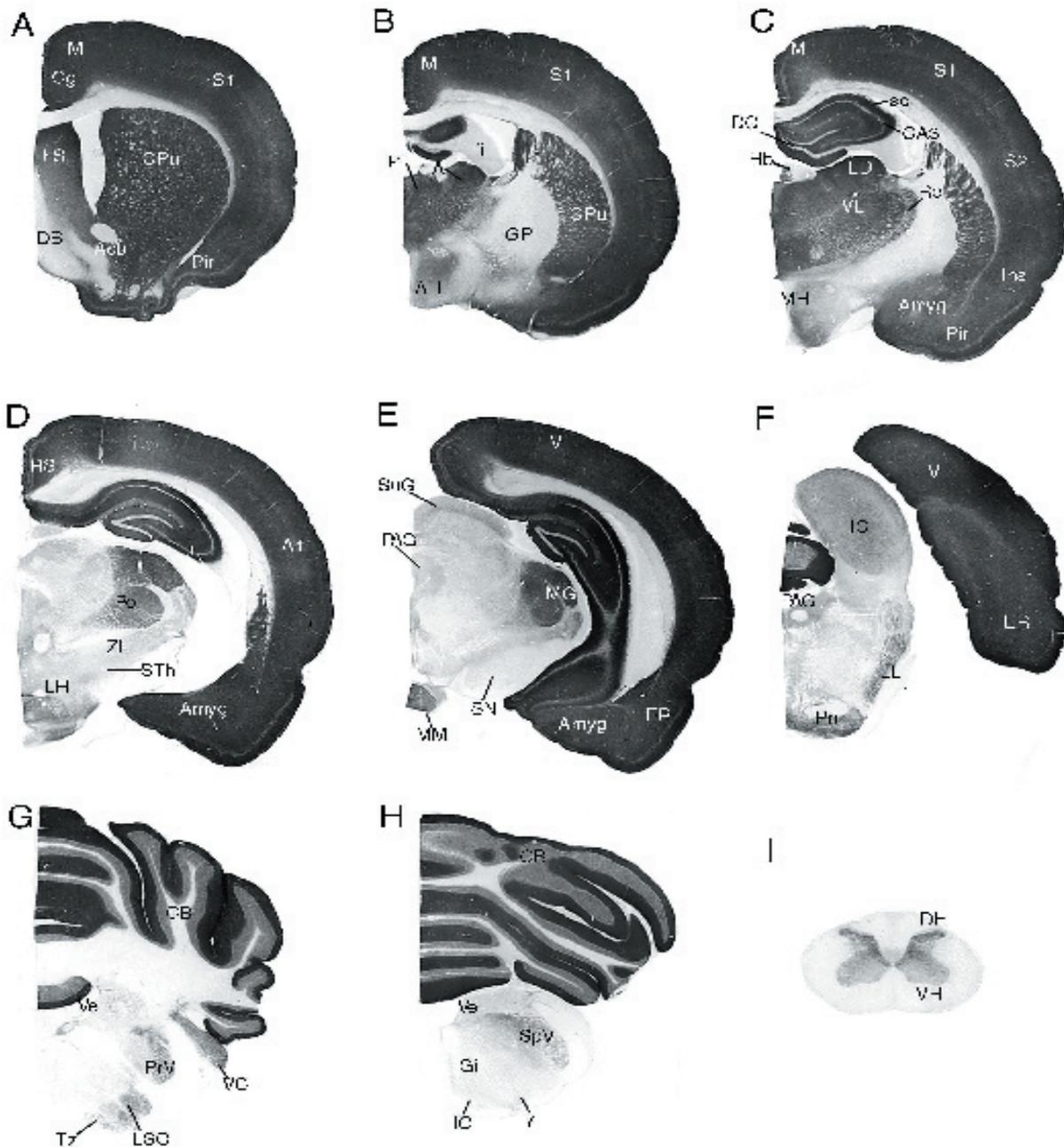
La cuantificación densitométrica de las bandas específicas para SNAT5 (fig. 10) mostró que los niveles de expresión en el hipocampo, el estriado o la médula eran entre tres y cuatro veces mayores que en el cerebro anterior o en el tálamo/hipotálamo, y alrededor del doble que en el cerebelo. Se detectó una pequeña cantidad de SNAT5 en la retina.

#### **IV. 2. I. 2. Distribución de SNAT5 mediante microscopía óptica de baja resolución.**

El análisis inmunohistoquímico de la distribución de SNAT5 se realizó en secciones de tejido incubadas con anticuerpos anti-SNAT5 y, en un paso posterior, con anticuerpos secundarios acoplados a peroxidasa. Sólo presentaremos los resultados obtenidos con el suero Ab1, pues, aunque el patrón regional, celular y subcelular obtenido con el suero Ab2 es similar al obtenido con Ab1, Ab2 presentó tinción nuclear, por lo que no se ha usado en este estudio. Para favorecer la penetración del anticuerpo se usó Tritón X-100 en la dilución del anticuerpo específico. La distribución regional observada reveló un patrón consistente con los análisis de inmunotransferencia que previamente hemos mostrado (fig. 11). En el telencéfalo, la inmunoreactividad para SNAT5 fue muy intensa en el neocórtex (fig. 10 C y 11). La tinción fue también muy intensa en la mayoría de las regiones del hipocampo, a excepción de el estrato piramidal del asta de Ammon y la capa granular del giro dentado (fig. 11 C). La inmunoreactividad de mayor intensidad se observó en el *stratum oriens*. En las regiones septales y basales del cerebro anterior, la reactividad para SNAT5 era intensa en el núcleo septal lateral y, de moderada a intensa, en el núcleo basal de la *stria terminalis*. La tinción fue moderada en las ramas horizontal y vertical de la banda diagonal mientras que era muy intensa en la mayoría de los núcleos del complejo amigdaloides (fig. 11 C-E). Dentro de los ganglios basales y las regiones asociadas, la mayor intensidad de tinción se detectó en el caudado-putamen y era moderada en el *globus pallidus* y en el *pallidum ventral* (fig. 11 A-B). La inmunoreactividad fue también moderada en el núcleo subtalámico y de moderada a intensa en la sustancia negra (fig. 11 D y E). En relación con las regiones anteriormente descritas, en el diencéfalo SNAT5 se detectó de forma moderada. No obstante, detectamos inmunoreactividad entre moderada e intensa en la mayoría de las estructuras hipotalámicas. Y, también, en algunos núcleos talámicos como el núcleo geniculado lateral y medial (fig. 11 C-D). En contraste, la inmunoreactividad fue débil en la habénula (fig. 11 C). En el mesencéfalo, se observó tinción entre moderada e intensa en núcleo interpeduncular, los cóliculos superior e inferior, la sustancia gris periacueductal y el núcleo mesencefálico del rafe (fig. 11 E-F). La tinción en otras regiones del mesencéfalo era más débil. En la región del puente, la tinción de mayor intensidad se encontró en el núcleo pontino, seguido del núcleo trigeminal motor, el núcleo vestibular, el núcleo parabranquial y varios núcleos involucrados en el procesamiento de la información auditiva (complejo olivar superior, núcleos cocleares ventrales y dorsales, y lemnisco lateral (fig. 11 F y G). En el cerebelo, la inmunoreactividad era, en general, moderada aunque con mayor intensidad en la capa molecular que en la capa granular (fig. 11 G-H). Finalmente, la inmunoreactividad en la materia gris de la médula espinal fue muy elevada (fig. 11 I).



**Fig. 11. A-I)** Localización inmunohistoquímica de SNAT5 en secciones coronales del SNC de rata. Amplificaciones de las secciones coronales incubadas Ab1. Las secciones (40  $\mu$ m) se incubaron con Ab1 (1:250) en presencia de 0.2% Triton X-100 y se visualizaron mediante reacción con inmunoperoxidasa. Además de las abreviaturas usadas en la Fig. 10C, córtex auditivo; AH, área hipotalámica anterior; Amyg, amígdala; Cg, área cingulada; DB, banda diagonal; DH, asta dorsal de la médula espinal; ER, área entorrinal; fi, fimbria; Gi, núcleo reticular gigantocelular; GP, *globus pallidus*; Hb, habérmula; Ins, área insular; IO, oliva inferior; LD, núcleo talámico laterodorsal; LH, hipotálamo lateral; LS, septo lateral; LSO, oliva superior lateral LL, núcleo lateral del lemnisco; M áreas, motoras; MG, núcleo geniculado medial; MH, hipotálamo medial; MM, área mamilar; PAG, sustancia gris periacueductal; Pir, área piriforme; Po, núcleo talámico posterior; PrV, núcleo sensorial principal del trigemino; PT, núcleo talámico paratenial; Re, núcleo talámico reticular; RS, área retrosplenial; S1, área somatosensorial primaria; S2, área somatosensorial secundaria; SO, *stratum oriens*; SpV, núcleo espinal trigeminal; STh, núcleo subtalámico; SuG, capa gris superficial del coliculus superior; Tz, núcleo medio del cuerpo trapezoidal; VC, núcleo ventral cóclea; V, área visual; Ve, núcleo vestibular; VH, asta ventral de la médula espinal; VL, núcleo talámico ventrolateral; ZI, zona incerta.



**Fig. 12. A-I)** Localización inmunohistoquímica de vGLUT1 en secciones coronales del SNC de rata. Amplificaciones de las secciones coronales incubadas con anti-vGLUT1. Las secciones (40  $\mu$ m) se incubaron con anti-vGLUT1 (1:1000), en presencia de 0.2% Tritón X-100 y se visualizaron mediante inmunoperoxidasa. Las abreviaturas se describen en las figuras 10 C y 11.

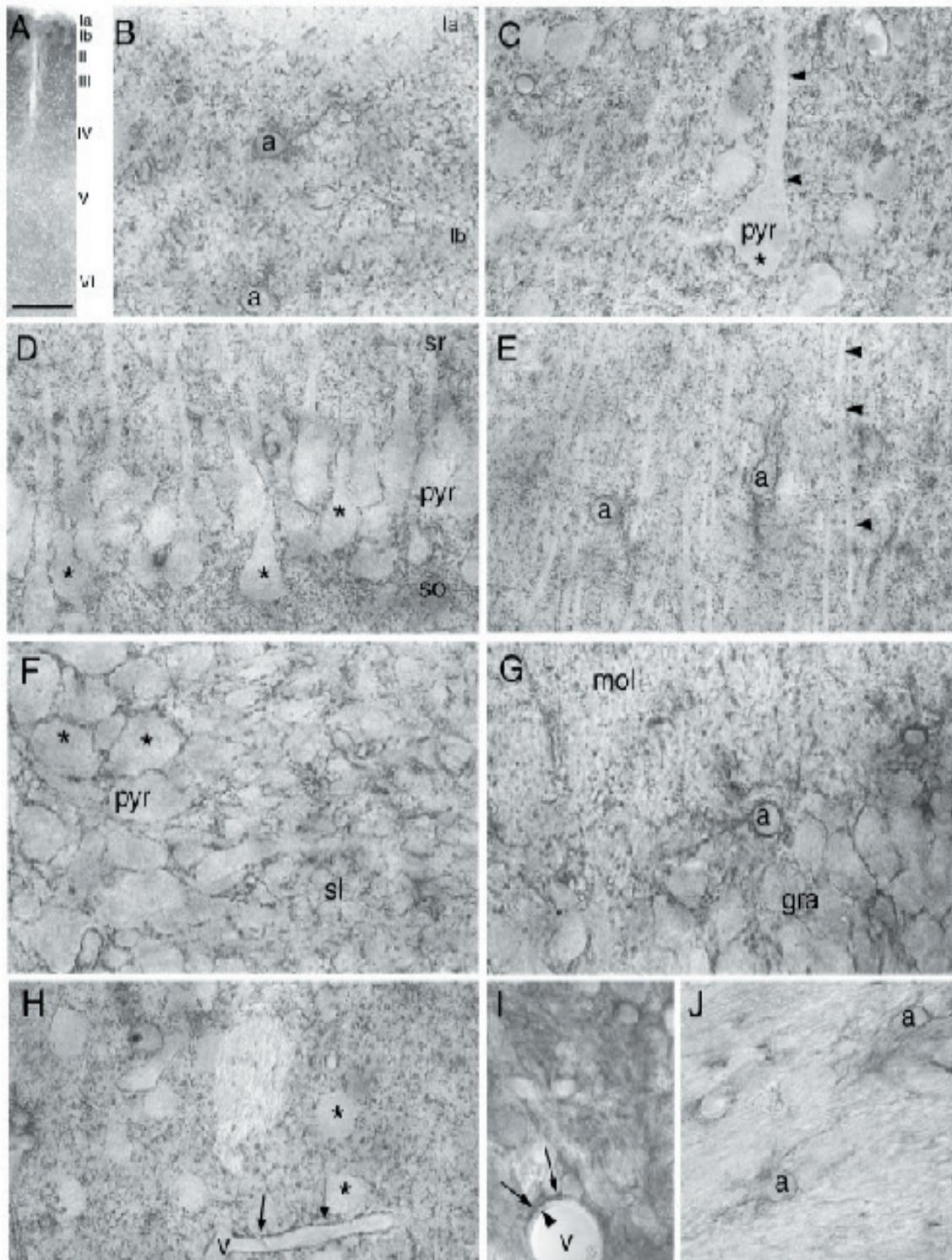
#### **IV. 2. 1. 3. Comparación de los patrones de distribución de SNAT5 y vGLUT1.**

Puesto que la distribución regional de SNAT5 descrita recuerda a la que previamente se había descrito para el marcador de la subpoblación más importante de terminales glutamatergicos, vGLUT1 (Fremeau et al., 2001; Herzog et al., 2001; Kaneko et al., 2002), comparamos los patrones de distribución de ambas proteínas en series de secciones coronales. Encontramos fuertes paralelismos entre el marcaje detectado con anticuerpos anti-vGLUT1 y la inmunoreactividad detectada para SNAT5. La tinción para ambas proteínas era intensa en regiones como el neocórtex, el hipocampo, el caudado, el putamen o la amígdala, y débil en el diencefalo y el tallo cerebral (fig. 12). En áreas con bajos niveles de inmunoreactividad para vGLUT1 como el globus pallidus, el *pallidum* ventral o el tallo cerebral se observó una señal relativamente baja para SNAT5 (fig. 12 B, D -G). El patrón de tinción de las diferentes capas del hipocampo es similar para ambas proteínas. Sin embargo, se observan diferencias significativas en el diencefalo y en el tallo cerebral, en donde hay zonas que presentan una tinción muy débil para vGLUT1 y sin embargo hay una señal moderada para SNAT5. Además, en algunos núcleos talámicos, hipotalámicos y del tallo cerebral en los que la tinción era moderada o incluso alta para SNAT5, la tinción para vGLUT era débil. De manera inversa, algunos núcleos talámicos presentaban inmunoreactividad elevada para vGLUT1 y sólo era moderada para SNAT5 (fig. 12 C). No obstante, tales diferencias parecen compensarse cuando además de la distribución de vGLUT1 consideramos la del marcador vGLUT2, que está enriquecido en otra subpoblación de terminales glutamatergicos más abundantes en el diencefalo y tallo cerebral que en el cerebro anterior (ver Kaneko et al., 2002, para una descripción detallada de la expresión de vGLUT2 en secciones coronales seriadas). Por tanto, el patrón de tinción de SNAT5 en el tálamo, el hipotálamo, el colículo superior, el colículo inferior, la sustancia negra, sustancia gris periacueductal, núcleos vestibulares y otros varios núcleos del tallo cerebral, se asemeja al patrón combinado de vGLUT1 y vGLUT2.

#### **IV. 2. 1. 4. Localización de SNAT5 en astrocitos por microscopía óptica de alta resolución.**

El examen de las secciones teñidas a mayor resolución en el microscopio óptico nos permitió una primera aproximación a la definición de los tipos celulares que expresan SNAT5. Así, el patrón de tinción que se observó es compatible con una localización glial de SNAT5, mientras que las neuronas no aparecían marcadas. Esta distribución era bastante clara en regiones anteriores como el neocórtex. Aquí la inmunoreactividad era más intensa en las capas corticales externas (a excepción de la capa Ib) (fig. 13 A), distribuyéndose en un patrón punteado en el neuropilo así como alrededor de los cuerpos neuronales, que no eran inmunoreactivos, tal y como ilustran las micrografías de alta resolución de las capas Ib (fig. 13 B) y V (fig. 13 C) del neocórtex. Este patrón se repetía en el hipocampo, de donde mostramos la capa piramidal de la región CA1 (fig. 13 D), el *stratum radiatum* (fig. 13 E), y el *stratum lucidum* a nivel de la región CA3 (fig. 13 F). De manera similar, encontramos astrocitos inmunoreactivos y neuronas no teñidas en el giro dentado (fig. 13 G) y en el estriado (fig. 13 H). La inmunoreactividad para

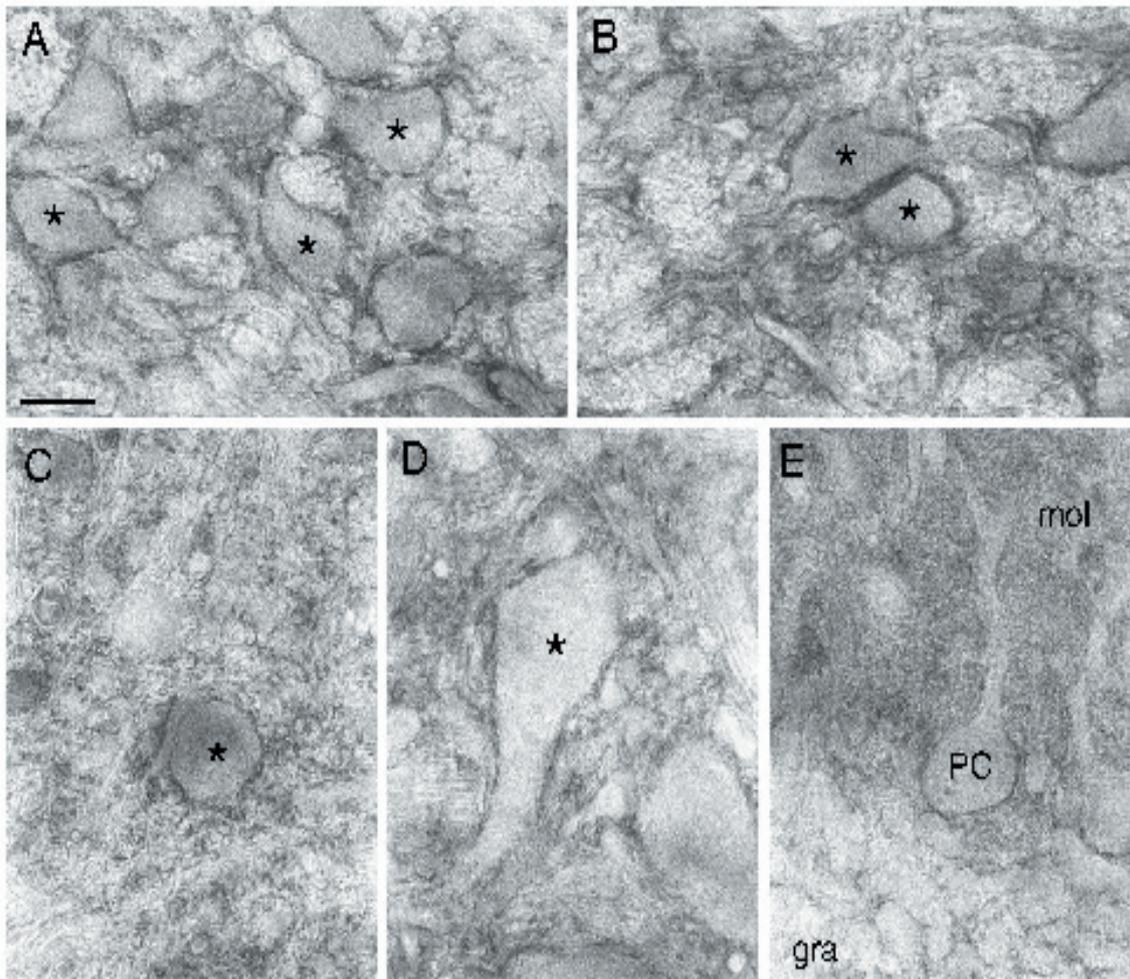
SNAT5 se observa también en los finos procesos de células, probablemente gliales, delimitando los cuerpos neuronales no teñidos tanto piramidales (fig. 13 F) como granulares (fig. 13 G). El patrón punteado en el neuropilo era más pronunciado en el neocórtex (fig. 13 B-C), en algunas áreas del hipocampo (fig. 13 D-E) o en el estriado (fig. 13 H), en comparación con otras áreas del cerebro anterior. Hay que reseñar que si bien los vasos sanguíneos aparecían delimitados por la una región inmunoreactiva para SNAT5, las células endoteliales no parecían reactivas (fig. 13 I). En la materia blanca, la tinción sólo se observa en los cuerpos celulares de los astrocitos y en sus procesos (fig. 13 J).



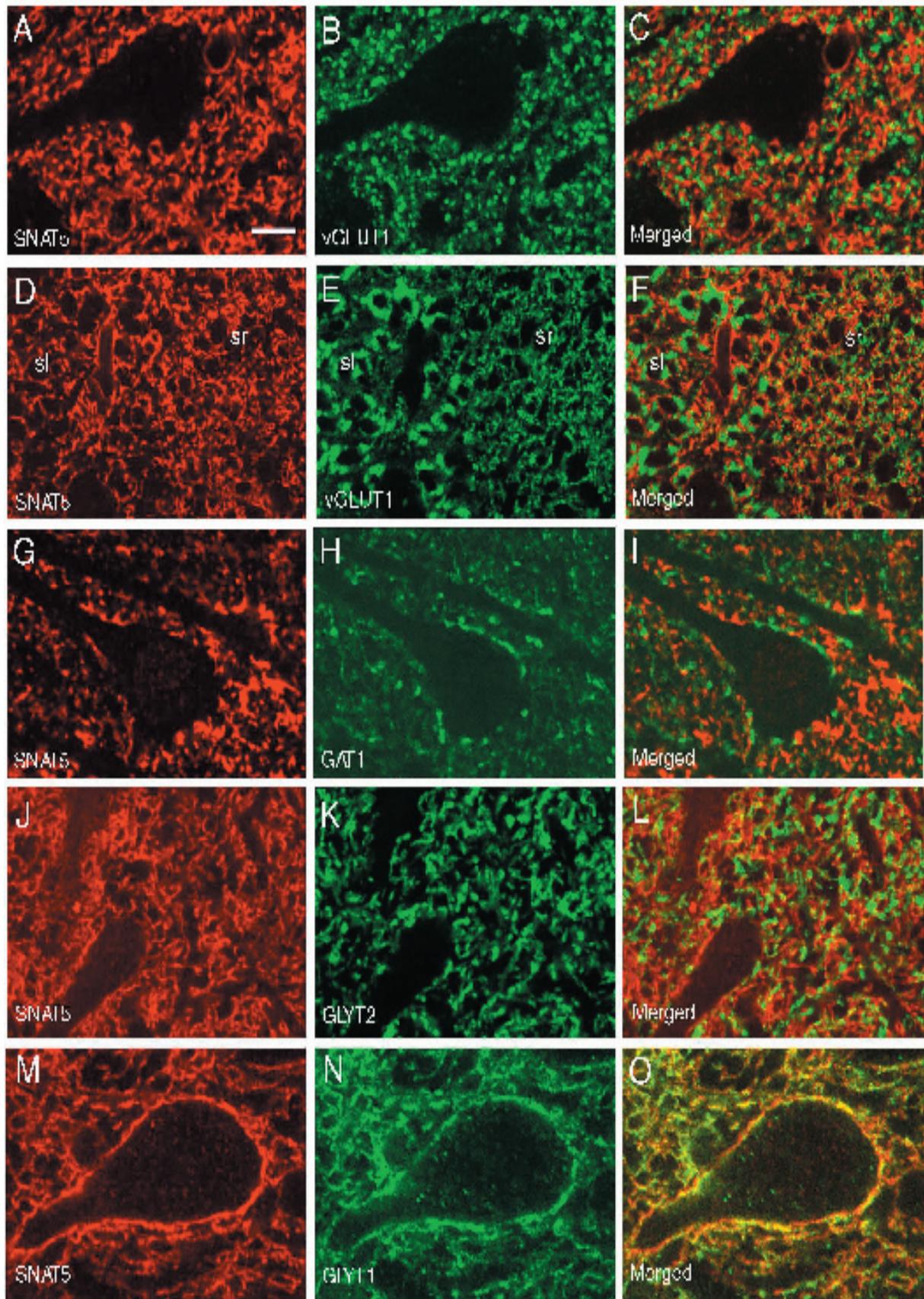
**Fig. 13. A-J)** Distribución celular de SNAT5 en el telencéfalo y diencefalo de rata. Fotomicrografías obtenidas mediante microscopía óptica de alta resolución de las secciones tratadas como en la Fig. 11 a excepción del Tritón X-100 omitido en estas preparaciones. Las ampliificaciones corresponden a: **A)** neocórtex; **B)** capa cortical I (Ia and Ib); **C)** capa cortical V; **D)** *stratum oriens* (so), estrato piramidal (pyr) y *stratum radiatum* (sr) al nivel CA1 del hipocampo; **E)** estrato radiado del hipocampo; **F)** estrato piramidal (pyr) y lúcido (sl) al nivel CA3 del hipocampo; **G)** capa molecular (mol) y granular (gra) del giro dentado; **H)** caudado/putamen; **I)** tálamo. Los vasos sanguíneos (v) en G and H delimitados por la señal inmunoreactiva de SNAT5 se han señalado (flechas), el epitelio vascular no inmunoreactivo se ha señalado (puntas de flecha); **J)** fimbria. Destacar que en esas regiones la inmunoreactividad se concentra en los cuerpos celulares de los astrocitos (a) mientras que el soma y las dendritas (marcados con asteriscos y puntas de flecha) no son inmunoreactivos. Barras de escala 0.3 mm en A; 20  $\mu$ m en B–J.

Por otra parte, en la mayoría de los núcleos del tallo cerebral y de la médula espinal, los procesos que rodean a las neuronas son inmunoreactivos y en ocasiones definen el contorno de los algunos botones terminales que contactan con el pericario neuronal (fig. 14 A-D). Algo parecido se observaba en el neuropilo, donde se podían apreciar procesos gliales inmunoreactivos que perfilaban a botones terminales no teñidos, tal y como se muestra en los ejemplos correspondientes al núcleo medio del cuerpo trapezoidal (fig. 14 A), el núcleo coclear ventral (fig. 14 B), el núcleo lateral de la oliva (fig. 14 C), y las neuronas gigantes del núcleo vestibular lateral (fig. 14 D). En la corteza cerebelosa, la inmunoreactividad se localizaba principalmente en la capa molecular, si bien el patrón difuso que presentaba dificultaba la definición detallada en este nivel de resolución (fig. 14 E). En las células de Purkinje no se detectó inmunoreactividad para SNAT5, mientras que en la capa molecular se observaban células gliales inmunoreactivas que alrededor de las células granulares y las de Purkinje (fig. 14 E).

Si bien la mayoría de las estructuras inmunoreactivas descritas parecían corresponderse con estructuras gliales, esto no estaba tan claro para el patrón punteado, especialmente en el cerebro anterior. Para investigar si algunas de estas estructuras se corresponden con terminales nerviosas, realizamos un marcaje doble con anticuerpos específicos para SNAT5 y marcadores de terminales glutamatérgicas, GABAérgicas o glicinérgicas en secciones de tejido. El análisis mediante microscopía confocal demuestra de manera inequívoca que SNAT5 no colocaliza con vGLUT1 en el neocórtex (fig. 15 A-C), el hipocampo (fig. 15 D-F) y en ninguna otra de las regiones analizadas (datos no mostrados). Mas bien puede observarse que SNAT5 se localiza en estructuras que envuelven a los terminales inmunoreactivos para vGLUT1. Del mismo modo, SNAT5 no colocaliza ni con terminales GABAérgicos marcados con el transportador de GABA GAT1 (fig. 15 G-H), ni con los terminales glicinérgicos inmunoreactivos para GLYT2 (fig. 15 J-L). Sin embargo, SNAT5 colocaliza con GLYT1 (fig. 15 M-O), un transportador que en el diencefalo, cerebelo, tallo cerebral y cordón espinal se expresa mayoritariamente en células gliales.



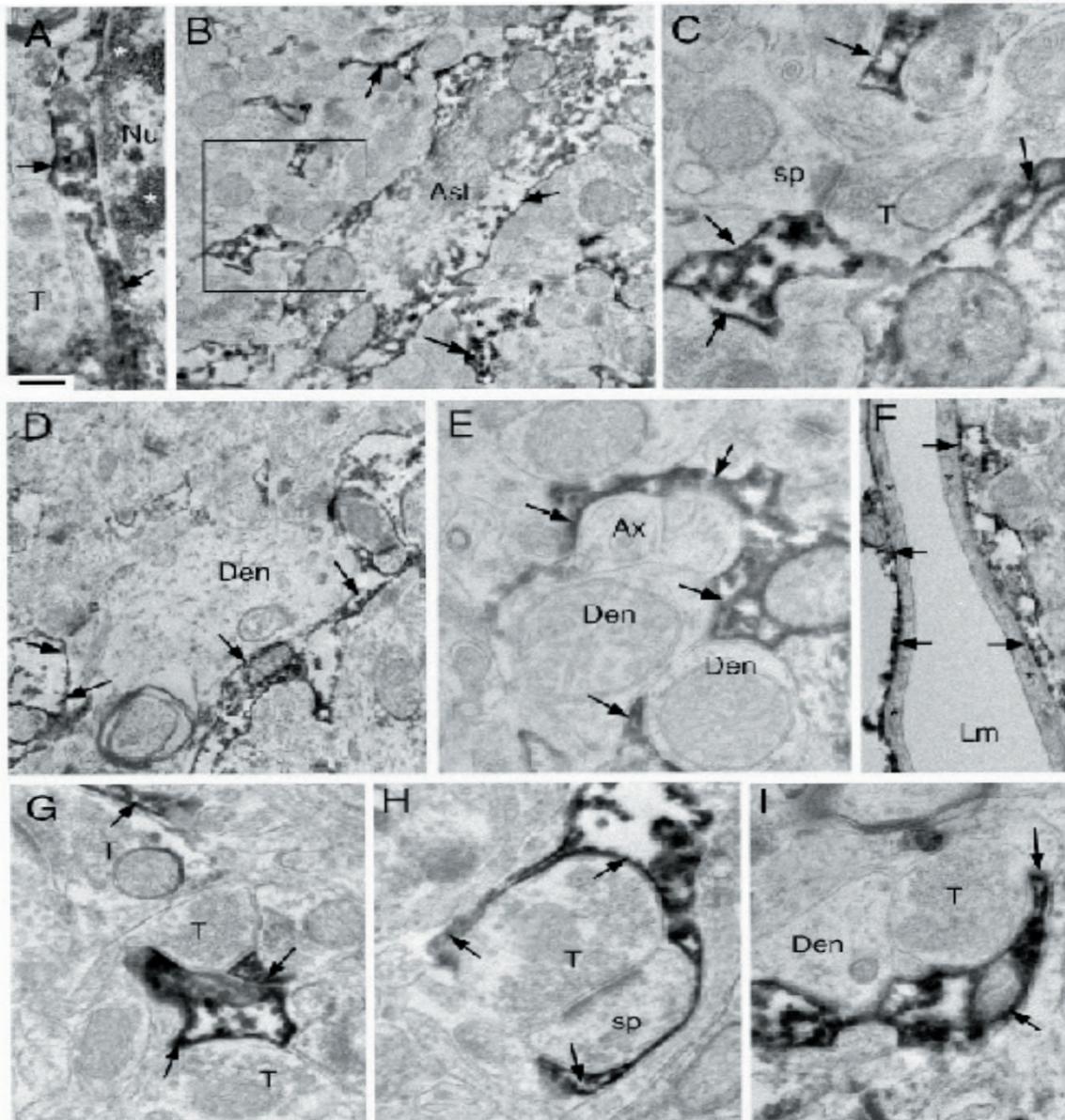
**Fig. 14. A-E)** Distribución celular de SNAT5 en el tallo cerebral de rata. Fotomicrografías obtenidas mediante microscopía de luz de alta resolución de las secciones tratadas como en la Fig. 3 a excepción del Tritón X-100 omitido en estas preparaciones. Las ampliificaciones corresponden a: **A)** núcleo medial del cuerpo trapezoidal; **B)** núcleo ventral coclear; **C)** oliva superior lateral; **D)** núcleo vestibular lateral; **E)** capa molecular (mol), capa gránular (gra), y capa de células Purkinje (PC) del cerebelo. Los cuerpos celulares no inmunoreactivos (asteriscos) aparecen delimitados por perfiles de procesos gliales inmunoreactivos. Estos perfiles también se observan en el neuropilo. Barras de escala 20  $\mu$ m.



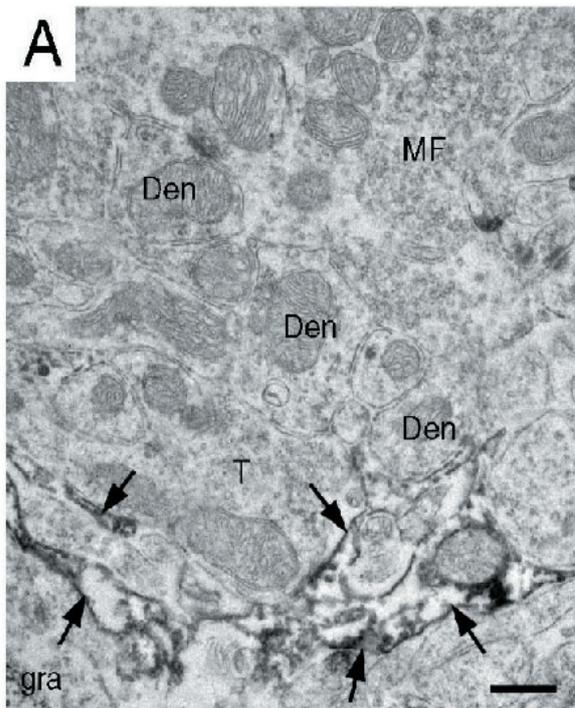
**Fig. 15. A-O)** SNAT5 no está presente en la mayoría de los terminales nerviosos. Micrografías obtenidas mediante microscopía confocal de secciones de cerebro de rata. Se realizó marcaje doble con anticuerpos anti-SNAT5 (imágenes en rojo, paneles izquierdos) y una de las siguientes proteínas (imágenes en verde, paneles centrales): vGLUT1 (A–C and D–F); GAT1 (G–I); GLYT2 (J–L); o GLYT1 (M–O). Los paneles de la derecha (C, F, I, L, O). Las regiones mostradas son: capa cortical V (A–C); el estrato lúcido (sl) y estrato radiado (sr) al nivel CA3 del hipocampo (D–F); capa cortical V (G–I); tallo cerebral (J–L); y la sustancia negra (M–O). Barras de escala 6  $\mu\text{m}$  en A–C, G–I, M–O; 8  $\mu\text{m}$  en J–L; 12  $\mu\text{m}$  en D–F.

#### IV. 2. 1. 5. Análisis ultraestructural de la distribución de SNAT5.

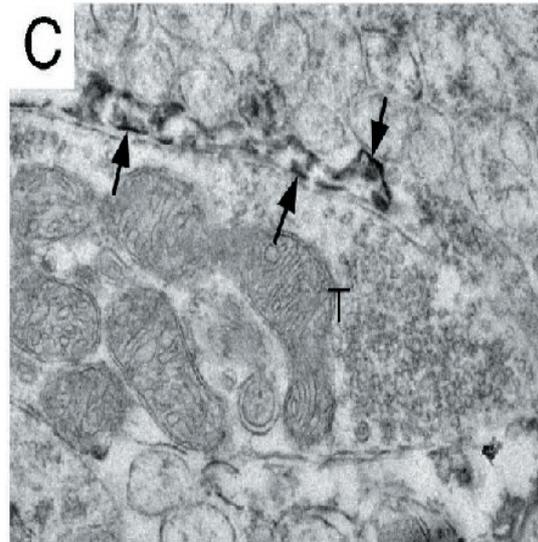
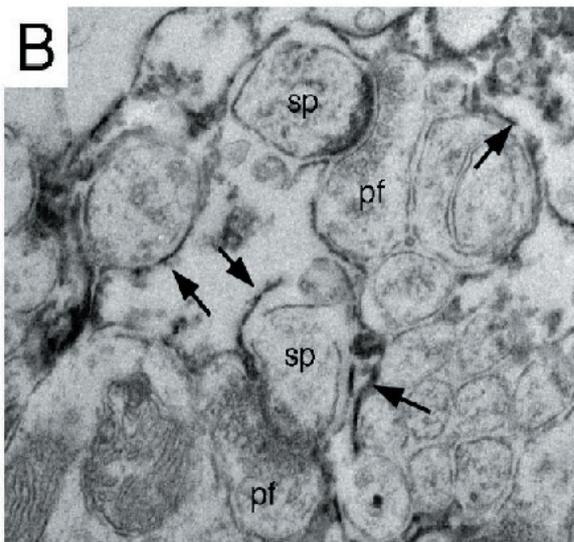
Para confirmar si la naturaleza de las estructuras inmunoreactivas para SNAT5 era glial, realizamos el análisis del patrón inmunohistoquímico de SNAT5 mediante microscopía electrónica en secciones del hipocampo, la corteza y el cerebelo. En el hipocampo, se detectaron niveles intensos de inmunoreactividad en los cuerpos celulares de los astrocitos (fig. 16A) y sus procesos (fig. 16 B-C). Estos procesos penetran en el tejido que rodea elementos neuronales diversos como las sinápsis (fig. 16 C), los axones, las dendritas principales y las arborizaciones dendríticas (fig. 16 D-E). De manera sistemática, la inmunoreactividad para SNAT5 aparecía excluida de los elementos neuronales. Observamos que la precipitación de DAB ocurre en la cara citosólica de la membrana plasmática y en las estructuras internas de los astrocitos, lo que indicaría que el segmento N-terminal de SNAT5 es intracelular. Hecho que es consistente con la topología predicha para SNAT5 mediante algoritmos teóricos. El producto de la reacción de la peroxidasa también se observaba en los pie chupadores de los astrositos, en torno a los vasos sanguíneos, pero no en el endotelio vascular (fig. 16 F). En el neocortex se observó un patrón similar al que acabamos de describir para el hipocampo, con tinción de astrocitos que con frecuencia rodeaban a sinapsis asimétricas, es decir glutamatérgicas (fig. 16 H), aunque a veces aparecían algunas sinapsis simétricas. En el cerebelo, se detectaron procesos astrocíticos inmunoreactivos tanto en la capa granular (fig. 17 A) como en la molecular. En la capa granular, la tinción aparecía en procesos gliales alrededor de los glomerulos y de las células granulares (fig. 17 A). En la capa molecular los procesos gliales inmunoreactivos envolvían a los contactos sinápticos entre las terminales de las fibras paralelas y las espinas de las células de Purkinje (fig. 17 B), y alrededor de los terminales de las fibras trepadoras (fig. 17 C).



**Fig. 16. A-I)** Micrografías obtenidas mediante microscopía electrónica de la tinción con anticuerpos anti- SNAT5 en el hipocampo (A–F) y neocórtex (G–I). A: Soma astrocítico con altos niveles de inmunoreactividad en una fina capa del citoplasma (flechas) que rodea núcleos no inmunoreactivos (Nu). El material electrodenso dentro del núcleo corresponde a grupos de cromatina condensada (asterisco). Se aprecian terminales no teñidos (T). B: procesos gliales teñidos (Ast) que rodean a estructuras neuronales no inmunoreactivas. C: Detalle de la región enmarcada en B, que muestra los procesos gliales rodeando a los (T) que forman sinapsis asimétricas con las espinas dendríticas (sp). D y E: Procesos gliales inmunoreactivos que rodean dendritas no teñidas (Den) y axones no mielinizados (Ax). F: El pie terminal de un astrocito que rodea un vaso sanguíneo es inmunoreactivo, mientras que el epitelio (asterisco) que cubre el lumen (Lm) del vaso no es inmunoreactivo. G: Los procesos gliales teñidos rodeando terminales no reactivos (T) en el neocórtex. H: Procesos gliales rodeando una sinápsis asimétrica en el neocórtex. I: Procesos gliales rodeando una sinápsis simétrica en el neocórtex. Las flechas en A–I indican estructuras gliales inmunoreactivas. Barras de 250 nm en A,C,E,G–I; 500 nm en D,F; 625 nm en B.



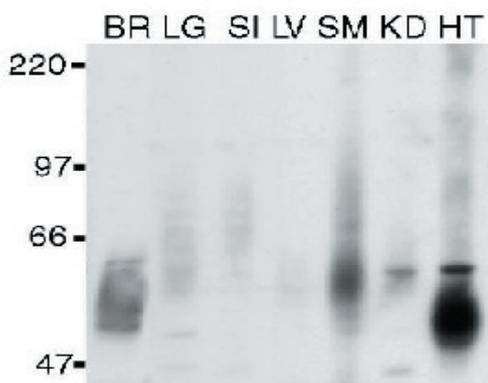
**Fig. 17. A-C)** Fotomicrografías obtenidas mediante microscopía electrónica de la tinción con anticuerpos anti-SNAT5 en el cerebelo **A)** Procesos gliales inmunoreactivos (flechas) entre una célula (gra) y una estructura glomedular, donde la fibra musgosa (MF), las prolongaciones dedríticas de una célula granular (Den) y los terminales de las células de Golgi (T) no presentan inmunoreactividad. **B)** Procesos gliales teñidos (flechas) que rodean a dos terminales (T) de fibras paralelas (pf), y forman una sinápsis asimétrica con las espinas de las células de Purkinje (sp). **C)** Procesos gliales teñidos (flechas) que rodean al terminal de una fibra trepadora putativa (T) no teñida. Barras de escala 415 nm en A; 250 nm en B; 312 nm en C.



## IV. 2. 2. DISTRIBUCIÓN DE SNAT2 (ATA2)

### IV. 2. 2. 1. Distribución regional de SNAT2 en tejidos mediante inmunquímica.

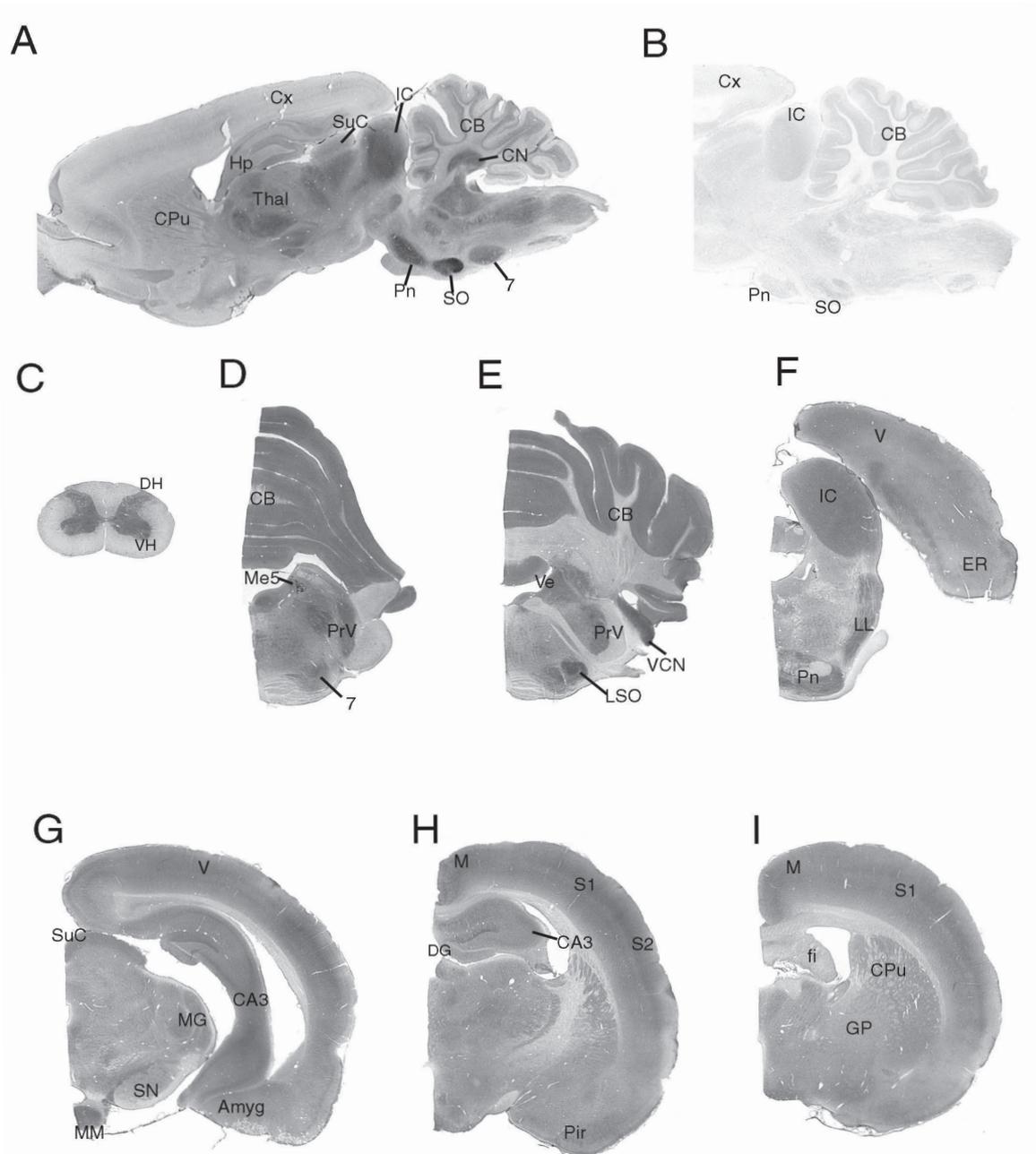
Utilizando la técnica de inmunotransferencia con extractos de tejidos de rata detectamos la presencia de SNAT2 en varios órganos (fig. 18). La señal más fuerte se observó en extractos de tejido cardiaco, seguido del tejido nervioso y del estomacal. La proteína SNAT2 se detectó también en pulmón e intestino delgado, mientras que en hígado y riñón la visualización de esta proteína sólo fue posible tras un tiempo prolongado de exposición (datos no mostrados). En estos ensayos la apariencia de la banda detectada por los antisueros es la de una banda difusa, hecho que habitualmente refleja la glicosilación heterogénea de esta proteína, como ya ha sido descrito para otros transportadores de membrana plasmática (Zafra et al., 1995). Sin embargo, la movilidad de SNAT2 varía en distintos tejidos, lo que sugiere que esta proteína presenta un patrón de glicosilación específico de tejido. Se obtuvieron resultados similares con ambos antisueros (no se muestran los datos para el Ab11).



**Fig 17.** Extractos crudos de tejido de rata solubilizados con tampón con SDS y procesados mediante SDS-PAGE e inmunotransferencia. Las inmunotransferencias fueron incubadas con los anticuerpos purificados Ab11 (Ab11), Ab12 (Ab12), o con los anticuerpos Ab11 y Ab12 preadsorbido con los antígenos (Ab12PA, Ab11PA) o con suero preinmune (PI). La detección del anticuerpo unido se realizó mediante quimioluminiscencia (ECL). BR, cerebro; HT, corazón; KD, riñón; LG, pulmón; LV, hígado; SI, intestino delgado.

### IV. 2. 2. 2. Distribución regional de SNAT2 por microscopía de baja resolución.

La distribución de SNAT2 se analizó mediante inmunohistoquímica de secciones coronales y sagitales permeabilizadas con Tritón X-100 para facilitar la penetración del anticuerpo. Sólo se presentan los resultados obtenidos con Ab12; el suero inmune Ab11 produjo un patrón regional, celular y subcelular similar al encontrado para Ab12 pero con un título ligeramente inferior. La solución de fijación contenía 4% de paraformaldehído. La adición de glutaraldehído, que mejora la morfología, produjo una disminución general de la intensidad de la tinción, por lo que sólo se utilizó en la detección simultánea de SNAT2 y GABA (ver más abajo).

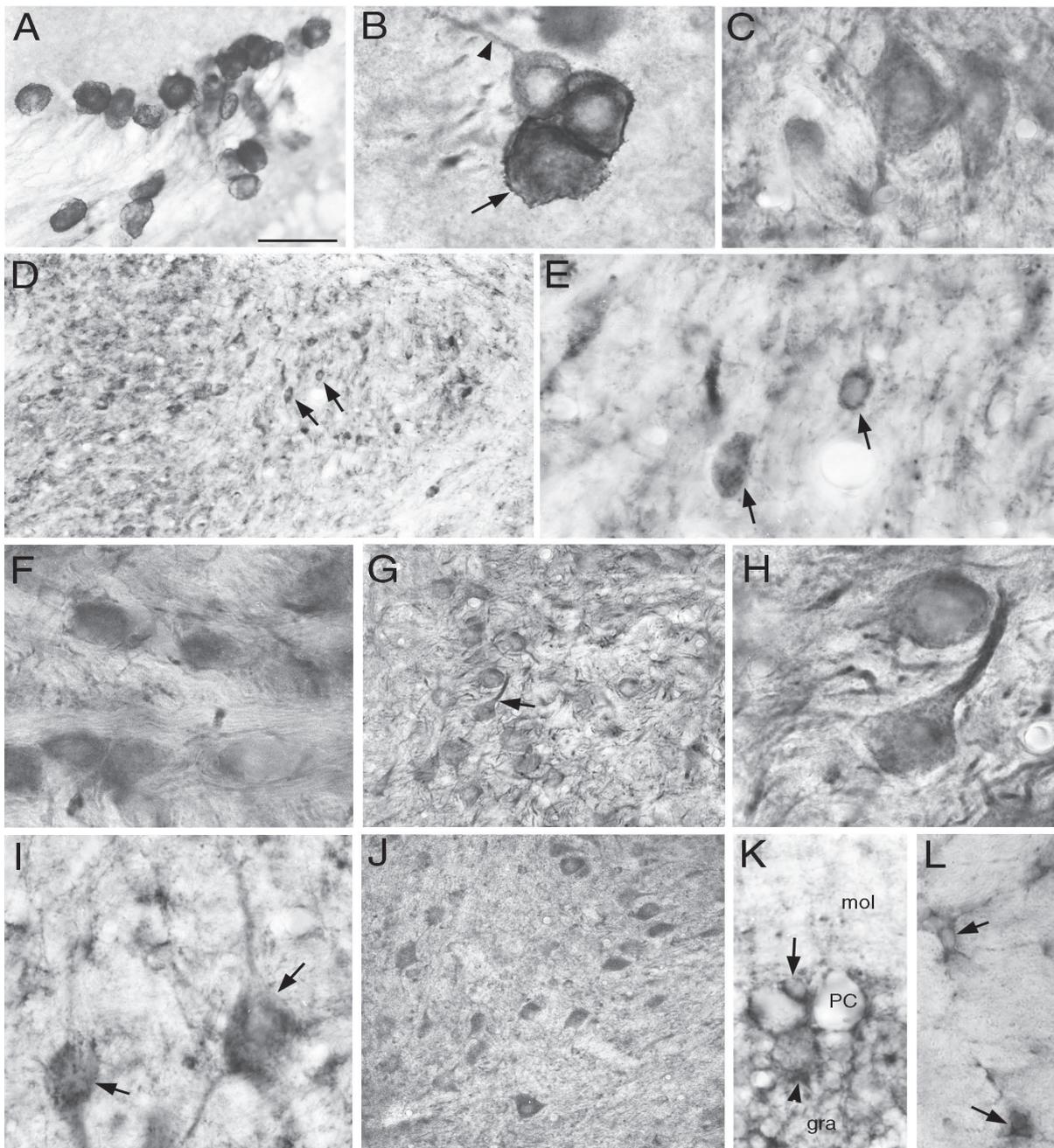


**Fig 18. A-I)** Localización inmunohistoquímica de SNAT2 en secciones del SNC de rata. Amplificaciones de las secciones sagitales (A,B) y coronales (C-I) incubadas con Ab12 (10  $\mu\text{g/ml}$ ) en presencia de 0.2% Triton X-100 y visualizadas mediante reacción con inmunoperoxidasa. En la sección B, las secciones fueron teñidas como en la sección A, pero el anticuerpo fue previamente preadsorbido con el antígeno. En A y en B, la solución de fijación contenía 4% de paraformaldehído y 0,2% de ácido pícrico. El ácido pícrico se suprimió en C-I. A, córtex auditivo; CA3, área CA3 del hipocampo; CB, cerebelo; CN, núcleo cerebellar; CPu, caudato/putamen; Cx, córtex; DG, giro dentado; DH, asta dorsal de la médula espinal; ER, área entorrinal; fi, fimbria; GP, globus pallidus; IC, colículo inferior; LL, núcleo del lemnisco lateral; LSO, oliva superior lateral; M, área motora; Me5, núcleo mesencefálico del trigémino; MG, núcleo medial geniculado; MM, área mamilar; Pir, área piriforme; Pn, núcleo pontino; PrV, núcleo sensorial principal del trigémino; S1, área somatosensorial primaria; S2, área somatosensorial secundaria; SN, sustancia negra; SO, complejo de la oliva superior; SuC, colículo superior; Thal, tálamo; V, área visual; VCN, núcleo ventral coclear; Ve, núcleo vestibular; VH, asta ventral de la médula espinal; 7, núcleo facial.

En concordancia con los trabajos previos sobre la distribución del mRNA por hibridación *in situ* y Northern blot (Yao et al., 2000), los mayores niveles de inmunoreactividad se detectaron en el cordón espinal y el tallo cerebral (fig. 18 A-C). En la médula espinal la tinción aparecía concentrada en la sustancia gris y se distribuía homogéneamente a través de las diferentes capas, aunque era ligeramente menos intensa en la capa 2, en el asta dorsal, y en la capa 10, alrededor del canal central (fig. 18 C). En el cerebelo, la tinción era de moderada a intensa en las capas molecular y granular y muy intensa en los núcleos cerebelosos profundos (fig. 18 D-E). En las regiones medulares, se observó tinción intensa en los núcleos vestibulares y los núcleos cocleares tanto dorsal como ventral (fig. 18 E). El núcleo espinal del trigémino y el núcleo facial mostraban inmunoreactividad de moderada a intensa, mientras que la tinción en otros núcleos medulares era débil. En la región del puente, se observó tinción intensa en el complejo de la oliva superior, especialmente en la oliva superior lateral (fig. 18 E). El núcleo lateral del lemnisco, el núcleo pontino y los núcleos motor y sensorial del trigémino tenían niveles de inmunoreactividad altos (fig. 18 F). En el mesencéfalo, el núcleo mesencefálico del trigémino era con diferencia la estructura con mayor grado de inmunoreactividad del sistema nervioso, pero debido a su pequeño tamaño, se aprecia con dificultad en este nivel de resolución (fig. 18 D). La tinción era intensa en el colículo inferior mientras que el colículo superior, el núcleo rojo y el área pretectal anterior, la inmunoreactividad era de moderada a intensa (fig. 18 G). En el diencefalo, la tinción era generalmente moderada aunque con alguna excepción. Así, se detectó inmunoreactividad de moderada a intensa en la región hipotalámica mamilar y en algunos de los núcleos talámicos como el núcleo anterodorsal (fig. 18 G-H). Dentro de los ganglios basales y las regiones asociadas se observó tinción moderada en el caudado-putamen, el globo pálido, y en la parte reticulada de la sustancia negra, mientras que en la parte compacta era de moderada a intensa (fig. 18 I). En el neocórtex, la inmunoreactividad fue en general de débil a moderada aunque más intensa en las capas II-III y V. La tinción fue de débil a moderada en el hipocampo, presentando mayor intensidad en el estrato lúcido (fig. 18 H).

#### **IV. 2. 2. 3. Distribución celular y subcelular de SNAT2 por microscopía óptica de alta resolución.**

A mayor resolución se observa que SNAT2 se acumula en los cuerpos celulares de las neuronas y sus procesos a lo largo de todo el cerebro. En el tallo cerebral, las neuronas sensoriales del núcleo mesencefálico del trigémino presentaban una inmunoreactividad muy fuerte (fig. 19 A y B). SNAT2 se detectada tanto en la membrana plasmática como el compartimento intracelular, que aparece decorado con un fino punteado. Estas células son pseudounipolares y su único proceso también es inmunoreactivo (fig. 19 D). Además, se tiñeron otras células del tallo cerebral como las del núcleo rojo (fig. 19 C), la oliva superior lateral (fig. 19 D-E), y el núcleo medial del cuerpo trapezoidal (fig. 19 F) o las células del núcleo gigantocelular de la formación reticular (fig. 19 I). En todos estos casos, se observaba un patrón punteado en el interior de los cuerpos celulares y las dendritas, aunque no estaba claro si la membrana plasmática era inmunoreactiva. En el neuropilo se detectaron numerosas estructuras tubulares marcadas que

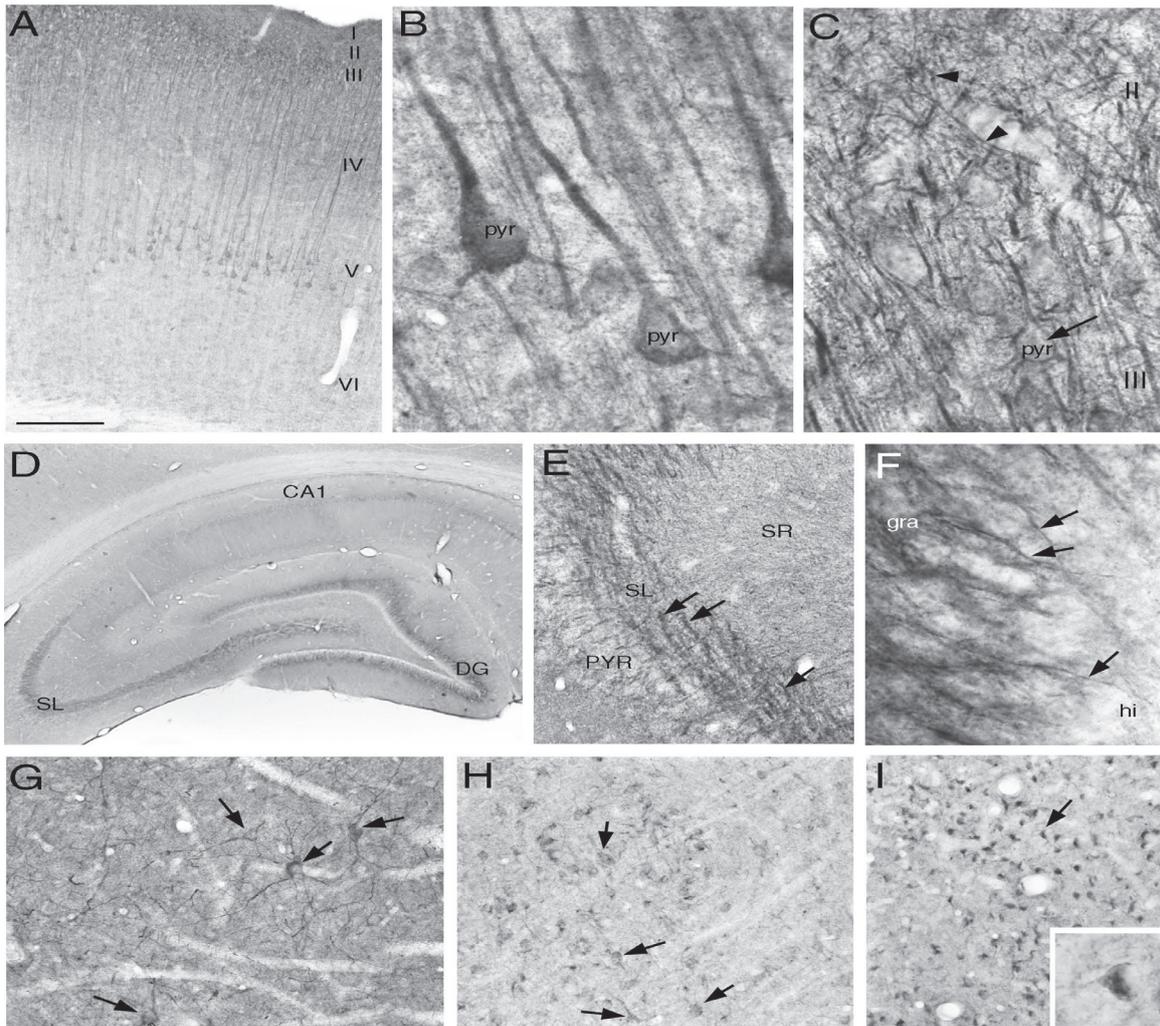


**Fig. 19.** A-L) Distribución celular de SNAT2 en el tallo cerebral de rata. Fotomicrografías obtenidas mediante microscopía de luz de alta resolución de las secciones en ausencia Tritón X-100. Los detalles corresponden a: **A-B**) núcleo mesencefálico del trigemino. Se aprecia inmunoreactividad en la membrana plasmática (flecha en B) y en el citoplasma. El único proceso de una neurona primaria sensorial también es inmunoreactivo (puntas de flecha en B). **C**) neuronas del núcleo rojo; **D-E**) oliva superior lateral. Las neuronas señaladas con flechas en D se han amplificado en E. **F**) Núcleo medio del cuerpo trapezoidal; (**G** y **H**) núcleo facial. La neurona señalada por una flecha se ha amplificado en H; **I**) neuronas gigantes (flechas) del núcleo reticular gigantocelular; **J**) núcleos cerebelosos; **K**) capa molecular (mol), capa granular (gra) y capa de células Purkinje (PC) del cerebelo. **L**) Dos astrocitos inmunoreactivos (flechas) en el cuerpo trapezoidal. Barras de escala 80  $\mu\text{m}$  para A, D, G y J; 20  $\mu\text{m}$  para B, C, E, F, H, K y L; 32  $\mu\text{m}$  para I.

podrían corresponder a axones (ver más abajo). En los núcleos motores como el facial (Fig. 19 G-H), el trigémino, el hipogloso o el asta ventral de la médula espinal (datos no mostrados) el soma de las motoneuronas se teñía de manera moderada mientras que en los procesos se detectaba una inmunoreactividad intensa. En la materia blanca del tallo cerebral se detectaron astrocitos que expresaban SNAT2 (fig. 19 L). En los núcleos cerebelosos se observó una tinción intensa en numerosos cuerpos neuronales mientras que el neuropilo la inmunoreactividad se localizaba en estructuras tubulares y punteadas (fig. 19 J). En las células granulares del cerebelo, se observaba una fina capa de tinción punteada intracelular alrededor de los núcleos celulares no marcados. En esta capa también se marcaban algunas células dispersas que probablemente correspondían a astrocitos (fig. 19 K). Las células de Purkinje no se tiñeron, mientras que los cuerpos celulares de la glía de Bergman, que se localizan próximos a la capa de las células de Purkinje, aparecían fuertemente marcados (fig. 19 K).

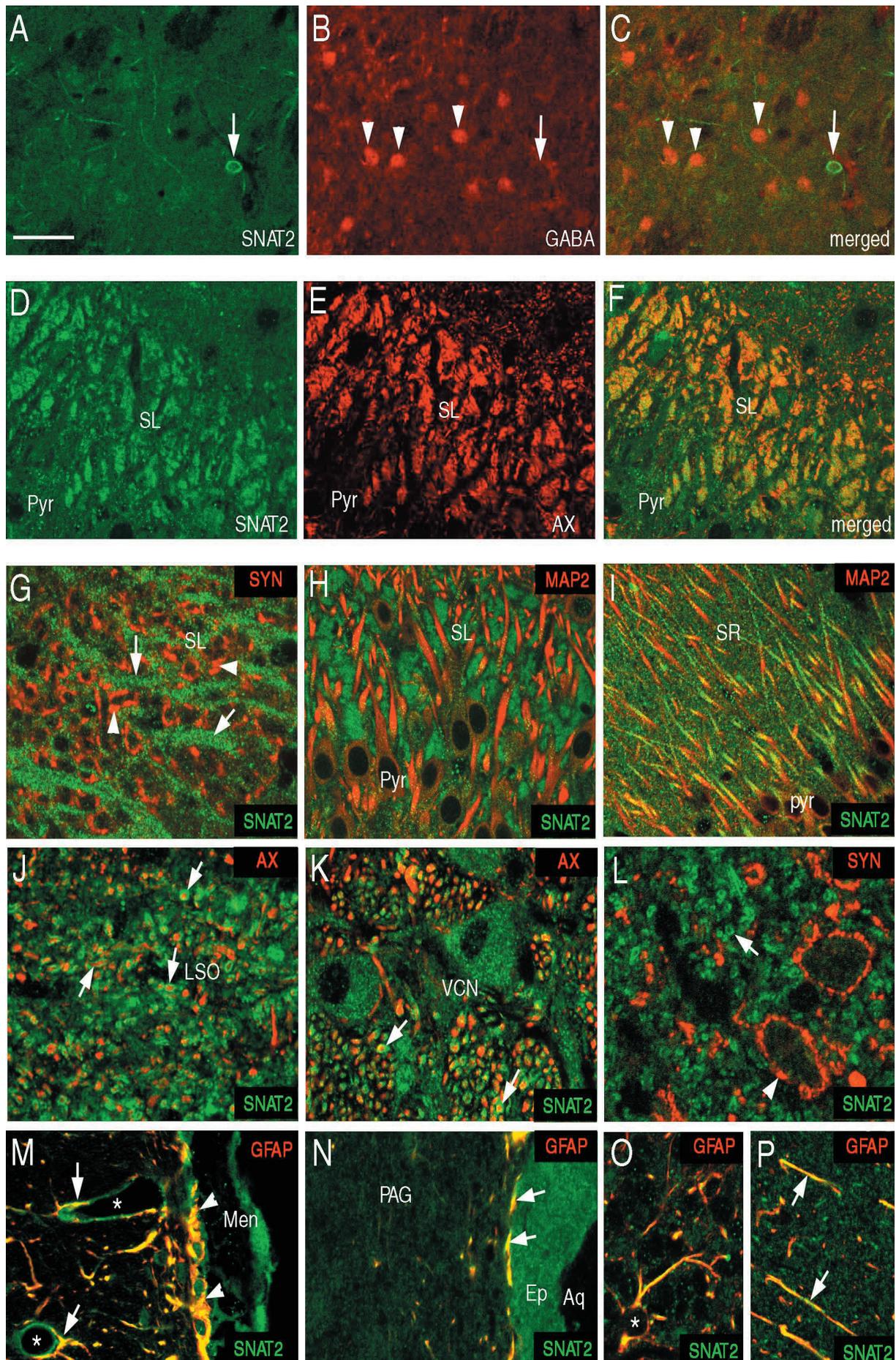
En el telencéfalo y diencefalo, la mayor parte de la inmunoreactividad se localizaba en los cuerpos neuronales y en las dendritas (fig. 20). Así, en el neocórtex, la tinción se observaba principalmente en el soma y las dendritas de las neuronas piramidales de la capa 5 (fig. 20A-B), mientras que algunas neuronas piramidales de la capa 3 también se marcaban (fig.). Sin embargo era difícil encontrar tinción para SNAT2 en neuronas no piramidales del neocórtex. El análisis cuantitativo de las secciones inmunoreactivas (10 secciones de dos animales, 100 micrografías) reveló que de 685 neuronas con inmunoreactividad elevada, sólo 28 (4,8%) no presentaban morfología piramidal. El patrón de tinción punteado en el compartimento intracelular era semejante al descrito en el tallo cerebral. La tinción de las neuronas de la corteza no se restringía a las dendritas principales sino que también se observaba en las arborizaciones de las capas más externas de la misma (fig. 20 C). A diferencia del neocórtex, la tinción más fuerte en el hipocampo no se observó en las dendritas sino en estructuras tubulares que recorren el estrato lúcido y que parecen corresponder a las fibras musgosas (axones de las neuronas granulares) (fig. 20 D-E). También aparecía marcado el tramo inicial de estos axones a la altura de la región hilar (fig. 20 F).

Si bien en el caudado-putamen y en el globo pálido había pocas neuronas que expresaran SNAT2, éstas tenían unos niveles de expresión muy elevados en los cuerpos celulares y en las dendritas que se extendían formando redes de estructuras tubulares a través del neuropilo (fig. 20 G). Además, en estas células, la membrana plasmática aparece claramente perfilada. En el tálamo, al igual que en el hipotálamo, la tinción celular era débil (fig. 20 H), a excepción del área mamilar, donde las células presentan un marcaje intracelular intenso, generalmente en un único polo de la célula (fig. 20 I).



**Fig. 20. A-I)** Distribución celular de SNAT2 en el telencéfalo y el diencefalo de rata. Fotomicrografías de las secciones en ausencia Tritón X-100. Los detalles corresponden a: **A)** capas I–VI del córtex; **B)** neuronas piramidales (Pyr) de la capa cortical V; **C)** neurona piramidal (pyr) (flecha) y arborizaciones dendríticas de neuronas inmunoreactivas en las capas corticales II–III (puntas de flecha); **D)** hipocampo y giro dentado; **E)** estrato piramidal (PYR), estrato lúcido (SL) y estrato radiado (SR) del hipocampo. La inmunoreactividad se concentra en estructuras tubulares en el SL (flechas). **F)** capa granular (gra) e hilo en el giro dentado. La inmunoreactividad se concentra en las fibras musgosas (flecha). **G)** Neuronas inmunoreactivas (flechas) en el caudado/putamen; **H)** neuronas con niveles bajos de inmunoreactividad (flechas) en el tálamo; **I)** neuronas inmunoreactivas en el núcleo mamilar medio. La neurona señalada con una flecha se muestra ampliificada en la esquina. Barras de escala 200  $\mu\text{m}$  para A; 20  $\mu\text{m}$  para B, C, E, F e I; 80  $\mu\text{m}$  para G, H y I; 400  $\mu\text{m}$  para D.

Muchas de las células con inmunorreactividad para SNAT2 que acabamos de describir usan glutamato como neurotransmisor. Se ha publicado recientemente que las neuronas glutamatérgicas también expresan el transportador SNAT1, y que SNAT1 también se expresa en las neuronas GABAérgicas. Para determinar si estas últimas también expresan SNAT2, hicimos un marcaje doble con anticuerpos anti-SNAT2 y anti-GABA. Sin embargo, los resultados no fueron enteramente concluyentes, ya que, aunque no detectamos colocalización, la introducción de glutaraldehído en la solución de fijación –necesario para detectar el GABA– produjo una importante disminución de la inmunorreactividad para SNAT2 (fig. 21 A-C).



**Fig. 21. A-P)** Estudio de colocalización de SNAT2 con marcadores gliales y neuronales. Micrografías obtenidas mediante microscopía confocal de secciones de cerebro de rata. Se realizó marcaje doble con anticuerpos anti-SNAT2 (fluorescencia verde) y uno de los siguientes marcadores (fluorescencia roja): GABA, neurofilamentos fosforilados como marcar axonal (AX), sinaptofisina como marcador de terminales nerviosos (SYN), MAP2 como marcador dendrítico (MAP2) y la proteína fibrilar glial ácida (GFAP) como marcador de células gliales. **A–C)** La inmunoreactividad para SNAT2 en neuronas del estriado (flechas) no colocaliza con GABA (cabezas de flecha). C es la fusión de las imágenes A y B. **D–F)** SNAT2 y los neurofilamentos fosforilados (AX) colocalizan en los cortes transversales de las fibras musgosas en el estrato lúcido del hipocampo. F es la fusión de las imágenes D y E. En G-F se muestran sólo las imágenes fusionadas. **G)** SNAT2 (verde) en cortes longitudinales de las fibras musgosas (flechas) no colocaliza con sinaptofisina (rojo) que señala los terminales (flechas). **H)** SNAT2 (verde) y el marcador dendrítico (rojo) no colocaliza en CA3. **I)** Las dendritas en CA1 presentan inmunoreactividad para SNAT2 (verde) y MAP2 (rojo). En la oliva superior lateral **J)** y en el núcleo coclear ventral **K)** anti-SNAT2 (verde) está presente en los axones (flechas) identificados por la inmunoreactividad de los neurofilamentos fosforilados (AX). **L)** SNAT2 (verde) y sinaptofisina no colocalizan en la oliva superior lateral. **M)** SNAT2 (verde) y GFAP (rojo) colocalizan (amarillo) en la glia limitans (puntas de flecha) y en astrocitos (flechas) que rodean vasos sanguíneos (asterisco). La inmunoreactividad para SNAT2 se aprecia también en las meninges (Men). **N)** En la sustancia gris periacueductal (PAG), SNAT2 (verde) y GFAP (rojo) también colocaliza en la glia subependimal (flechas). Se aprecia inmunoreactividad en la capa endotelial (Ep) rodeando el acueducto (Aq). **O)** Un astrocito (asterisco) inmunoreactivo para SNAT2 y GFAP en la capa granular del cerebelo. **P)** Fibras radiales de la glia de Bergmann inmunoreactivas para SNAT2 y GFAP. Barras de escala: 54  $\mu\text{m}$  para A–C; 35  $\mu\text{m}$  D–F, H y I; 22  $\mu\text{m}$  para G y L; 20  $\mu\text{m}$  para J and K; 33  $\mu\text{m}$  para M; 21  $\mu\text{m}$  para N; 19  $\mu\text{m}$  para O y P.

Para confirmar la naturaleza de las estructuras tubulares y punteadas inmunoreactivas que acabamos de describir, comparamos la expresión de SNAT2 con la de algunos marcadores celulares (axonales, dendríticos y gliales) utilizando técnicas de doble inmunofluorescencia y microscopía confocal. Así observamos que en el estrato lúcido del hipocampo SNAT2 colocalizaba con los neurofilamentos fosforilados, un marcador axonal, lo que confirmaba que estas estructuras tubulares son axones. Es de destacar que las varicosidades y los terminales de las fibras musgosas no se marcaron, ya que no obtuvimos ninguna evidencia de colocalización con sinaptofisina, un marcador de terminales nerviosas (fig. 21 D-F). El análisis cuantitativo mediante el programa Metamorph de la colocalización entre SNAT2 y sinaptofisina en las imágenes de diversas regiones del cerebro hace que esta observación se pueda generalizar: el análisis de 80 campos correspondientes a secciones de la corteza y del tallo cerebral mostró que de los 188.425 puntos inmunoreactivos contados para sinaptofisina, sólo 1735 (0,92%) coexpresaban SNAT2.

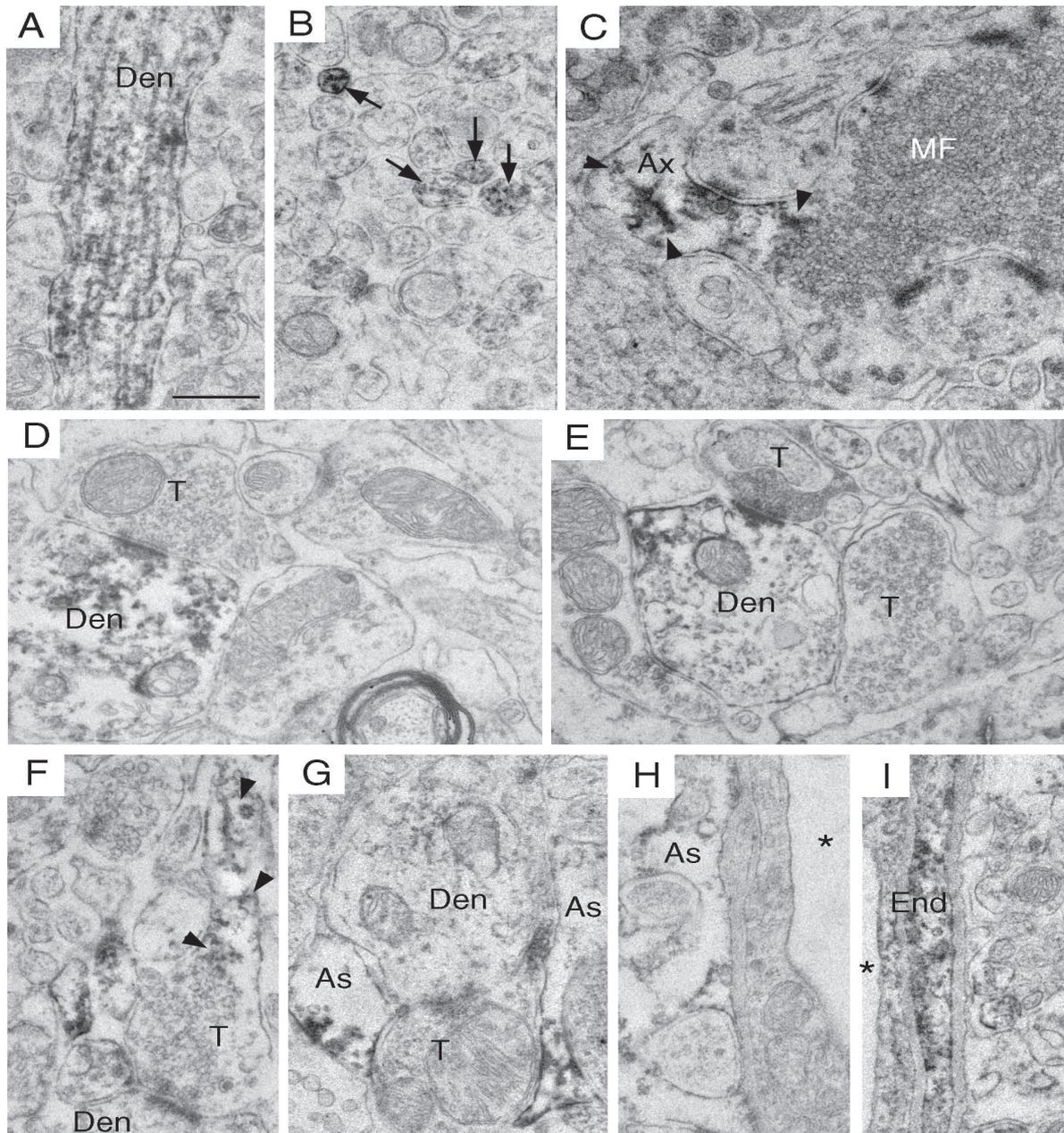
En cuanto a la localización en dendritas, a diferencia de lo que se ha mencionado más arriba para las neuronas piramidales de la corteza, las dendritas de las neuronas piramidales del área CA3 del hipocampo, identificadas por el marcador MAP2, no contenían SNAT2 (fig. 21 H). Sin embargo, en CA1 (Fig. 21 I) y en el subículo (no mostrado) SNAT2 se observaba en las dendritas de las células piramidales, aunque en niveles más bajos que en la corteza. En aquellas dendritas que han sido seccionadas de manera oblicua se puede observar que SNAT2 se encontraba en las proximidades de la membrana plasmática y estaba ausente en el núcleo central donde se localiza a MAP2 (fig. 21, I).

Las fibras musgosas del hipocampo no constituyen los únicos axones inmunoreactivos ya que, además, se observaron niveles elevados de SNAT2 en axones del tallo cerebral, por ejemplo, en la oliva superior lateral (fig. 21 I) o en el núcleo coclear ventral (fig. 21 K). Como en las dendritas, SNAT2 aparece asociado a la región externa del axón rodeando al núcleo central de neurofilamentos fosforilados. De manera análoga a lo que ocurre en las fibras musgosas, SNAT2 tampoco colocalizaba con sinaptofisina en estas regiones del cerebro de rata (fig. 21 J). La tinción axonal en el cerebro anterior fue relativamente débil, aunque se observó algún axón inmunoreactivo en la sustancia blanca del cuerpo calloso, en la fimbria o en la comisura anterior (datos no mostrados). Por último, para confirmar la expresión glial de SNAT2 comparamos la distribución de SNAT2 con la del marcador glial GFAP, observándose colocalización en las capas más externas e internas del cerebro. Así, se encontraron niveles elevados de SNAT2 que colocalizaban con GFAP en los pies terminales de los astrocitos que rodean a los vasos sanguíneos y en la glía limitans que subyace a las leptomeninges (fig. 21 M). También se apreciaba un fuerte marcaje en los astrocitos que subyacen a la capa de células ependimales en la sustancia gris periacueductal (fig. 21 N). En general, la inmunoreactividad detectada en los astrocitos del parénquima cerebral fue débil con la excepción del cerebelo, en donde los cuerpos celulares de los astrocitos de la capa granular sí se teñían de manera intensa (fig. 21 O), así como las fibras de la glía de Bergman en la capa molecular (fig. 21 P). También se observó tinción en otras estructuras no neuronales como las leptomeninges, el epitelio ependimal y vascular (fig. 21 M-N), así como el plexo coroideo (datos no mostrados).

#### **IV. 2. 2. 4. Análisis ultraestructural de la distribución de SNAT2.**

Ya que varias de las estructuras de menor tamaño no se podían identificar con certeza mediante microscopía óptica, analizamos la distribución de SNAT2 en secciones de hipocampo, córtex y colículo inferior mediante microscopía electrónica. En todas las regiones analizadas, la inmunoreactividad se encontró dentro de dendritas grandes (fig. 22 A) y pequeñas que en ocasiones formaban sinapsis asimétricas con terminales no inmunorreactivos (fig. 22). La inmunoreactividad siempre se apreciaba en la cara interna de la membrana plasmática y depositada sobre estructuras intracelulares. En el estrato lúcido del hipocampo, la inmunoreactividad se detectó en axones no mielinizados que probablemente correspondan a las fibras musgosas ya que estaban densamente empaquetados (fig. 22 B). La señal inmunoreactiva se extendía a lo largo del axón pero, en consonancia con las observaciones realizadas en el microscopio confocal, SNAT2 era excluido sistemáticamente de los terminales de las fibras musgosas (fig. 22 C). Este patrón de vainas axonales teñidas pero terminales no teñidos también se observó en el colículo inferior (fig. 22 D-F).

Los perfiles astrocíticos se teñieron, en general, de manera menos intensa y frecuente que los perfiles neuronales. Sin embargo, en ocasiones, encontramos perfiles inmunorreactivos que rodeaban estructuras sinápticas (fig. 22 G). SNAT2 también está presente en los pies terminales que rodean los vasos sanguíneos y en el epitelio endotelial (fig. 22 H-I).



**Fig. 22. A-I)** Fotomicrografías obtenidas mediante microscopía electrónica de la tinción con anticuerpos anti- SNAT2. **A)** Corte longitudinal de una dendrita (Den) inmunoreactiva en el córtex. **B)** Corte transversal de axones inmunoreactivos (flechas) en un grupo de fibras musgosas en el estrato lúcido de CA3. **C)** Se aprecian depósitos inmunoreactivos (cabezas de flecha) en el axón (Ax) pero no dentro de los terminales de las fibras musgosas (MF). **D-E)** Perfiles inmunoreactivos en los que se observan sinápsis asimétricas en el colículo inferior. **F)** Los depósitos inmunoreactivos se concentran a lo largo del axón (punteado de flecha) pero no penetran en los terminales (T) que establecen sinápsis asimétricas con una dendrita en el colículo inferior. **G)** Perfiles astrocíticos inmunoreactivos para SNAT2 (As) en el colículo inferior rodeando una sinapsis asimétrica, donde la dendrita postsináptica también es inmunoreactiva. **H)** Pie terminal de un astrocito inmunoreactivo rodeando un vaso sanguíneo (asterisco). **I)** Los acúmulos de producto inmunoreactivo se detectan en las células endoteliales (End) alrededor del lumen de los vasos sanguíneos (asterisco). Barras de escala: 0.5  $\mu\text{m}$  para A, B, D, E, G-I; 0.4  $\mu\text{m}$  para C y F.

## **II PARTE: ESTUDIOS SOBRE LA LOCALIZACIÓN Y EL TRÁFICO DEL TRANSPORTADOR DE GLUTAMATO GLT1.**

El transportador de glutamato GLT1 es responsable de hasta el 90 % del transporte de glutamato en el cerebro, por lo que se trata de una proteína de extraordinaria importancia dadas las funciones en las que interviene el glutamato. Si bien las propiedades de la isoforma inicialmente descrita GLT1a han sido objeto de un número importante de estudios, éste no es el caso para la isoforma GLT1b, que había sido descrita en el año 2002, poco antes del inicio de esta Tesis. Por tanto, como parte de nuestro interés en el conocimiento de los sistemas de transporte de las sinapsis glutamatérgicas, decidimos realizar estudios sobre el tráfico y la localización de esta proteína en cerebro.

### **IV. 3. ANCLAJE DE GLT1b EN LA MEMBRANA PLASMÁTICA**

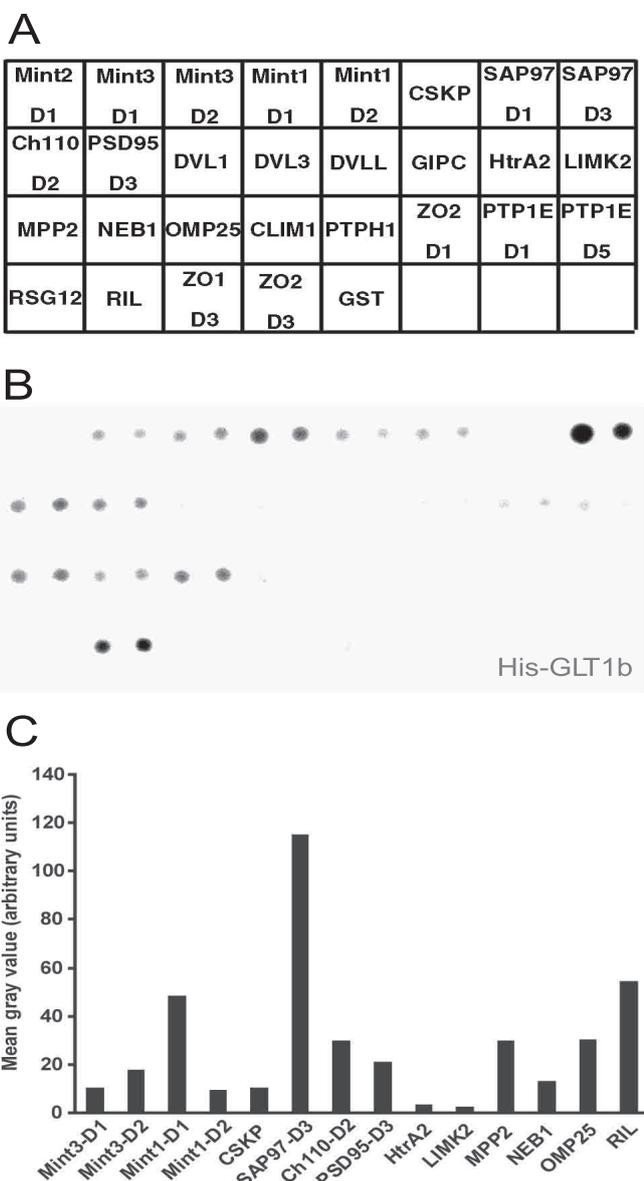
#### **IV. 3. 1. Búsqueda de proteínas que interaccionan con GLT1b.**

La isoforma GLT1b deriva del procesamiento alternativo del transcrito primario del gen GLT1 (SLC1A2), e introduce en el extremo carboxilo de la proteína un motivo consenso de interacción con dominios PDZ que no existe en la isoforma GLT1a. Esto nos llevó a plantear una búsqueda de proteínas con dominios PDZ que pudieran interaccionar con GLT1b, puesto que este tipo de proteínas suelen jugar papeles importantes en los procesos de tráfico y localización celular de las proteínas con las que interaccionan. Para ello se estudió la capacidad de un péptido derivado del extremo carboxilo de GLT1b para unirse de manera específica a una serie de dominios PDZ inmovilizados sobre una membrana de material sintético. Estos dominios PDZ habían sido depositados por el fabricante de la membrana de una manera ordenada en pequeñas manchas por duplicado (ver mapa en Fig. 23 A) y se correspondían a proteínas de fusión de dominios PDZ de diversas proteínas con GST. Para poder detectar la unión de GLT1bCt, al extremo amino de este péptido le fusionamos mediante técnicas de DNA recombinante un epítipo de histidinas fácilmente detectable con anticuerpos contra el mismo por detección quimioluminiscente. La proteína se expresó en *E. coli*, y un lisado de estas bacterias se incubó con la membrana. La reacción más fuerte se produjo con el dominio PDZIII de SAP97 (Fig. 23 B y cuantificación densitométrica en 23 C). También se observó reacción con el segundo dominio de la chapsina-110 y con el único dominio de MMP2. Se observaron interacciones más débiles con miembros de la familia Mint (Mint 1 y Mint3), así como con las proteínas RIL y OMOP25. Había una interacción débil con el tercer dominio PDZ de PSD-95, una proteína importante en la organización de las sinapsis glutamatérgicas que posee otros dos dominios PDZ que no estaban representados en esta membrana.

En una aproximación independiente para la búsqueda de proteínas que pudieran interaccionar con GLT1b en el SNC, incubamos un extracto de sinaptosomas de cerebro de rata con un “array” o matriz de 400 anticuerpos. Estos anticuerpos inmovilizados de manera ordenada sobre una membrana inerte reconocen a otras tantas proteínas involucradas en las vías de transducción

de señales (ver la lista en [www.hypromatrix.com](http://www.hypromatrix.com)). Esta técnica precisa el desarrollo previo de un anticuerpo específico contra el transportador (ver apartado IV) así como el acoplamiento de biotina en la región Fc del anticuerpo (ver materiales y métodos).

El extracto solubilizado de cerebro de rata se incubó con el array de anticuerpos siguiendo las instrucciones del fabricante. Las proteínas del solubilizado que estuvieran incluidas en algún complejo macromolecular que contuviera GLT1b y que fueran reconocidas por alguno de los anticuerpos presentes en el array serían retenidas en la correspondiente mancha de anticuerpo y, con ellas quedaría también retenido GLT1b. Después de lavar para eliminar el material no unido, los complejos que contenían GLT1b se detectaron mediante la incubación de la membrana con el anti-GLT1b biotinilado seguido de visualización con estreptavidina acoplada a peroxidasa y el sistema de detección ECL. Este anticuerpo anti-GLT1b produjo inmunotinción en algunas de las manchas del array y entre ellas la que correspondía a PSD-95 (fig. 24). Puesto que, como ya hemos comentado, PSD-95 juega un importante papel en la organización de las sinapsis glutamatérgicas, decidimos investigar en profundidad la posible interacción de GLT1b con esta proteína de anclaje.

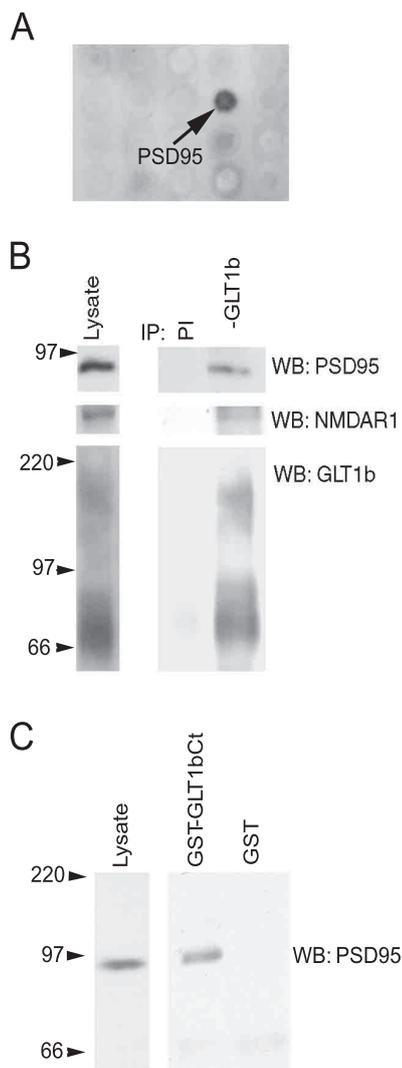


**Fig. 23. A-B)** Unión del C-terminal de GLT1b a una matriz de dominios PDZ inmovilizados. **A)** Un extracto celular de *E. coli* transformados con el vector de expresión para His-GLT1ct se incubó con el array dominios PDZ fusionados a GST e inmovilizados por duplicado en una membrana sintética, como se indica en el esquema A. **B)** El His-GLT1ct unido a la membrana se reveló utilizando anticuerpos anti-6xHis Tagydetección quimioluminiscente (ECL). **C)** La intensidad de los puntos se cuantificó mediante análisis densitométrico de las autoradiografías.

### IV. 3. 2. GLT1b interacciona con PSD95.

Para obtener evidencias adicionales de la interacción entre GLT1b y PSD95 en el cerebro se realizaron experimentos de inmunoprecipitación y ensayos de *pull-down* en homogeneizados de cerebro de rata. En consonancia con los resultados del “array”, el antisuero específico contra GLT1b, pero no el suero preinmune, era capaz de inmunoprecipitar complejos proteicos que contenían a PSD95 de los extractos de cerebro de rata (fig. 24 B). Es de destacar que los complejos inmunoprecipitados también contenían inmunorreactividad para los receptores de glutamato del tipo NMDA, hecho que pudimos comprobar al reprobar las inmunotransferencias con anticuerpos que detectan a la subunidad NR1 del receptor NMDA (fig. 24 B).

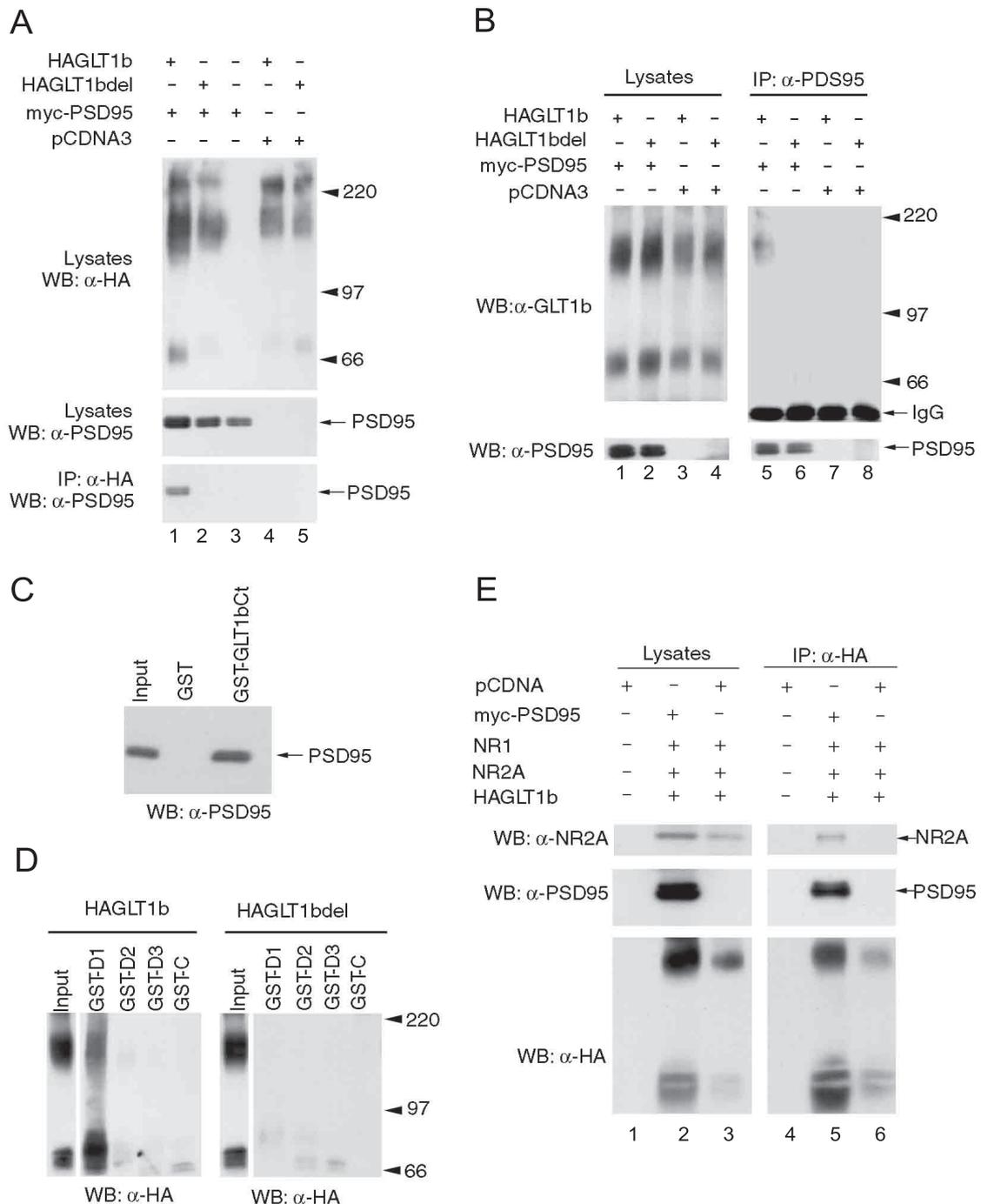
Para comprobar si la interacción entre GLT1b y PSD95 ocurre a través del extremo carboxilo de GLT1b realizamos un ensayo de unión específica denominado de *pull-down*. Para ello se utilizó una proteína de fusión que contenía los 74 aminoácidos del extremo carboxilo terminal de GLT1b fusionados a GST (GST-GLT1bCt). La proteína de fusión GST-GLT1bCt inmovilizada en bolas de glutation-sefarosa era capaz de precipitar a PSD95 en un homogeneizado de cerebro de rata con mayor afinidad que la proteína control GST (fig. 24 C).



**Fig. 24. A-C) GLT1b interacciona con PSD95 en el cerebro de rata. A)** Una sección del array de anticuerpos. Este array se incubó con un extracto solubilizado de sinaptosomas de rata. Los complejos proteicos cuyos componentes son reconocidos por los anticuerpos inmobilizados en el array se visualizaron con el anticuerpo anti-GLT1b biotinilado seguido de la detección quimioluminiscente de este anticuerpo (ECL). Los puntos señalados con flechas presentan inmunoreactividad para PSD-95. **B)** Coimmunoprecipitación de GLT1b, PSD-95 Y NMDAR en cerebro de rata. Se inmunoprecipitaron extractos solubilizados de cerebro anterior de rata (carriles 1, 2) con anticuerpos anti-GLT1b ( $\alpha$ GLT1b), o con suero preinmune (PI). Los inmunoprecipitados se resolvieron mediante SDS-PAGE e inmunotransferencia y se incubaron con anticuerpos anti-PSD95, anti-NR1 o anti-GLT1b como se indica en la figura. La detección de los anticuerpos unidos se realizó mediante quimioluminiscencia (ECL). **C)** Ensayo de *Pull-down* en extractos solubilizados de cerebro de rata. Los homogeneizados de cerebro de rata solubilizados en RIPA se incubaron con una proteína de fusión con GST que contenía el extremo C-terminal de GLT1b o GST solo como control. Las proteínas unidas a las proteínas de fusión se aislaron mediante incubación con esferas de glutation-sefarosa y se analizaron mediante inmunotransferencia con anticuerpos anti-PSD-95. Los lisados representan un 2% del total del extracto usado en este ensayo.

### IV. 3. 3. Caracterización de la interacción entre PSD95 y GLT1.

Para analizar el mecanismo molecular que subyace a la interacción entre GLT1 y PSD95, llevamos a cabo estudios de inmunoprecipitación en células COS7 transfectadas con myc-PSD95 y HA-GLT1b, o un mutante truncado de GLT1b (HA-GLT1b~~del~~) al que suprimimos los cuatro aminoácidos del extremo carboxilo terminal (ETCI), en las combinaciones indicadas en la figura 25 A. Myc-PSD95 se detectó en el material inmunoprecipitado con anticuerpos anti-HA sólo cuando se coexpresaba con la forma nativa de HAGLT1b (fig. 25 A panel inferior, carril 1). Por el contrario, cuando el mutante de delección se inmunoprecipitaron con anticuerpos anti-HA, no se detectó myc-PSD95 en el inmunoprecipitado (fig. 25 A, panel inferior, carril 2).



**Fig. 25. A-E)** GLT1b, PSD-95 y NMDAR se interaccionan en un sistema heterólogo. **A)** Co-immunoprecipitación de GLT1b y PSD-95. Se transfectaron células COS7 con vectores de expresión para HAGLT1b o el mutante de delección HAGLT1b $\Delta$  y/o myc-PSD-95, en las combinaciones indicadas en la figura. El transportador se inmunoprecipitó con anticuerpos anti-HA y las proteínas inmunoprecipitadas se analizaron mediante SDS-PAGE e inmunotransferencia. Los lisados se analizaron con anticuerpos anti-HA y anti-PSD-95 como control de la eficiencia de transfección. **B)** Las células COS7 se transfectaron con vectores de expresión para las proteínas indicadas en la figura y se inmunoprecipitaron con anticuerpos anti-PSD-95. Los inmunoprecipitados y los lisados se analizaron con anticuerpos anti-HA, o anti-PSD-95. **C)** Ensayo de *Pull-down* en extractos solubilizados de células COS7 transfectadas con vectores de expresión para myc-PSD-95. Las proteínas solubilizadas se incubaron con GST-GLT1bCT o GST (control). Las proteínas unidas a la proteína de fusión se aislaron mediante incubación con esferas de glutation-sefarosa y se analizaron mediante inmunotransferencia con anticuerpos anti-PSD-95. **D)** Ensayo de *Pull-down* en extractos de células COS7 transfectadas con vectores de expresión para HAGLT1b. Las proteínas solubilizadas se incubaron con proteínas de fusión con GST que contenían los dominios PDZ 1, 2 ó 3 de PSD-95 (GST-D1, GST-D2 y GST-D3, respectivamente) o GST (control). Las proteínas unidas a la proteína de fusión se analizaron como se ha indicado arriba, usando anticuerpos anti-HA. **E)** La interacción entre HAGLT1b y NMDAR ocurre a través de PSD-95. Se transfectaron células COS7 con los vectores de expresión indicados en la figura. Tras la inmunoprecipitación con anticuerpos anti-HA, la interacción entre HAGLT1b, PSD-95 y NMDAR se evaluó con anticuerpos anti-HA, anti-PSD-95 y anti-NR2A. Destacar que la presencia de PSD-95 influye en la cantidad de GLT1b y NR2A detectados en los lisados (carril 2). NR2A sólo coimmunoprecipita con GLT1b en presencia de PSD95 (carril 5). Los resultados mostrados son representativos de tres experimentos independientes.

De manera recíproca, los complejos que contienen a GLT1b y myc-PSD95 fueron inmunoprecipitados con anticuerpos comerciales anti-PSD95 (fig. 25 B, carril 5). La interacción fue suprimida tras la delección del C-terminal de GLT1b (fig. 25 B, carril 6).

La importancia de los aminoácidos del extremo carboxilo terminal se confirmó en los ensayos de *pull-down*. La proteína de fusión GST-GLT1bCt fue capaz de precipitar a PSD95 desde un extracto de células COS7 transfectadas con myc-PSD95 (fig. 25 C). Por el contrario el control (GST solo) fue incapaz de capturar a myc-PSD95 de los mismos extractos solubilizados (fig. 25 C).

En conjunto, estos ensayos demuestran que la interacción entre GLT1b y PSD95 está mediada por residuos del extremo carboxilo terminal de GLT1b.

#### **IV. 3. 4. Determinación de los dominios PDZ de PSD95 que intervienen en la interacción con GLT1b.**

El motivo TCI presente en el extremo carboxilo terminal de GLT1b corresponde a un motivo consenso de interacción con dominios PDZ de clase I. Por su parte, PSD95 presenta tres dominios PDZ en su extremo amino terminal, dos corresponden a dominios de clase I y el tercero a dominios de clase III; tales dominios establecen interacciones diferenciales y específicas con diversas proteínas del SNC. Para poder determinar cuál de los dominios PDZ de PSD95 mediaba la interacción con GLT1b generamos construcciones que permitían la expresión de cada uno de los dominios PDZ (PDZ1, PDZ2 y PDZ3) por separado fusionados a GST (GST-PDZ1, GST-PDZ2 y GST-PDZ3). Estas proteínas unidas a esferas de glutation

sefarosa se incubaron con extractos solubilizados de células COS7 previamente transfectadas con HA-GLT1b, HA-GLT1b $\Delta$ el o con el vector vacío. Como muestra la figura 25 D, HA-GLT1b fue precipitada por el primer dominio de clase I de PSD95 (GST-PDZ1) mientras que los restantes dominios (GST-PDZ2 y GST-PDZ3) parecen no interactuar con GLT1b (panel izquierdo). El mutante truncado de GLT1b (HA-GLT1b $\Delta$ el) fue incapaz de interactuar con cualquiera de los dominios PDZ de PSD95 (fig. 25 D, panel derecho), lo que confirma la especificidad de esta interacción. No se detectó inmunoreacción en el experimento control realizado con los extractos solubilizados de COS7 transfectadas con el vector vacío (datos no mostrados).

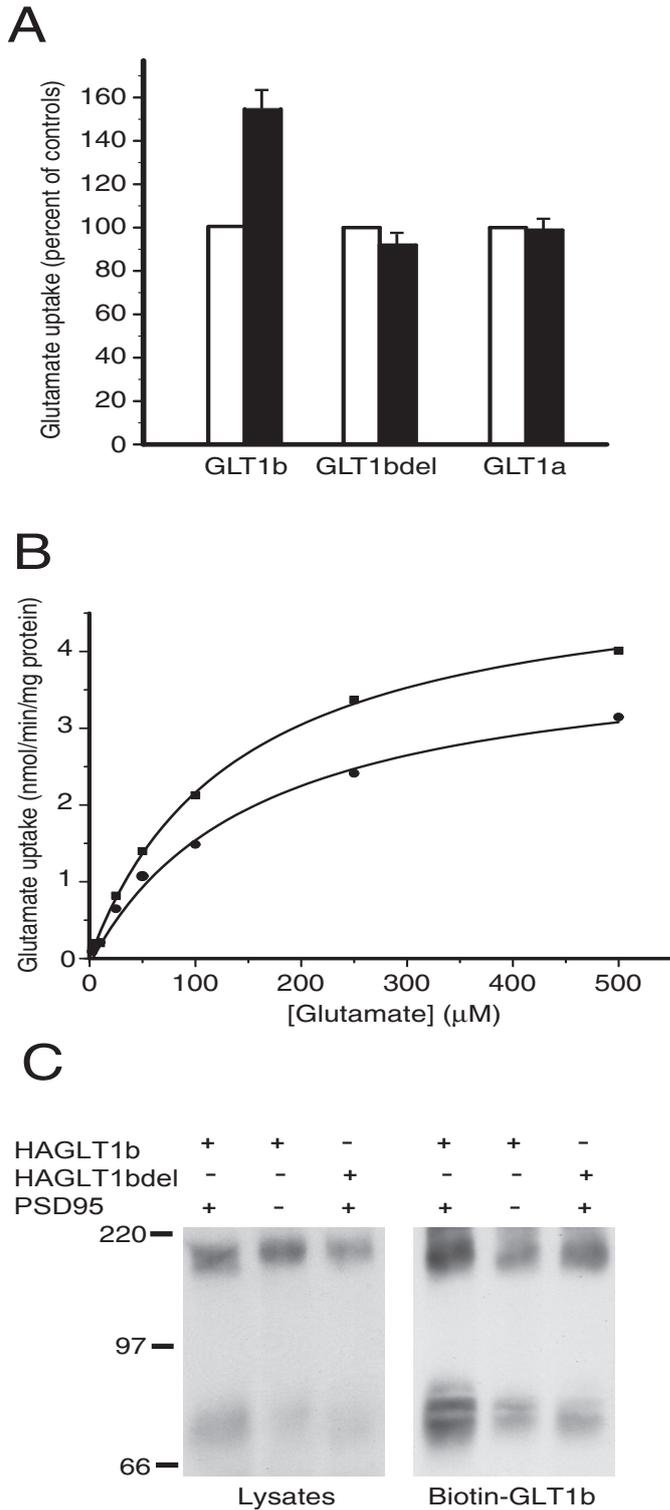
En conjunto, estos experimentos muestran que la interacción entre GLT1b y PSD95 detectada en el cerebro de rata esta mediada por la interacción específica entre el motivo consenso del extremo C-terminal de GLT1b y el primer dominio PDZ de PSD95.

#### **IV. 3. 5. PSD95 forma un puente entre GLT1b y NMDAr.**

La presencia de el receptor de NMDA en los inmunoprecipitados obtenidos a partir de cerebro de rata con anticuerpos anti-GLT1b sugiere o bien que existe una interacción directa entre GLT1b y el receptor o bien que la interacción es indirecta y está mediada por una tercera proteína, PSD95. Para estudiar esta posibilidad, se cotransfectaron vectores de expresión para HA-GLT1b, NMDAr (NR1 y NR2A) en presencia y en ausencia de myc-PSD95 seguido de inmunoprecipitación con anticuerpos anti-HA. El análisis de las inmunotransferencias reveló que NMDAr (detectado con anticuerpos anti-NR2A o anti-NR1) estaba presente en el inmunoprecipitado sólo cuando el transportador y el receptor se coexpresaban con PSD95 (fig. 25 E, carril 5), lo que supone una interacción indirecta entre GLT1b y el receptor de NMDA mediada por PSD95.

#### **IV. 3. 6. PSD95 incrementa la actividad de transporte de GLT1b.**

Los posibles efectos funcionales de la interacción descrita entre GLT1b y PSD95 fueron investigados midiendo la incorporación de [<sup>3</sup>H]-glutamato en células COS7 transfectadas. La coexpresión de GLT1b y PSD95 produjo un incremento significativo de la actividad del transportador sobre el transporte medido en ausencia de PSD95 (fig. 26 A). Como control se comprobó que tal efecto no obedeciese a diferencias en la eficiencia de transfección mediante cotransfección con  $\beta$ -galactosidasa y posterior ensayo colorimétrico de esta proteína en los diferentes extractos (datos no mostrados).



**Fig. 26. A-C)** La sobreexpresión de PSD-95 incrementa la actividad de GLT1b así como la cantidad de proteína presente en la membrana plasmática de células COS7 cotransfectadas. **A)** El transporte de  $[^3\text{H}]$ Glutamato se midió, como se indica en materiales y métodos, en células transfectadas con GLT1b, GLT1bdel o GLT1a en ausencia (barras vacías) o presencia del vector de expresión para *myc*-PSD-95 (barras llenas). Los datos representados comprenden la media de tres experimentos diferentes con triplicados de cada situación. **B)** El análisis cinético del transporte de  $[^3\text{H}]$ Glutamato en células transfectadas con GLT1b (círculos llenos) o GLT1b y PSD-95 (cuadrados llenos). **C)** La expresión de PSD95 aumenta la cantidad de GLT1b en la membrana plasmática. Los experimentos de biotinylación se realizaron en células COS7 que expresan HAGLT1b o HAGLT1bdel sólo o en combinación con *myc*-PSD95. Después de la biotinylación, las proteínas marcadas se aislaron con estreptavidina inmovilizada y las muestras se analizaron mediante inmunotransferencia con anticuerpos anti-HA. Los resultados mostrados son representativos de tres experimentos independientes.

Comprobamos además que el efecto funcional es dependiente de la presencia del C-terminal intacto de GLT1b, ya que ni el mutante GLT1bdel ni la isoforma GLT1a mostraron incremento en el transporte al ser coexpresados con PSD95 (fig). El análisis de la cinética del transportador reveló que la coexpresión con PSD95 produce un incremento de la  $V_{\text{max}}$  del 38% pero no afecta de manera significativa a la constante de Michaelis ( $K_M$  103  $\mu\text{M}$  y 116  $\mu\text{M}$  respectivamente), lo que sugiere un incremento en el número de transportadores en la membrana plasmática (fig. 26 B).

#### **IV. 3. 7. PSD95 promueve el aumento de la densidad de transportador en la membrana plasmática.**

Para comprobar que el aumento de la  $V_{max}$  de GLT1b se debe realmente a un aumento de la cantidad de transportador en la membrana plasmática se realizaron ensayos de biotilación de las proteínas de la superficie celular. En estos experimentos se usó Sulfo-NHS-SS-biotina, un reactivo que se une a los grupos amino libres de proteínas y, puesto que la membrana es impermeable al mismo, marca las proteínas de la superficie celular pero no las intracelulares. Las proteínas de membrana marcadas con Sulfo-NHS-SS-biotina se precipitaron con estreptavidina unida a partículas de sefarosa y se analizaron mediante inmunotransferencia usando anticuerpos anti-HA. Los resultados indican que la expresión de HAGLTb, pero no la de HAGLT1b $\Delta$ el, se incrementa en la membrana plasmática cuando el transportador se coexpresa con PSD95 (fig. 26 C). En conjunto, estas observaciones sugieren que la interacción mediada por PDZ incrementa la actividad de transporte de GLT1b mediante el aumento del número de transportadores funcionales en la membrana celular.

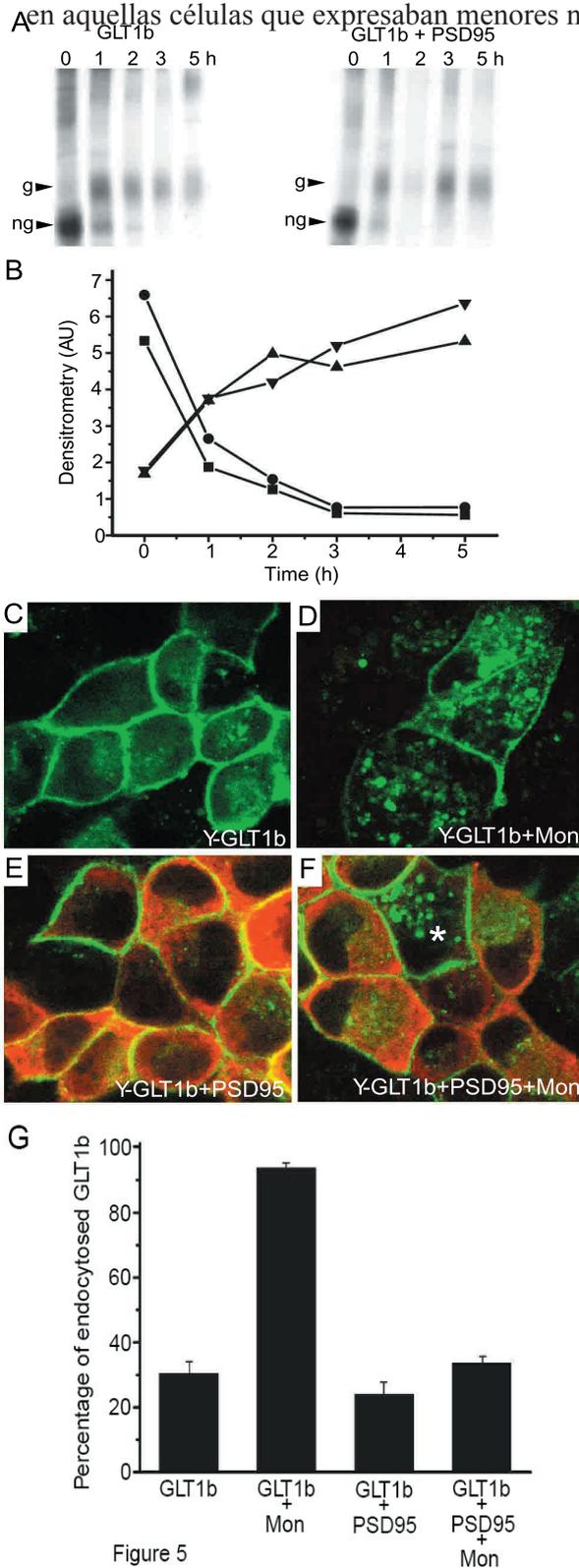
#### **IV. 3. 8. La coexpresión con PSD95 no altera la inserción de GLT1b en la membrana.**

El aumento de densidad de GLT1b en la membrana plasmática observado en presencia de PSD95 podría deberse a un reclutamiento más eficiente de los transportadores a la membrana plasmática, a una interferencia en el mecanismo de eliminación del transportador en la membrana plasmática o a la combinación de ambos mecanismos. Para investigar este punto, primero, medimos la velocidad de maduración de GLT1b mediante experimentos de marcaje metabólico por pulso y caza (fig. 27 A). Tras 30 minutos de pulso con una mezcla de [ $^{35}$ S]metionina-cisteína, la proteína fue sometida a diferentes tiempos de caza con medio fresco (0 a 5 horas), inmunoprecipitada y analizada por autorradiografía. Al inicio de la caza, la proteína aparece principalmente como una forma inmadura de 55 kDa que en el transcurso de 1h madura hasta alcanzar la forma madura de 70 kDa. Esta banda presumiblemente corresponde al transportador presente en la membrana plasmática. Sin embargo, la presencia de PSD95 no alteraba significativamente la velocidad de maduración de GLT1b (fig. 27 A-B). De manera consistente con esta interpretación, PSD95 no alteró la velocidad de aparición de la proteína madura en la membrana plasmática en experimentos diseñados para marcar con biotina la proteína [ $^{35}$ S]GLT1b incorporada de novo (datos no mostrados).

#### **IV. 3. 9. La coexpresión con PSD95 inhibe la endocitosis de GLT1b.**

Puesto que el tráfico hacia la membrana de GLT1b no parecía afectarse por PSD95, procedimos a determinar su posible influencia sobre la internalización del transportador. Para este fin, llevamos a cabo experimentos en presencia del ionóforo monensina que inhibe el tráfico de proteínas de membrana a través de vesículas de tráfico ácidas. Este tratamiento bloquea el reciclaje de proteínas de la membrana plasmática y promueve su acumulación en los endosomas.

El tratamiento con una concentración no tóxica de monensina (10  $\mu$ M) en células MDCK transfectadas transitoriamente con YFP-GLT1b durante 30 minutos promovió la acumulación del transportador en estructuras vesiculares endosomales, acompañado de una disminución paralela en la cantidad de transportador presente en la superficie celular (fig. 27 D). Este proceso se retrasó considerablemente en células que expresaban PSD95 (Fig. 27 F) y sólo se apreciaba en aquellas células que expresaban menores niveles de PSD95 (asterisco en fig. 27 F).



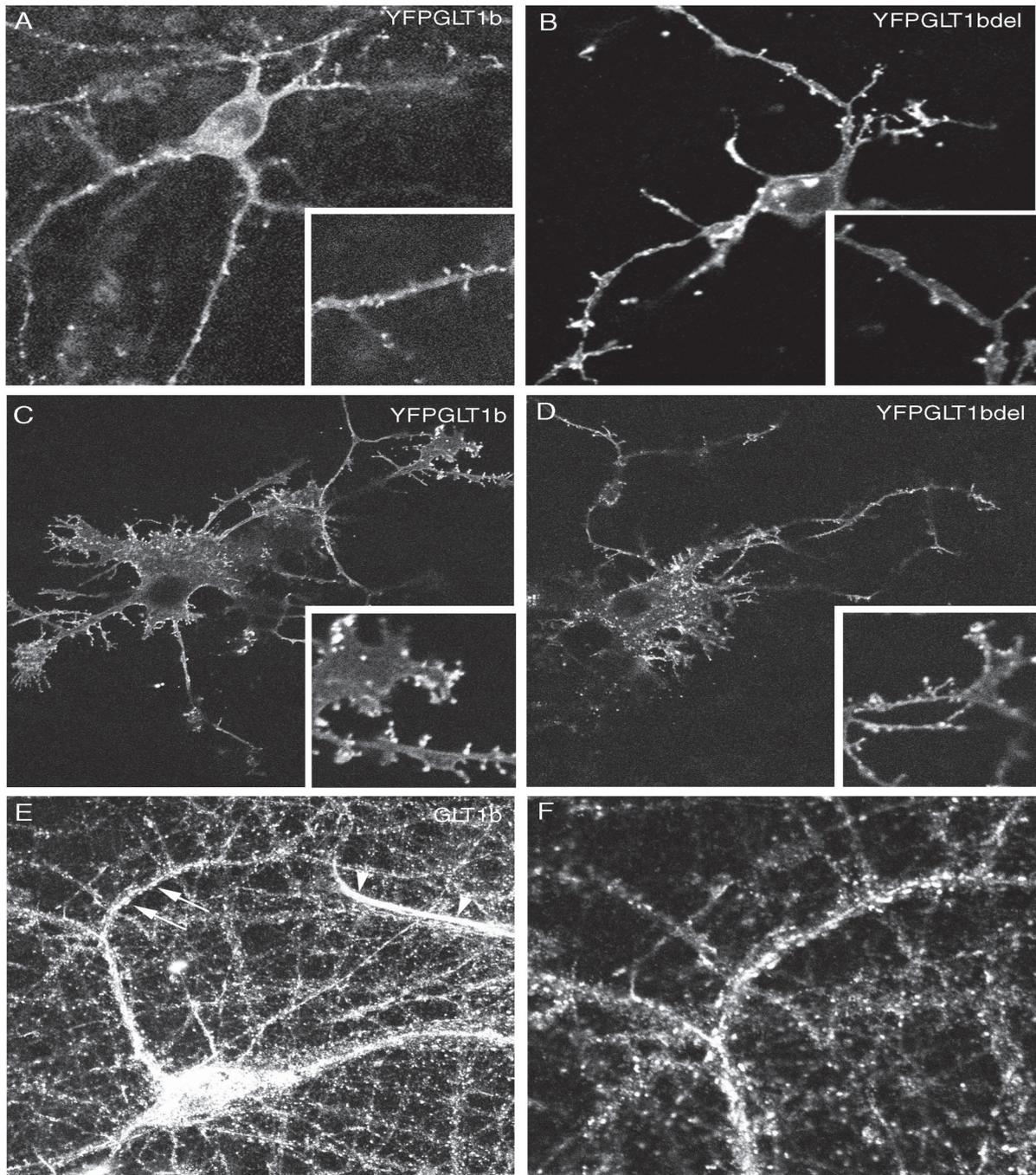
**Fig. 27. A-G)** Efecto de PSD95 sobre la maduración y endocitosis de GLT1b. **A)** Células COS7 transfectadas con GLT1b (panel izquierdo) ó con GLT1b plus PSD95 (panel derecho) se incubaron durante 30 min con una mezcla de [<sup>35</sup>]metionina-cisteína. Las células se lavaron y se añadió medio frío para la incubación durante los tiempos indicados, antes de proceder a la lisis celular. Las muestras se inmunoprecipitaron con anticuerpos anti-HA. Las proteínas inmunoprecipitadas se analizaron mediante electroforesis y exposición autoradiográfica del gel deshidratado. Se observan bandas que corresponden a intermediarios biosintéticos poco glicosilados (ng) y bandas que corresponden a la proteína GLT1b madura glicosilada (g). **B)** La densitometría de las bandas que corresponden a ngGLT1b y gGLT1b en ausencia y presencia de PSD95. En ausencia de PSD95, los símbolos corresponden a ngGLT1b (●) y gGLT1b (▲), mientras que la presencia de PSD95, los símbolos corresponden a ngGLT1b (■) and gGLT1b (▼). **C-F)** Análisis del efecto de PSD95 sobre la endocitosis de GLT1b mediante inmunofluorescencia. Se transfectoron células MDCK con YFP-GLT1b (C y D) o con YFP-GLT1b plus PSD-95 (E y F) se incubaron en ausencia (C y E) ó en presencia de (D y F) monensina (10 $\mu$ M) durante 30 min a 37°C. Las células se fijaron y se incubaron con anticuerpos anti-PSD95. Destacar que en ausencia de monensina la mayor parte de la proteína se internalizó en endosomas, mientras que la presencia de PSD95 bloqueó la endocitosis en la mayoría de las células, aunque se observa endocitosis en aquellas células que expresan niveles bajos de PSD95 (asterisco en F). **G)** El efecto de PSD95 sobre la endocitosis de GLT1b se determinó mediante un ensayo de biotilación. Las células COS7 se transfectoron con las construcciones indicadas. La proteína presente en la superficie de las células se marcó con el reactivo impermeable sulfonhiss-SS-Biotina durante 30 min a 4°C para prevenir la endocitosis de la proteína unida a biotina. Las células se devolvieron al incubador donde se mantuvieron durante 45 min a 37°C en ausencia o presencia de monensina. Después, la proteína que permanecía en la superficie celular se trató con MESNA y las células se lisaron. La proteína biotinilada se aisló con esferas de estreptavidina y se cuantificó la cantidad de GLT1b presente en el inmunotransferencia con anticuerpos anti-HA. Las barras representan la desviación de la media entre tres experimentos diferentes y los valores corresponden al porcentaje de proteína marcada que fue endocitada.

Para obtener una estimación cuantitativa de este efecto realizamos experimentos de endocitosis de HAGLT1b utilizando una técnica de biotilación reversible de las proteínas de membrana. Las proteínas de la superficie celular se marcaron utilizando de nuevo el reactivo impermeable NHS-SS-biotina a una temperatura no permisiva para la endocitosis del transportador (4°C). Posteriormente las células se incubaron a 37°C, temperatura a la cual se reanuda el proceso de endocitosis, durante periodos de 45 minutos en ausencia y presencia del ionóforo monensina. A continuación las células se expusieron a la acción del reactivo impermeable MesNa que promueve la disociación del puente disulfuro de NHS-SS-biotina y, por tanto, elimina la marca sobre la proteína no endocitada que aún está presente en la superficie de la célula. Por último se procedió a la lisis celular y al aislamiento de la proteína biotilada, es decir la endocitada, mediante incubación de los lisados con estreptavidina-sefarosa. La cantidad de HA-GLT1b endocitado se cuantificó mediante inmunotransferencia con anticuerpos anti-HA y densitometría de las películas fotográficas. Los datos se han representado como tanto por ciento de HAGLT1b endocitado respecto al total de transportador inicialmente marcado (tiempo 0 de incubación a 37°), tras restar el tanto por ciento de proteína que permanecía marcada tras la acción del MesNa a tiempo 0 de incubación a 37°C (blanco del experimento). Como se desprende de los histogramas de la figura 27 G la endocitosis resulta fuertemente estimulada por la monensina en ausencia de PSD95, mientras que en su presencia hay un bloqueo significativo del proceso de internalización. En conjunto, estos experimentos indican que el aumento de la cantidad de GLT1b en la membrana plasmática observado en presencia de PSD95 se debe a una estabilización del transportador en la misma al disminuir su velocidad de endocitosis.

#### **IV. 3. 10. Interacción de GLT1b y PSD95 en cultivos primarios:**

##### **La localización específica de GLT1b en cultivos primarios no depende del ETCI terminal.**

Para investigar si GLT1b y PSD95 eran capaces de interactuar en el ambiente celular proporcionado por las células del sistema nervioso central, se estudió la distribución subcelular de estas proteínas expresadas tanto mediante transfección como expresadas de manera endógena en cultivos primarios de neuronas. Para estudiar la distribución del transportador transfectado, los cultivos primarios de neuronas de corteza (2 semanas *in vitro*) se transfectaron con YFP-GLT1b solo o en combinación con myc-PSD95 y su distribución se analizó 72 horas después. La mayoría de las células transfectadas en el cultivo eran células gliales, mientras que las neuronas mostraron una eficiencia de transfección con YFP-GLT1b muy baja. De hecho, la eficiencia de transfección de las neuronas con PSD95 era unas 50 veces más alta bajo las mismas condiciones experimentales, lo que sugiere que la sobreexpresión del transportador de glutamato es tóxica para las neuronas. Sin embargo, las neuronas que expresaban bajos niveles del YFP-GLT1b tenían una apariencia saludable. En ellas, YFP-GLT1b tenía una clara tendencia a acumularse en puntos a lo largo de las dendritas y que morfológicamente parecen espinas dendríticas (fig. 28 A). Sin embargo, la formación de “clusters” o acúmulos parece ser independiente de la interacción con dominios PDZ ya que el mutante truncado YFP-GLT1b<sub>del</sub> se localiza en clusters que también

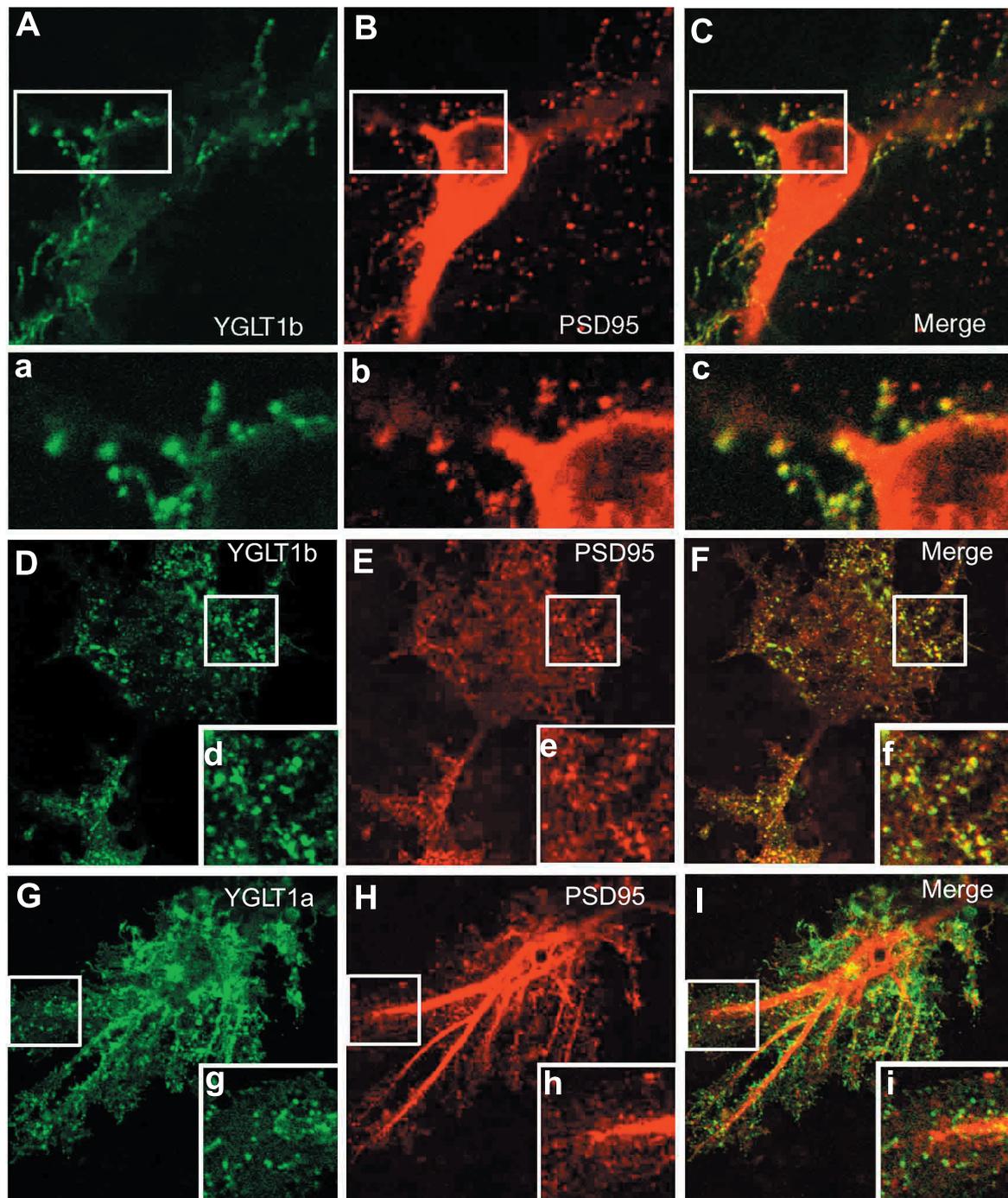


**Fig. 28. A-F)** Expresión de GLT1b transfectado y endógeno en cultivos primarios de neuronas. Los cultivos primarios de neuronas de corteza se mantenían en cultivo durante 15 días antes de ser transfectados transitoriamente con YFP-GLT1b (A, C) o YFP-GLT1b $\Delta$ del (B, D). Tres días después, los cultivos se fijaban y se analizaba la expresión y distribución de GLT1b mediante microscopía confocal. A y B corresponden a neuronas transfectadas, mientras que C y D corresponden a astrocitos transfectados, que fueron identificados con el marcador astrocítico GFAP (no se muestran estas imágenes). Las ampliaciones en a-d corresponden a las células mostradas en A-D, respectivamente, sin embargo, en a y f las ampliaciones mostradas corresponden a planos focales que no se observan en A y F, respectivamente. **E y F)** Cultivo primario de corteza de rata fijado a 18DIV, tras la tinción con anticuerpos anti-GLT1b (1:500), los cultivos se incubaron con el anticuerpo secundario acoplado a un fluoróforo (Alexa-594). D corresponde a una ampliación de C.

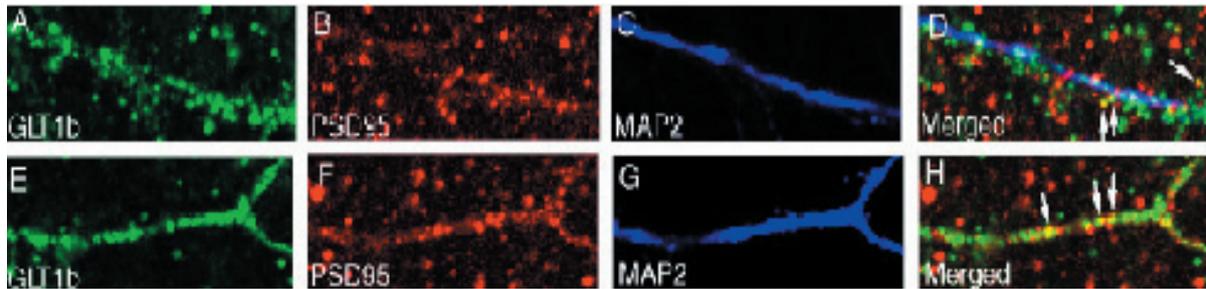
parecen corresponderse a espinas dendríticas (fig. 28 B). Esta localización se observa también para el GLT1b endógeno en neuronas primarias teñidas mediante inmunofluorescencia con el anticuerpo anti-GLT1b (fig. 28 E y F). De manera similar a lo que ocurre en neuronas, YFP-GLT1b expresado solo en células gliales transfectadas forman acúmulos sobre los procesos astrocíticos (fig. 28 C), una propiedad que ha sido previamente descrita para GLT1a (Zhou et al. 2004) y que sugiere que la formación de clusters en las células gliales no es dependiente de la interacción con proteínas PDZ. En consonancia con esta posibilidad el mutante truncado YFP-GLT1del también formaba clusters en las células gliales transfectadas que no parecían diferir de los formados por YFP-GLT1b (fig. 28 D).

#### **IV. 3. 11. GLT1b y PSD95 colocalizan en cultivos primarios.**

El siguiente paso fue investigar el efecto de la coexpresión de PSD95 sobre la distribución del transportador. En neuronas transfectadas, PSD95 y YFP-GLT1b colocalizan en las espinas dendríticas (fig. 29). La coexpresión de GLT1b con PSD95 no produjo alteración observable en los patrones de distribución del transportador (fig. 29 A-C y ampliación a-c). De manera similar, en células gliales cotransfectadas con YFP-GLT1b y myc-PSD95 ambas proteínas colocalizaban de manera extensa en “clusters” o acúmulos localizados sobre la superficie de la célula glial (fig. 29 D-F ampliación d-f). Respecto a GLT1a la situación es distinta, ya que si bien YFPGLT1a forma “clusters”, en la membrana plasmática, estos no colocalizan con PSD95 (fig. 29 G-I y ampliación g-i). Estas observaciones confirman la capacidad de GLT1b para interactuar con PSD95 en el contexto celular proporcionado por las células gliales mientras que en neuronas ambas proteínas tienen la potencialidad de interactuar ya que colocalizan en las espinas. Estas observaciones pueden extenderse a la proteína expresada de manera endógena. Así, los experimentos de microscopía confocal realizados para visualizar la localización de GLT1b y PSD95 endógeno revelaron que ambas proteínas se coexpresan en numerosos puntos a lo largo de las dendritas de las neuronas primarias (fig. 30 A-H). Sin embargo, los experimentos de colocalización se llevaron a cabo en condiciones subóptimas para la inmunodetección de PSD95 ya que procedimiento de fijación requerido para visualizar ambas proteínas simultáneamente no es el óptimo para PSD95.



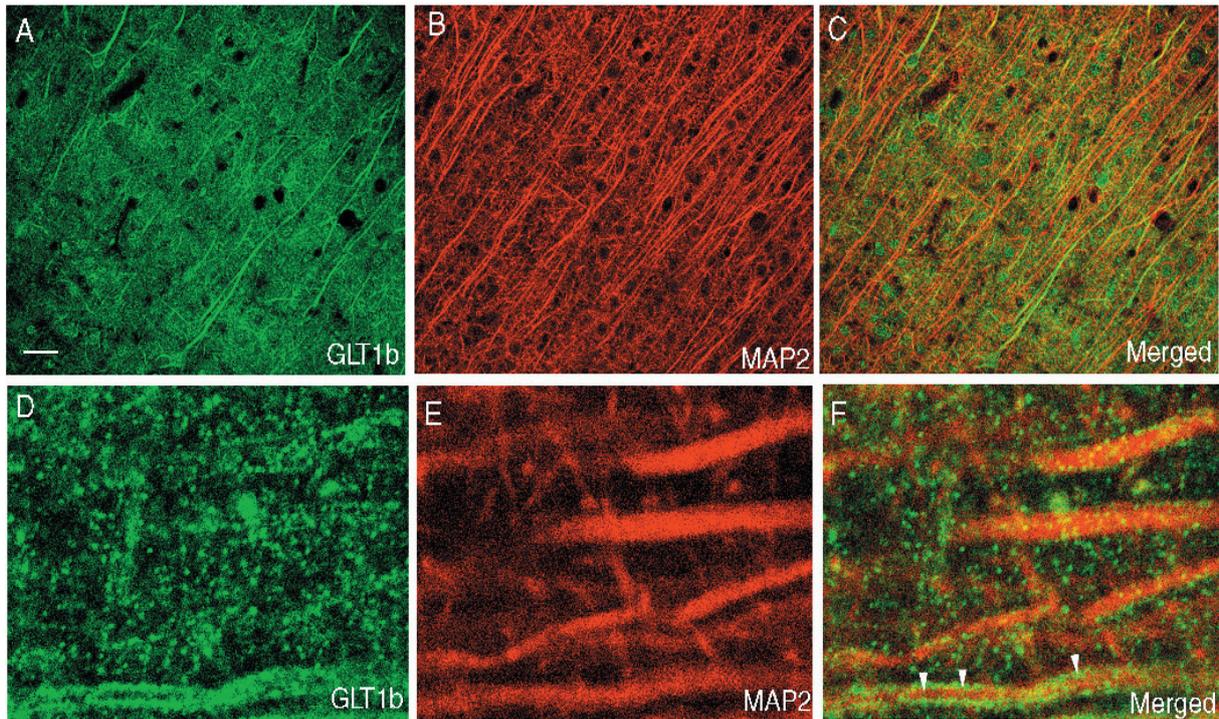
**Fig. 29.** A-F) Colocalización de GLT1 y PSD-95 en cultivos primarios transfectados. Los cultivos primarios de corteza se transfectaron a 15DIV con vectores de expresión para YFPGLT1b plus myc-PSD-95 (A-F) ó YFPGLT1a plus PSD-95 (G-I). Tres días después, las células se fijaron y tiñeron con anti-PSD-95 (rojo) y se analizaron mediante microscopía confocal. YFP-GLT1b y PSD-95 colocalizan en espinas y en filopodios de las neuronas cotransfectadas que se muestran en A-C y en las ampliaciones a-c. Los “clusters” o acúmulos de YFP-GLT1b y PSD-95 también colocalizan en los astrocitos cotransfectados mostrados en D-F y en las ampliaciones d-f. Sin embargo, los acúmulos de YFP-GLT1a sólo colocalizan ocasionalmente con PSD-95 en los astrocitos mostrados en G-I y en las ampliaciones g-i.



**Fig. 30. A-H)** Colocalización de GLUT1b y PSD-95 endógeno en cultivos primarios de corteza de rata. Los cultivos primarios de corteza (18DIV) se incubaron con anticuerpos anti-GLT1b (conejo), anti-PSD-95 (ratón) y anti-MAP2 (pollo) como marcador dendrítico. Los anticuerpos secundarios fueron Alexa-488 anti-conejo (verde) y Alexa 594 anti-ratón (rojo) y Alexa 697 anti-pollo (azul). GLUT1b y PSD95 colocalizan en algunas estructuras dendríticas (amarillo en las imágenes fundidas D y H, marcado con flechas)

#### **IV. 3. 12. GLUT1b se expresa en dendritas y en astrocitos del cerebro de rata.**

Para investigar si GLUT1b y PSD95 colocalizan en el cerebro de rata, realizamos experimentos de inmunohistoquímica. La limitación sobre el procedimiento de fijación adecuado para la visualización de ambas proteínas se hizo más evidente en tejido, por lo que no pudimos hacer experimentos de colocalización. No obstante, a pesar de esta limitación técnica, analizamos la distribución de GLUT1b usando microscopía confocal y electrónica. La microscopía confocal se llevó a cabo usando secciones de cerebro teñidas con el anticuerpo anti-GLT1b y el marcador dendrítico MAP2. El marcaje más prominente se encontró en las regiones frontales del córtex aunque otras áreas del cerebro, tales como la región posterior del córtex, el hipocampo, el estriado o las regiones talámicas e hipotalámicas mostraron una señal más débil (datos no mostrados). En el córtex anterior, una subpoblación de neuronas piramidales presentó una fuerte inmunoreactividad en sus árboles dendríticos (fig. 31 A-F). La observación con mayor resolución de estas neuronas reveló que la inmunoreactividad se concentra en la superficie de las dendritas principales así como en numerosos puntos distribuidos a lo largo del neuropilo (fig. 31 L-N). Estos puntos sin embargo parecen estar excluidos de los terminales presinápticos pues no hubo colocalización con el marcador sinaptofisina (datos no mostrados).



**Fig. 31 A-F).** Colocalización de la inmunoreactividad para GLT1a y GLT1b en la corteza cerebral. Las secciones de cerebro de rata se incubaron con anti-GLT1a producido en cobaya, anti-GLT1b producido en conejo y anti-neurofilamentos producido en ratón. A continuación se incubaron con los correspondientes anticuerpos secundarios conjugados a Alexa 488, 594 y 647, respectivamente. Las secciones se visualizaron en un microscopio confocal y corresponden a la capa III de la corteza. El color amarillo en la imagen fundida corresponde a colocalización de GLT1a y GLT1b. Barra de escal: 3 $\mu$ m y 50  $\mu$ m en A-C.

Debido al pequeño tamaño de estas estructuras que no puede resolverse adecuadamente mediante microscopía confocal, analizamos la distribución de GLT1b mediante microscopía electrónica. La inmunoreactividad para GLT1b se localizó en el interior de dendritas grandes y pequeñas, y frecuentemente en espinas que forman sinapsis asimétricas con terminales no marcados (fig. 32). En consistencia con la localización intracelular de los epitopos C-terminales de GLT1b, la inmunoreactividad era más aparente en la cara interna de la membrana plasmática y en estructuras intracelulares.

También se detectaron perfiles astrocíticos inmunoreactivos y en ocasiones rodeando las estructuras sinápticas (fig. 32 G). De la misma manera, GLT1b también estaba presente en los pies terminales alrededor de los vasos sanguíneos (fig. 32 I). Las evidencias inmunohistoquímicas apuntan a que *in vivo* GLT1b se localiza en astrocitos y en elementos neuronales, entre estos, principalmente en las dendritas y en las espinas dendríticas. Tal localización hace compatible su interacción con la proteína de anclaje PSD95.

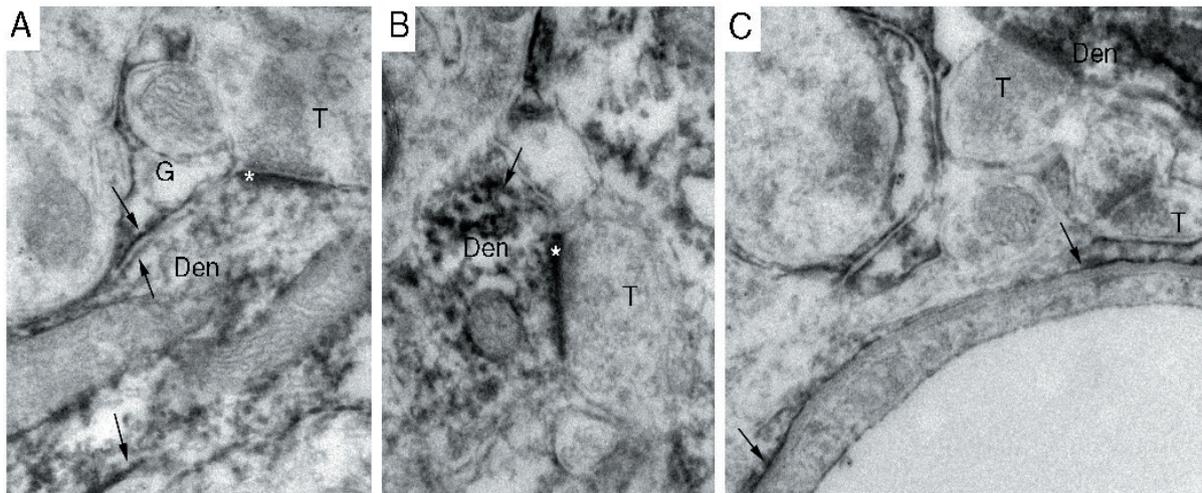


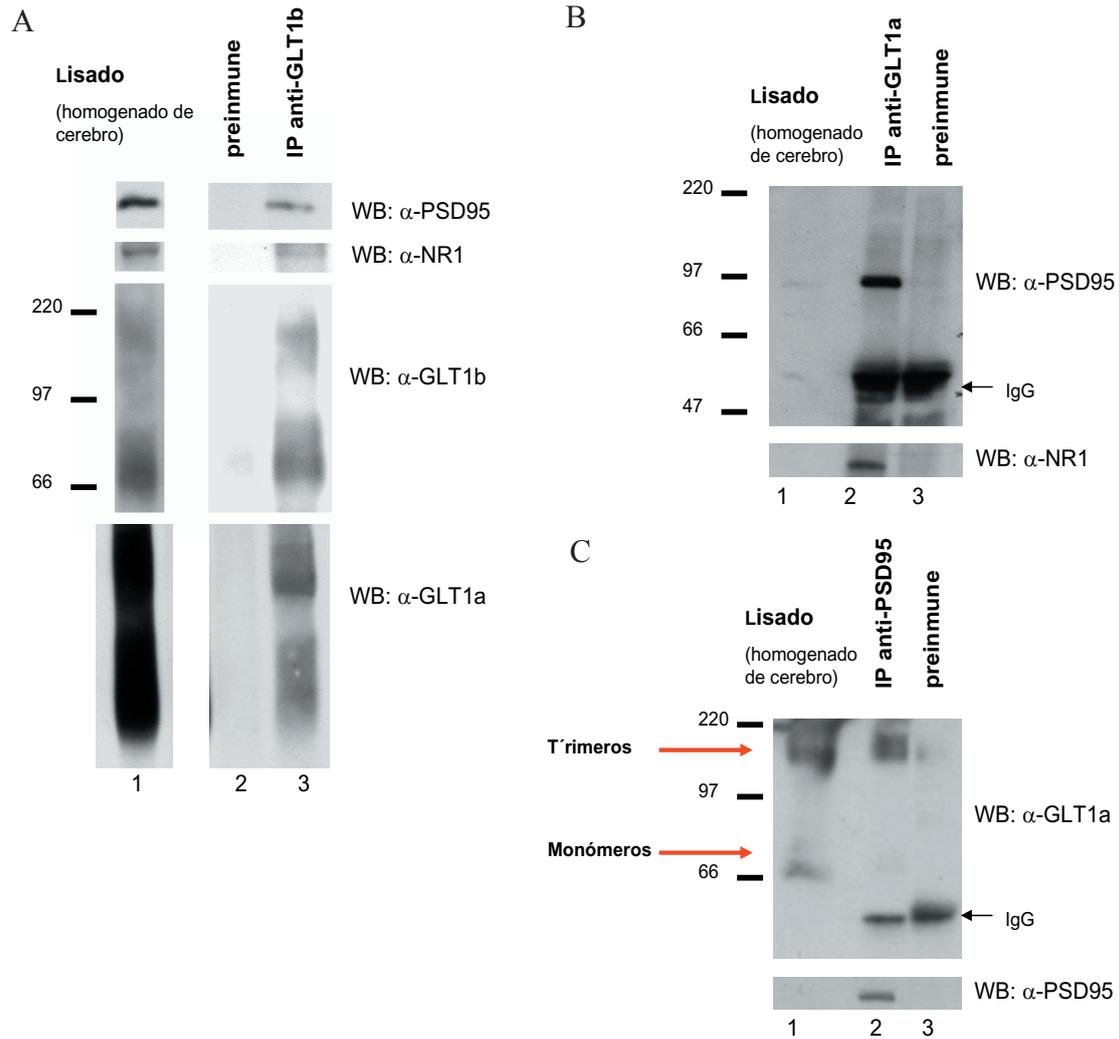
Fig. 32. A-C. Localización untraestructural de GLT1b. Las secciones de corteza de rata se sometieron a la reacción de la inmunoperoxidasa con anti-GLT1b y se procesaron para observarlas en el microscopio electrónico. El producto de la reacción se deposita en el interior de dendritas (Den) y perfiles gliales (G), mientras que los terminales (T) no aparecen marcados. Se puede apreciar también en astrocitos perivasculares (flechas en C).

#### IV. 4. FORMACIÓN DE HETEROLIGÓMEROS ENTRE GLT1a Y GLT1b.

##### IV. 4. 1. GLT1a también interacciona con PSD95 y NMDAR.

Como se ha descrito más arriba, nuestros anticuerpos anti-GLT1b no presentaban reacción cruzada con GLT1a en ensayos de inmunotransferencia o de inmunoprecipitación en células transfectadas. De la misma manera, los anticuerpos comerciales anti-GLT1a no reaccionaban con GLT1b en los mismos ensayos. Sin embargo, cuando se realizaron experimentos de inmunoprecipitación en homogeneizados de tejido de rata con los anticuerpos anti-GLT1b, los complejos precipitados no sólo contenían PSD-95 y NMDAR sino que también contenían GLT1a (fig. 33 A).

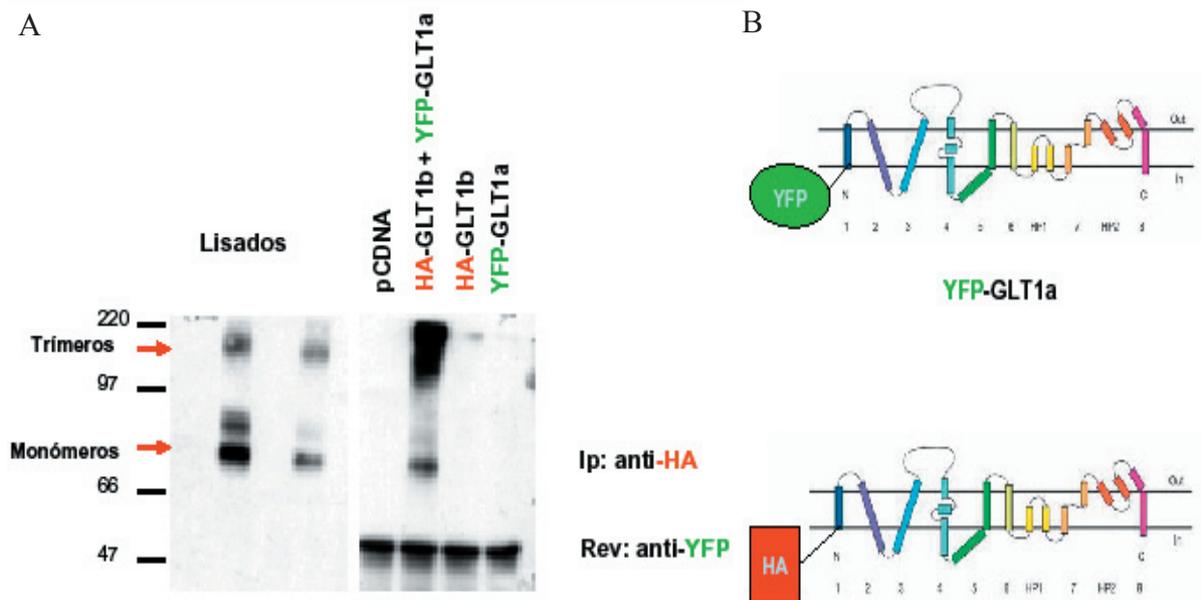
De manera recíproca, los anticuerpos específicos para la isoforma GLT1a también fueron capaces de inmunoprecipitar complejos que contenían GLT1b, PSD95 y NMDAR (fig. 33 B). Esto sugiere que las dos isoformas de GLT1, PSD95 y NMDAR forman parte del mismo complejo. Además, los anticuerpos comerciales dirigidos contra PSD95 también inmunoprecipitaron a GLT1a (fig. 33 C). Puesto que GLT1a carece de motivos consenso de interacción con dominios PDZ, parece improbable que la interacción con PSD95 ocurra de manera directa. Por ello, elaboramos la hipótesis de que GLT1a podría ser incorporada a estos complejos por la formación de heterooligómeros con GLT1b, siendo esta isoforma la que confiere la capacidad a GLT1a para interaccionar con PSD95 (y por tanto con NMDAR)



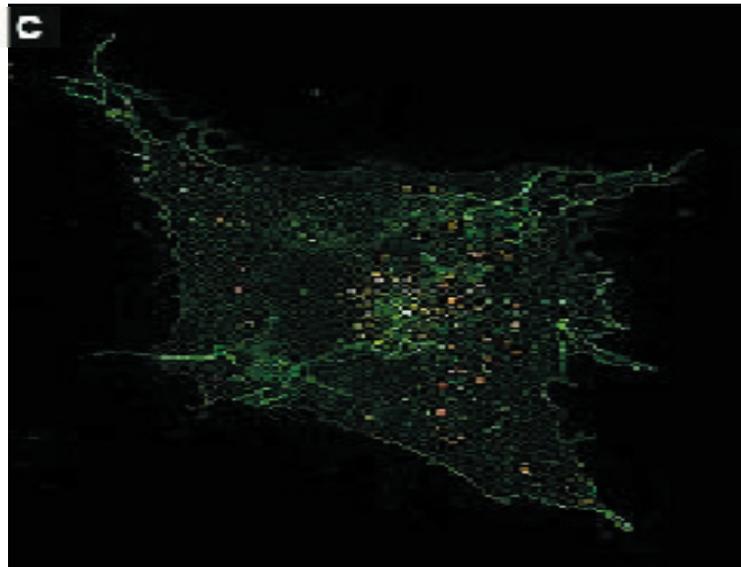
**Fig. 32. A-B)** GLT1a interacciona con GLT1b, PSD-95 y NMDAR en el cerebro de rata. **A y B)** Coimmunoprecipitación de GLT1a y PSD-95 en cerebro de rata. Se inmunoprecipitaron extractos solubilizados de cerebro anterior de rata (carriles 2 y 3, A y B) con anticuerpos anti-GLT1a (anti-GLT1a), o con suero preimmune (PI, panel A) y con anticuerpos anti-PSD95 (anti-PSD95), o con suero preimmune (PI) en el panel B. Los inmunoprecipitados se resolvieron mediante SDS-PAGE e inmunotransferencia y se incubaron con anticuerpos anti-PSD95 (A y B panel inferior), anti-GLT1a (B) y anti-NR1 (A) como se indica en la figura. La detección de los anticuerpos unidos se realizó mediante quimioluminiscencia (ECL). **C)** Coimmunoprecipitación de GLT1a con GLT1b, PSD-95 y NR1 en homogenados de cerebro de rata. Se inmunoprecipitaron extractos solubilizados (carriles 2 y 3) como se ha indicado en A y B con anticuerpos anti-GLT1b (anti-GLT1b) o suero preimmune (carril 2). Las inmunotransferencias se incubaron con anticuerpos anti-PSD95 ( $\alpha$ PSD95), anti-GLT1a ( $\alpha$ GLT1a), anti-NR1 ( $\alpha$ NR1) y anti-GLT1b ( $\alpha$ GLT1b) como se indica en la figura. Las inmunotransferencias mostradas son representativas de tres experimentos realizados de manera independiente.

#### IV. 4. 2. GLT1a y GLT1b forman heteroligómeros.

Se ha descrito en la bibliografía que el homólogo bacteriano de GLT1 presenta una estructura trimérica (Yelmo et al. 2004). Puesto que nuestros datos apuntan a una posible interacción entre GLT1a y GLT1b, decidimos investigar si estas isoformas eran capaces de asociarse formando heteroligómeros generamos construcciones con epítopos distintivos para cada una de las dos isoformas (fig. 33 B).



**Fig. 33. A-C).** GLT1a interacciona con GLT1b en un sistema heterólogo. Se transfirieron células COS7 con vectores de expresión para YFPGLT1a y HAGLT1b o con el vector de expresión vacío (pCDNA) en las combinaciones indicadas en la figura. Los extractos solubilizados se inmunoprecipitaron con anticuerpos anti-HA y las proteínas inmunoprecipitadas (A, panel derecho) se analizaron mediante SDS-PAGE e inmunotransferencia. Las inmunotransferencias se analizaron con anticuerpos anti-HA (no se muestra) y anti-YFP. Los lisados (carriles 1-4) corresponden a un 2% del extracto solubilizado usado en las inmunoprecipitaciones. La inmunotransferencia mostrada es representativa de tres experimentos realizados de manera independiente. B) Esquema de las construcciones usadas en A. C) Colocalización de CFP-GLT1a y GFP-GLT1b en células COS7.



La inmunoprecipitación de GLT1b a partir de extractos de COS7 que coexpresan HA-GLT1b y YFP-GLT1a con anticuerpos anti-HA mostró que GLT1a estaba presente en los inmunoprecipitados (fig. 33 A). Además, los datos que obtuvimos mediante microscopía de fluorescencia en células COS7 cotransfectadas con YFP-GLT1a y CFP-GLT1b también avalaban la formación de heteroligómeros ya que ambas proteínas colocalizaban en numerosos acúmulos tanto en la membrana como en vesículas de tráfico intracelular (fig. 33 C).

Aunque la distribución subcelular de GLT1a ya ha sido descrita (Rosenberg et al., 2004), quisimos analizar la colocalización de las dos isoformas del transportador en tejido nervioso. Los experimentos de inmunohistoquímica y el posterior análisis mediante microscopía confocal

se llevaron a cabo usando secciones de corteza teñidas con los anticuerpos anti-GLT1a, anti-GLT1b y neurofilamentos como marcador axonal (fig. 34 A-D). Si bien los patrones de tinción que presentan GLT1a y GLT1b son bastante diferentes, ambas proteínas colocalizan de manera profusa (fig. 34 A,B y D) lo que apoya la capacidad de GLT1a y GLT1b de asociarse en la corteza cerebral formando heteroligómeros.

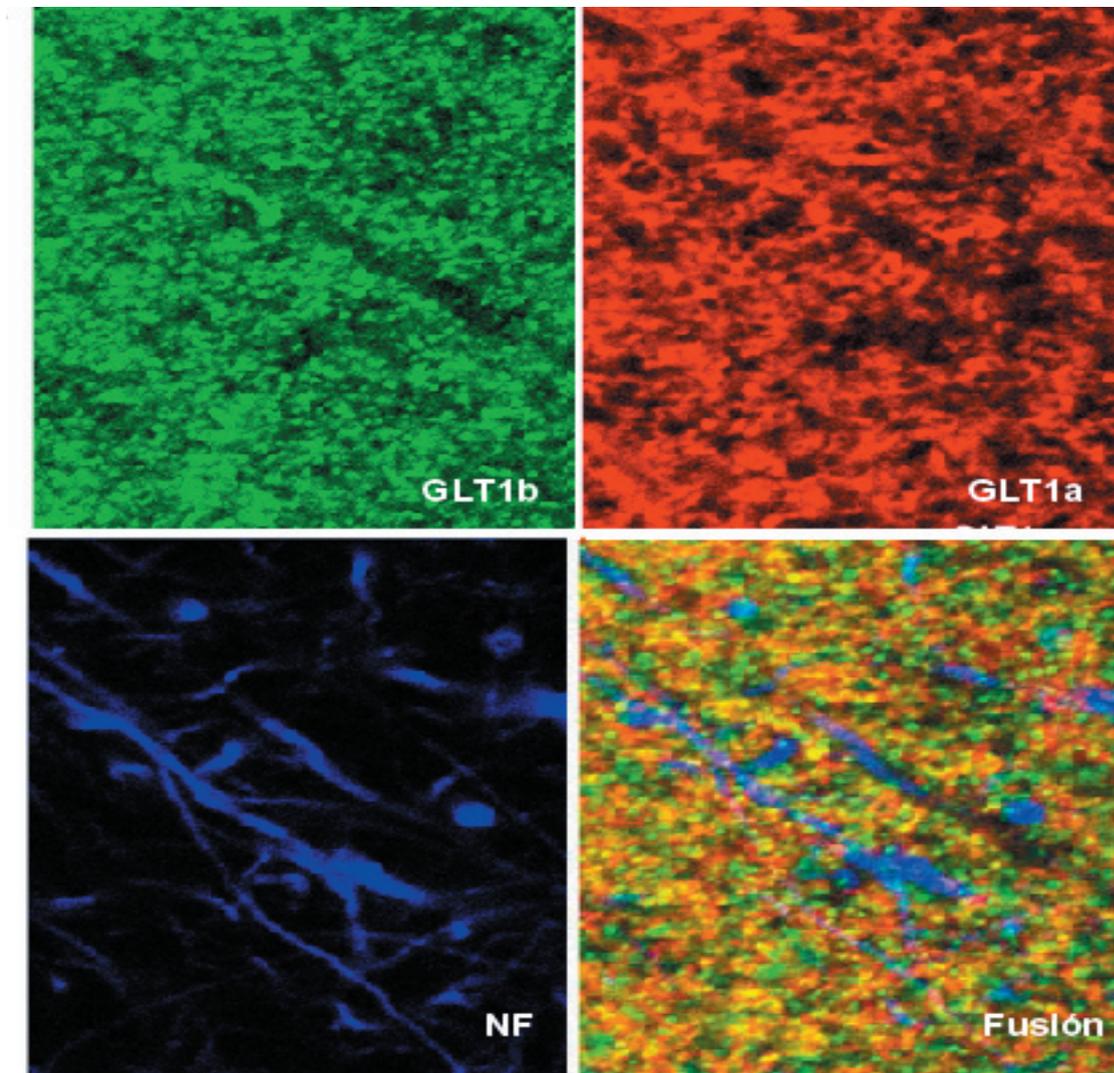
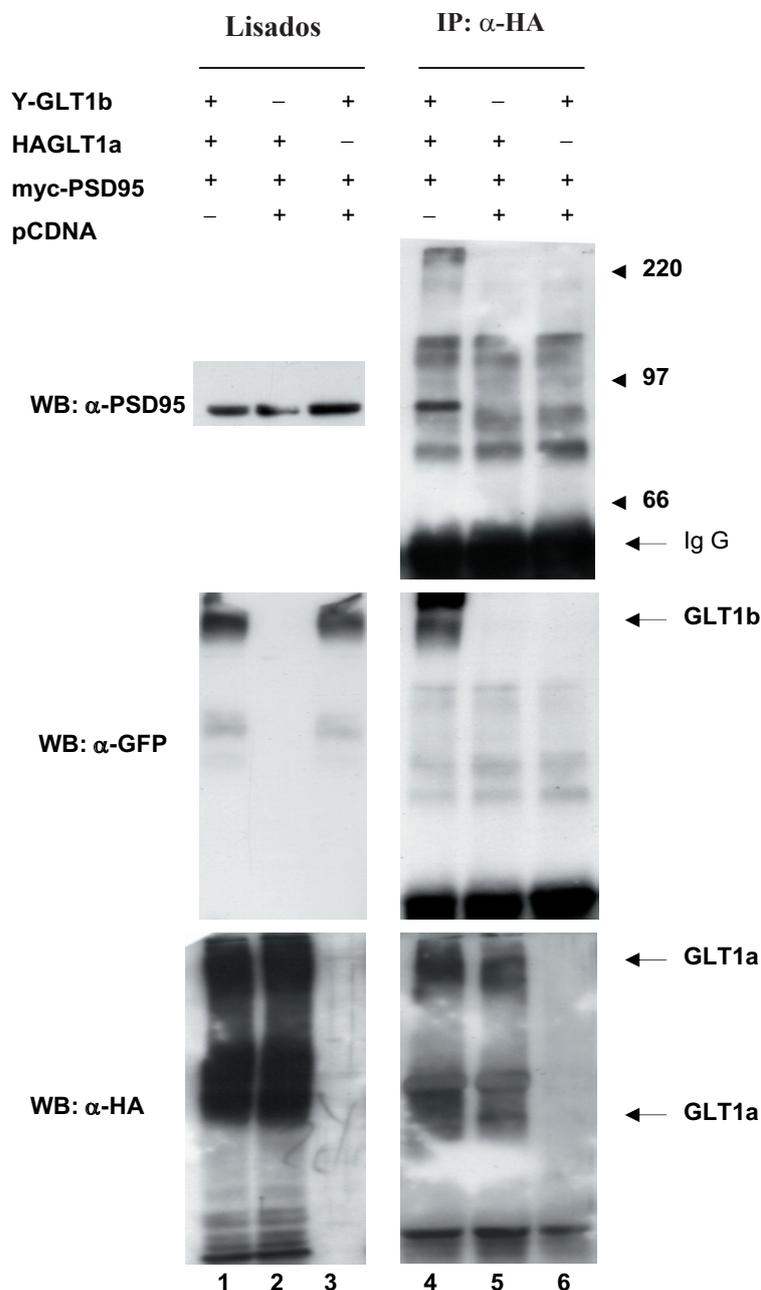


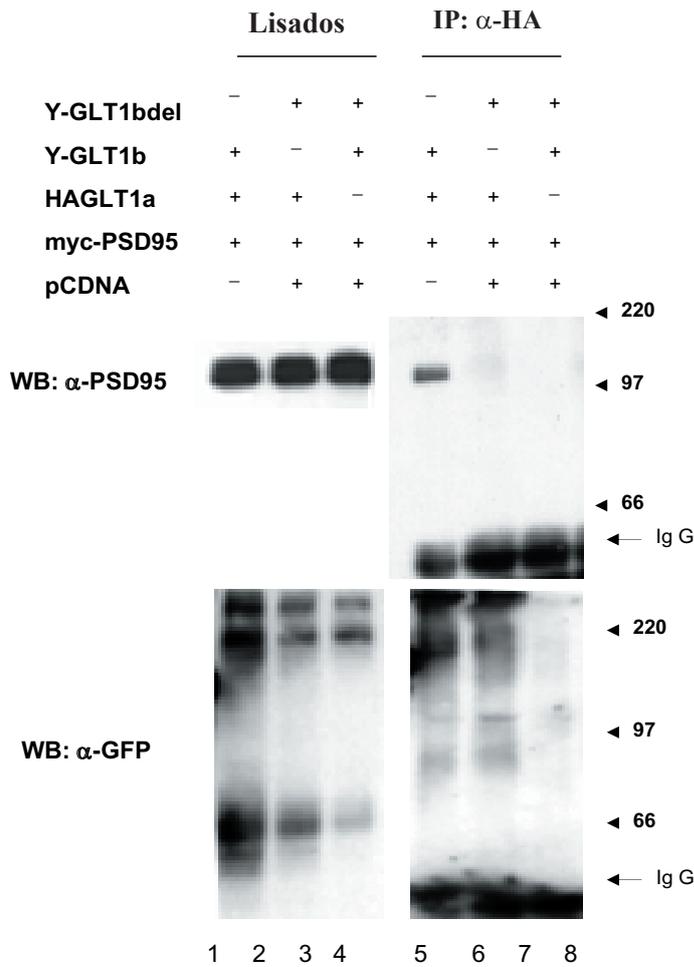
Fig. 34. A-D) Colocalización de GLT1a y GLT1b en secciones de corteza de rata. Las secciones de corteza fijadas como se describe en materiales y métodos se incubaron con anticuerpos anti-GLT1a (A), anti-GLT1b (B) y anti-Neurofilamentos (C) como marcador axonal. Los anticuerpos secundarios fueron Alexa-488 anti-conejo (verde) y Alexa 594 anti-ratón (rojo) y Alexa 697 anti-pollo (azul). Las inmunohistoquímicas presentadas en estos paneles corresponden a las capas V y VI del córtex parietal de rata.

### VI. 4. 3. GLT1a requiere a GLT1b para interactuar con PSD95.

Teniendo en cuenta a la ausencia de motivos de interacción con PDZ en GLT1a, cuando esta isoforma se coexpresaba con myc-PSD95 en un sistema heterólogo, no se detectó ni PSD95 ni HAGLT1a en el inmunoprecipitado obtenido con anticuerpos anti-HA (fig. 35, carril 5). Sin embargo, cuando HAGLT1a se coexpresaba con YFPGLT1b y PSD95, el inmunoprecipitado obtenido con anticuerpos anti-HA contenía tanto GLT1b como PSD95 (fig. 35, carril 4). Además, la supresión del motivo consenso de interacción con PDZ de GLT1b (GLT1b $\Delta$ del) supuso la interrupción de la interacción de GLT1a con PSD95 (fig. 36), tal como se esperaba aunque GLT1b y GLT1a seguían formando heteroligómeros (Fig. 36). En conjunto, estos resultados sugieren que la asociación del complejo GLT1a/GLT1b con PSD95 ocurre a través de GLT1b y que la delección del motivo de interacción con PDZ de GLT1b no supone una alteración aparente en la formación del heteroligómero.



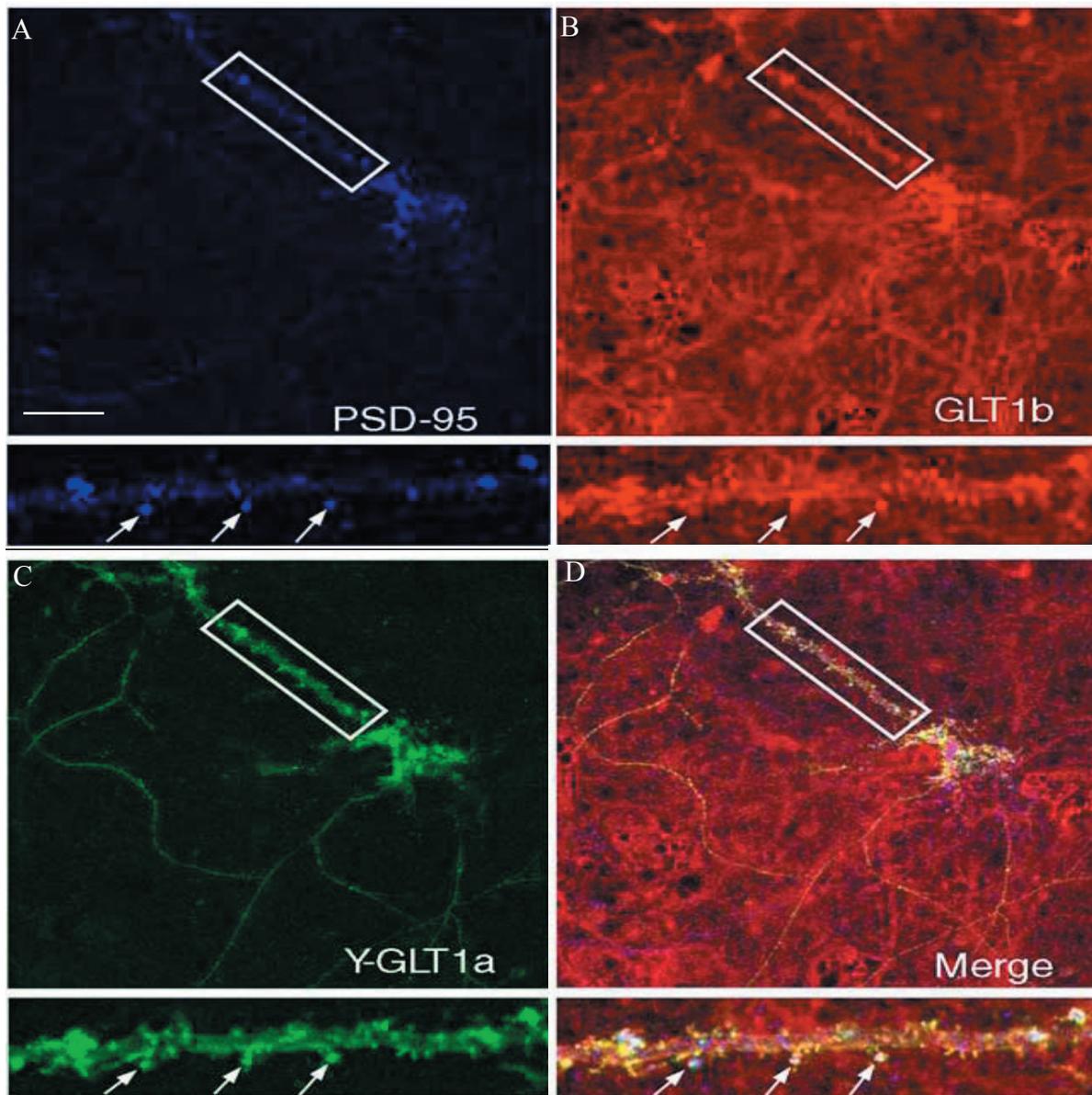
**Fig. 35.** GLT1a coimmunoprecipita a PSD95 sólo cuando GLT1b se expresa. Se transfectaron células COS7 con vectores de expresión para YFPGLT1b (Y-GLT1b), HAGLT1a y myc-PSD95 ó con el vector de expresión vacío (pCDNA) en las combinaciones indicadas en la figura. Los extractos solubilizados se inmunoprecipitaron con anticuerpos anti-HA y las proteínas inmunoprecipitadas (carriles 4-6) se analizaron mediante SDS-PAGE e inmunotransferencia. Las inmunotransferencias se analizaron con anticuerpos anti- PSD95 ( $\alpha$ PSD95,) y anti-YFP( $\alpha$ GFP) y anti-HA ( $\alpha$ HA) como se indica. Los lisados (carriles 1-3) corresponden a un 2% del extracto solubilizado usado en las inmunoprecipitaciones. La inmunotransferencia mostrada es representativa de tres experimentos realizados de manera independiente



**Fig. 36.** La interacción de GLT1a y PSD95 depende del motivo ETCI de GLT1b. Se transfectaron células COS7 con vectores de expresión para YFPGLT1b (Y-GLT1b), YFPGLT1bdel (Y-GLT1bdel), HAGLT1a y myc-PSD95 o con el vector de expresión vacío (pCDNA) en las combinaciones indicadas en la figura. Los extractos solubilizados se inmunoprecipitaron con anticuerpos anti-HA y las proteínas inmunoprecipitadas (carriles 4-6) se analizaron mediante SDS-PAGE e inmunotransferencia. Las inmunotransferencias se analizaron con anticuerpos anti- PSD95 ( $\alpha$ PSD95,) y anti-YFP( $\alpha$ GFP) y anti-HA (no se muestra) como se indica. Los lisados (carriles 1-3) corresponden a un 2% del extracto solubilizado usado en las inmunoprecipitaciones. La inmunotransferencia mostrada es representativa de tres experimentos realizados de manera independiente

#### IV. 4. 4. Colocalización de GLT1a, GLT1b y PSD95 en cultivos primarios.

Hemos descrito previamente la acumulación de GLT1b en las espinas dendríticas de células transfectadas. De manera similar quisimos comprobar la distribución de YFP-GLT1a, bien sólo o coexpresado con GLT1b y mycPSD95. Cuando se transfectó sólo, YFPGLT1a se acumulaba en espinas dendríticas, de manera semejante a como lo hacía YFPGLT1b, aunque quizá de una manera menos marcada. Cuando YFPGLT1a se coexpresaba con GLT1b y PSD95, las tres proteínas colocalizaban en las espinas dendríticas (fig. 39). Por tanto, de estos datos se deduce que GLT1a y GLT1b forman heterolígomeros que son capaces de reclutar a PSD95 en el contexto celular.



**Fig. 37. A-D)** Colocalización de GLT1a, GLT1b y PSD-95 en cultivos primarios transfectados. Los cultivos primarios de corteza se transfectaron a 15DIV con vectores de expresión para myc-PSD95 (PSD-95, A), HAGLT1b (GLT1b, B) plus YFP-GLT1a (Y-GLT1a,C). Tres días después, las células se fijaron y tiñeron con anti-PSD-95 (azul) y anti-GLT1b (rojo) y se analizaron mediante microscopía confocal de fluorescencia. YFP-GLT1a (verde), HAGLT1b y PSD-95 colocalizan en “clusters” o agrupaciones en la membrana plasmática de la dendrita mostrada (flechas). Las ampliaciones (a-d) corresponden a las regiones enmarcadas (A-D). Barras de escala: 30  $\mu\text{m}$  en paneles A-D y 10  $\mu\text{m}$  en a-d.

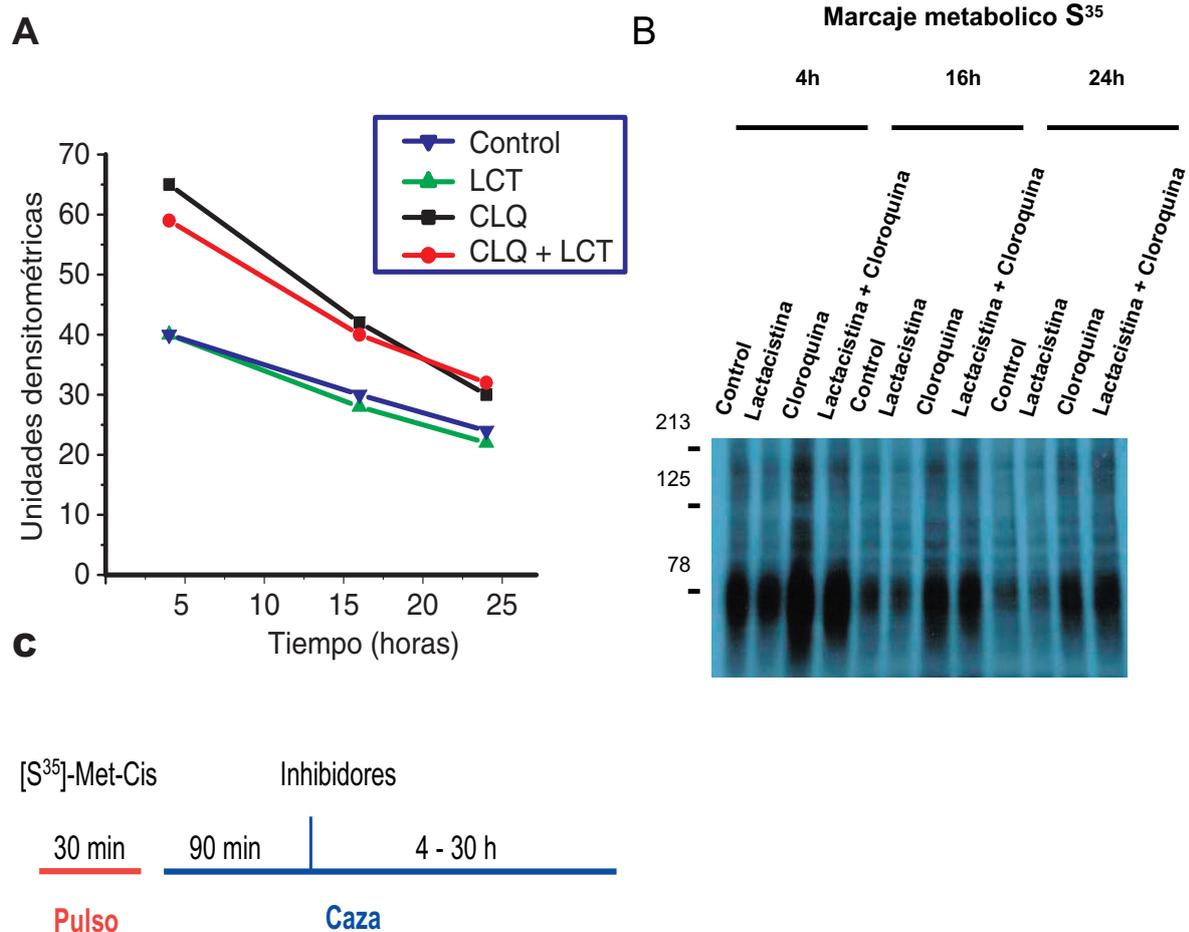
### **III PARTE: REGULACIÓN DEL TRÁFICO DE GLT1a POR UBIQUITILACIÓN.**

Como ya hemos mencionado, los mecanismos de tráfico intracelular de la isoforma GLT1a habían sido examinados por diversos laboratorios. Se sabe que tras la síntesis en el retículo endoplásmico, la proteína atraviesa el aparato de Golgi donde completa su glicosilación, para ser posteriormente distribuida a la membrana. Una vez allí, es endocitada al compartimento endosomal en un proceso que puede ser acelerado por ésteres de forbol de manera dependiente a la activación de PKC. Sin embargo, no se conoce mucho ni acerca del mecanismo de degradación de la proteína, ni sobre el mecanismo de acción de los ésteres de forbol. Decidimos, por tanto, realizar experimentos para intentar esclarecer estos puntos.

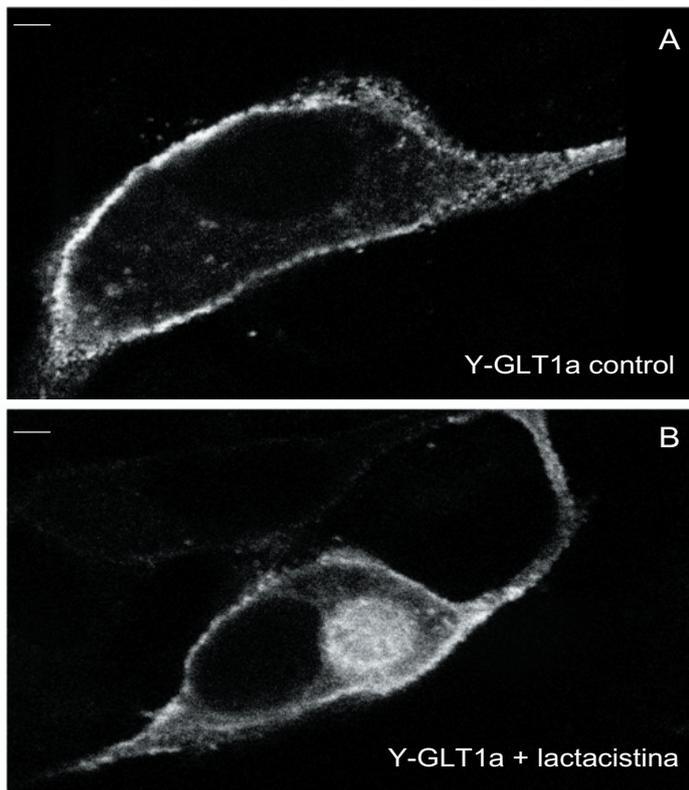
#### **VI. 5. 1. Degradación lisosomal vs proteasomal.**

De manera general, se considera que la degradación de proteínas transmembrana ocurre preferentemente a través de las vías de degradación lisosomales. Sin embargo, se ha observado que, en algunos casos, la vía proteasomal también interviene en la degradación de estas proteínas así como en otros aspectos del tráfico intracelular. Por este motivo, analizamos en primer lugar la importancia de estas vías en la degradación de GLT1a. Para ello realizamos experimentos de marcaje metabólico, mediante un ensayo de pulso y caza, que nos han permitido valorar la estabilidad de la forma madura de GLT1a en presencia de inhibidores específicos de cada una de las vías de degradación. Como previamente hemos descrito para GLT1b, tras un pulso de 30 min con la mezcla [<sup>35</sup>S]met-cys, la proteína radiactiva completaba su maduración tras una caza de 60 a 90 minutos. En este punto (90 min) se añadieron los inhibidores, bien de las vías de degradación lisosomal (100  $\mu$ M cloroquina) o de la proteosomal (10  $\mu$ M lactacistina), y analizamos la estabilidad de la proteína radiactiva madura (fig. 39). La presencia de cloroquina incrementó la vida media aproximada de la proteína madura en unas 8 h. En cambio, no observamos diferencias respecto al control en las células tratadas con inhibidores específicos de la vía proteasomal (fig. 38, lactacistina). Estos datos indican que la vía de degradación constitutiva mayoritaria para el transportador maduro es la vía lisosomal. El tratamiento conjunto con lactacistina y cloroquina tuvo un efecto semejante al de cloroquina sola.

A pesar de la falta de la inhibición del proteasoma sobre la degradación de la proteína madura, la observación microscópica de células MDCK transfectadas con YFP-GLT1a y tratadas con lactacistina durante 16 horas nos sugirió la existencia de un efecto de estos compuestos sobre el transportador ya que se observaban agregados intracelulares que recuerdan a los agrosomas, depósitos de proteínas con plegamientos anómalos (fig. 39). Esto nos llevó a un análisis más profundo sobre el efecto de estos inhibidores y la posible ubiquitilación de GLT1a en algún momento de su biogénesis



**Fig. 38.** A-C) Efecto la inhibición de las vías de degradación lisosomal y proteosomal sobre la degradación de GLT1a. Células COS7 transfectas con GLT1a. B) se incubaron durante 30 min con una mezcla de [ $^{35}$ ]metionina-cisteína (ver esquema C, pulso). Las células se lavaron y se añadió medio frío para la incubación durante 90 min (ver esquema C, caza 90 min) que permitiría la llegada a membrana de la proteína radiactiva madura. Los inhibidores de la vía lisosomal (cloroquina 0,1 mM, CLQ) y de la vía proteosomal (lactacistina 10  $\mu$ M, LCT) se mantuvieron en el medio de cultivo frío durante los tiempos indicados (4-30 h) antes de proceder a la lisis celular. Las muestras se inmunoprecipitaron con anticuerpos anti-HA. Las proteínas inmunoprecipitadas se analizaron mediante electroforesis y exposición autoradiográfica del gel deshidratado. Se observan bandas que corresponden a la proteína GLT1a madura (B, 78 KDa). La autoradiografía mostrada es representativa de tres experimentos realizados de manera independiente. Los datos representados en A corresponden al análisis densitométrico de B.

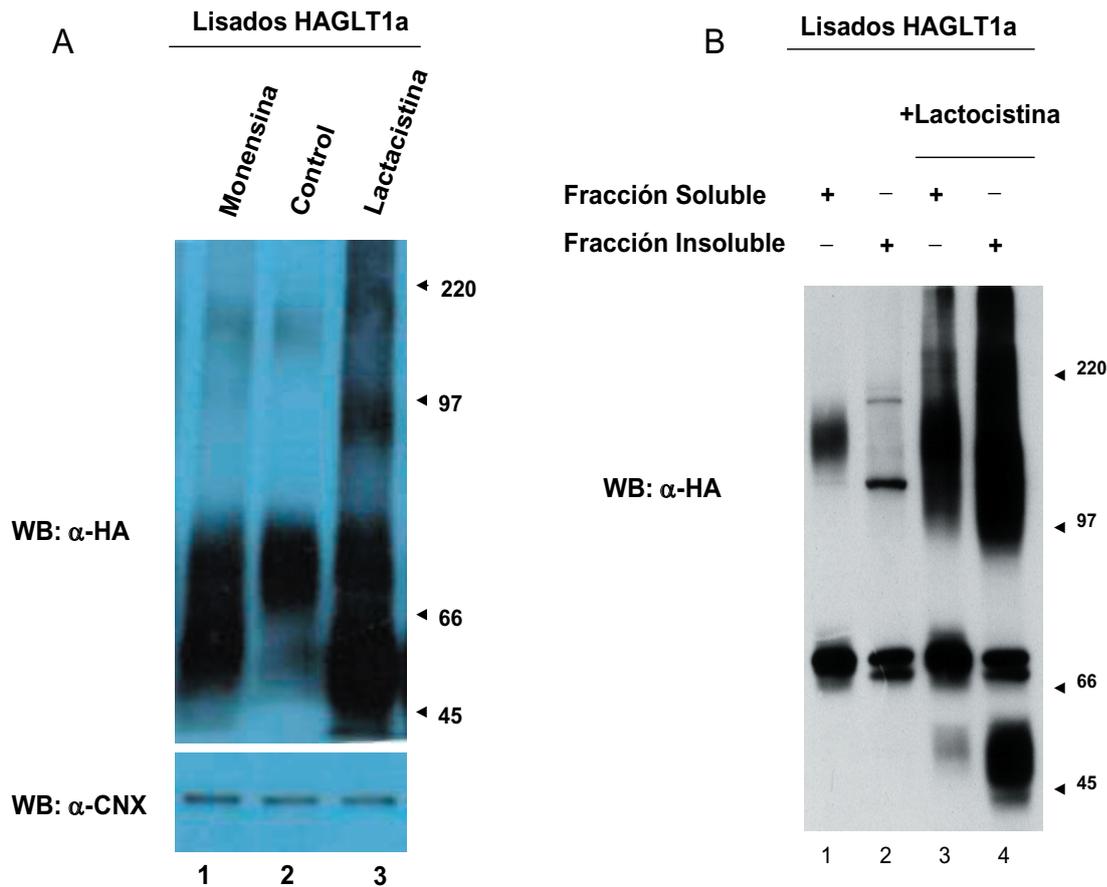


**Fig. 39. A-B)** Efecto de la inhibición del proteasoma sobre GLT1a. Las células MDCK se transfecaron con vectores de expresión para YFP-GLT1a (YFP-GLT1a). Transcurridas 48 h desde la transfección, se añadió lactacistina en el medio de cultivo (10  $\mu$ M B) ó vehículo (DMSO, A) en el control. Las células se mantuvieron 16 h en el incubador a 37°C antes de ser fijadas y analizadas mediante microscopía confocal. Barras de escala: 3  $\mu$ M.

#### IV. 5. 2. Implicación del proteasoma en la biosíntesis de GLT1a.

Se trataron células COS7 transfecadas con HA-GLT1a con el inhibidor del proteasoma lactacistina (o MG132) durante 16 horas y tras lisar las células, las muestras se analizaron por inmunotransferencia con anticuerpos anti-HA. Mientras que en las células control no tratadas GLT1a producía dos bandas correspondientes al monómero de 70 kDa y al agregado trimérico de alrededor de 200 kDa (fig. 40 A). El tratamiento con lactacistina provocó un fuerte aumento de una forma de unos 50 kDa, que podría corresponder a un intermediario parcialmente glicosilado del transportador (fig 40 A, carril 3). También se apreciaba una banda intensa que se extendía desde la región de 100 kDa hasta los 200 kDa, que probablemente corresponde a agregados di- y triméricos de la forma de 50 kDa que solapan en la parte superior del carril con el trimero de la forma madura (200 kDa) (figs. 40, 42 y 45). La banda de 50 kDa también se acumulaba en presencia del ionóforo monensina, un compuesto que además de los efectos previamente descritos sobre el tráfico de vesículas endosomales, también bloquea la salida de proteínas del retículo endoplásmico (fig. 40 A, carril 1), lo que sugiere que esta forma de 50 kDa corresponde a un intermediario que no han abandonado todavía el retículo endoplasmático y no habría completado su glicosilación por no haber llegado al aparato de Golgi.

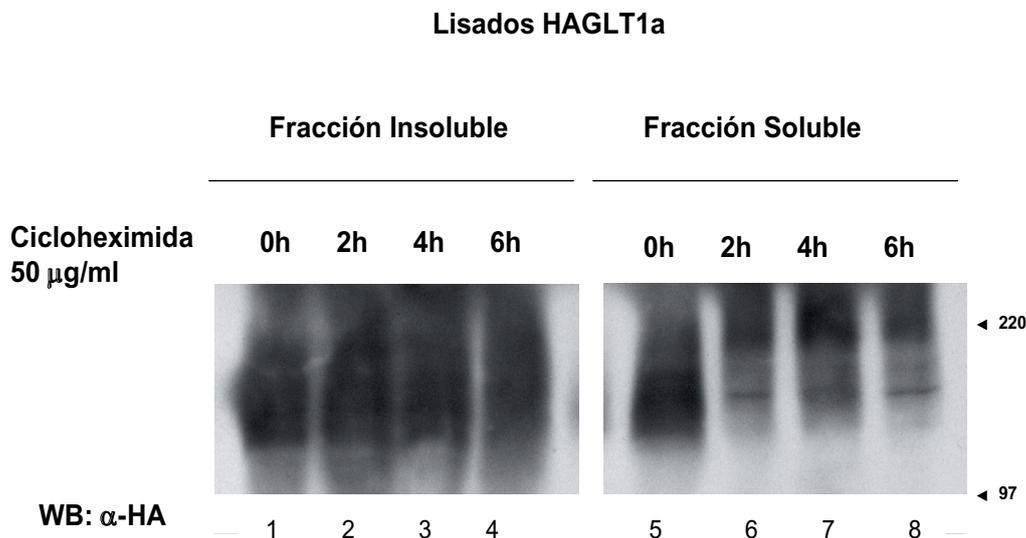
Mientras que las formas de 70 y 200 kDa eran fácilmente solubilizadas con Tritón X-100 (fig. 40 B, fracción soluble), la de 50 kDa y 100-150 kDa eran prácticamente insolubles en este detergente y sólo podía solubilizarse con 0,1% SDS (fig. 40 B, fracción insoluble). Se ha descrito en la bibliografía que la diferencia de solubilidad de los intermediarios de síntesis puede estar relacionada con plegamientos anómalos



**Fig. 40. A-B)** Implicación del proteasoma en la biogénesis de GLT1a. Se transfectaron células COS7 con vectores de expresión para HA-GLT1a (HAGLT1a). **A)** Las células se trataron con lactacistina (10  $\mu$ M, 16 h, carril 3), monensina (10  $\mu$ M, 16 h, carril 1) o vehículo (DMSO, carril 2) a 37° C. Las células se lisaron en solución de lisis con Tritón X-100 y se analizaron mediante SDS-PAGE e inmunotransferencia. Las inmunotransferencias se analizaron con anticuerpos anti-HA ( $\alpha$ -HA) y anti-CNX ( $\alpha$ -CNX) como control de carga. Los lisados (carriles 1-3) corresponden a un 2% del extracto solubilizado en cada caso. **B)** Las células COS7 transfectadas se trataron con el inhibidor proteasomal lactacistina (10  $\mu$ M, 16 h, carriles 3 y 4) o vehículo (DMSO, carriles 1 y 2) como se indica en la figura. Los extractos celulares se solubilizaron con una solución de lisis (ver materiales y métodos) que contenía Tritón X-100 al 1% (fracción soluble, carriles 1 y 3). La fracción de proteína insoluble obtenida tras la centrifugación de los extractos solubilizados en Tritón X-100 se solubilizó en solución de lisis con SDS al 0,1 % (fracción insoluble, carriles 2 y 4). Los extractos se analizaron mediante SDS-PAGE e inmunotransferencia. Las inmunotransferencias se analizaron con anticuerpos anti-HA ( $\alpha$ -HA) como se indica. Los lisados (carriles 1-3) corresponden a un 2% del extracto solubilizado en cada caso. Las inmunotransferencias mostradas son representativas de tres experimentos realizados de manera independiente.

de estas formas que promueven una mayor agregación, quedando los agregados abocados a una vía muerta en lo que a tráfico intracelular se refiere. Esta posibilidad se ve apoyada por el experimento presentado en la figura 41. Tras el tratamiento de células transfectadas con lactacistina (16h) se añadió cicloheximida para bloquear la incorporación de proteína nueva. Posteriormente, a diferentes tiempos, se procedía a separar la fracción de proteína soluble en tritón X 100 de la insoluble (soluble en SDS 0,1%). Se observó que la forma de 150 kDa, que se había acumulado por el tratamiento con lactacistina desaparecía de la fracción soluble tras añadir la cicloheximida, probablemente evolucionando hasta la forma madura de 200 kDa (Fig 41,

panel derecho). Sin embargo, esta forma de 150 kDa persistía en la fracción insoluble a todos los tiempos ensayados tras la adición de cicloheximida (Fig 41, panel izquierdo). Estos resultados indican que la proteína soluble está sometida a tráfico intracelular, mientras que la insoluble no. En resumen, nuestros datos apoyan la participación del proteasoma en la biogénesis de GLT1a, probablemente a través de la eliminación de las formas mal plegadas del transportador.



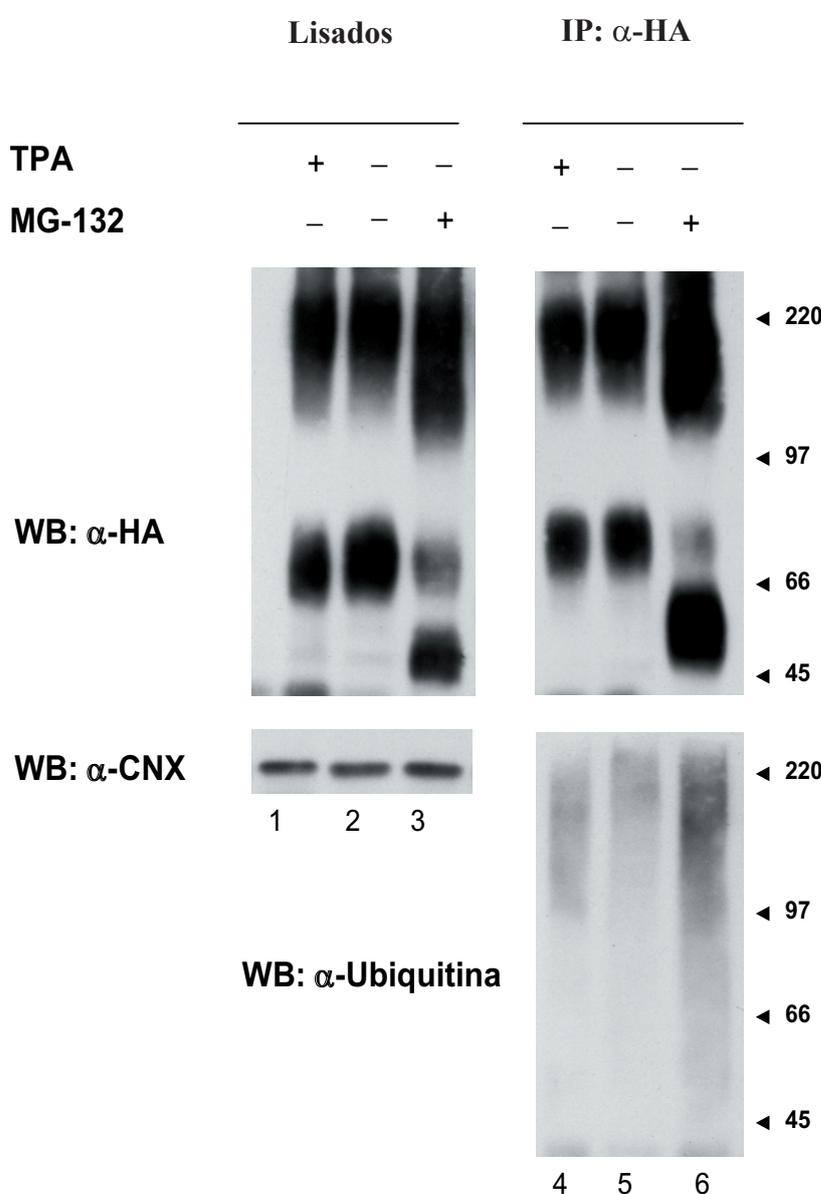
**Fig. 41.** Implicación del proteasoma en la biogénesis de GLT1a. Se transfectaron células COS7 con vectores de expresión para HA-GLT1a (HAGLT1a). Las células se trataron con el inhibidor proteasomal lactacistina (10 µM, carriles 1-8) durante 16 h, y cicloheximida (50 µg/ml, carriles 1-8) a los tiempos indicados en la figura. Los extractos celulares se solubilizaron con una solución de lisis (ver materiales y métodos) que contenía Tritón X-100 al 1% (fracción soluble, carriles 5-8). La fracción de proteína insoluble obtenida tras la centrifugación de los extractos solubilizados en Tritón X-100 se solubilizó en solución de lisis con SDS al 0,1 % (fracción insoluble, carriles 1-4). Los extractos se analizaron mediante SDS-PAGE e inmunotransferencia. Las inmunotransferencias se analizaron con anticuerpos anti-HA (α-HA) como se indica. Las inmunotrasferencias mostradas son representativas de tres experimentos realizados de manera independiente

#### IV. 5. 3. GLT1a se ubiquitila en sistemas de expresión heterólogos

Ya que nuestros datos sugieren que el proteasoma regula la biosíntesis de GLT1a, esta proteína podría ser objeto de ubiquitilación. Para analizar si esto era así, se transfectaron células COS7 con HAGLT1a y después las células se lisaron, HAGLT1a se inmunoprecipitó con anti-HA y las muestras se analizaron por inmunotransferencia con anti-ubiquitina. Mientras que el nivel de ubiquitilación era bajo en las células control (sin tratamientos), la adición de MG-132 aumentaba considerablemente la cantidad de transportador ubiquitilado, que aparecía con un patrón de inmunorreactividad difuso desde la zona de 200 KDa hacia abajo (fig 42, carriles 5 y 6). No obstante, el intermediario de 50 kDa sólo mostraba débiles signos de ubiquitilación,

probablemente debido a que no estaba inhibida la actividad isopeptidasa del proteasoma, que tiene que separar la ubiquitina antes de degradar a este intermediario biosintético. El hecho de que la zona de ubiquitinación se extienda hasta los 200 KDa sugiere que la proteína madura también está sometida a ubiquitinación. De hecho, las formas triméricas de GLT1a (200 kDa) parecen mejores sustratos de las ubiquitin ligasas que las formas monoméricas.

Para analizar si la ubiquitinación de la proteína madura estaba relacionada con el tráfico intracelular sometimos a las células a tratamientos con el éster de forbol TPA, para el que se ha descrito que aumenta la velocidad de recambio de la proteína desde la superficie celular a un compartimento intracelular. El tratamiento de células transfectadas con HAGLT1a con TPA (1µM, 30 min) aumentó la cantidad de HAGLT1 ubiquitinado (fig 42, carril 4).

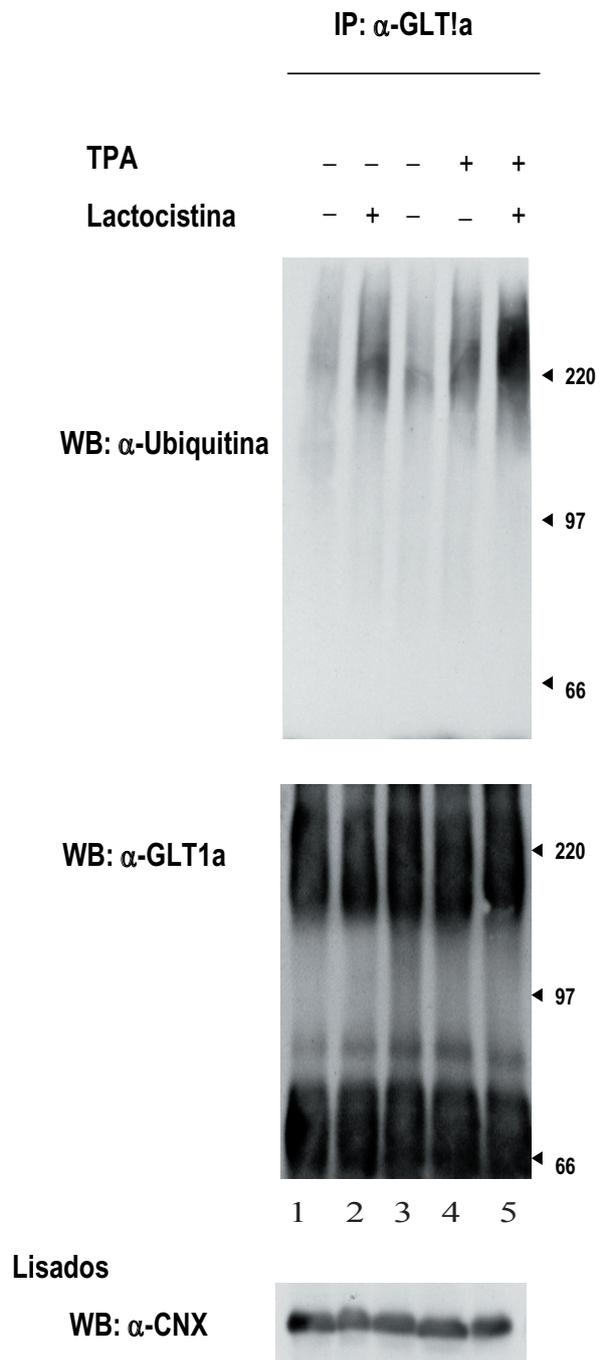


**Fig. 42.** Ubiquitinación de la proteína madura GLT1a en un sistema heterólogo. Se transfectaron células COS7 con vectores de expresión para HA-GLT1a (HAGLT1a). Las células se trataron con el inhibidor proteasomal MG-132 (15 µM, 16 h, carril 3) ó TPA (1 µM, 30 min, carril 1). Los extractos celulares se solubilizaron y se inmunoprecipitaron con anticuerpos anti-HA (α-HA) (carriles 4-6). Los inmunoprecipitados se analizaron mediante SDS-PAGE e inmunotransferencia. Las inmunotransferencias se analizaron con anticuerpos anti-HA (α-HA), anti-ubiquitina (α-ubiquitina), y anti-CN X (α-CN X) como control de carga. Los lisados (carriles 1-3) corresponden a un 2% del extracto solubilizado en cada caso. Las inmunotransferencias mostradas son representativas de tres experimentos realizados de manera independiente.

#### IV. 5. 4. GLT1a se ubiquitina en cerebro

Quisimos comprobar si la ubiquitilación también se produce en cerebro de rata. Para ello, el cerebro se homogeneizó (en ausencia de detergentes) y el homogeneizado se trató bien con lactacistina (10  $\mu$ M 4 horas) o con TPA (1  $\mu$ M, 30 minutos). Posteriormente las proteínas se solubilizaron, se inmunoprecipitaron con antiGLT1a y se analizaron por inmunotransferencia (fig. 43). Los resultados indicaron que tanto la inhibición del proteosoma (fig. 43, carril 2) como el tratamiento con TPA (fig. 43, carril 4), aumentan la ubiquitilación de GLT1a en cerebro. Además, el tratamiento simultáneo con el inhibidor del proteosoma (10  $\mu$ M, 4h) y TPA (1  $\mu$ M, 30 minutos tras 3.30h de tratamiento con lactacistina) produjo niveles de inmunoreactividad con anticuerpos anti-ubiquitina mayores que los detectados en los tratamientos simples (fig. 43, carril 5).

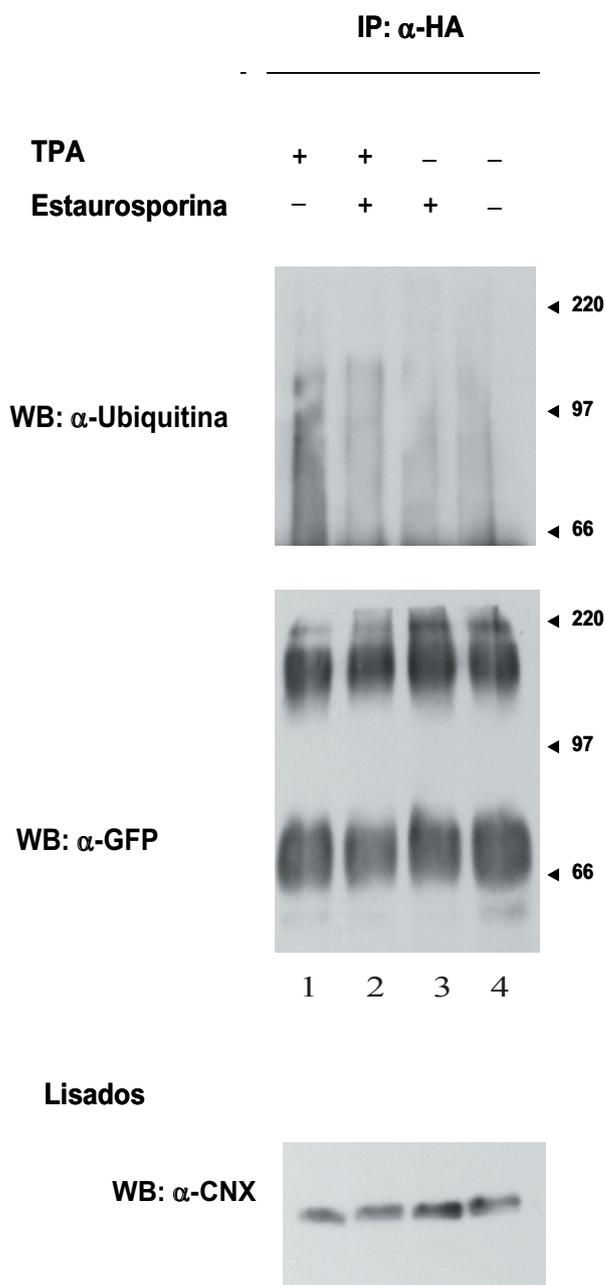
**Fig. 43.** Ubiquitilación de la proteína madura GLT1a en el cerebro de rata. Se homogeneizó la corteza de una rata wistar en solución RIPA (ver materiales y métodos) sin detergentes. Los homogenados se trataron con el inhibidor proteosomal lactacistina (10  $\mu$ M, 4 h, carriles 2, 5, 7 y 10) o TPA (1  $\mu$ M, 30 min, carriles 4, 5, 7 y 10) o vehículo (DMSO, carriles 1, 3, 6 y 8). Los extractos celulares se solubilizaron y se inmunoprecipitaron con anticuerpos anti-HA ( $\alpha$ -HA) (carriles 6-10). Los inmunoprecipitados se analizaron mediante SDS-PAGE e inmunotransferencia. Las inmunotransferencias se analizaron con anticuerpos anti-HA ( $\alpha$ -HA), anti-ubiquitina ( $\alpha$ -ubiquitina), y anti-CNX ( $\alpha$ -CNX) como control de carga. Destacar el incremento de la tamaño de la proteína detectada con anti-ubiquitina respecto a la proteína inmunoreactiva para anti-HA. Tal incremento sería consistente con la unión covalente de varias moléculas de ubiquitina en un proceso de poliubiquitilación o multimonubiquitilación. Los lisados corresponden a un 3% del extracto solubilizado en cada caso. Las inmunotransferencias mostradas son representativas de tres experimentos realizados de manera independiente



#### IV. 5. 5. El efecto de TPA sobre la ubiquitación de GLT1 se debe a la activación de PKC.

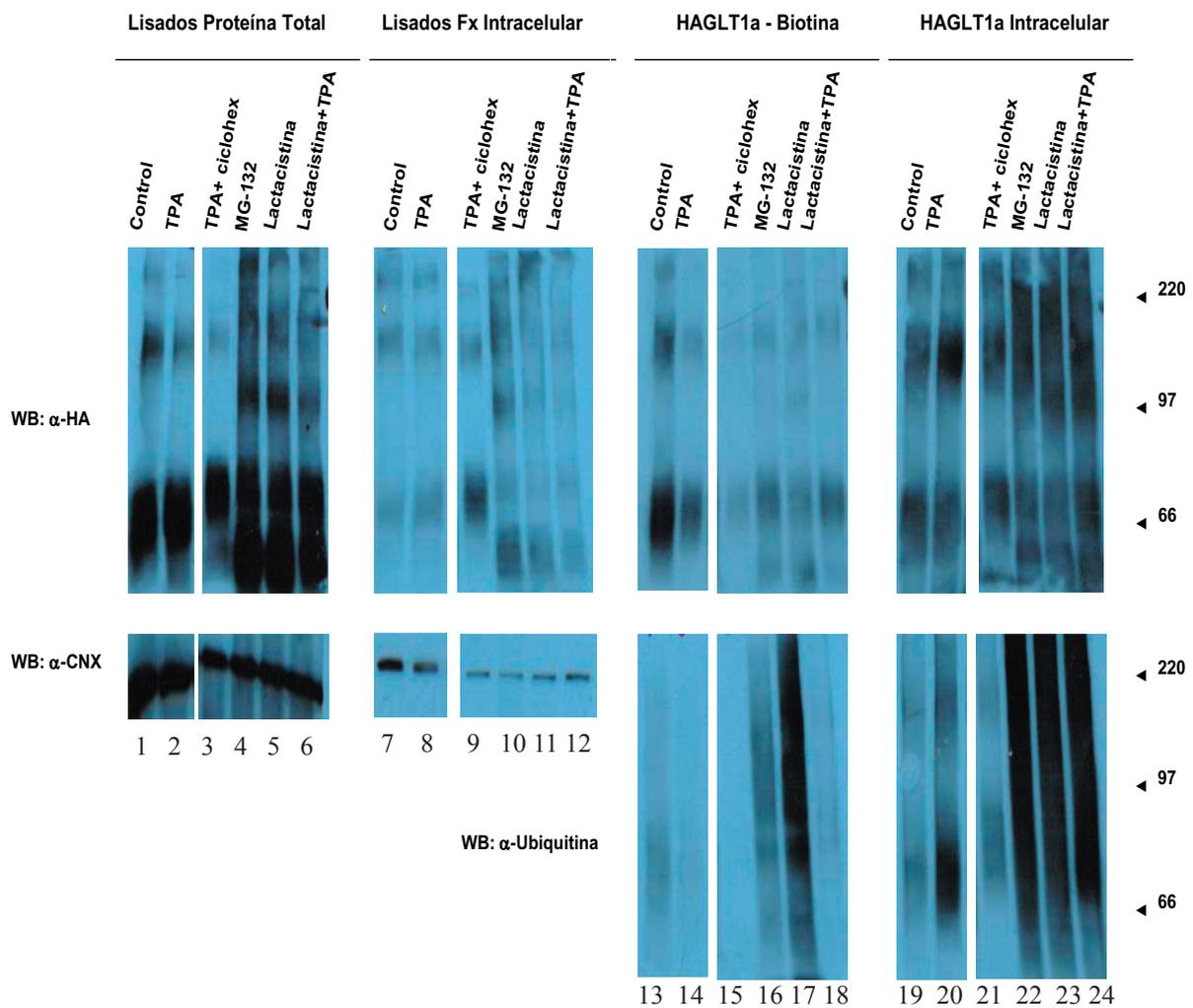
Para comprobar si el efecto de TPA sobre la ubiquitación de GLT1a se debe a la activación de PKC tratamos células COS7 transfectadas con HA-GLT1a con el inhibidor de la PKC estaurosporina. Tras el tratamiento con estaurosporina (1  $\mu$ M, 30 minutos), con TPA (1  $\mu$ M, 30 minutos) o con ambos compuestos, se inmunoprecipitó HA-GLT1a a partir de los extractos celulares solubilizados. La detección de proteína ubiquitada en la inmunotransferencia demostró que el incremento de proteína ubiquitada observado tras la adición de TPA se suprime en presencia del inhibidor específico estaurosporina (fig. 44, carril 2). Por tanto, estos datos demuestran que la activación de PKC es responsable del aumento de ubiquitación observado para GLT1a en presencia de TPA.

**Fig. 44.** El efecto de TPA sobre la ubiquitación de GLT1a se debe a la activación de PKC. Se transfectaron células COS7 con vectores de expresión para HA-GLT1a (HAGLT1a). Las células se trataron con estaurosporina (1  $\mu$ M, 30 min, carriles 2 y 3) o TPA (1  $\mu$ M, 30 min, carriles 1 y 2). Los extractos celulares se solubilizaron y se inmunoprecipitaron con anticuerpos anti-HA ( $\alpha$ -HA) (carriles 3-4). Los inmunoprecipitados se analizaron mediante SDS-PAGE e inmunotransferencia. Las inmunotransferencias se analizaron con anticuerpos anti-HA ( $\alpha$ -HA), anti-ubiquitina ( $\alpha$ -ubiquitina), y anti-CNX ( $\alpha$ -CNX) como control de carga. Los lisados corresponden a un 2% del extracto solubilizado en cada caso. Las inmunotransferencias mostradas son representativas de tres experimentos realizados de manera independiente.



#### IV. 5. 6. GLT1 se ubiquitila en la membrana plasmática.

Puesto que la activación de PKC promueve tanto un aumento de la ubiquitilación como de la internalización de GLT1a, quisimos comprobar si ambos procesos estaban relacionados entre sí. En primer lugar analizamos si la forma madura del transportador, es decir HAGLT1 situado en la membrana plasmática, se ubiquitilaba, y en tal caso si estaba sometido a procesos de redistribución al compartimento intracelular. Las células transfectadas con HAGLT1a se sometieron a tratamientos con TPA (1 $\mu$ M, 30 minutos), MG132 (15 $\mu$ M, 16h), lactacistina (10 $\mu$ M, 16h), o cicloheximida (50  $\mu$ g/ml, 4h). Posteriormente, las proteínas de membrana se marcaron con Sulfo-NHS-SS-biotina, se aislaron con estreptavidina-agarosa y de esta fracción



**Fig. 45.** GLT1a se ubiquitila en la membrana plasmática. Se transfectaron células COS7 con vectores de expresión para HA-GLT1a (HAGLT1a). Las células se trataron con TPA (1  $\mu$ M, 30 min, carriles 14, 15, 20 y 21), MG-132 (15  $\mu$ M, 16h, carriles 16 y 22), lactacistina (10  $\mu$ M, 16h, carriles 17, 18, 23 y 24) o vehículo (DMSO, carriles 13 y 19). Las células se lavaron y se incubaron con el reactivo impermeable sulfo-NHS-SS-Biotina durante 30 min a 0°C. Los extractos celulares se solubilizaron y la proteína biotilada se aisló con esferas de estreptavidina (fracción de proteína de membrana). Esta fracción de proteína se eluyó de las esferas de estreptavidina y se inmunoprecipitó con anticuerpos anti-HA ( $\alpha$ -HA) (HAGLT1a-Biotina, carriles 13-18). Los sobrenadantes que contenían la fracción de proteína intracelular se inmunoprecipitaron con anticuerpos anti-HA ( $\alpha$ -HA) (HAGLT1a intracelular, carriles 19-24). Los inmunoprecipitados se analizaron mediante SDS-PAGE e inmunotransferencia. Las inmunotransferencias se analizaron con anticuerpos anti-HA ( $\alpha$ -HA), anti-ubiquitina ( $\alpha$ -ubiquitina), y anti-CNX ( $\alpha$ -CNX) como control de carga. Los lisados (paneles izquierdos, carriles 1-12) corresponden a un 2% del extracto solubilizado en cada caso. Las inmunotransferencias mostradas son representativas de tres experimentos realizados de manera independiente.

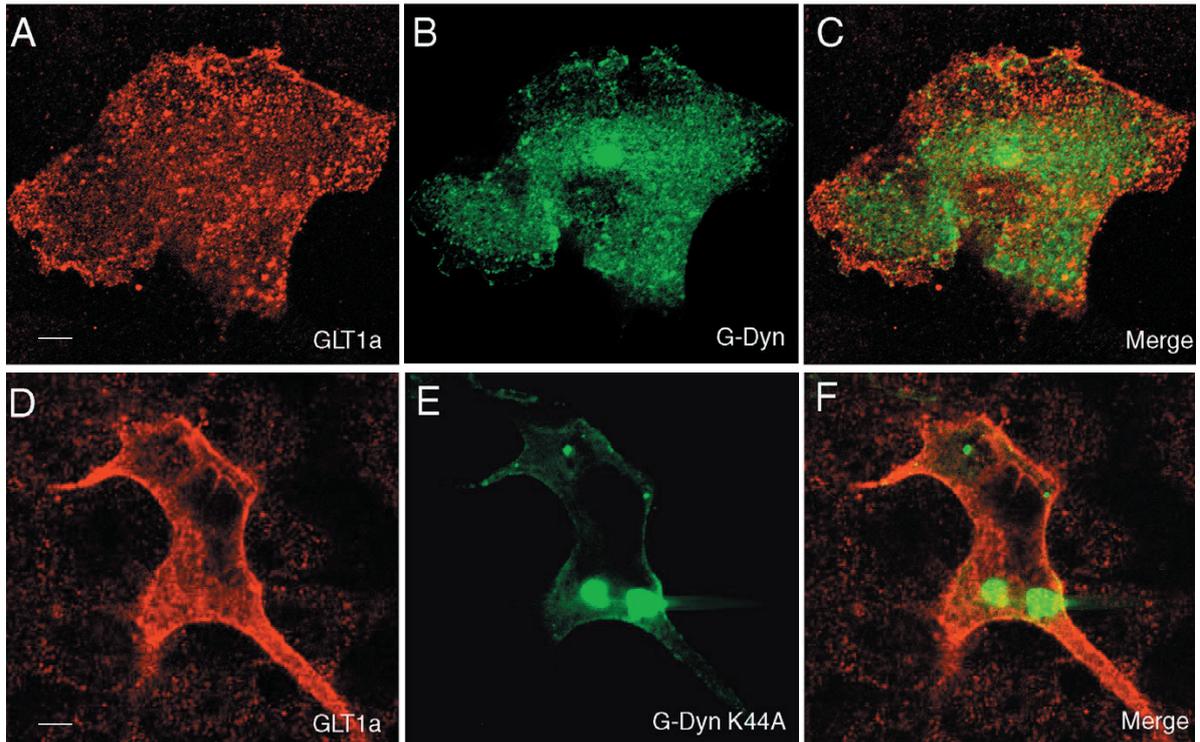
se inmunoprecipitó específicamente HAGLT1a biotinilado con anticuerpos anti HA y se analizó su posible ubiquitilación por inmunotransferencia con anti-Ub. En paralelo también se analizó la posible ubiquitilación de la fracción que quedó después de retirar la proteína de membrana, es decir, la proteína intracelular. En las células control no tratadas se observaba la presencia de proteína ubiquitilada tanto en la fracción de membrana (fig. 45, carril 13, panel inferior derecho), como en la fracción intracelular (fig. 45, carril 19, panel inferior derecho). En ambas fracciones el tamaño de la proteína ubiquitilada es de 70 KDa y 200 KDa que corresponde a la forma monomérica madura de HA-GLT1a y su agregado. La presencia de proteína ubiquitilada en la fracción de proteína de membrana indica que el proceso de ubiquitilación tiene lugar sobre la proteína madura anclada en la membrana plasmática. El tratamiento con TPA desplazó la proteína ubiquitilada desde la fracción de membrana hacia la fracción intracelular (fig. 45, carriles 14 y 20, panel inferior derecho) en un proceso independiente a la síntesis de proteína (fig. 45, carriles 15 y 21, panel inferior derecho). Por tanto, estos resultados son consistentes con la hipótesis de que el TPA promueve la endocitosis de la proteína ubiquitilada.

Por otra parte, el bloqueo del proteosoma mediante inhibidores específicos (MG-132 y lactacistina), produjo un notable incremento de la inmunoreactividad detectada con anti-ubiquitina en ambas fracciones, si bien, fue mayor en la fracción intracelular (fig. 45, carriles 22-24, panel inferior derecho) lo que podría implicar que la proteína endocitada se acumula intracelularmente en respuesta al bloqueo del proteasoma. Estos datos no suponen necesariamente la implicación del proteasoma en la degradación de GLT1a madura, ya que se ha descrito que la inhibición del proteasoma interfiere en los últimos pasos de la transferencia de proteínas ubiquitiladas al lisosoma, y previamente hemos demostrado que la degradación de GLT1a ocurre a través de la vía lisosomal.

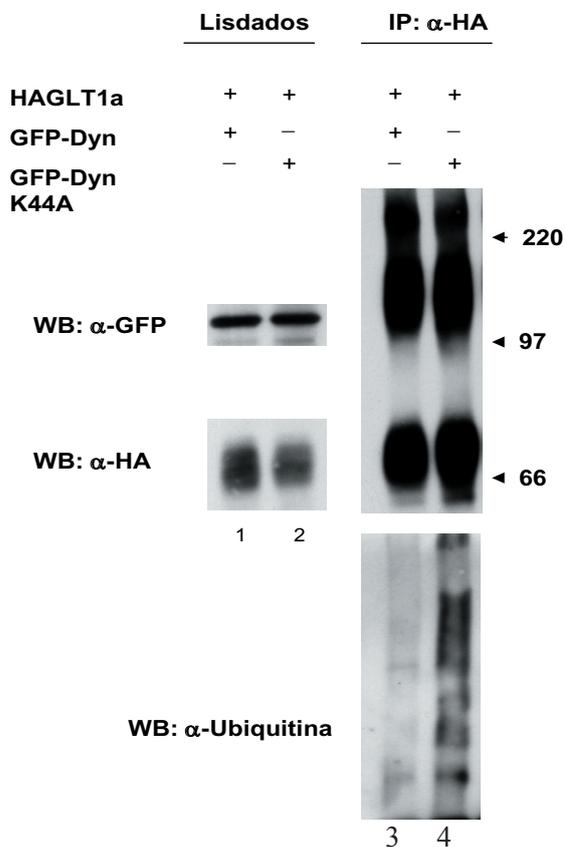
#### **IV. 5. 7. El bloqueo de la endocitosis promueve la acumulación de GLT1a ubiquitilado en la membrana plasmática.**

Para comprobar si la ubiquitilación de GLT1a precedía a su internalización, bien en condiciones control como en presencia de TPA, realizamos experimentos en los que se bloqueó la endocitosis mediante un dominante negativo de la dinamina (DynK44A). Ya que experimentos de otros grupos han demostrado que el efecto del TPA sobre la endocitosis de GLT1a depende de la vía de clatrina (Susnala et al., 2004), el dominante negativo DynK44A debería, por tanto, bloquear la endocitosis de este transportador. En efecto, como se muestra en la figura 46, mientras que en células que expresaban la forma nativa de dinamina (fusionada con GFP, para visualización) el TPA promovía la endocitosis de GLT1a (fig. 46 A-C), en aquellas que expresaban GFP-DynK44A el transportador no se endocitaba en respuesta a TPA (fig. 46 D-F). En cuanto a la ubiquitilación, el mutante DynK44A aumentó la cantidad de transportador ubiquitilado en células si tratar con TPA (fig. 47, carril 4, panel inferior), lo que sugiere que el tráfico basal de GLT1a también es dependiente de su ubiquitilación .

Respecto al efecto del TPA, se observó que el mutante DynK44A promovía la acumulación de HAGLT1a ubiquitilado en la fracción de transportador de membrana plasmática (aislado como se ha descrito en el apartado III. 22 ) (fig. 48. carriles 4 y 10, panel superior).



**Fig. 46.** A-F) El dominante negativo DynK44 bloquea la endocitosis dependiente de TPA de GLT1a. Las células COS7 se transfectaron con vectores de expresión para HAGLT1a (GLT1a), GFP-Dinamina (G-Dyn) y GFP-Dinamina K44 (G-DynK44). Transcurridas 48 h desde la transfección, se añadió TPA en el medio de cultivo (1  $\mu$ M, A-F) o vehículo (DMSO, imágenes no mostradas) en el control. Las células se mantuvieron 30 minutos en el incubador a 37°C antes de ser fijadas y analizadas mediante microscopía confocal. Barras de escala: 5  $\mu$ M.

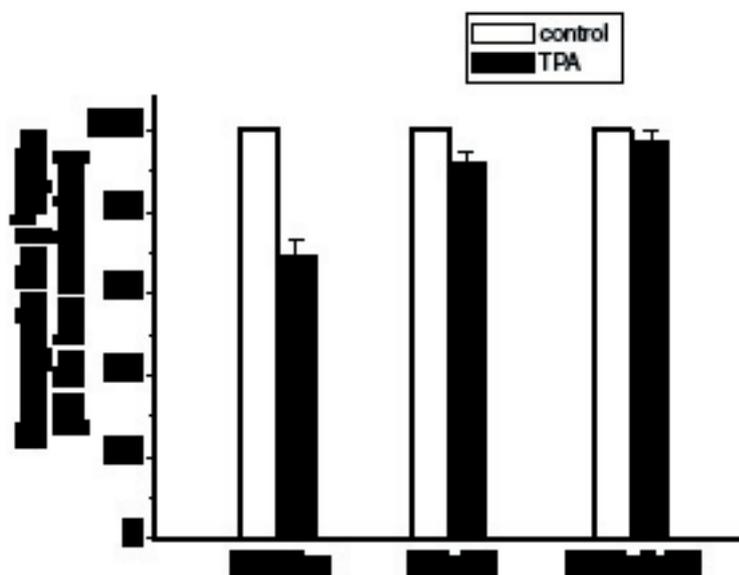


**Fig. 47.** El bloqueo de la endocitosis aumenta la ubiquitinación GLT1a. Se transfectaron células COS7 con vectores de expresión para HA-GLT1a (HAGLT1a), GFP-Dinamina (G-Dyn) y GFP-Dinamina K44A (G-DynK44), en las combinaciones que se indican en la figura. Los extractos celulares se solubilizaron y se inmunoprecipitaron con anticuerpos anti-HA ( $\alpha$ -HA) (carriles 3 y 4). Los inmunoprecipitados se analizaron mediante SDS-PAGE e inmunotransferencia. Las inmunotransferencias se analizaron con anticuerpos anti-HA ( $\alpha$ -HA), anti-ubiquitina ( $\alpha$ -ubiquitina), y anti-CNX ( $\alpha$ -CNX) como control de carga. Los lisados (carriles 1 y 2) corresponden a un 2% del extracto solubilizado en cada caso. Las inmunotransferencias mostradas son representativas de tres experimentos realizados de manera independiente.

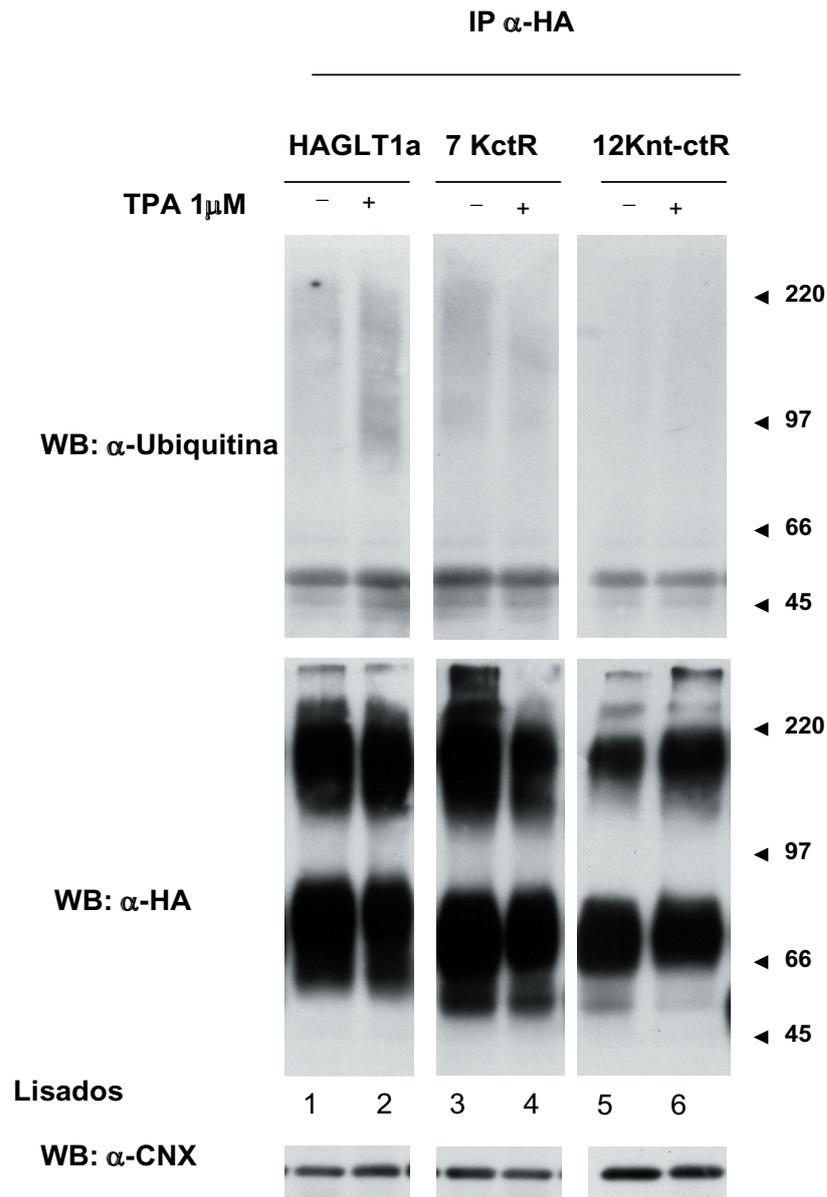


#### IV. 5. 8. La eliminación de las lisinas de la cola C-terminal de GLT1a bloquea la endocitosis promovida por TPA

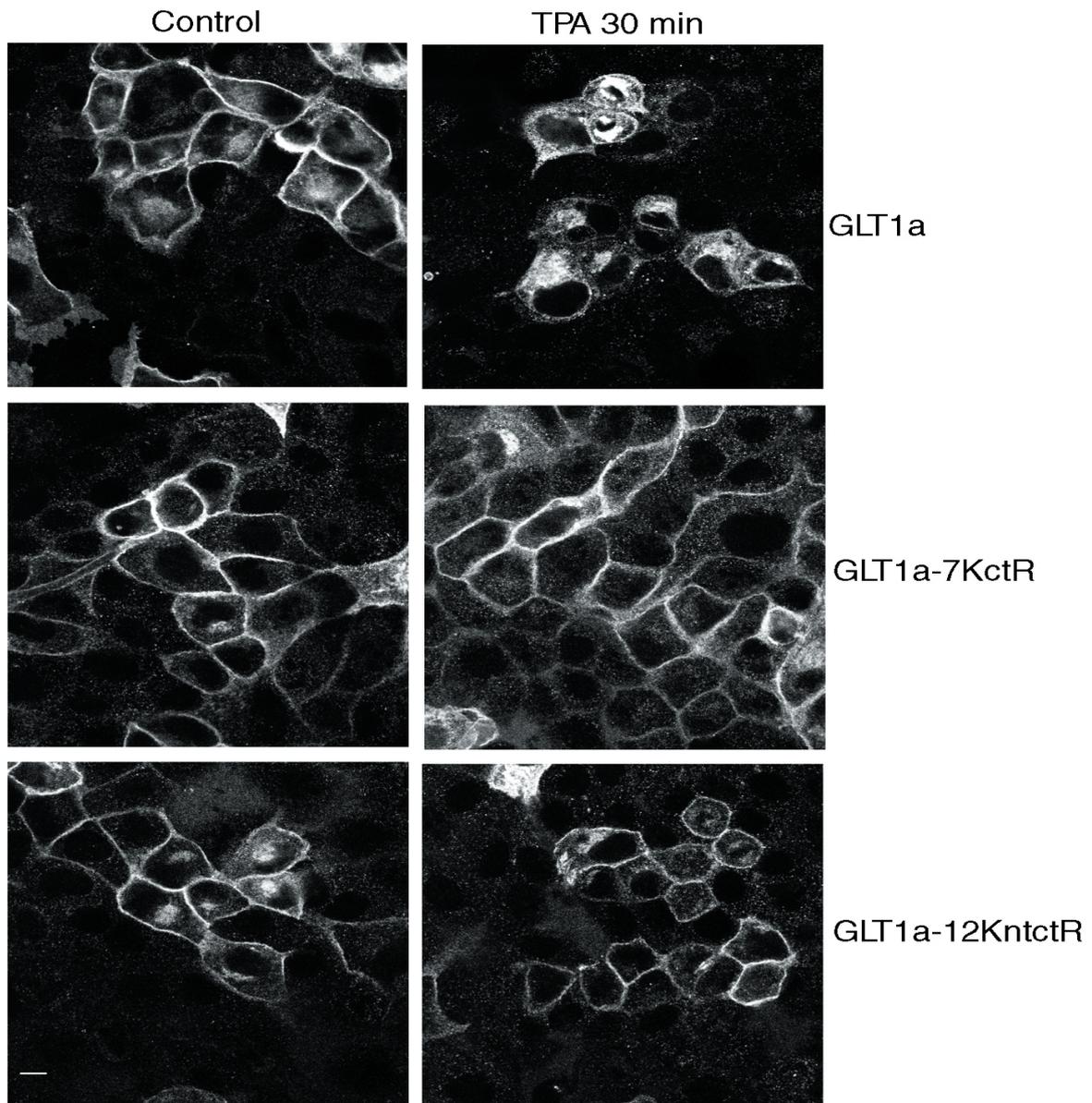
Los resultados anteriores apoyan la hipótesis de que la endocitosis y la ubiquitilación son dos procesos correlacionados en donde la ubiquitilación precede a la endocitosis. Para demostrar de manera inequívoca la existencia de una relación causa-efecto entre estos dos procesos se procedió a eliminar los sitios de ubiquitilación mediante mutagénesis dirigida. Puesto que el efecto del TPA sobre la endocitosis había sido mapeado en el extremo carboxilo de GLT1 por los trabajos del Dr. MB Robinson y colaboradores, procedimos a la eliminación de las siete lisinas que se ubican en esta zona de la proteína, sustituyéndolas por argininas (mutante 7KctR). Generamos además, un mutante en el que además de las lisinas del extremo carboxilo, se sustituyeron las lisinas presentes en el extremo amino terminal de GLT1a (mutante 12Knt-ctR) Todos los mutantes resultaron funcionales en los ensayos de transporte. El efecto del tratamiento con TPA sobre la ubiquitilación y la endocitosis se evaluó en ensayos de transporte, experimentos de inmunotransferencia y microscopía de fluorescencia. En los ensayos de transporte se observó que la eliminación de las lisinas disminuía considerablemente el efecto inhibitor del TPA (fig 49). Mientras que en las células control el TPA inhibió el transporte de glutamato en un 31%, en el mutante 7KctR la inhibición fue de un 8%, y de un 7% para 12Knt-ctR (fig 49). Además se observó que el TPA perdía la capacidad para estimular la ubiquitilación del mutante 7KctR (fig 50 , carriles 2, 4 y 6 panel superior). Por último en los experimentos de microscopía se observó que, mientras la forma nativa de GLT1a era endocitada de manera masiva tras 30 min de tratamiento con TPA, tanto el mutante 7KctR como el mutante 12Knt-ctR permanecían en la membrana plasmática en respuesta al mismo tratamiento (fig 51). En conjunto estos resultados demuestran que la endocitosis promovida por TPA depende de manera crítica de la ubiquitilación de alguna(s) de las lisinas localizadas en el extremo Ct de GLT1a.



**Fig. 49.** La eliminación de las lisinas del extremo c-terminal de GLT1a bloquea la endocitosis dependiente de TPA. El transporte de [ $^3$ H]Glutamato se midió, como se indica en materiales y métodos, en células COS7 transfetadas con HAGLT1a ó los mutantes de sustitución HAGLT1 7KctR (7KctR) o HAGLT1 12Knt-ctR (12Knt-ctR) y un vector de expresión para  $\beta$ -galactosidasa (control de la eficiencia de transfección). Las células se trataron previamente con TPA (1  $\mu$ M, 30 min) o vehículo (DMSO), como se indica en la figura. Se analizó la eficiencia de la transfección mediante un ensayo  $\beta$ -galactosidasa descrito en materiales y métodos. Los datos representados comprenden la media de tres experimentos diferentes con triplicados de cada situación.



**Fig. 50.** La eliminación de las lisinas del extremo c-terminal de GLT1a disminuye la ubiquitilación dependiente de TPA. Se transfectaron células COS7 con vectores de expresión para HA-GLT1a (HAGLT1a), HAGLT1 7KctR (7KctR) o HAGLT1 12Knt-ctR (12Knt-ctR). Las células se trataron con TPA (1  $\mu$ M, 30 min) o vehículo (DMSO), como se indica en la figura. Los extractos celulares se solubilizaron y se inmunoprecipitaron con anticuerpos anti-HA ( $\alpha$ -HA) (carriles 7-12). Los inmunoprecipitados se sometieron a SDS-PAGE e inmunotransferencia. Las inmunotransferencias se analizaron con anticuerpos anti-HA ( $\alpha$ -HA), anti-ubiquitina ( $\alpha$ -ubiquitina), y anti-CNX ( $\alpha$ -CNX) como control de carga. Los lisados (carriles 1 y 2) corresponden a un 2% del extracto solubilizado en cada caso. Las inmunotransferencias mostradas son representativas de tres experimentos realizados de manera independiente.

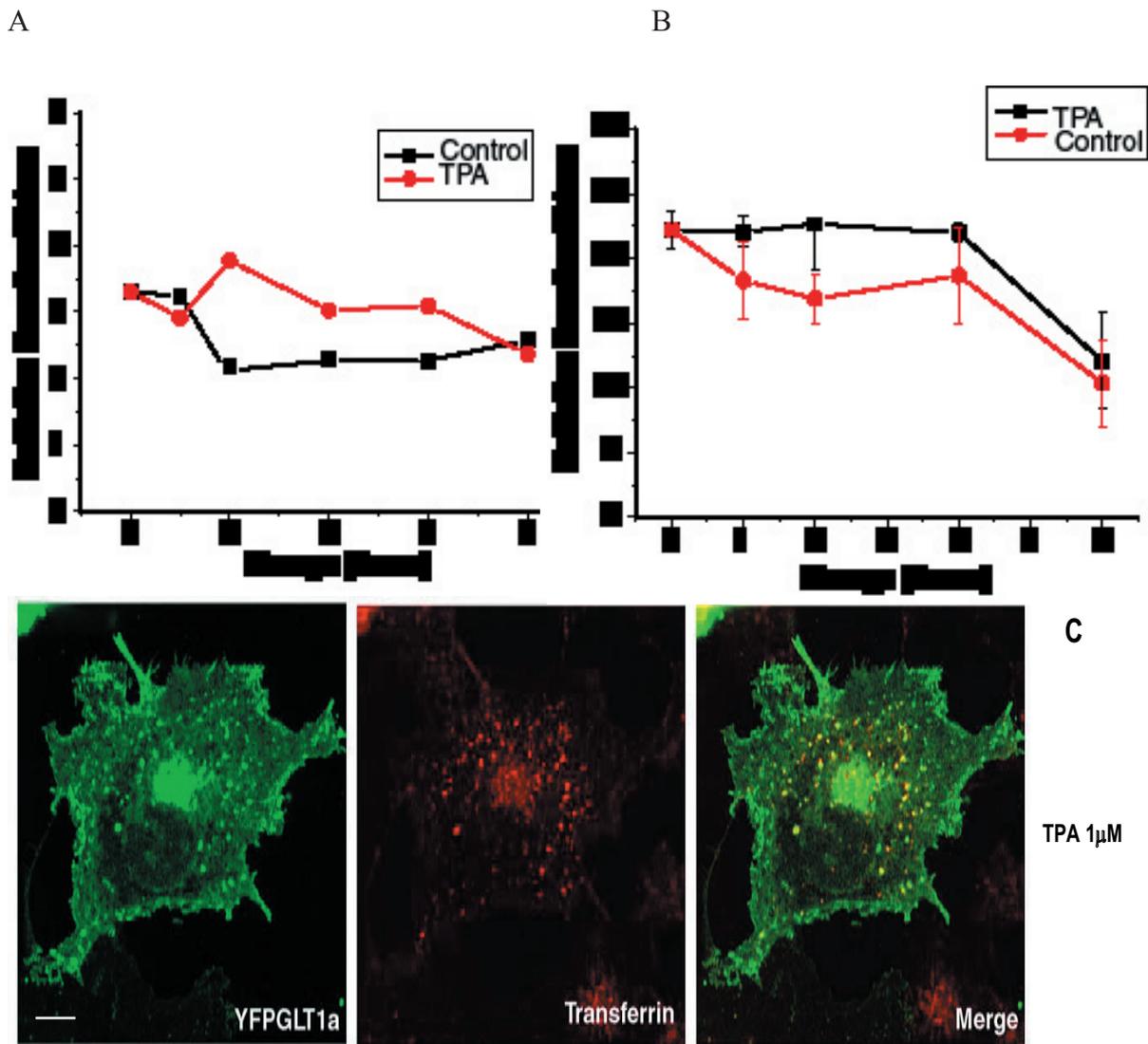


**Fig. 51.** La eliminación de las lisinas del extremo c-terminal de GLT1a bloquea la endocitosis dependiente de TPA. Se transfectaron células MDCK con vectores de expresión para HA-GLT1a (HAGLT1a), HAGLT1 7KctR (7KctR) o HAGLT1 12Knt-ctR (12Knt-ctR). Las células se trataron con TPA (1  $\mu$ M, 30 min) o vehículo (DMSO), como se indica en la figura. Las células fueron fijadas y analizadas mediante microscopía confocal. Barras de escala: 5 $\mu$ M.

#### **IV. 5. 9. La activación de PKC promueve la endocitosis pero no la degradación de GLT1a.**

Puesto que se ha descrito que la activación de PKC promueve la endocitosis y degradación del transportador de dopamina DAT (Sorkin et al., 2005), quisimos comprobar si la estimulación por TPA conducía a la degradación de GLT1a. Para ello, realizamos experimentos de marcaje metabólico en células transfectadas transitoriamente con HAGLT1a. Como se ha descrito previamente, tras un pulso de 30 minutos, permitíamos la maduración de la proteína radiactiva y su llegada a la membrana plasmática (90 minutos de caza en ausencia de tratamiento). En este punto, añadimos TPA (1  $\mu$ M) o vehículo (DMSO) en las células control y estimamos la vida media de HA-GLT1a. En estos ensayos, no detectamos variaciones significativas en la vida media de HA-GLT1a tras el tratamiento con TPA, respecto a las células sin tratar (fig. 52 A). En un abordaje alternativo, tratamos cultivos celulares que expresaban HAGLT1a con cicloheximida (50  $\mu$ g/ml) para eliminar la contribución de la proteína sintetizada *de novo*. Dos horas después del inicio del tratamiento con cicloheximida añadimos TPA (1  $\mu$ M) o vehículo en las células control y analizamos la cantidad de HAGLT1a presente en los extractos celulares solubilizados. De nuevo, el análisis densitométrico de la inmunotransferencia no mostró diferencias significativas en el rango de degradación de HAGLT1a en presencia o ausencia de TPA (fig 52 B). Por tanto, estos datos sugieren que la endocitosis de HAGLT1a inducida por la activación de PKC no conduce a la degradación del transportador.

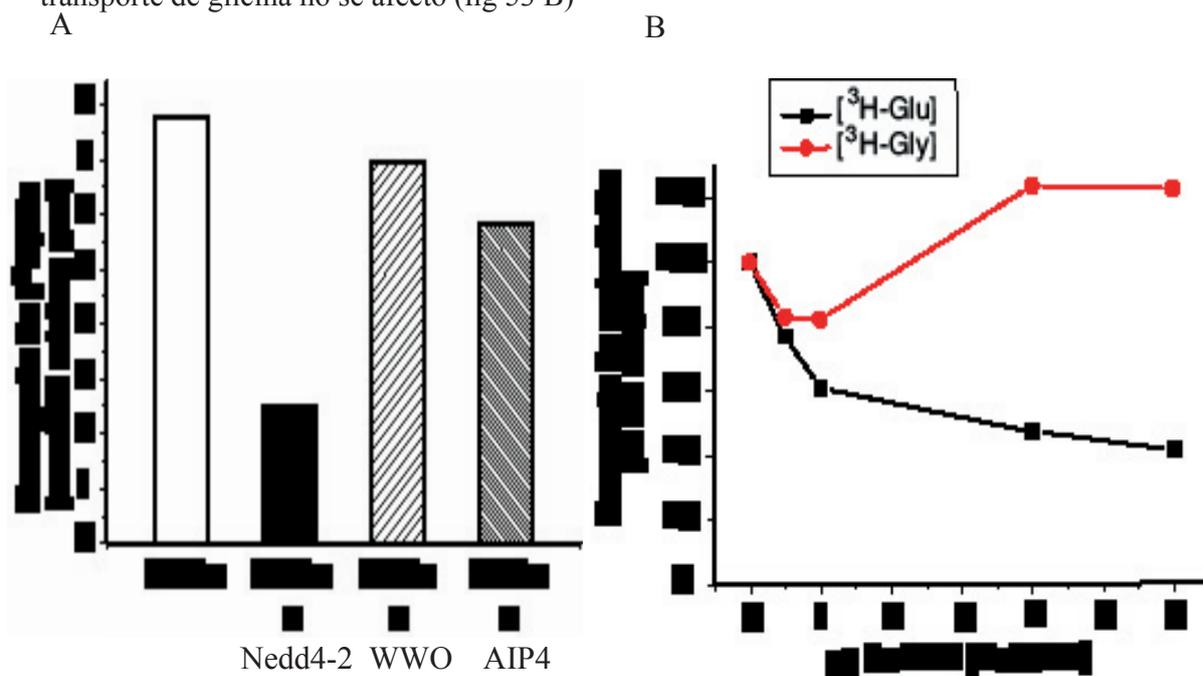
Se ha descrito en la bibliografía que, tras la estimulación por TPA, PKC es secuestrado en vesículas de reciclaje donde colocaliza con el receptor de transferrina y bloquea su reciclaje (Hannun Y. A., et al. 2006). Puesto que PKC además interacciona con GLT1a (González et al., 2005), quisimos comprobar si la estimulación por TPA promovía la localización de GLT1a en vesículas de reciclaje. Para ello, incubamos células COS7 transfectadas con YFP-GLT1a con transferrina unida a un fluoróforo (Alexa 594). Tras permitir la unión de la transferrina-594 al receptor de transferrina, tratamos con TPA (1  $\mu$ M) y analizamos la localización de YFP-GLT1a mediante microscopía confocal. En estos experimentos observamos que, tras la estimulación por TPA, YFP-GLT1a colocaliza con transferrina en vesículas intracelulares (fig 52 C). Estos datos sugieren que la endocitosis dependiente de la activación de PKC, podría conducir al reciclaje de GLT1a y no a su degradación.



**Fig. 52. A-C)** Efecto del TPA sobre la endocitosis y degradación de GLT1a. **A)** Células COS7 transfectas con HAGLT1a se incubaron durante 30 min con una mezcla de [<sup>35</sup>S]metionina-cisteína (A, panel superior). Las células se lavaron y se añadió medio frío para la incubación durante 90 min (caza 90 min) que permitiría la llegada a membrana de la proteína radiactiva madura. El activador de PKC TPA se mantuvo en el medio de cultivo frío durante los tiempos indicados (0,5-8 h) antes de proceder a la lisis celular. Las muestras se inmunoprecipitaron con anticuerpos anti-HA. Las proteínas inmunoprecipitadas se analizaron mediante electroforesis y exposición autoradiográfica del gel deshidratado. Los datos representados en A corresponden al análisis densitométrico de una autoradiografía representativa de tres experimentos independientes. **B)** Células COS7 transfectas con HAGLT1a se incubaron con cicloheximida (50μg/ml) a 37°C durante las dos horas previas al tratamiento con TPA (1μM) o vehículo (DMSO) en los tiempos indicados en la figura. Las células se lisaron y se inmunoprecipitaron con anticuerpos anti-HA. Las proteínas inmunoprecipitadas se sometieron a SDS-PAGE e inmunotransferencia. Las inmunotransferencias se analizaron con anticuerpos anti-HA (α-HA). Los datos representados en B corresponden al análisis densitométrico de tres experimentos independientes. **C)** Las células COS7 se transfectaron con vectores de expresión para YFP-GLT1a (YFP-GLT1a). Transcurridas 48 h desde la transfección, se añadió transferrina unida a un fluoróforo (Alexa 488) en el medio de cultivo. Las células se trataron con TPA (1 μM) o vehículo (DMSO) en el control (imagen no mostrada). Las células se mantuvieron en 30 min el incubador a 37°C antes de ser fijadas y analizadas mediante microscopía confocal. Barras de escala: 5μM.

#### IV. 5. 10. La ubiquitin ligasa Nedd4-2 podría participar en la ubiquilación de GLT1a.

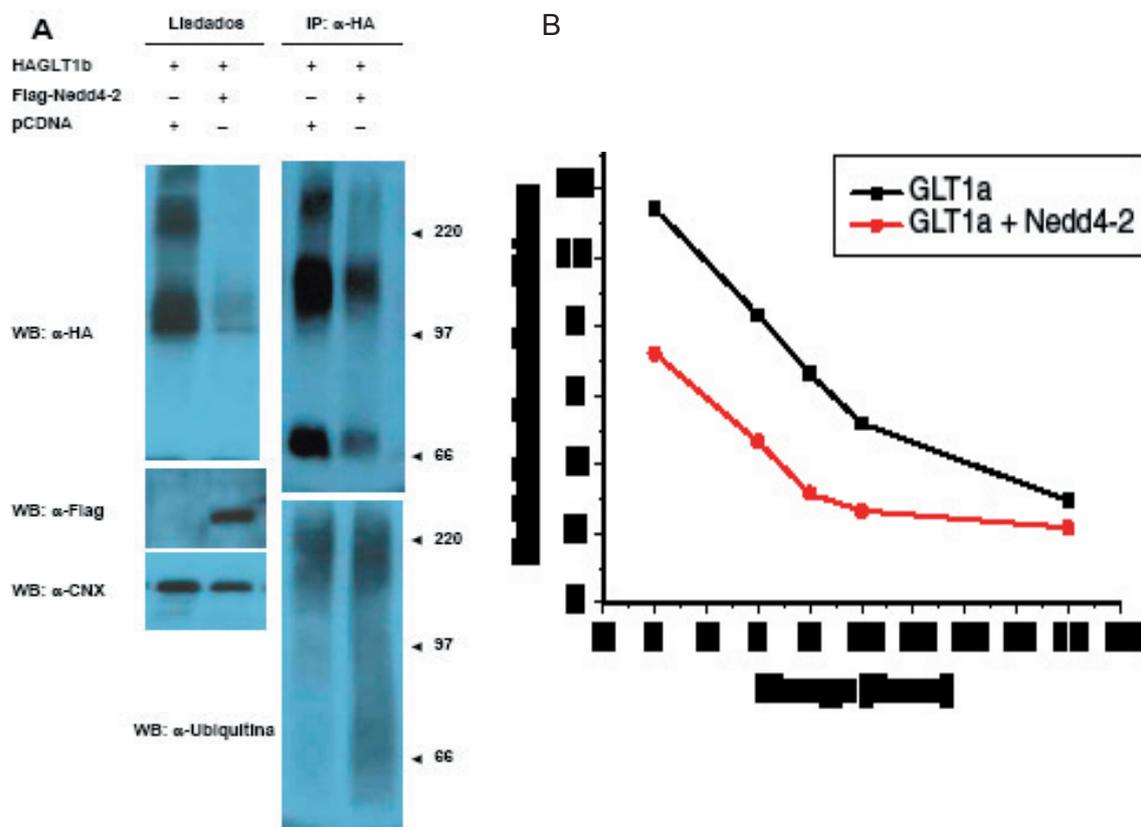
Estudios previos han descrito que la expresión de GLT1 en oocitos de *Xenopus* disminuye cuando se coexpresa con la ubiquitin ligasa Nedd4-2 (Boehmer et al., 2006). Decidimos investigar si este efecto era causado por la ubiquitilación de GLT1 y como Nedd4-2 era capaz de mediar en este proceso en células COS7. De manera semejante a lo ya publicado en oocitos de *Xenopus*, la coexpresión de HA-GLT1a con Flag-Nedd4-2 en células COS7 produjo una disminución significativa de la actividad de transporte de GLT1 (fig 53). Esta disminución no se detectó con otras ubiquitin ligasas como AIP4 y WWO (fig. 53 A) por lo que parece ser causado de manera específica por la ligasa Nedd4-2. En otro experimento, transfectamos células COS7 con cantidades crecientes del vector de expresión para Nedd4-2 (de 0 a 6  $\mu$ gr) manteniendo constante la expresión para HA-GLT1a (4  $\mu$ gr) (fig 53 B, en negro). Como control negativo se utilizó el transportador de glicina GLYT1 (fig 53 B, en rojo), para el que no tenemos evidencias de un efecto de esta ubiquitin-ligasa. Los resultados mostraron que la disminución de la actividad de transporte para GLT1 es dependiente del grado de expresión de Nedd4-2, mientras que el transporte de glicina no se afectó (fig 53 B)



**Fig. 53. A-B)** Análisis del efecto de tres ubiquitin ligasas sobre GLT1a. **A)** El transporte de  $[^3\text{H}]$ Glutamato se midió como se indica en materiales y métodos, en células COS7 cotransfectadas con HAGLT1a y vectores de expresión para Nedd4-2, WWO, AIP4 y  $\beta$ -galactosidasa (control de la eficiencia de transfección, no mostrado). **B)** Se midió el transporte de  $[^3\text{H}]$ Glutamato (línea negra) y  $[^3\text{H}]$ Glicina (línea roja) en células COS7 cotransfectadas con vectores de expresión para HAGLT1a y Nedd4-2 (B, izquierda) ó HAGLYT1 y Nedd4-2 como control negativo (derecha). Los datos representados comprenden la media de tres experimentos diferentes con triplicados de cada situación.

#### IV. 5. 11. La coexpresión de Nedd4-2 incrementa la ubiquitilación y degradación de GLT1a.

Puesto que la reducción del transporte de glutamato causada por Nedd4-2 podría deberse a una a una disminución de la cantidad de transportador presente en la célula, analizamos los niveles de expresión del mismo mediante inmunotransferencia. En efecto, detectamos una notable disminución de la cantidad de transportador presente en los extractos de proteína total derivados de las células que coexpresaban Nedd4-2 y GLT1a (fig. 54 A, ver lisados revelados con  $\alpha$ -HA), algo que no ocurría con otras proteínas del mismo extracto, como calnexina (fig. 54 A, ver lisados revelados con anti-calnexina,  $\alpha$ -CNX). La disminución de la cantidad de HA-GLT1a presente en los lisados se reflejó en una menor cantidad de HAGLT1 inmunoprecipitado con anticuerpos anti-HA a partir de estos extractos celulares (fig. 54, IP:  $\alpha$ -HA).



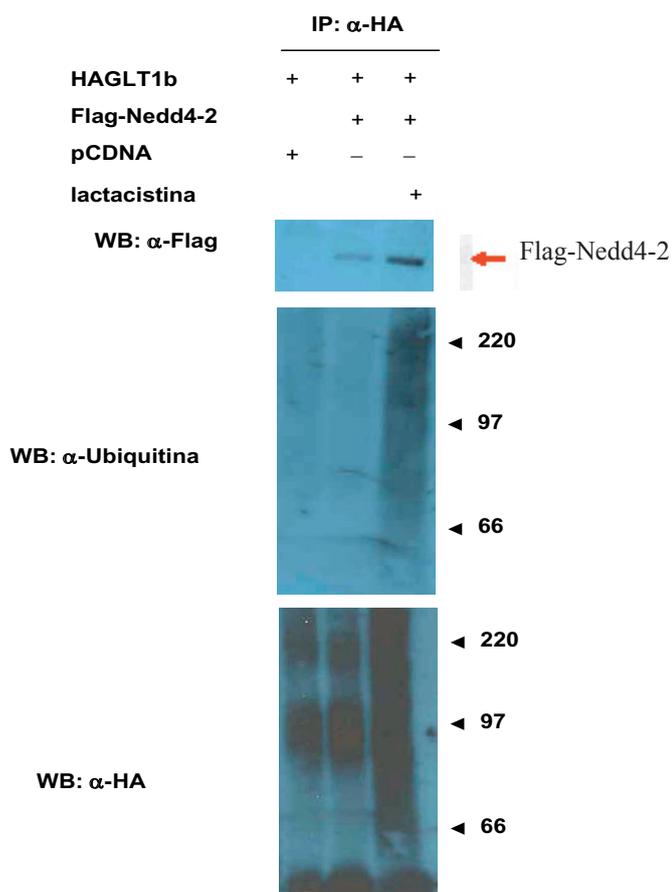
**Fig. 54. A-C)** La coexpresión de GLT1a y Nedd4-2 aumenta la ubiquitilación y degradación del transportador. **A)** Se transfectaron células COS7 con vectores de expresión para GLT1a (HAGLT1a) y Nedd4-2 (Flag-Nedd4-2) en las combinaciones que se indican en la figura. Los extractos celulares se solubilizaron y se inmunoprecipitaron con anticuerpos anti-HA ( $\alpha$ -HA) (A, panel derecho). Los inmunoprecipitados se sometieron a SDS-PAGE e inmunotransferencia. Las inmunotransferencias se analizaron con anticuerpos anti-HA ( $\alpha$ -HA), anti-ubiquitina ( $\alpha$ -ubiquitina), anti-Flag ( $\alpha$ -Flag) y anti-CNXX ( $\alpha$ -CNXX) como control de carga. Los lisados (A, panel izquierdo) corresponden a un 2% del extracto solubilizado en cada caso. Las inmunotransferencias mostradas son representativas de tres experimentos realizados de manera independiente. **B)** Células COS7 transfectadas con HAGLT1a y Flag-Nedd4.2 se incubaron durante 30 min con una mezcla de [ $^{35}$ ]metionina-cisteína. Las células se lavaron y se añadió medio frío para las cazas a los tiempos indicados. Las células se solubilizaron y se inmunoprecipitaron con anticuerpos anti-HA. Las proteínas inmunoprecipitadas se analizaron mediante electroforesis y exposición autoradiográfica del gel deshidratado. Los datos representados en B corresponden al análisis densitométrico las autoradiografías.

No obstante, cuando el inmunoprecipitado se analizó con anti-Ub, se observó que HA-GLT1a estaba considerablemente más ubiquitilado (fig. 54,  $\alpha$ -Ubiquitina). Puesto que estos datos indicarían que Nedd4-2 aumenta la ubiquitilación de GLT1a y disminuye su concentración realizamos experimentos de pulso y caza para determinar el efecto de la expresión de Nedd4-2 sobre GLT1a. La cuantificación de los experimentos en los que se evaluó la vida media de la proteína madura mostraron una reducción de aproximadamente 3h en la vida media de GLT1a cuando se coexpresa con Nedd4-2 (fig 54 B). En conjunto, estos experimentos demuestran que Nedd4-2 acelera la degradación de GLT1a promoviendo su ubiquitilación.

#### IV. 5. 12. Nedd4-2 interacciona con GLT1.

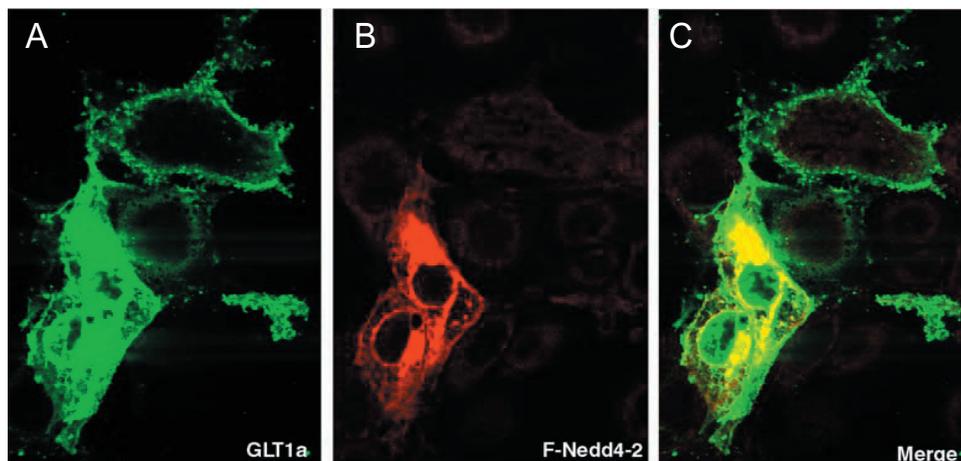
Se ha descrito que las ubiquitin ligasas de la familia HECT, a la que pertenece Nedd4-2, realizan la transferencia directa de la molécula de ubiquitina conjugada con el enzima E2 al sustrato. Esta transferencia de moléculas de ubiquitina puede implicar una interacción directa entre la ubiquitin ligasa y la proteína diana. Para comprobar si GLT1a interacciona con Nedd4-2, cotransfectamos células COS7 con vectores de expresión para flag-Nedd4-2 y HAGLT1a. Como se muestra en la figura 55, la inmunoprecipitación con anticuerpos anti-HA de HAGLT1a, precipitó, de manera moderada, a flag-Nedd4-2 y la interacción se potenció por el tratamiento de las células con lactacistina (fig 55).

**Fig. 55.** GLT1a y Nedd4-2 coimmunoprecipitan en un sistema heterólogo. Se transfectaron células COS7 con vectores de expresión para GLT1a (HAGLT1a) y Nedd4-2 (Flag-Nedd4-2). Las células se trataron con lactacistina (10  $\mu$ M, 16h) o vehículo (DMSO) en los carriles que se indican en la figura. Los extractos celulares se solubilizaron y se inmunoprecipitaron con anticuerpos anti-HA ( $\alpha$ -HA) (A, panel derecho). Los inmunoprecipitados se sometieron a SDS-PAGE e inmunotransferencia. Las inmunotransferencias se analizaron con anticuerpos anti-HA ( $\alpha$ -HA), anti-ubiquitina ( $\alpha$ -ubiquitina), anti-Flag ( $\alpha$ -Flag) y anti-CNX ( $\alpha$ -CNX) como control de carga (no se muestra). Las inmunotrasnferencias mostradas son representativas de tres experimentos realizados de manera independiente.



De manera compatible con estos datos, YFP-GLT1a y flag-Nedd4-2 coexpresadas en células COS7 mostraron una fuerte colocalización en experimentos de microscopía confocal (fig. 56, C).

Estos resultados demuestran que Nedd4-2 es capaz de interactuar con GLT1a en el contexto celular.

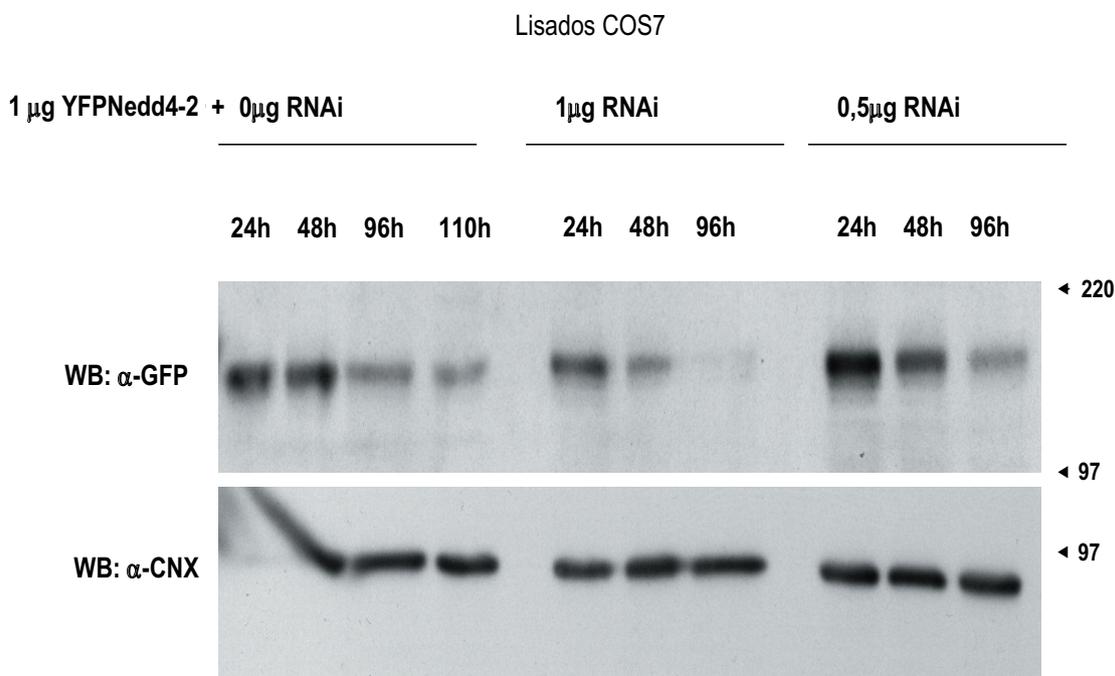


**Fig. 56. A-C)** Comparación de los efectos causados por Nedd4-2 y lactacistina sobre GLT1a. Se transfectaron células COS7 con vectores de expresión para YFP-GLT1a (GLT1a, D) y Flag-Nedd4-2 (F-Nedd4-2, A-C). Las células se fijaron y se incubaron con anticuerpos anti-Flag seguido de un anticuerpo secundario acoplado a un fluoróforo (Alexa 594) antes de ser fijadas y analizadas mediante microscopía confocal. Barras de escala: 5  $\mu$ M.

#### IV. 5. 13. El silenciamiento de Nedd4-2 mediante RNAi disminuye la ubiquitilación de GLT1a y su degradación.

Puesto que, como ya hemos comprobado, la sobreexpresión de Nedd4-2 aumenta la ubiquitilación de GLT1a y acelera la degradación de este transportador, quisimos comprobar cuál era el efecto del silenciamiento de Nedd4-2 sobre GLT1a. Para ello, diseñamos RNA de interferencia (siRNA) específicos para Nedd4-2. Puesto que no existen anticuerpos comerciales que reconozcan a Nedd4-2, caracterizamos la funcionalidad de RNAi en un sistema heterólogo que expresaba YFP-Nedd4-2. En este sistema, observamos una consistente disminución en la expresión de YFP-Nedd4-2 en células transfectadas con el RNAi específico para Nedd4-2 que no se detectó en células sin transfectar (fig 57) o transfectadas con siRNA no relacionados (datos no mostrados). El siguiente paso fue silenciar a Nedd4-2 expresado de manera endógena en una línea celular de neuroblastoma de ratón (N2a), transfectada con vectores de expresión para HAGLT1a. En estos ensayos se cuantificó la disminución de Nedd4-2 mediante RT-PCR y PCR cuantitativa.

El análisis mediante inmunotransferencia de HAGLT1a reveló una notable acumulación del transportador en las células tratadas con el RNAi específico para Nedd4-2 (fig. 58) en comparación con las células transfectadas con RNAi no relacionados (fig 58, carriles 1 y 3 del panel inferior). Además, el silenciamiento de Nedd4-2 endógeno produjo una disminución en la ubiquitilación de HAGLT1a en células tratadas con el inhibidor proteasomal lactacistina (fig 58, carriles 2 y 4 del panel superior). Estos datos confirman que Nedd4-2 es capaz de regular la degradación constitutiva de GLT1a mediante ubiquitilación.

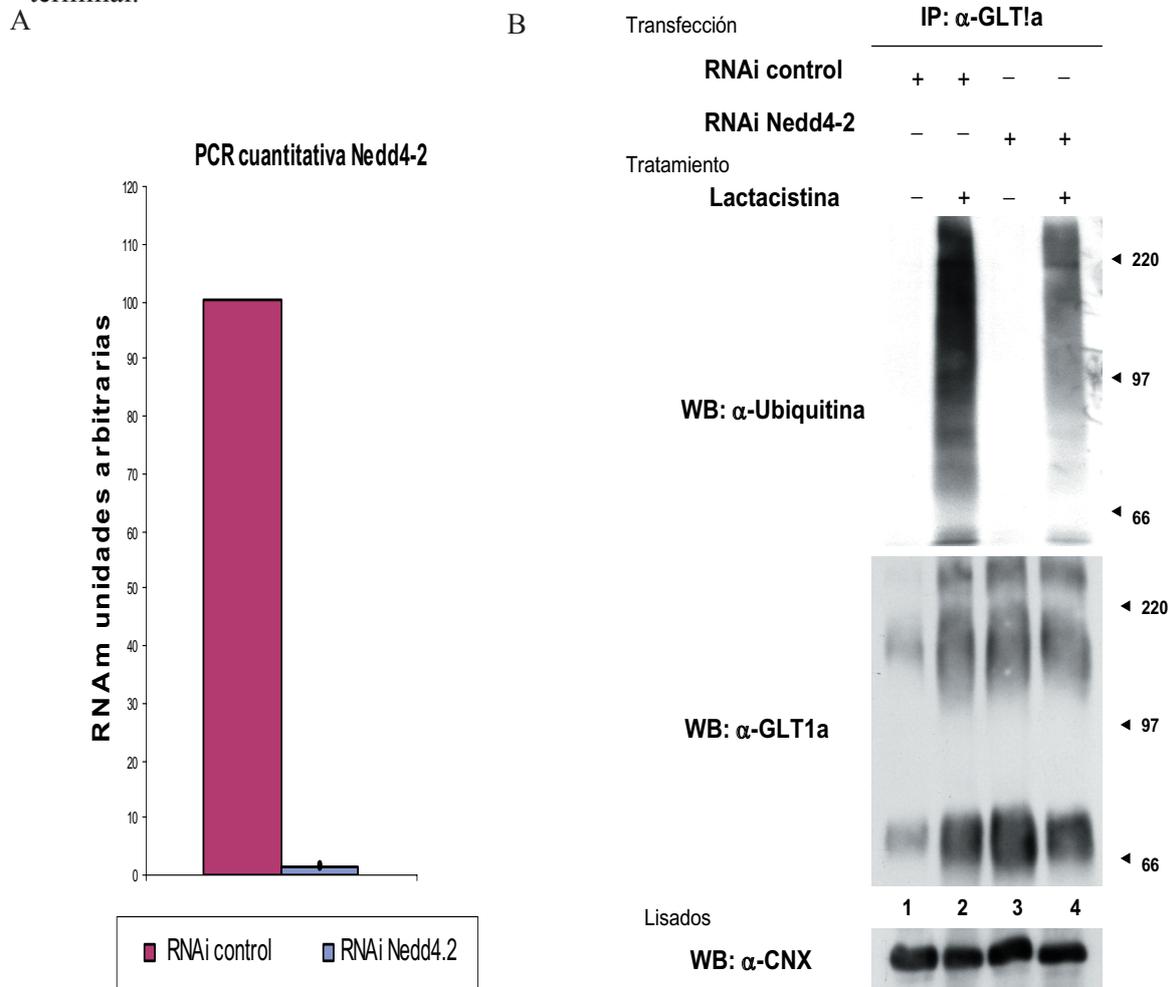


**Fig. 57.** Silenciamiento de Nedd4-2 mediante RNAi. Se transfectaron células COS7 las cantidades de RNAi indicadas en la figura y con vectores de expresión para Nedd4-2 (YFP-Nedd4-2). Las células se mantuvieron en el incubador y se lisaron transcurridos los tiempos indicados en la figura. Los extractos celulares se solubilizaron a SDS-PAGE e inmunotransferencia. Las inmunotransferencias se analizaron con anticuerpos anti-YFP ( $\alpha$ -GFP) y anti-CNX ( $\alpha$ -CNX) como control de carga. Los lisados corresponden a un 4% del extracto solubilizado en cada caso.

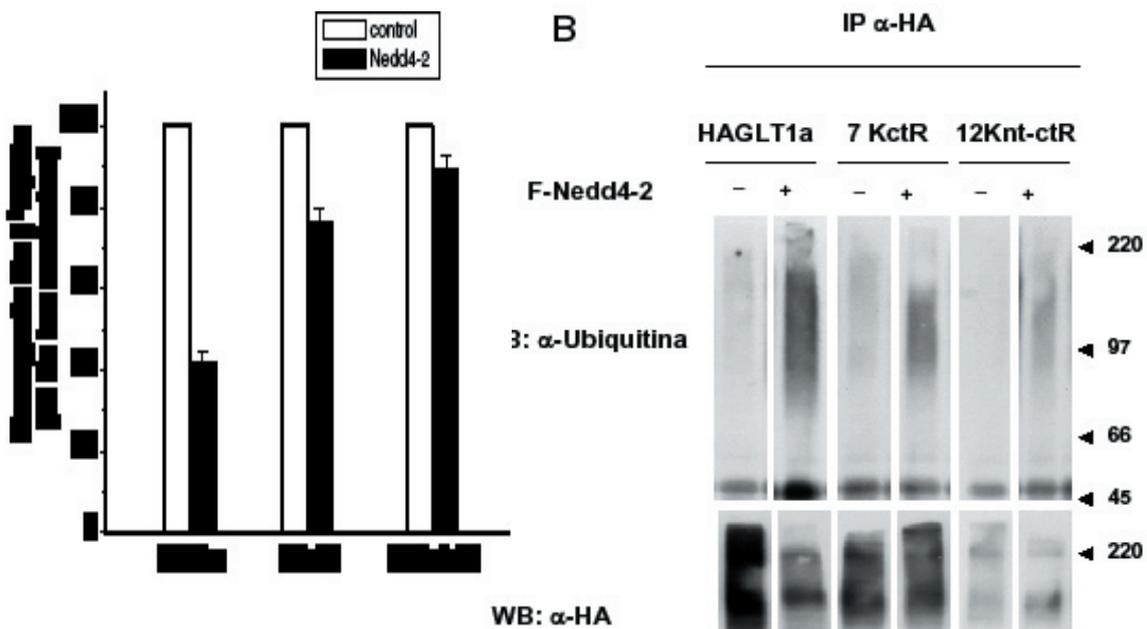
#### IV. 5. 14. La eliminación de las lisinas de los extremos N y C-terminal de GLT1a bloquea la degradación promovida por Nedd4.2

Los resultados anteriores apoyan la hipótesis de que la ubiquitilación de GLT1a promovida por Nedd4-2 regula la degradación del transportador. Puesto que el proceso de ubiquitilación ha de tener lugar sobre las lisinas presentes en los extremos intracelulares N terminal y/o C terminal quisimos evaluar la participación de estos residuos en la ubiquitilación dependiente de Nedd4-2. Para ello, realizamos ensayos de transporte y western blot con los mutantes 7KctR y 12Knt-ctR que previamente hemos descrito. En los ensayos de transporte, la cotransfección de Nedd4-2 con los mutantes de sustitución de las lisina produjo una reducción en la actividad de transporte de un 26% para 7KctR y tan sólo un 10% para 12Knt-ctR frente al 59% de inhibición obtenido para GLT1a nativo (fig 59 A). Los datos de inmunotransferencia fueron coherentes con estos ensayos, ya que no detectamos una disminución significativa en la cantidad de

proteína mutante en presencia de Nedd 4-2 (fig 59 B, panel inferior). Además, el análisis de las inmunotransferencias con anticuerpos anti-ubiquitina nos permitió observar que existe una correlación entre el menor grado de degradación de los mutantes y su grado de ubiquitilación. Así, la ubiquitilación fue menor para el mutante 12Knt-ctR que para el 7KctR (fig 59 B, carriles 4 y 6, panel superior). Estos resultados implicarían que en la regulación de la degradación de GLT1a regulada por Nedd4.2 están implicadas lisinas del extremo C terminal y del extremo N terminal.



**Fig. 58. A-B)** Silenciamiento de Nedd4-2 mediante RNAi. **A)** Se transfectaron células COS7 con  $1\mu\text{g}$  de RNAi, específico para Nedd4-2 ó para HPRT (control). Transcurridas 48h se volvieron a transfectar con vectores de expresión para HAGLT1a, 24 h después se trataron con lactacistina ( $10\mu\text{M}$ , 16h). Los extractos celulares se solubilizaron y se inmunoprecipitaron con anticuerpos anti-HA ( $\alpha$ -HA) (panel derecho). Los inmunoprecipitados se sometieron a SDS-PAGE e inmunotransferencia. Las inmunotransferencias se analizaron con anticuerpos anti-HA ( $\alpha$ -HA), anti-ubiquitina ( $\alpha$ -ubiquitina), anti-Flag ( $\alpha$ -Flag) y anti-CNX ( $\alpha$ -CNX) como control de carga (no se muestra). **B)** RT-PCR y PCR cuantitativa del RNAm de Nedd4-2 (A). Los datos representados suponen tres experimentos independientes normalizados con  $\beta$ -actina y calnexina.



**Fig. 59. A-B)** La eliminación de las lisinas del extremo N y C-terminal de GLT1a disminuye la ubiquitilación y degradación dependiente de Nedd4-2. **A)** El transporte de  $[^3\text{H}]$ Glutamato se midió, como se indica en materiales y métodos, en células COS7 transfetadas con HAGLT1a o los mutantes de sustitución HAGLT1 7KctR (7KctR), HAGLT1 12Knt-ctR (12Knt-ctR) y Flag-Nedd4.2. Los datos representados comprenden la media de tres experimentos diferentes con triplicados de cada situación. **B)** Se transfectaron células COS7 con las construcciones indicadas en la figura. Los extractos celulares se solubilizaron y se inmunoprecipitaron con anticuerpos anti-HA ( $\alpha$ -HA) (carriles 7-12). Los inmunoprecipitados se sometieron a SDS-PAGE e inmunotransferencia. Las inmunotransferencias se analizaron con anticuerpos anti-HA ( $\alpha$ -HA) y anti-ubiquitina ( $\alpha$ -ubiquitina), y anti-CNX ( $\alpha$ -CNX) como control de carga (no se muestra). Las inmunotransferencias mostradas son representativas de tres experimentos realizados de manera independiente.



## **V. DISCUSIÓN.**



## V. DISCUSIÓN

El correcto funcionamiento de la neurotransmisión mediada por glutamato implica el trabajo coordinado de una serie de proteínas que se encuentran en la membrana de los elementos presinápticos, los postsinápticos y las células de glía adyacentes. La señal química transmitida por el glutamato liberado de la neurona presináptica se transforma en una señal eléctrica en la neurona postsináptica tras la activación de los diferentes tipos de receptores de glutamato. Otras proteínas de membrana, los transportadores de glutamato, se encargan de reducir la concentración sináptica de glutamato hasta niveles no tóxicos. Esta función es realizada principalmente por GLT1, aunque en ciertas sinapsis otros transportadores juegan un papel importante. Pero las sinapsis glutamatérgicas requieren de transportadores adicionales para mantener su función: el glutamato atrapado en las células de glía por GLT1 ha de volver a las neuronas en forma de glutamina completando el llamado ciclo glutamato-glutamina. La salida de glutamina de la glía y la entrada en las neuronas podría implicar a transportadores de la familia SNAT. Además uno de los subtipos de receptores de glutamato, el receptor de NMDA, requiere glicina como coagonista, un neurotransmisor cuyos niveles se controlan básicamente por el transportador de glicina GLYT1 y quizá también por miembros de la familia SNAT.

En esta tesis se han abordado diferentes aspectos de la biología de varios de los sistemas de transporte mencionados. Nuestros principales hallazgos se pueden resumir en:

- Hemos descrito por primera vez la distribución inmunohistoquímica de los transportadores de aminoácidos neutros SNAT2 y SNAT5
- Hemos demostrado que la nueva isoforma del transportador de glutamato GLT1, GLT1b, se encuentra en las neuronas, con una localización postsináptica.
- Hemos demostrado que GLT1b interacciona con la proteína andamiaje de la densidad postsináptica PSD-95 y, probablemente a través de esta, con los receptores de NMDA
- Hemos demostrado que GLT1a también interacciona con PSD95 y NMDAR, gracias a la heterooligomerización con GLT1b que proporciona la secuencia de interacción con los dominios PDZ de PSD95
- Hemos demostrado que el tráfico intracelular de GLT1, tanto hacia la membrana como desde la membrana es controlado por procesos de ubiquitilación.

### V. 1. Localización de miembros de la familia SNAT.

Los sistemas de transporte de aminoácidos neutros (SNATs) podrían jugar un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis en las sinapsis glutamatérgicas, ayudando a la transferencia de aminoácidos entre las células de glía y las neuronas. Esto puede ser especialmente relevante en el caso de la glutamina, contribuyendo al llamado ciclo glutamato-glutamina, que suministra glutamina a las neuronas glutamatérgicas y a las GABAérgicas a partir de la cual derivan el glutamato o el GABA, respectivamente (Danbolt, 2001). Esta familia génica incluye varias proteínas que pertenecen a dos grupos mecanísticamente bien diferenciados: los tradicionalmente denominados sistemas A y N. A los primeros corresponden SNAT1 (ATA1) y SNAT2 (ATA2),

mientras que a los segundos corresponden SNAT3 (SN1) y SNAT5 (SN5) (Chaudri et al., 1999). En esta Tesis describimos la generación de anticuerpos específicos para los transportadores de aminoácidos neutros denominados SNAT2 y SNAT5. Con los anticuerpos desarrollados hemos estudiado la distribución mediante técnicas inmunoquímicas e inmunohistoquímicas de SNAT2 y SNAT5, desconocida hasta el momento. Los resultados indican que SNAT5 está enriquecido en las zonas glutamatérgicas, ya que a baja resolución colocaliza con los marcadores glutamatérgicos vGLUT1 y vGLUT2. Sin embargo, por microscopía de alta resolución hemos demostrado que no se encuentra en las terminales glutamatérgicas, sino en la membrana de los astrocitos que envuelven a las sinapsis asimétricas, es decir excitadoras. Esta situación parece adecuada para intervenir en la salida de glutamina desde las células de glía en dirección a las neuronas. La situación es menos clara para SNAT2, ya que se expresa en determinadas poblaciones de neuronas claramente glutamatérgicas, como las de la corteza, pero también lo hace en neuronas no glutamatérgicas. SNAT2, de hecho está especialmente enriquecido en zonas en donde la neurotransmisión glicinérgica es abundante, como la médula, y algunos núcleos del tallo cerebral como los auditivos, y podría participar en la regulación de la concentración de glicina en estas áreas puesto que, *in vitro*, este aminoácido inhibitorio es uno de los sustratos preferentes para SNAT2. Su participación como transportador neuronal de glutamina, dentro del ciclo glutamato-glutamina es más improbable, ya que no sólo no se enriquece en terminales glutamatérgicos sino que está excluido de los mismos.

Volviendo a SNAT5, su localización astrocítica es similar a la publicada para el transportador SNAT3. Aunque las propiedades moleculares de SNAT3 se han estudiado en mayor profundidad que las de SNAT5, parece que ambas proteínas muestran los mismos mecanismos básicos de transporte. Tanto SNAT3 como SNAT5 median la recaptura de aminoácidos dependiente de  $\text{Na}^+$  e intercambiando  $\text{H}^+$ . Además, se ha observado movimiento de carga hacia fuera tanto para SNAT3 como para SNAT5. En el caso de SNAT3, se ha atribuido a la conductancia de protones desacoplada disparada por glutamina a través del transportador, un hecho que podría favorecer el flujo reverso de glutamina a través de la membrana plasmática (Chaudhry et al., 2001). Esto es un paso esencial en el ciclo glutamato-glutamina entre las células gliales y las neuronas. La comparación de los datos de distribución obtenidos en esta Tesis para SNAT5 con los previamente publicados para SNAT3 nos indica un solapamiento parcial de la expresión de ambas proteínas, pero también un cierto grado de complementariedad. Por ejemplo en el diencefalo, el tallo cerebral, el cerebelo o la retina los niveles de SNAT5 son bajos mientras que los de SNAT3 son elevados (Boulland et al., 2002). Lo contrario ocurre en el hipocampo o el estriado. De hecho, se había descrito que la distribución de SNAT3 correlaciona mejor con las sinapsis GABA-érgicas que con las glutamatérgicas, lo que llevó a sugerir que SNAT3 podría transferir glutamina desde los astrocitos a las neuronas inhibitorias para la síntesis de GABA (Boulland et al., 2002). En contraposición con SNAT3, nuestros datos apoyan el posible papel de SNAT5 en el suministro de glutamina a las neuronas glutamatérgicas. Además de la glutamina, SNAT5 es capaz de transportar otros aminoácidos, aunque los mecanismos de transporte para los mismos no se han estudiado. Entre ellos cabe destacar la glicina, un coagonista de los receptores

de glutamato de tipo NMDA. Por tanto es concebible que SNAT5 también pudiera colaborar con el transportador de glicina GLYT1 en la regulación de los niveles de este aminoácido neuroactivo en las sinapsis glutamatérgicas.

En cuanto a SNAT2, como ya se ha mencionado, se expresa en neuronas glutamatérgicas (células piramidales de la corteza e hipocampo, el giro dentado, y las células granulares cerebelares, las neuronas sensoriales mesencefálicas, entre otra) y glicinérgicas (núcleos mediales del cuerpo trapezoidal). Sin embargo, no detectamos niveles particularmente elevados de SNAT2 en las neuronas GABAérgicas (Erickson et al., 2004; Melone et al., 2006). El transportador se encuentra muy enriquecido en células no neuronales, como la glía perivascular, los astrocitos del cerebelo, la leptomeninges, la glia *limitans* o el epéndimo. En estas ubicaciones no neuronales SNAT2 podría contribuir al control del flujo de aminoácidos a través de la barrera hematoencefálica y al control de la composición aminoácidica del líquido cefalorraquídeo. La comparación de nuestros datos con el miembro de la familia más relacionado, SNAT1, muestra que hay un solapamiento parcial en la distribución de ambas proteínas en algunas poblaciones neuronales como las neuronas piramidales del córtex e hipocampo, en las neuronas sensoriales primarias, en el núcleo pontino y en el núcleo reticular gigantocelular o en motoneuronas en la médula espinal (Mackenzie et al 2003). Sin embargo, se observan diferencias importantes en la distribución de los dos transportadores. Primero, mientras que la expresión de SNAT1 está restringida al SNC, la de SNAT2 se amplía a otros tejidos. Segundo, dentro del sistema nervioso central SNAT2 no está enriquecido en neuronas GABAérgicas, mientras que SNAT1 se expresa en niveles similares en neuronas glutamatérgica y GABAérgicas (Melone et al 2004). Tercero, existen divergencias importantes en la distribución subcelular puesto que SNAT2 se expresa tanto en el compartimento somatodendrítico como en los axones (con la notable excepción de los terminales) y, sin embargo, SNAT1 sólo se expresa en el compartimento somatodendrítico (Melone et al 2004). Dentro de las dendritas, SNAT2 es abundante en las arborizaciones distales mientras que SNAT1 aparece enriquecido en las dendritas proximales. A pesar de esas diferencias, ambos transportadores colocalizan no sólo en neuronas glutamatérgicas sino también en células no neuronales como las leptomeninges, el ependimo y el plexo coroideo. Otro aspecto común de SNAT1 y SNAT2 es la abundante expresión en el compartimento intracelular: muchas de las neuronas inmunoreactivas presentaban tinción intracelular y tenían una apariencia punteada llenando el citoplasma. Sin embargo, las neuronas sensoriales primarias del núcleo mesencefálico trigeminal o en neuronas en el estriado, donde se detectaron altos niveles de expresión, la membrana aparecía claramente delineada. En dendritas y axones, el marcaje se observa en o próximo a la superficie celular. Parte del marcaje intracelular podría corresponder a vesículas de transporte de camino a la membrana plasmática, o a vesículas de reciclaje. Se conocen ejemplos en donde tanto SNAT1 como SNAT2 se estimulan por hormonas, factores de crecimiento y estrés celular que parecen promover la rápida traslocación de la proteína desde el compartimento endosomal a la membrana en células no neuronales (Tramacere et al., 1984; Hundal et al., 1994; McArdle et al., 2006). Por tanto, no sería sorprendente que estas formas

intracelulares del transportador que se observan en las neuronas también pudieran translocarse a la membrana en respuesta a estímulos fisiológicos.

El hecho de que ni SNAT1 ni SNAT2 posean una localización adecuada para mediar la transferencia de glutamina a las neuronas sugiere que podrían estar implicados en el transporte de otros aminoácidos. SNAT2 funciona mejor con sustratos como la glicina, la alanina, la serina, la cisteína o la metionina por lo que podría actuar como un proveedor de estos aminoácidos para el metabolismo oxidativo, especialmente en neuronas glutamatérgicas. La contribución al transporte de glicina podría ser de nuevo significativa en el control de la excitabilidad de las sinapsis glutamatérgicas. En este sentido hay de destacar un estudio reciente que establece una conexión entre estos transportadores y la esquizofrenia, o más concretamente con el mecanismo de acción de un fármaco empleado en el tratamiento de los síntomas negativos y cognitivos de la enfermedad: la clozapina. La clozapina, además de su capacidad de unión a los receptores dopaminérgicos D2 y los de 5-HT<sub>2A</sub>, potencia la actividad de los receptores de NMDA. En este estudio se demostró que la clozapina inhibe específicamente el transporte de glicina a través del sistema A a concentraciones farmacológicas (Javitt et al., 2005). El efecto sobre el sistema A explicaría el incremento en la actividad de NMDAR por el incremento en los niveles extracelulares de glicina (Javitt et al., 2005).

En resumen, la localización específica de SNAT2 en determinadas subpoblaciones neuronales sugiere una función especializada para este transportador en la homeostasis de estas neuronas, aparte de su posible contribución a la permeabilidad de la barrera hematoencefálica por su localización en células no neuronales.

## **V. 2. Localización e interacciones de GLT1b.**

El transportador de glutamato GLT1 da cuenta de hasta el 90 % de la recaptura de glutamato en el SNC (Danbolt 2001). Si embargo, GLT1 no es un simple sistema de drenaje de este neurotransmisor: a través de una regulación compleja, desconocida en muchos aspectos, participa en la organización de la actividad sináptica en procesos que van desde la transmisión rápida de señales excitadoras, hasta la neurotoxicidad o la modulación de los procesos de LTP, bases fisiológicas de la memoria o el aprendizaje. En esta Tesis hemos tratado de contribuir a la clarificación de algunos aspectos poco conocidos de la biología de este transportador, relacionados con los procesos de tráfico y localización del mismo.

Uno de los aspectos sin resolver es la localización, abundancia e importancia fisiológica de la isoforma GLT1b. Esta isoforma, generada por procesamiento alternativo del transcrito primario, se diferencia únicamente de la isoforma GLT1a en los 11 aminoácidos del extremo carboxilo terminal. Nuestros resultados muestran que esta peculiaridad estructural le permite interactuar con proteínas con dominios PDZ, esenciales en la organización de estas sinapsis. Además, nuestros datos inmunohistoquímicos y bioquímicos indican que esta proteína, aparte de expresarse en las células de glía, también lo hace en las neuronas, especialmente en las dendritas y las espinas dendríticas, y por tanto en una ubicación estratégica para poder contribuir a la regulación de la concentración de glutamato en las sinapsis glutamatérgicas.

### V. 3. Interacción con PSD-95.

Entre las proteínas con dominios PDZ que podrían unirse a GLT1b, hemos demostrado que interacciona con PSD-95, tanto en sistemas heterólogos como en el cerebro de la rata. Nuestros resultados muestran que la interacción del motivo ETCI de GLT1b se realiza con el primer dominio PDZ de PSD95. Se sabe desde hace tiempo que PSD95 es una proteína andamiaje capaz de unir a una serie de proteínas de la sinapsis glutamatérgicas, entre las que destacan algunos subtipos del receptor de tipo NMDA y los receptores de AMPA, si bien estos lo hacen indirectamente a través de estargazina (Ives et al. 2004). PSD95 es capaz de oligomerizar formando una red de dominios PDZ en la región submembranosa a la que se unen estas y otras proteínas de membrana. La interacción con PSD95 influye sobre la actividad de las proteínas de membrana de diversos modos controlando aspectos como su inserción en la membrana, estabilidad, localización subcelular, composición de subunidades o propiedades funcionales intrínsecas de los canales o transportadores (van Ham, 2003; Bezprozvanny et al., 2001b). Además, sobre PSD95 también se unen proteínas de señalización intracelular cuya actividad es regulada por la activación de los receptores de glutamato. A su vez, estas proteínas reguladoras modulan la actividad de los receptores y proteínas asociadas. De todas maneras, el significado fisiológico de muchas de las interacciones no siempre ha sido fácil de demostrar debido a la existencia de proteínas similares de la familia MAGUK con funciones parcialmente redundantes. Por ejemplo, numerosos estudios indicaban que la interacción entre NMDAR y PSD-95 era importante para la localización específica del receptor en la densidad postsináptica y para su acoplamiento con las vías de señalización intracelular. Sin embargo, la distribución de los receptores de NMDA en ratones carentes de PSD95 no resultaba afectada (Migaud et al., 1998), aunque el análisis detallado de la fisiología de estos ratones mostró importantes alteraciones en la LTP y en los procesos de aprendizaje. Estudios recientes basados en la eliminación mediante RNAi de varias proteínas MAGUK simultáneamente han demostrado que, si bien existe cierta redundancia en las interacciones en las que participan los miembros de esta familia, hay otras interacciones que presentan especificidad espacial o temporal que las hacen únicas (Elias et al., 2006 y Collingridge et al., 2006).

La presencia de un motivo funcional de interacción con dominios PDZ en GLT1b confiere a esta proteína múltiples posibilidades de regulación a través de la interacción con otras proteínas con PDZ, además de PSD95. En este caso, nuestro ensayo de unión *in vitro* revela la capacidad de interacción de GLT1b con los dominios PDZ de otras proteínas MAGUK como Chapsina-110, SAP97 o MPP2. Aunque no hemos profundizado en el papel funcional de estas interacciones putativas sobre GLT1b, la situación recuerda de nuevo a lo que ocurre con los receptores de AMPA o NMDA, que también interaccionan con varias proteínas MAGUK (Hsueh et al., 2006).

Nuestros datos de inmunoprecipitación en cerebro indican que GLT1b está incluido en complejos proteicos que también contienen NMDAR. Además hemos sido capaces de reproducir esta interacción en un sistema heterólogo, en donde ha quedado de manifiesto que la interacción entre GLT1b y NMDAR es indirecta y que requiere de la presencia de PSD95.

Hay que destacar que la proteína que regula la concentración del otro ligando del receptor NMDA, es decir, el transportador de glicina GLYT1, también está asociado a NMDAR a través de PSD95 (Cubelos et al., 2005). Por tanto, la estrecha asociación de GLT1b y GLYT1 con NMDAR coloca a los dos transportadores en una posición óptima para controlar la concentración de los dos ligandos, glutamato y de glicina, en el entorno de los receptores de NMDA, y quizá para ser regulados de manera coordinada. Recientemente se ha demostrado que otro transportador de glutamato, EAAC1, también está asociado con NMDAR, aunque por un mecanismo independiente de PSD95, y que esta ubicación coloca al receptor bajo la influencia reguladora de NMDAR (Waxman et al., 2007). EAAC1 se endocita en respuesta a la activación de NMDAR. Por el momento no sabemos si GLT1b (o GLYT1) está sometido a un mecanismo regulador semejante.

Nuestros resultados indican que la interacción entre GLT1b y PSD95 tiene consecuencias sobre la funcionalidad de la proteína ya que la  $V_{max}$  del transportador aumenta un 38%, debido a un aumento de la densidad del transportador en la membrana. El análisis del recambio de GLT1b en la membrana plasmática indica que el efecto de PSD95 se debe al bloqueo de la endocitosis de GLT1b, más que a la facilitación de su inserción. Este mecanismo es el mismo que se ha descrito para el receptor de NMDA o el transportador de glicina GLYT1 (Lin et al., 2004; Cubelos et al., 2005). Este incremento en la actividad del transportador podría ser relevante en condiciones fisiológicas o fisiopatológicas tales como la LTP o la excitotoxicidad.

Un requisito previo para que la interacción sea también relevante en el cerebro es la localización neuronal de GLT1b. Existe cierta controversia respecto al peso específico de GLT1 (y no sólo de GLT1b) en la sinapsis madura derivada de localización incierta de este transportador. La presencia de concentraciones elevadas de glutamato en las terminales glutamatérgicas llevó a la idea de la existencia de un transportador en estas terminales responsable de la recaptura del neurotransmisor tras su liberación en la hendidura. Ya que el 90% del transporte de glutamato en el SNC depende de un único transportador, GLT1, este parecía ser el candidato idóneo. Otros datos reforzaron esta hipótesis: el transporte en preparaciones de sinaptosomas presenta el mismo perfil farmacológico que el transporte mediado por GLT1, es decir, sensibilidad a los inhibidores kainato y dihydrokainato (Robinson et al., 1993). Además, el tratamiento de sinaptosomas con anticuerpos específicos contra GLT1 suprimen la mayor parte de la actividad de transporte de glutamato en estas preparaciones (Danbolt et al., 1992; Haugseto et al., 1996). Sin embargo, estos anticuerpos sólo detectaban la forma glial en el cerebro adulto normal (Laake et al., 1995), aunque una reciente reevaluación de los datos inmunohistoquímicos por NC Danbolt indica que aproximadamente un 20% de GLT1 es neuronal (Neurosci. Meeting, 2006). GLT1 ha demostrado ser una proteína extremadamente sensible a las condiciones de fijación. Así, la supresión de glutaraldehído en las preparaciones inmunohistoquímicas hizo posible la detección de la isoforma GLT1a en neuronas con anticuerpos que previamente habían mostrado tinción glial y no neuronal (Chen et al., 2004). Sin embargo, los autores de este trabajo no pudieron llegar a una conclusión sobre la localización de GLT1b.

Los datos bioquímicos e histoquímicos expuestos en este trabajo apoyan una localización

neuronal de GLT1b. Primero, PSD95 es una proteína neuronal por lo que la coimmunoprecipitación de GLT1b y PSD95 es improbable con una localización exclusivamente glial de GLT1b. Segundo, nuestro anticuerpo detectó la proteína en neuronas en cultivo con un patrón punteado que es compatible con la localización de GLT1b en espinas dendríticas, en donde mostraba cierta colocalización con PSD95, a pesar de las limitaciones técnicas impuestas por la falta de un procedimiento de fijación óptimo para detectar ambas proteínas simultáneamente. Otro indicio que apoya la localización postsináptica de GLT1b es la distribución observada en neuronas transfectadas con YFP-GLT1b que produce un patrón punteado similar al de la proteína endógena, con una clara tendencia a acumularse en las espinas dendríticas. Dicha observación supone la existencia en GLT1b de determinantes estructurales que son descifrados por la maquinaria neuronal para conducir a la proteína a su localización en las espinas dendríticas. No obstante, nuestros datos sugieren que estos mecanismos que permiten la localización específica en la membrana plasmática, parecen independientes de interacciones con proteínas PDZ, ya que el mutante carente del motivo C-terminal también se acumula en las espinas. Esta situación recuerda a la recientemente publicada para los receptores de glutamato AMPA o el mGluR1 que también interactúan con proteínas PDZ, pero que se distribuye a las espinas dendríticas usando señales diferentes (Schulz y Osten, 2004; Das y Banker, 2006). Un último argumento a favor de la localización neuronal de GLT1b lo proporcionan los datos inmunohistoquímicos en secciones de cerebro de rata, ya que además de la expresión glial, GLT1b se detectó mediante microscopía confocal en las dendritas de una subpoblación de neuronas piramidales en el córtex y en puntos distribuidos a lo largo del neuropilo. Esta localización es compatible con la distribución descrita del RNAm de GLT1b en subpoblaciones de neuronas corticales (Berger et al., 2005). La microscopía electrónica reveló que algunas de esas estructuras inmunorreactivas corresponden a espinas dendríticas. La localización inmunohistoquímica de proteínas que localizan en las espinas dendríticas es a menudo complicada por la dificultad de penetración de los anticuerpos en esas estructuras y por la oclusión de epitopos debido a su interacción con proteínas de la densidad postsináptica. Esto podría explicar los fracasos previos respecto a la localización de GLT1b en estructuras neuronales. Incluso en aquellos casos en los que se detectó en estas células, sólo se tiñeron las formas intracelulares de la proteína. Es posible que el corto epítipo carboxilo de GLT1b (11 residuos) en estas estructuras intracelulares pudiera ser más accesible a los anticuerpos que cuando está anclado a las PSDs.

#### **V. 4. Formación de heterooligómeros.**

Los datos presentados en esta Memoria avalan la posibilidad de formación de heterooligómeros entre GLT1a y GLT1b. Por una parte GLT1a y GLT1b son inmunoprecipitados a partir de los extractos de cerebro con el anticuerpo contra la otra isoforma, a pesar de que los anticuerpos no presentan reactividades cruzadas cuando se ensayan para cada una de las isoformas por separado. Además, en experimentos de expresión en sistemas heterólogos, GLT1a interactúa con PSD95 de manera indirecta siempre que esté presente GLT1b, y la interacción se pierde si se elimina el extremo carboxilo de GLT1b. Por otra parte, experimentos de inmunohistoquímica

muestran una colocalización parcial de ambas proteínas en secciones de cerebro de rata. Por último, cuando ambas proteínas se transfectan en neuronas muestran una tendencia a acumularse en espinas dendríticas en donde colocalizan, junto con PSD95. Recientemente se ha determinado la estructura tridimensional del homólogo bacteriano de esta familia de transportadores, el cual oligomeriza para formar trímeros. Igualmente, hay datos bioquímicos y de microscopía FRET que indican que los transportadores de glutamato eucarióticos también son oligómeros. Es, por tanto, concebible que, en aquellas células en donde se coexpresen las dos isoformas, pueda existir una población de heterooligómeros. Si bien GLT1b es una proteína menos estudiada que GLT1a, no se conoce ninguna diferencia funcional entre las dos isoformas, bien sea en el perfil cinético o en el farmacológico (Chen et al., 2001). Las diferencias de secuencia entre los extremos carboxilos de GLT1a y GLT1b podrían sustentar divergencias en cuanto a la regulación o localización de cada una de las isoformas cuando formen homooligómeros, pero al mismo tiempo podrían transferir estas propiedades privativas a la otra isoforma a través de la formación de heterooligómeros. Creemos que este fenómeno está claramente ilustrado en la interacción entre GLT1a y PSD95, la cual depende de la presencia de GLT1b. En este sentido, los receptores de NMDA, AMPA, y los canales de K<sup>+</sup> constituyen ejemplos conocidos de proteínas heterooligoméricas en las que al menos una subunidad presenta motivos de interacción con dominios PDZ (Stephenson et al., 2001; Eldstrom et al., 2002). Estos motivos median la asociación del oligómero completo con proteínas diversas que contienen dominios PDZ. Como ya se ha descrito más arriba para PSD95, tales interacciones pueden influir en la función de los canales, receptores y transportadores de varios modos. Primero, mediante modulación directa de la actividad de la proteína. Segundo, alterando su localización subcelular y en tercer lugar, facilitando la formación de complejos de señalización intracelulares entre los receptores, canales y transportadores y otras proteínas de señalización.

No está claro cuanto GLT1b hay en el SNC y cuál podría ser la contribución fisiológica a la neurotransmisión glutamatérgica. Sin embargo, incluso pequeñas concentraciones del transportador en la proximidad de los receptores de glutamato en la PSD, podrían tener un impacto significativo en la neurotransmisión, entre otras razones reclutando moléculas de la probablemente más abundante isoforma GLT1a a sitios específicos en las sinapsis. Esto podría ser incluso más relevante en condiciones patológicas tales como hipoxia en la que se ha demostrado fuertes aumentos en la concentración de GLT1b en las neuronas (Martín et al., 1997).

#### **V. 5. Tráfico y ubiquitilación de GLT1a.**

Los niveles de GLT1 en la membrana dependen del balance entre su biosíntesis e inserción en la membrana y su posterior endocitosis bien para su reciclaje o para su degradación definitiva. Si bien se han publicado algunos datos sobre el proceso de endocitosis de GLT1, tanto constitutiva como regulada por vías de señalización, los detalles de estos procesos son bastante desconocidos, y han sido objeto de la última parte de esta Tesis. La mayor parte de los experimentos se han realizado con la isoforma mayoritaria GLT1a, aunque algunos experimentos puntuales realizados con GLT1b no presentados en la memoria, sugieren que los datos serían extrapolables a esta

isoforma. El principal hallazgo de estos experimentos es que GLT1a está sometido a regulación por ubiquitilación, un fenómeno que no sólo está relacionado con su degradación, sino también con su biogénesis y su endocitosis constitutiva y regulada. Además hemos encontrado que la ubiquitina ligasa Nedd4-2 participa en la ubiquitilación de GLT1a.

Las proteínas ubiquitiladas suelen ser sustrato del proteasoma, aunque en el caso de las proteínas de membrana la ubiquitilación también está implicada en procesos de tráfico, como discutiremos posteriormente (Urbe, 2005). Entre las funciones del proteasoma se incluye la degradación de las glicoproteínas sintetizadas en el retículo endoplásmico que presentan plegamientos anómalos. Existe, por tanto, un mecanismo control de calidad sobre las proteínas sintetizadas de novo que chequea el plegamiento correcto, las modificaciones post traduccionales y la oligomerización de estas proteínas. Cuando las chaperonas moleculares que asisten a las proteínas detectan plegamientos aberrantes, se inicia la degradación asociada al retículo endoplásmico o ERAD (McCracken y Brodsky 1996). Este proceso incluye la exportación selectiva de estas proteínas desde el retículo endoplásmico al citosol mediante retrotranslocación y finalmente su degradación proteasomal. Nuestros datos apoyan que GLT1a es sustrato para ERAD ya que el bloqueo del proteasoma con MG132 o con lactacistina, promueve la acumulación intracelular, en estructuras que recuerdan a los agrosomas, de un intermediario insoluble en detergentes y que no ha completado su glicosilación. Los agrosomas son el resultado de la agregación de proteínas mal plegadas y se generan en las regiones pericentriolares al superarse la capacidad degradativa del proteasoma o tras el bloqueo del mismo con inhibidores, como es nuestro caso. Las características del intermediario son similares a las del que se acumula cuando se bloquean las vías de tráfico intracelular con monensina, un compuesto que inhibe la salida de vesículas de RE hacia el aparato de Golgi. Se ha calculado que aproximadamente un 30% de la proteína sintetizada de novo en el retículo sufre degradación por el proteasoma debido a su plegamiento incorrecto, un porcentaje que podría ser mayor para las proteínas transmembrana (Schubert, 2000) Se han encontrado situaciones semejantes para otras proteínas de membrana como CFTR (Ward et al., 1995), el receptor de opiáceos (Petäjä-Repo et al., 2000), el transportador de taurocolato (Kuhlkamp et al 2005), entre otras.

Aparte de este efecto sobre la biogénesis, nuestros datos indican que la proteína madura también es sustrato de ubiquitilación. Así, en condiciones basales, una fracción de GLT1a está ubiquitilado y se acumula en presencia de los inhibidores de proteasoma. Sin embargo, esto no implica necesariamente al proteasoma en su degradación, ya que se sabe que estos inhibidores afectan a las últimas etapas del tráfico de algunas proteínas de membrana hasta el lisosoma (Van Kerkhof et al 2001). De hecho, los ensayos realizados en presencia del inhibidor lisosomal cloroquina indican que la vía lisosomal es la mayoritaria en la degradación de GLT1a maduro. Para las proteínas de membrana, la ubiquitilación no sólo está relacionada con la degradación propiamente dicha sino también con otros procesos de tráfico intracelular. Una de las primeras funciones no proteolíticas que se describieron para la ubiquitilación es su implicación en los procesos de endocitosis de proteínas de membrana en levaduras. En este sistema, la monoubiquitilación constituye una señal suficiente para promover la endocitosis de las proteínas

diana, si bien la poliubiquitilación a través de la lisina 63 de la ubiquitina estimula este proceso. En células de mamífero la situación es más compleja. Se han descrito al menos tres patrones de ubiquitilación diferentes en la vía no proteolítica: monoubiquitilación, multimonoubiquitilación y poliubiquitilación a través de la lisina 63, que actúan como señal de internalización. Existen, al menos, otros dos niveles de regulación sobre los que opera la ubiquitilación en el mecanismo de endocitosis: la determinación de la vía preferente de endocitosis y, posteriormente, el acceso a los endosomas tempranos donde se conduce selectivamente al sustrato hacia vesículas de reciclaje o hacia la degradación lisosomal (Urbe, 2005). Nuestros datos indican que en el caso de GLT1a la ubiquitilación de la proteína madura está asociada con la endocitosis constitutiva y la regulada por PKC. Así, el silenciamiento de la ubiquitina ligasa Nedd4-2 endógena de las células N2a transfectadas con GLT1a produjo una notable acumulación de transportador maduro, lo que indica esta ligasa interviene en el tráfico basal de GLT1a. Además, la sobreexpresión de Nedd4-2 produce una disminución consistente en la actividad de transporte de GLT1a y que este efecto correlaciona con un fuerte aumento de la ubiquitilación del transportador que finalmente conduce a su degradación. Además, se ha publicado que Nedd4-2 también participa en el tráfico regulado de GLT1a en respuesta a las quinasas inducibles por suero y glucocorticoides SGK1-3 o PKB. Estas quinasas fosforilan a Nedd4-2 y lo inactivan. Como consecuencia, aumentan la actividad del transportador al bloquearse su degradación por Nedd4-2 (Boehmer et al. 2006) No obstante, en este estudio no se analizó directamente la ubiquitilación de GLT1a por la acción de Nedd4-2. Nuestros datos de inmunoprecipitación y colocalización apoyan una interacción física (directa o indirecta) entre Nedd4-2 y GLT1a. En general, Nedd4-2 se une a sus sustratos utilizando su dominio WW que interacciona directamente con el motivo consenso PPXY del sustrato (Hicke et al., 2003; Hagenauer-Tapis et al 2004). GLT1a carece de este motivo estructural, un hecho no infrecuente en otros sustratos de Nedd4-2. Sin embargo, en estos casos parecen participar proteínas adaptadoras que permitirían la interacción indirecta de Nedd4-2 con sus sustratos. Se ha demostrado además, que estas proteínas adaptadoras no siempre desempeñan un mero papel estructural como mediadores de la unión entre la ubiquitin ligasa y el sustrato, sino que en algunos casos regulan la accesibilidad de Nedd4-2 al sustrato (Taoka et al 2005; LeGrande et al 2005) o modifican el patrón específico de ubiquitilación (D'Azzo, 2005). Los adaptadores constituyen, por tanto, un nivel de regulación adicional dentro del sistema de ubiquitilación. Nedd4-2 está implicada en la degradación de otras proteínas transmembrana relevantes dentro y fuera del sistema nervioso central, como el transportador de dopamina DAT, el transportador de aminoácidos neutros SNAT2 o el canal epitelial de sodio ENaC (Zhou et al., 2007), entre otras. En estos trabajos, se han descrito variaciones de la densidad de proteína activa en la superficie celular dependiente de la expresión de Nedd4-2, lo que supone la modulación de la actividad de estos transportadores y canales.

Los resultados expuestos en este trabajo demuestran que la endocitosis de GLT1 promovida por TPA también depende de la ubiquitilación del transportador. Así hemos observado que tras la activación de la PKC por esteroides de forbol, que recluta PKC a la membrana plasmática (Nishizuka et al, 1995), se produce un incremento en la ubiquitilación de GLT1a que precede a

su endocitosis. La eliminación de las lisinas del extremo carboxilo de GLT1a anula tanto el incremento de ubiquitilación como la endocitosis del transportador. Trabajos previos habían demostrado que la endocitosis de GLT1a estimulada por PKC ocurre a través de la vía de clatrina (Gonzalez et al 2005). Por tanto, la ubiquitilación podría constituir la señal que conduce la endocitosis de GLT1a a través de vía dependiente de clatrina puesto que se han descrito al menos dos intermediarios, Eps15 y Epsina, que, a través de sus dominios de unión a ubiquitina (UBDs), reconocen sustratos ubiquitilados e intervienen en el reclutamiento de los adaptadores de la vía de clatrina (AP-2) (Grange et al., 2000). Por otra parte, la vía dependiente de clatrina está involucrada no sólo en la internalización de sustratos para su degradación, sino también en el reciclaje desde los endosomas a la membrana, como p. ej. el receptor de transferrina (ref). Se ha demostrado recientemente que la estimulación de PKC mediante TPA secuestra a la quinasa en vesículas endocíticas de reciclaje. Además, la activación sostenida de PKC bloquea el reciclaje del receptor de transferrina (Idkowiak-Baldys et al., 2006). Puesto que la activación de PKC no promueve la degradación de GLT1a y hemos detectado una fuerte colocalización de este transportador en endosomas con el receptor de transferrina tras la estimulación con TPA, probablemente GLT1a será reciclado a la membrana tras su regeneración (desubiquitilación y defosforilación) a su paso por los endosomas.

En experimentos actualmente en curso en el laboratorio pretendemos esclarecer la conexión entre la activación de la PKC y el incremento en la ubiquitilación. En este contexto, la fosforilación mediada por la PKC puede ocurrir directamente sobre el sustrato, sobre la ubiquitin ligasa, sobre alguna proteína adaptadora o una combinación de estos mecanismos. Inicialmente, los trabajos de nuestro laboratorio demostraron la fosforilación de GLT1b por PKC (Casado et al., 1993) y posteriormente el laboratorio de MB Robinson estableció que alguna(s) de las cinco serinas presentes en la región del carboxilo terminal implicada en la endocitosis de GLT1b se fosforilaba(n) por PKC. Sin embargo, no se llegó a demostrar inequívocamente la relación entre fosforilación y endocitosis, ya que en este estudio se identificó a una de estas serinas (Ser486) como mediadora de la endocitosis, pero su eliminación no afectaba a la fosforilación dependiente de PKC. En realidad nosotros cuestionamos el papel de la Ser486 también en la endocitosis, ya que no hemos podido reproducir la pérdida de endocitosis dependiente de TPA que se publicó para este mutante.

Otra cuestión abierta es el papel que Nedd4-2 pudiera tener en la endocitosis estimulada por PKC. Nuestros datos indican la existencia de diferencias en el mecanismo de ubiquitilación promovido por PKC y por Nedd4-2 ya que mientras que PKC parece actuar casi exclusivamente sobre las lisinas del C-terminal, Nedd4-2 también ubiquitila lisinas situadas en el extremo N-terminal. Otra diferencia radica en el destino de la proteína ubiquitilada por una u otra vía: mientras que Nedd4-2 promueve la proteólisis de GLT1, este no es el caso para PKC, que conduce a la endocitosis regulada de GLT1a pero no a su degradación. Sin embargo, no podemos descartar que el patrón de ubiquitilación promovido por Nedd4-2 varíe en función de que intervenga en la endocitosis constitutiva o en la endocitosis regulada, y que esto afectara al destino de la proteína. Los dominios WW de Nedd4-2 presentan elevada afinidad por fosfoserinas

y fosfotreoninas, y se ha sugerido que la fosforilación de sustratos en estos residuos puede actuar como motivo de interacción con la ubiquitin ligasa Nedd4-2. Como ya hemos descrito anteriormente, GLT1a carece de motivos consenso de interacción con Nedd4-2, por lo que la fosforilación en los residuos de serina y/o treonina presentes en los extremos citoplasmáticos del transportador podría generar los motivos de unión necesarios para la interacción con esta ubiquitin ligasa. Además del sustrato, la fosforilación de la ligasa puede modular su actuación. Como ya hemos descrito más arriba, la fosforilación de Nedd4-2 por quinasas inducibles por glucocorticoides (SGK) inhibe la disminución dependiente de Nedd4-2 de GLT1 así como de otras proteínas como EAAT1 (Boehmer et al 2006; Boehmer et al., 2003b), el transportador de glucosa SGLT1 (Boehmer et al., 2004) o el transportador de aminoácidos SNAT1 (Boehmer et al., 2003a). La fosforilación no siempre regula negativamente la acción de Nedd4-2: la fosforilación de Nedd4-2 dependiente del factor de crecimiento neuronal (NGF) aumenta la ubiquitilación y degradación del receptor de NGF Trk A (Arevalo et al., 2006). No obstante, se desconoce si la PKC actúa sobre Nedd4-2 y, por tanto, si podría operar a través de este mecanismo en la regulación de GLT1a.

En resumen, hemos demostrado que la ubiquitilación de GLT1a interviene en procesos de tráfico del transportador que van desde su biogénesis a su endocitosis y posterior degradación. Si embargo, todavía quedan aspectos importantes del mecanismo por resolver, como es la relación entre la fosforilación y la ubiquitilación, o las ubiquitina ligasas implicadas, así como el modo en que las diferentes maneras de ubiquitilación permiten discernir entre el reciclaje o la degradación definitiva de GLT1a.

## **VI. CONCLUSIONES**



1. Hemos desarrollado tres anticuerpos policlonales que reconocen específicamente a los transportadores de aminoácidos neutros SNAT2/ATA2 y SNAT5/SN2 y para la isoforma del transportador de glutamato GLT1b.
2. Los estudios inmunohistoquímicos han revelado que SNAT5 se expresa exclusivamente en los astrocitos, y está especialmente enriquecido en torno a los terminales glutamatérgicos. Esta localización parece adecuada para su participación en el ciclo glutamato-glutamina
3. SNAT2 se expresa en diferentes subpoblaciones de neuronas tanto glutamatérgicas como no-glutamatérgicas, pero está excluido de los terminales, un hecho que no apoya su participación en el ciclo glutamato-glutamina. Se expresa, además, en células no neuronales en donde podría participar en el tráfico de aminoácidos a través de la barrera hematoencefálica.
4. El transportador de glutamato GLT1b se expresa tanto en células gliales como en las dendritas y espinas dendríticas de subpoblaciones de neuronas probablemente glutamatérgicas.
5. GLT1b interacciona a través de su extremo carboxilo con proteínas con dominios PDZ, y de manera notable con PSD95, una proteína esencial en la organización de las sinapsis glutamatérgicas. A través de esta interacción GLT1b está incorporado a los complejos multiproteicos que contienen receptores de NMDA
6. La isoforma mayoritaria GLT1a también interacciona con PSD95 pero lo hace a través de GLT1b con el que formaría heterooligómeros.
7. El bloqueo del proteosoma produce la acumulación de intermediarios de síntesis de GLT1a.
8. La regulación de la endocitosis de GLT1a dependiente de la activación de PKC implica a los sistemas de ubiquitilación y conduce a la internalización del transportador pero no a su degradación.
9. La ubiquitin ligasa Nedd4-2 regula el tráfico constitutivo de GLT1a mediante un proceso de ubiquitilación que determina la endocitosis y degradación del transportador.



## **VII. RESUMEN.**



Proper function of glutamatergic neurotransmission implies the coordinate interplay of presynaptic, postsynaptic and glial cell elements. The chemical signal mediated by the neurotransmitter glutamate becomes an electric signal after the activation of different types of glutamate receptors. Another membrane proteins, glutamate transporters, clear the glutamate released into the synaptic cleft in order to avoid toxic levels for this neurotoxic substance. The high affinity glutamate transporter GLT1 is responsible for up to 90% of the glutamate uptake in the central nervous system. But glutamatergic synapses need additional transporters: glutamate inside glial cells is transformed into glutamine which is transferred back to presynaptic neurons to replenish neurotransmitter pools. This completes the glutamate-glutamine cycle. The transport of glutamine inside neurons might involve members on the neutral amino acid transporters that are classified in the SLC38 gene family, and named SNATs. Since the localization of SNAT2 and SNAT5 transporters in the nervous system is unknown, in this work we have studied the immunohistochemical distribution of both transporters. We have found the SNAT5 is expressed in glial cells that surround glutamatergic synapses, while SNAT2 is expressed in dendrites and axons, but not in terminals, of glutamatergic and glycinergic neurons.

Additionally, we have studied the cellular localization of the GLT1b isoform of the glutamate transporter. We found that it is expressed in the postsynaptic elements of glutamatergic synapses. This localization is consistent with the interaction of GLT1b and the postsynaptic scaffold protein PSD95 that we also describe in the present work. This interaction occurs through the GLT1b carboxyl terminal sequence motif that binds the first PDZ domain of PSD95, thereby permitting the formation of multiprotein complexes containing GLT1b, PSD95 and the NMDA subtype of glutamate receptor. Moreover, GLT1a could interact with this complex thanks to its capability to form oligomers with GLT1b.

Finally, we have studied some aspects of the intracellular traffic of GLT1 and we describe the important role played by the ubiquitin system in the regulation of this process. Thus, GLT1 biogenesis is regulated by the ERAD mechanism that eliminates in the proteasome the misfolded transporter molecules. In addition, ubiquitin is also involved in both, constitutive and regulated endocytosis of GLT1. We describe that the ubiquitin E3 ligase Nedd4.2 promotes ubiquitination of GLT1 and regulates the lysosomal degradation of this protein. Also, ubiquitination regulates the internalization of GLT1 triggered by activation of the protein kinase C probably promoting the sorting of GLT1 into recycling vesicles.



## **VIII. BIBLIOGRAFIA.**



**BIBLIOGRAFIA.**

- Abdul-Ghani, A. S., P. J. Attwell, and H. F. Bradford. 1998. The effect of 2-amino-3-arsenopropionate and 2-amino-4-arsenobutyrate on the development and maintenance of amygdala kindled seizures. *Int J Neurosci* 96: 255-67.
- Aoki, C., I. Miko, H. Oviedo, T. Mikeladze-Dvali, L. Alexandre, N. Sweeney, and D. S. Bredt. 2001. Electron microscopic immunocytochemical detection of PSD-95, PSD-93, SAP-102, and SAP-97 at postsynaptic, presynaptic, and nonsynaptic sites of adult and neonatal rat visual cortex. *Synapse* 40: 239-57.
- Ardley, H. C., and P. A. Robinson. 2005. E3 ubiquitin ligases. *Essays Biochem* 41: 15-30.
- Arevalo, J. C., J. Waite, R. Rajagopal, M. Beyna, Z. Y. Chen, F. S. Lee, and M. V. Chao. 2006. Cell survival through Trk neurotrophin receptors is differentially regulated by ubiquitination. *Neuron* 50: 549-59.
- Arriza, J. L., S. Eliasof, M. P. Kavanaugh, and S. G. Amara. 1997. Excitatory amino acid transporter 5, a retinal glutamate transporter coupled to a chloride conductance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 4155-60.
- Azari, M. F., T. Karnezis, C. C. Bernard, C. Profyris, M. R. LeGrande, D. W. Zang, S. S. Cheema, and S. Petratos. 2005. Incomplete Freund's adjuvant enhances locomotor performance following spinal cord injury. *Eur J Neurol* 12: 1004-8.
- Barbour B, Brew H, Attwell D. Electrogenic glutamate uptake in glial cells is activated by intracellular potassium. *Nature*. 1988 Sep 29;335(6189):433-5
- Benmerah, A., V. Poupon, N. Cerf-Bensussan, and A. Dautry-Varsat. 2000. Mapping of Eps15 domains involved in its targeting to clathrin-coated pits. *J Biol Chem* 275: 3288-95.
- Benveniste, M., and M. L. Mayer. 1991. Kinetic analysis of antagonist action at N-methyl-D-aspartic acid receptors. Two binding sites each for glutamate and glycine. *Biophys J* 59: 560-73.
- Benveniste, M and M.L. Mayer. 1991. Structure-activity analysis of binding kinetics for NMDA receptor competitive antagonists: the influence of conformational restriction. *Br J Pharmacol* 104: 207-21.
- Berger, U. V., T. M. DeSilva, W. Chen, and P. A. Rosenberg. 2005. Cellular and subcellular mRNA localization of glutamate transporter isoforms GLT1a and GLT1b in rat brain by in situ hybridization. *J Comp Neurol* 492: 78-89.
- Berger, U. V., and M. A. Hediger. 1998. Comparative analysis of glutamate transporter expression in rat brain using differential double in situ hybridization. *Anat Embryol (Berl)* 198: 13-30.
- Berger, U. V., and M. A. Hediger. 2000. Distribution of the glutamate transporters GLAST and GLT-1 in rat circumventricular organs, meninges, and dorsal root ganglia. *J Comp Neurol* 421: 385-99.
- Bezprozvanny, I., and A. Maximov. 2001a. Classification of PDZ domains. *FEBS Lett* 509: 457-62.
- Bezprozvanny, I., and A. Maximov. 2001b. PDZ domains: More than just a glue. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 787-9.
- Bezprozvanny I, Maximov A. PDZ domains: More than just a glue. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Jan 30;98(3):787-9. Review.
- Bliss, T. V., and G. L. Collingridge. 1993. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361: 31-9.
- Boehmer, C., G. Henke, R. Schniepp, M. Palmada, J. D. Rothstein, S. Broer, and F. Lang. 2003. Regulation of the glutamate transporter EAAT1 by the ubiquitin ligase Nedd4-2 and

- the serum and glucocorticoid-inducible kinase isoforms SGK1/3 and protein kinase B. *J Neurochem* 86: 1181-8.
- Boehmer, C., F. Okur, I. Setiawan, S. Broer, and F. Lang. 2003. Properties and regulation of glutamine transporter SN1 by protein kinases SGK and PKB. *Biochem Biophys Res Commun* 306: 156-62.
- Boehmer, C., M. Palmada, J. Rajamanickam, R. Schniepp, S. Amara, and F. Lang. 2006. Post-translational regulation of EAAT2 function by co-expressed ubiquitin ligase Nedd4-2 is impacted by SGK kinases. *J Neurochem* 97: 911-21.
- Boehmer, C., V. Wilhelm, M. Palmada, S. Wallisch, G. Henke, H. Brinkmeier, P. Cohen, B. Pieske, and F. Lang. 2003. Serum and glucocorticoid inducible kinases in the regulation of the cardiac sodium channel SCN5A. *Cardiovasc Res* 57: 1079-84.
- Boulland, J. L., K. K. Osen, L. M. Levy, N. C. Danbolt, R. H. Edwards, J. Storm-Mathisen, and F. A. Chaudhry. 2002. Cell-specific expression of the glutamine transporter SN1 suggests differences in dependence on the glutamine cycle. *Eur J Neurosci* 15: 1615-31.
- Broer, A., A. Albers, I. Setiawan, R. H. Edwards, F. A. Chaudhry, F. Lang, C. A. Wagner, and S. Broer. 2002. Regulation of the glutamine transporter SN1 by extracellular pH and intracellular sodium ions. *J Physiol* 539: 3-14.
- Broer, S., and N. Brookes. 2001. Transfer of glutamine between astrocytes and neurons. *J Neurochem* 77: 705-19.
- Casado, J. A., J. Merino, J. Cid, M. L. Subira, and A. Sanchez-Ibarrola. 1993. Simultaneous evaluation of phagocytosis and Fc gamma R-mediated oxidative burst in human monocytes by a simple flow cytometry method. *J Immunol Methods* 159: 173-6.
- Casado, M., A. Bendahan, F. Zafra, N. C. Danbolt, C. Aragon, C. Gimenez, and B. I. Kanner. 1993. Phosphorylation and modulation of brain glutamate transporters by protein kinase C. *J Biol Chem* 268: 27313-7.
- Chaudhry, F. A., D. Krizaj, P. Larsson, R. J. Reimer, C. Wreden, J. Storm-Mathisen, D. Copenhagen, M. Kavanaugh, and R. H. Edwards. 2001. Coupled and uncoupled proton movement by amino acid transport system N. *Embo J* 20: 7041-51.
- Chaudhry, F. A., K. P. Lehre, M. van Lookeren Campagne, O. P. Ottersen, N. C. Danbolt, and J. Storm-Mathisen. 1995. Glutamate transporters in glial plasma membranes: highly differentiated localizations revealed by quantitative ultrastructural immunocytochemistry. *Neuron* 15: 711-20.
- Chaudhry, F. A., D. Schmitz, R. J. Reimer, P. Larsson, A. T. Gray, R. Nicoll, M. Kavanaugh, and R. H. Edwards. 2002. Glutamine uptake by neurons: interaction of protons with system a transporters. *J Neurosci* 22: 62-72.
- Chaudhry FA, Reimer RJ, Krizaj D, Barber D, Storm-Mathisen J, Copenhagen DR, Edwards RH. Molecular analysis of system N suggests novel physiological roles in nitrogen metabolism and synaptic transmission. *Cell*. 1999 Dec 23;99(7):769-80.
- Chen, W., C. Aoki, V. Mahadomrongkul, C. E. Gruber, G. J. Wang, R. Blitzblau, N. Irwin, and P. A. Rosenberg. 2002. Expression of a variant form of the glutamate transporter GLT1 in neuronal cultures and in neurons and astrocytes in the rat brain. *J Neurosci* 22: 2142-52.
- Chen, W., V. Mahadomrongkul, U. V. Berger, M. Bassan, T. DeSilva, K. Tanaka, N. Irwin, C. Aoki, and P. A. Rosenberg. 2004. The glutamate transporter GLT1a is expressed in excitatory axon terminals of mature hippocampal neurons. *J Neurosci* 24: 1136-48.
- Colledge, M., R. A. Dean, G. K. Scott, L. K. Langeberg, R. L. Huganir, and J. D. Scott. 2000. Targeting of PKA to glutamate receptors through a MAGUK-AKAP complex. *Neuron* 27: 107-19.

- Colledge, M., E. M. Snyder, R. A. Crozier, J. A. Soderling, Y. Jin, L. K. Langeberg, H. Lu, M. F. Bear, and J. D. Scott. 2003. Ubiquitination regulates PSD-95 degradation and AMPA receptor surface expression. *Neuron* 40: 595-607.
- Conti, F., S. DeBiasi, A. Minelli, J. D. Rothstein, and M. Melone. 1998. EAAC1, a high-affinity glutamate transporter, is localized to astrocytes and gabaergic neurons besides pyramidal cells in the rat cerebral cortex. *Cereb Cortex* 8: 108-16.
- Crosson, C. E., and M. Petrovich. 1999. Contributions of adenosine receptor activation to the ocular actions of epinephrine. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40: 2054-61.
- Cubelos, B., I. M. Gonzalez-Gonzalez, C. Gimenez, and F. Zafra. 2005. The scaffolding protein PSD-95 interacts with the glycine transporter GLYT1 and impairs its internalization. *J Neurochem* 95: 1047-58.
- Danbolt, N. C., J. Storm-Mathisen, and B. I. Kanner. 1992. An [Na<sup>+</sup> + K<sup>+</sup>]coupled L-glutamate transporter purified from rat brain is located in glial cell processes. *Neuroscience* 51: 295-310.
- Danbolt NC. Glutamate uptake. *Prog Neurobiol.* 2001 Sep;65(1):1-105.
- d'Azzo, A., A. Bongiovanni, and T. Nastasi. 2005. E3 ubiquitin ligases as regulators of membrane protein trafficking and degradation. *Traffic* 6: 429-41.
- Dehnes, Y., F. A. Chaudhry, K. Ullensvang, K. P. Lehre, J. Storm-Mathisen, and N. C. Danbolt. 1998. The glutamate transporter EAAT4 in rat cerebellar Purkinje cells: a glutamate-gated chloride channel concentrated near the synapse in parts of the dendritic membrane facing astroglia. *J Neurosci* 18: 3606-19.
- Derouiche, A., and T. Rauen. 1995. Coincidence of L-glutamate/L-aspartate transporter (GLAST) and glutamine synthetase (GS) immunoreactions in retinal glia: evidence for coupling of GLAST and GS in transmitter clearance. *J Neurosci Res* 42: 131-43.
- Di Guglielmo, G. M., C. Le Roy, A. F. Goodfellow, and J. L. Wrana. 2003. Distinct endocytic pathways regulate TGF-beta receptor signalling and turnover. *Nat Cell Biol* 5: 410-21.
- Dieter, M., M. Palmada, J. Rajamanickam, A. Aydin, A. Busjahn, C. Boehmer, F. C. Luft, and F. Lang. 2004. Regulation of glucose transporter SGLT1 by ubiquitin ligase Nedd4-2 and kinases SGK1, SGK3, and PKB. *Obes Res* 12: 862-70.
- Domercq, M., and C. Matute. 1999. Expression of glutamate transporters in the adult bovine corpus callosum. *Brain Res Mol Brain Res* 67: 296-302.
- Doyle, D. A., A. Lee, J. Lewis, E. Kim, M. Sheng, and R. MacKinnon. 1996. Crystal structures of a complexed and peptide-free membrane protein-binding domain: molecular basis of peptide recognition by PDZ. *Cell* 85: 1067-76.
- Dunlop, J., Z. Lou, and H. B. McIlvain. 1999. Steroid hormone-inducible expression of the GLT-1 subtype of high-affinity l-glutamate transporter in human embryonic kidney cells. *Biochem Biophys Res Commun* 265: 101-5.
- Dunlop, J., Z. Lou, Y. Zhang, and H. B. McIlvain. 1999. Inducible expression and pharmacology of the human excitatory amino acid transporter 2 subtype of L-glutamate transporter. *Br J Pharmacol* 128: 1485-90.
- Eldstrom, J., K. W. Doerksen, D. F. Steele, and D. Fedida. 2002. N-terminal PDZ-binding domain in Kv1 potassium channels. *FEBS Lett* 531: 529-37.
- El-Husseini AE, Schnell E, Chetkovich DM, Nicoll RA, Brecht DS. PSD-95 involvement in maturation of excitatory synapses. *Science.* 2000 Nov 17;290(5495):1364-8
- Elias, G. M., L. Funke, V. Stein, S. G. Grant, D. S. Brecht, and R. A. Nicoll. 2006. Synapse-specific and developmentally regulated targeting of AMPA receptors by a family of MAGUK scaffolding proteins. *Neuron* 52: 307-20.

- Euler, T., and H. Wässle. 1995. Immunocytochemical identification of cone bipolar cells in the rat retina. *J Comp Neurol* 361: 461-78.
- Fairman, W. A., R. J. Vandenberg, J. L. Arriza, M. P. Kavanaugh, and S. G. Amara. 1995. An excitatory amino-acid transporter with properties of a ligand-gated chloride channel. *Nature* 375: 599-603.
- Furness, D. N., and K. P. Lehre. 1997. Immunocytochemical localization of a high-affinity glutamate-aspartate transporter, GLAST, in the rat and guinea-pig cochlea. *Eur J Neurosci* 9: 1961-9.
- Gonzalez, M. I., B. T. Susarla, and M. B. Robinson. 2005. Evidence that protein kinase Calpha interacts with and regulates the glial glutamate transporter GLT-1. *J Neurochem* 94: 1180-8.
- Grange MP, Blot V, Delamarre L, Bouchaert I, Rocca A, Dautry-Varsat A, Dokhelar MC. Identification of two intracellular mechanisms leading to reduced expression of oncoretrovirus envelope glycoproteins at the cell surface. *J Virol*. 2000 Dec;74(24):11734-43.
- Guillet, B. A., L. J. Velly, B. Canolle, F. M. Masméjean, A. L. Nieoullon, and P. Pisano. 2005. Differential regulation by protein kinases of activity and cell surface expression of glutamate transporters in neuron-enriched cultures. *Neurochem Int* 46: 337-46.
- Haugeto, O., K. Ullensvang, L. M. Levy, F. A. Chaudhry, T. Honore, M. Nielsen, K. P. Lehre, and N. C. Danbolt. 1996. Brain glutamate transporter proteins form homomultimers. *J Biol Chem* 271: 27715-22.
- Hayashi, T. 1952. A physiological study of epileptic seizures following cortical stimulation in animals and its application to human clinics. *Jpn J Physiol* 3: 46-64.
- Hicke L, Dunn R. Regulation of membrane protein transport by ubiquitin and ubiquitin-binding proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2003;19:141-72.
- Higuchi, R. Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J., and White, T. J., 1990. *PCR Protocols*, Academic Press, New York eds, pp. 177-183, .
- Hollmann, M., J. Boulter, C. Maron, and S. Heinemann. 1994. Molecular biology of glutamate receptors. Potentiation of N-methyl-D-aspartate receptor splice variants by zinc. *Ren Physiol Biochem* 17: 182-3.
- Hollmann, M., C. Maron, and S. Heinemann. 1994. N-glycosylation site tagging suggests a three transmembrane domain topology for the glutamate receptor GluR1. *Neuron* 13: 1331-43.
- Hu, L. A., Y. Tang, W. E. Miller, M. Cong, A. G. Lau, R. J. Lefkowitz, and R. A. Hall. 2000. beta 1-adrenergic receptor association with PSD-95. Inhibition of receptor internalization and facilitation of beta 1-adrenergic receptor interaction with N-methyl-D-aspartate receptors. *J Biol Chem* 275: 38659-66.
- Hundal, H. S., P. J. Bilan, T. Tsakiridis, A. Marette, and A. Klip. 1994. Structural disruption of the trans-Golgi network does not interfere with the acute stimulation of glucose and amino acid uptake by insulin-like growth factor I in muscle cells. *Biochem J* 297 ( Pt 2): 289-95.
- Hsueh YP. The role of the MAGUK protein CASK in neural development and synaptic function. *Curr Med Chem*. 2006;13(16):1915-27. Review.
- Ichimura, T., H. Yamamura, K. Sasamoto, Y. Tominaga, M. Taoka, K. Kakiuchi, T. Shinkawa, N. Takahashi, S. Shimada, and T. Isobe. 2005. 14-3-3 proteins modulate the expression of epithelial Na<sup>+</sup> channels by phosphorylation-dependent interaction with Nedd4-2 ubiquitin ligase. *J Biol Chem* 280: 13187-94.
- Idkowiak-Baldys, J., K. P. Becker, K. Kitatani, and Y. A. Hannun. 2006. Dynamic sequestration of the recycling compartment by classical protein kinase C. *J Biol Chem* 281: 22321-31.
- Ives JH, Fung S, Tiwari P, Payne HL, Thompson CL. Microtubule-associated protein light chain 2 is a stargazin-AMPA receptor complex-interacting protein in vivo. *J Biol Chem*. 2004 Jul 23;279(30):31002-9. Epub 2004 May 10.

- Itani, O. A., J. R. Campbell, J. Herrero, P. M. Snyder, and C. P. Thomas. 2003. Alternate promoters and variable splicing lead to hNedd4-2 isoforms with a C2 domain and varying number of WW domains. *Am J Physiol Renal Physiol* 285: F916-29.
- Javitt, D. C., L. Duncan, A. Balla, and H. Sershen. 2005. Inhibition of system A-mediated glycine transport in cortical synaptosomes by therapeutic concentrations of clozapine: implications for mechanisms of action. *Mol Psychiatry* 10: 275-87.
- Jones, H. N., C. J. Ashworth, K. R. Page, and H. J. McArdle. 2006. Cortisol stimulates system A amino acid transport and SNAT2 expression in a human placental cell line (BeWo). *Am J Physiol Endocrinol Metab* 291: E596-603.
- Jugloff, D. G., R. Khanna, L. C. Schlichter, and O. T. Jones. 2000. Internalization of the Kv1.4 potassium channel is suppressed by clustering interactions with PSD-95. *J Biol Chem* 275: 1357-64.
- Kalandadze, A., Y. Wu, and M. B. Robinson. 2002. Protein kinase C activation decreases cell surface expression of the GLT-1 subtype of glutamate transporter. Requirement of a carboxyl-terminal domain and partial dependence on serine 486. *J Biol Chem* 277: 45741-50.
- Kanai, Y., and M. A. Hediger. 1992. Primary structure and functional characterization of a high-affinity glutamate transporter. *Nature* 360: 467-71.
- Kavsak, P., R. K. Rasmussen, C. G. Causing, S. Bonni, H. Zhu, G. H. Thomsen, and J. L. Wrana. 2000. Smad7 binds to Smurf2 to form an E3 ubiquitin ligase that targets the TGF beta receptor for degradation. *Mol Cell* 6: 1365-75.
- Kennedy, M. B., H. C. Beale, H. J. Carlisle, and L. R. Washburn. 2005. Integration of biochemical signalling in spines. *Nat Rev Neurosci* 6: 423-34.
- Kikkert M, Hassink G, Wiertz E. The role of the ubiquitination machinery in dislocation and degradation of endoplasmic reticulum proteins. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2005;300:57-93
- Kim, E., K. O. Cho, A. Rothschild, and M. Sheng. 1996. Heteromultimerization and NMDA receptor-clustering activity of Chapsyn-110, a member of the PSD-95 family of proteins. *Neuron* 17: 103-13.
- Kim, E., and M. Sheng. 1996. Differential K<sup>+</sup> channel clustering activity of PSD-95 and SAP97, two related membrane-associated putative guanylate kinases. *Neuropharmacology* 35: 993-1000.
- Kim, E., and M. Sheng. 2004. PDZ domain proteins of synapses. *Nat Rev Neurosci* 5: 771-81.
- Kim, T. H., H. M. Lee, H. Utsonomiya, P. Ma, R. Langer, E. V. Schmidt, and J. P. Vacanti. 1997. Enhanced survival of transgenic hepatocytes expressing hepatocyte growth factor in hepatocyte tissue engineering. *Transplant Proc* 29: 858-60.
- Koulen, P., C. C. Garner, and H. Wassle. 1998. Immunocytochemical localization of the synapse-associated protein SAP102 in the rat retina. *J Comp Neurol* 397: 326-36.
- Kugler, P., and A. Schmitt. 1999. Glutamate transporter EAAC1 is expressed in neurons and glial cells in the rat nervous system. *Glia* 27: 129-42.
- Kuhlkamp, T., V. Keitel, A. Helmer, D. Haussinger, and R. Kubitz. 2005. Degradation of the sodium taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP) by the ubiquitin-proteasome system. *Biol Chem* 386: 1065-74.
- Kvamme, E. 1998. Synthesis of glutamate and its regulation. *Prog Brain Res* 116: 73-85.
- 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 Aug;65(2):871-81.

- Lehre, K. P., and N. C. Danbolt. 1998. The number of glutamate transporter subtype molecules at glutamatergic synapses: chemical and stereological quantification in young adult rat brain. *J Neurosci* 18: 8751-7.
- Lehre, K. P., L. M. Levy, O. P. Ottersen, J. Storm-Mathisen, and N. C. Danbolt. 1995. Differential expression of two glial glutamate transporters in the rat brain: quantitative and immunocytochemical observations. *J Neurosci* 15: 1835-53.
- Leerma, J., R. S. Zukin, and M. V. Bennett. 1990. Glycine decreases desensitization of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors expressed in *Xenopus* oocytes and is required for NMDA responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 2354-8.
- Levy, L. M., K. P. Lehre, S. I. Walaas, J. Storm-Mathisen, and N. C. Danbolt. 1995. Down-regulation of glial glutamate transporters after glutamatergic denervation in the rat brain. *Eur J Neurosci* 7: 2036-41.
- Li, B., Y. Otsu, T. H. Murphy, and L. A. Raymond. 2003. Developmental decrease in NMDA receptor desensitization associated with shift to synapse and interaction with postsynaptic density-95. *J Neurosci* 23: 11244-54.
- Lin, Y., V. A. Skeberdis, A. Francesconi, M. V. Bennett, and R. S. Zukin. 2004. Postsynaptic density protein-95 regulates NMDA channel gating and surface expression. *J Neurosci* 24: 10138-48.
- Losi, G., K. Prybylowski, Z. Fu, J. Luo, R. J. Wenthold, and S. Vicini. 2003. PSD-95 regulates NMDA receptors in developing cerebellar granule neurons of the rat. *J Physiol* 548: 21-9.
- Mackenzie, B., and J. D. Erickson. 2004. Sodium-coupled neutral amino acid (System N/A) transporters of the SLC38 gene family. *Pflugers Arch* 447: 784-95.
- Madson, P. W., and D. B. Lococo. 2000. Recovery of volatile products from dilute high-fouling process streams. *Appl Biochem Biotechnol* 84-86: 1049-61.
- Maragakis, N. J., M. Dykes-Hoberg, and J. D. Rothstein. 2004. Altered expression of the glutamate transporter EAAT2b in neurological disease. *Ann Neurol* 55: 469-77.
- Martin, L. J., A. M. Brambrink, C. Lehmann, C. Portera-Cailliau, R. Koehler, J. Rothstein, and R. J. Traystman. 1997. Hypoxia-ischemia causes abnormalities in glutamate transporters and death of astroglia and neurons in newborn striatum. *Ann Neurol* 42: 335-48.
- Masson, J., M. Riad, F. Chaudhry, M. Darmon, Z. Aidouni, M. Conrath, B. Giros, M. Hamon, J. Storm-Mathisen, L. Descarries, and S. El Mestikawy. 1999. Unexpected localization of the Na<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup>-dependent-like orphan transporter, Rxt1, on synaptic vesicles in the rat central nervous system. *Eur J Neurosci* 11: 1349-61.
- Matsuda, K., Y. Kamiya, S. Matsuda, and M. Yuzaki. 2002. Cloning and characterization of a novel NMDA receptor subunit NR3B: a dominant subunit that reduces calcium permeability. *Brain Res Mol Brain Res* 100: 43-52.
- Mayer, M. L., A. B. MacDermott, G. L. Westbrook, S. J. Smith, and J. L. Barker. 1987. Agonist- and voltage-gated calcium entry in cultured mouse spinal cord neurons under voltage clamp measured using arsenazo III. *J Neurosci* 7: 3230-44.
- Mayer, M. L., and G. L. Westbrook. 1987. Permeation and block of N-methyl-D-aspartic acid receptor channels by divalent cations in mouse cultured central neurones. *J Physiol* 394: 501-27.
- McCracken AA, Brodsky JL. Assembly of ER-associated protein degradation in vitro: dependence on cytosol, calnexin, and ATP. *J Cell Biol.* 1996 Feb;132(3):291-8.
- Melone, M., F. Quagliano, P. Barbaresi, H. Varoqui, J. D. Erickson, and F. Conti. 2004. Localization of the glutamine transporter SNAT1 in rat cerebral cortex and neighboring structures, with a note on its localization in human cortex. *Cereb Cortex* 14: 562-74.

- Migaud M, Charlesworth P, Dempster M, Webster LC, Watabe AM, Makhinson M, He Y, Ramsay MF, Morris RG, Morrison JH, O'Dell TJ, Grant SG. Enhanced long-term potentiation and impaired learning in mice with mutant postsynaptic density-95 protein. *Nature*. 1998 Dec 3;396(6710):433-9
- Miyamoto E. Molecular mechanism of neuronal plasticity: induction and maintenance of long-term potentiation in the hippocampus. *J Pharmacol Sci*. 2006;100(5):433-42.
- Moult, P. R., C. M. Gladding, T. M. Sanderson, S. M. Fitzjohn, Z. I. Bashir, E. Molnar, and G. L. Collingridge. 2006. Tyrosine phosphatases regulate AMPA receptor trafficking during metabotropic glutamate receptor-mediated long-term depression. *J Neurosci* 26: 2544-54.
- Nakanishi, S. 1992. Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain function. *Science* 258: 597-603.
- Niethammer, M., E. Kim, and M. Sheng. 1996. Interaction between the C terminus of NMDA receptor subunits and multiple members of the PSD-95 family of membrane-associated guanylate kinases. *J Neurosci* 16: 2157-63.
- Nishizuka Y. Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses. *FASEB J*. 1995 Apr;9(7):484-96.
- O'Brien RJ, Lau LF, Huganir RL. Molecular mechanisms of glutamate receptor clustering at excitatory synapses. *Curr Opin Neurobiol*. 1998 Jun;8(3):364-9.
- Ozawa, S. 1998. [Ca<sup>2+</sup> permeation through the ionotropic glutamate receptor]. *Tanpakushitsu Kakusan Koso* 43: 1589-95.
- Ozawa, S., H. Kamiya, and K. Tsuzuki. 1998. Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Prog Neurobiol* 54: 581-618.
- Paoletti P, Neyton J. NMDA receptor subunits: function and pharmacology. *Curr Opin Pharmacol*. 2007 Feb;7(1):39-47. Epub 2006 Nov 7.
- Patel, A. B., R. A. De Graaf, G. F. Mason, D. L. Rothman, R. G. Shulman, and K. L. Behar. 2003. Coupling of glutamatergic neurotransmission and neuronal glucose oxidation over the entire range of cerebral cortex activity. *Ann N Y Acad Sci* 1003: 452-3.
- Perego, C., C. Vanoni, A. Villa, R. Longhi, S. M. Kaech, E. Frohli, A. Hajnal, S. K. Kim, and G. Pietrini. 1999. PDZ-mediated interactions retain the epithelial GABA transporter on the basolateral surface of polarized epithelial cells. *Embo J* 18: 2384-93.
- Petaja-Repo UE, Hogue M, Laperriere A, Bhalla S, Walker P, Bouvier M. Newly synthesized human delta opioid receptors retained in the endoplasmic reticulum are retrotranslocated to the cytosol, deglycosylated, ubiquitinated, and degraded by the proteasome. *J Biol Chem*. 2001 Feb 9;276(6):4416-23. Epub 2000 Oct 27.
- Pines, G., N. C. Danbolt, M. Bjoras, Y. Zhang, A. Bendahan, L. Eide, H. Koepsell, J. Storm-Mathisen, E. Seeberg, and B. I. Kanner. 1992. Cloning and expression of a rat brain L-glutamate transporter. *Nature* 360: 464-7.
- Pollard, M., and J. McGivan. 2000. The rat hepatoma cell line H4-II-E-C3 expresses high activities of the high-affinity glutamate transporter GLT-1A. *FEBS Lett* 484: 74-6.
- Pow, D. V., T. Naidoo, B. E. Lingwood, G. N. Healy, S. M. Williams, R. K. Sullivan, S. O'Driscoll, and P. B. Colditz. 2004. Loss of glial glutamate transporters and induction of neuronal expression of GLT-1B in the hypoxic neonatal pig brain. *Brain Res Dev Brain Res* 153: 1-11.
- Prybylowski K, Chang K, Sans N, Kan L, Vicini S, Wenthold RJ. The synaptic localization of NR2B-containing NMDA receptors is controlled by interactions with PDZ proteins and AP-2. *Neuron*. 2005 Sep 15;47(6):845-57.

- Rauen, T. 2000. Diversity of glutamate transporter expression and function in the mammalian retina. *Amino Acids* 19: 53-62.
- Rauen, T., F. Fischer, and M. Wiessner. 1999. Glia-neuron interaction by high-affinity glutamate transporters in neurotransmission. *Adv Exp Med Biol* 468: 81-95.
- Rauen, T., and B. I. Kanner. 1994. Localization of the glutamate transporter GLT-1 in rat and macaque monkey retinae. *Neurosci Lett* 169: 137-40.
- Rauen, T., and M. Wiessner. 2000. Fine tuning of glutamate uptake and degradation in glial cells: common transcriptional regulation of GLAST1 and GS. *Neurochem Int* 37: 179-89.
- Rauen, T., M. Wiessner, R. Sullivan, A. Lee, and D. V. Pow. 2004. A new GLT1 splice variant: cloning and immunolocalization of GLT1c in the mammalian retina and brain. *Neurochem Int* 45: 1095-106.
- Rauh, R., A. Dinudom, A. B. Fotia, M. Paulides, S. Kumar, C. Korbmacher, and D. I. Cook. 2006. Stimulation of the epithelial sodium channel (ENaC) by the serum- and glucocorticoid-inducible kinase (Sgk) involves the PY motifs of the channel but is independent of sodium feedback inhibition. *Pflugers Arch* 452: 290-9.
- Robinson, M. B., J. D. Sinor, L. A. Dowd, and J. F. Kerwin, Jr. 1993. Subtypes of sodium-dependent high-affinity L-[3H]glutamate transport activity: pharmacologic specificity and regulation by sodium and potassium. *J Neurochem* 60: 167-79.
- Robinson MB, Djali S, Buchhalter JR. Inhibition of glutamate uptake with L-trans-pyrrolidine-2,4-dicarboxylate potentiates glutamate toxicity in primary hippocampal cultures. *J Neurochem*. 1993 Dec;61(6):2099-103.
- Gonzalez MI, Susarla BT, Robinson MB. Evidence that protein kinase Calpha interacts with and regulates the glial glutamate transporter GLT-1. *J Neurochem*. 2005 Sep;94(5):1180-8. Epub 2005 Jul 25.
- Roche, K. W. 2004. The expanding role of PSD-95: a new link to addiction. *Trends Neurosci* 27: 699-700.
- Rothstein, J. D., L. Martin, A. I. Levey, M. Dykes-Hoberg, L. Jin, D. Wu, N. Nash, and R. W. Kuncl. 1994. Localization of neuronal and glial glutamate transporters. *Neuron* 13: 713-25.
- Sans, N., P. Y. Wang, Q. Du, R. S. Petralia, Y. X. Wang, S. Nakka, J. B. Blumer, I. G. Macara, and R. J. Wenthold. 2005. mPins modulates PSD-95 and SAP102 trafficking and influences NMDA receptor surface expression. *Nat Cell Biol* 7: 1179-90.
- Schepp, W., K. Dehne, H. Herrmuth, K. Pfeffer, and C. Prinz. 1998. Identification and functional importance of IL-1 receptors on rat parietal cells. *Am J Physiol* 275: G1094-105.
- Shcherbik N, Kumar S, Haines DS. Substrate proteolysis is inhibited by dominant-negative Nedd4 and Rsp5 mutants harboring alterations in WW domain 1. *J Cell Sci*. 2002 Mar 1;115(Pt 5):1041-8
- Schmitt, A., E. Asan, K. P. Lesch, and P. Kugler. 2002. A splice variant of glutamate transporter GLT1/EAAT2 expressed in neurons: cloning and localization in rat nervous system. *Neuroscience* 109: 45-61.
- Schmitt, A., E. Asan, B. Puschel, and P. Kugler. 1997. Cellular and regional distribution of the glutamate transporter GLAST in the CNS of rats: nonradioactive in situ hybridization and comparative immunocytochemistry. *J Neurosci* 17: 1-10.
- Schubert U, Anton LC, Gibbs J, Norbury CC, Yewdell JW, Bennink JR. Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes. *Nature*. 2000 Apr 13;404(6779):770-4.
- Schulz, T. W., T. Nakagawa, P. Licznarski, V. Pawlak, A. Kollek, A. Rozov, J. Kim, T. Dittgen, G. Kohr, M. Sheng, P. H. Seeburg, and P. Osten. 2004. Actin/alpha-actinin-dependent transport of AMPA receptors in dendritic spines: role of the PDZ-LIM protein RIL. *J Neurosci* 24: 8584-94

- .Sheng, M., and E. Kim. 1996. Ion channel associated proteins. *Curr Opin Neurobiol* 6: 602-8.
- Sheng, M., and C. Sala. 2001. PDZ domains and the organization of supramolecular complexes. *Annu Rev Neurosci* 24: 1-29.
- Snyder, P. M. 2005. Minireview: regulation of epithelial Na<sup>+</sup> channel trafficking. *Endocrinology* 146: 5079-85.
- Stephenson, F. A. 2001. Subunit characterization of NMDA receptors. *Curr Drug Targets* 2: 233-9.
- Storck T, Schulte S, Hofmann K, Stoffel W. Structure, expression, and functional analysis of a Na(+)-dependent glutamate/aspartate transporter from rat brain. *vProc Natl Acad Sci U S A*. 1992 Nov 15;89(22):10955-9.
- Sullivan, R., T. Rauen, F. Fischer, M. Wiessner, C. Grewer, A. Bicho, and D. V. Pow. 2004. Cloning, transport properties, and differential localization of two splice variants of GLT-1 in the rat CNS: implications for CNS glutamate homeostasis. *Glia* 45: 155-69.
- Susarla, T.S., Robinson M.B. Mechanisms of protein kinase C (PKC)-dependent endocytosis of the glial glutamate transporter GLT1. Program No. 503.10. 2004 Abstract Viewer/Itinerary Planner. Washington, DC: Society for Neuroscience, 2004.
- Takumi, Y., A. Matsubara, N. C. Danbolt, J. H. Laake, J. Storm-Mathisen, S. Usami, H. Shinkawa, and O. P. Ottersen. 1997. Discrete cellular and subcellular localization of glutamine synthetase and the glutamate transporter GLAST in the rat vestibular end organ. *Neuroscience* 79: 1137-44.
- Tan, J., O. Zelenai, D. Correale, J. D. Rothstein, and M. B. Robinson. 1999. Expression of the GLT-1 subtype of Na<sup>+</sup>-dependent glutamate transporter: pharmacological characterization and lack of regulation by protein kinase C. *J Pharmacol Exp Ther* 289: 1600-10.
- Tanabe, Y., M. Masu, T. Ishii, R. Shigemoto, and S. Nakanishi. 1992. A family of metabotropic glutamate receptors. *Neuron* 8: 169-79.
- Tanaka, E., and R. A. North. 1993. Actions of 5-hydroxytryptamine on neurons of the rat cingulate cortex. *J Neurophysiol* 69: 1749-57.
- Tomita, S., R. A. Nicoll, and D. S. Bredt. 2001. PDZ protein interactions regulating glutamate receptor function and plasticity. *J Cell Biol* 153: F19-24.
- Torp, R., F. Hoover, N. C. Danbolt, J. Storm-Mathisen, and O. P. Ottersen. 1997. Differential distribution of the glutamate transporters GLT1 and rEAAC1 in rat cerebral cortex and thalamus: an in situ hybridization analysis. *Anat Embryol (Berl)* 195: 317-26.
- Torp, R., D. Lekieffre, L. M. Levy, F. M. Haug, N. C. Danbolt, B. S. Meldrum, and O. P. Ottersen. 1995. Reduced postischemic expression of a glial glutamate transporter, GLT1, in the rat hippocampus. *Exp Brain Res* 103: 51-8.
- Townsend, M., Y. Liu, and M. Constantine-Paton. 2004. Retina-driven dephosphorylation of the NR2A subunit correlates with faster NMDA receptor kinetics at developing retinocollicular synapses. *J Neurosci* 24: 11098-107.
- Tramacere, M., P. G. Petronini, and A. F. Borghetti. 1984. Effect of hyperosmolarity on the activity of amino acid transport system L in avian fibroblasts. *J Cell Physiol* 121: 81-6.
- Tramacere, M., P. G. Petronini, A. Severini, and A. F. Borghetti. 1984. Osmoregulation of amino acid transport activity in cultured fibroblasts. *Exp Cell Res* 151: 70-9.
- Trotti, D., M. Aoki, P. Pasinelli, U. V. Berger, N. C. Danbolt, R. H. Brown, Jr., and M. A. Hediger. 2001. Amyotrophic lateral sclerosis-linked glutamate transporter mutant has impaired glutamate clearance capacity. *J Biol Chem* 276: 576-82.
- Utsunomiya-Tate N, Endou H, Kanai Y. Tissue specific variants of glutamate transporter GLT-1. *FEBS Lett*. 1997 Oct 27;416(3):312-6.
- Urbe S. Ubiquitin and endocytic protein sorting. *Essays Biochem*. 2005;41:81-98.
- Varoqui, H., H. Zhu, D. Yao, H. Ming, and J. D. Erickson. 2000. Cloning and functional identification of a neuronal glutamine transporter. *J Biol Chem* 275: 4049-54.

- Van Ham M, Hendriks W. PDZ domains-glue and guide. *Mol Biol Rep*. 2003 Jun;30(2):69-82.
- Van Zundert B, Yoshii A, Constantine-Paton M. Receptor compartmentalization and trafficking at glutamate synapses: a developmental proposal. *Trends Neurosci*. 2004 Jul;27(7):428-37.
- Volland, C., J. M. Galan, D. Urban-Grimal, G. Devilliers, and R. Haguenaer-Tsapis. 1994. Endocytose and degradation of the uracil permease of *S. cerevisiae* under stress conditions: possible role of ubiquitin. *Folia Microbiol (Praha)* 39: 554-7.12;7(12):2013-7.
- Ward, C. L., S. Omura, and R. R. Kopito. 1995. Degradation of CFTR by the ubiquitin-proteasome pathway. *Cell* 83: 121-7.
- Yamada K, Watanabe M, Shibata T, Tanaka K, Wada K, Inoue Y. EAAT4 is a post-synaptic glutamate transporter at Purkinje cell synapses. *Neuroreport*. 1996 Aug
- Yernool D, Boudker O, Folta-Stogniew E, Gouaux E. Trimeric subunit stoichiometry of the glutamate transporters from *Bacillus caldotenax* and *Bacillus stearothermophilus*. *Biochemistry*. 2003 Nov 11;42(44):12981-8.
- Yernool D, Boudker O, Jin Y, Gouaux E. Structure of a glutamate transporter homologue from *Pyrococcus horikoshii*. *Nature*. 2004 Oct 14;431(7010):811-8.
- Westbrook, G. L., and M. L. Mayer. 1987. Micromolar concentrations of Zn<sup>2+</sup> antagonize NMDA and GABA responses of hippocampal neurons. *Nature* 328: 640-3.
- Yoshida, H. 2007. ER stress and diseases. *Febs J* 274: 630-58.
- Zhou J, Sutherland ML. Glutamate transporter cluster formation in astrocytic processes regulates glutamate uptake activity. *J Neurosci*. 2004 Jul 14;24(28):6301-6.
- Zhou, R., and P. M. Snyder. 2005. Nedd4-2 phosphorylation induces serum and glucocorticoid-regulated kinase (SGK) ubiquitination and degradation. *J Biol Chem* 280: 4518-23.
- Zhou, R., S. V. Patel, and P. M. Snyder. 2007. Nedd4-2 catalyzes ubiquitination and degradation of cell surface ENaC. *J Biol Chem*.

## **IX. ANEXO.**



[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

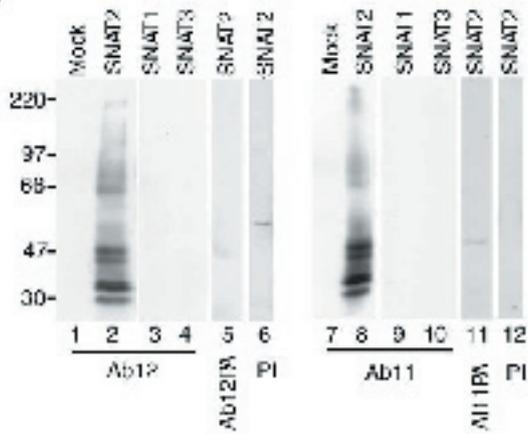
[Redacted]

[Redacted text block]

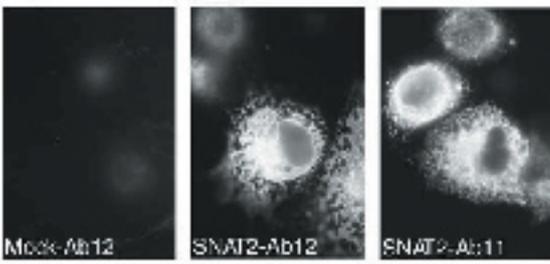
[Redacted text block]

[Redacted text block]

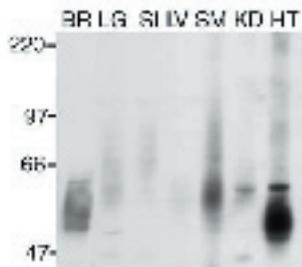
**A**

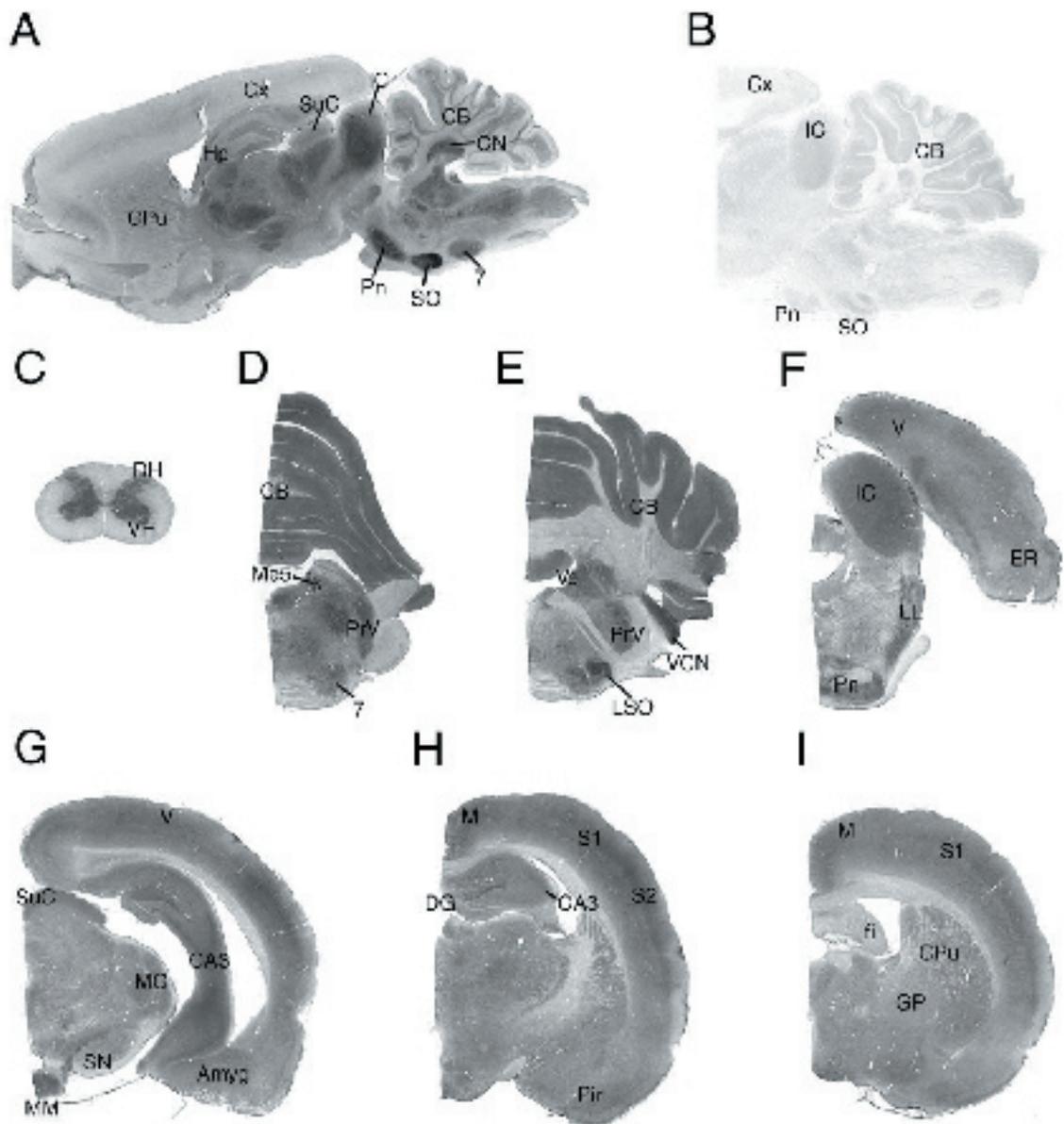


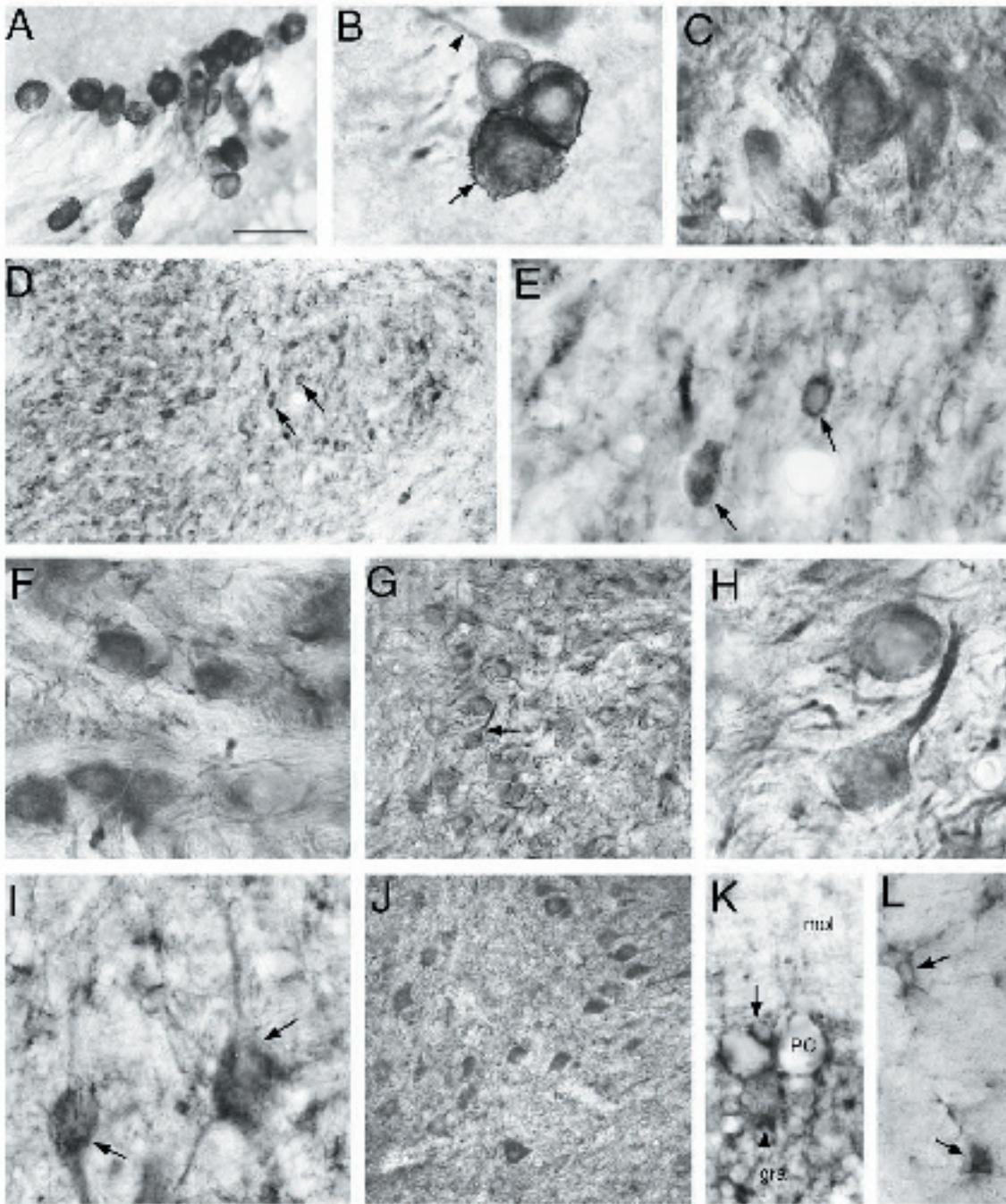
**B**



**C**





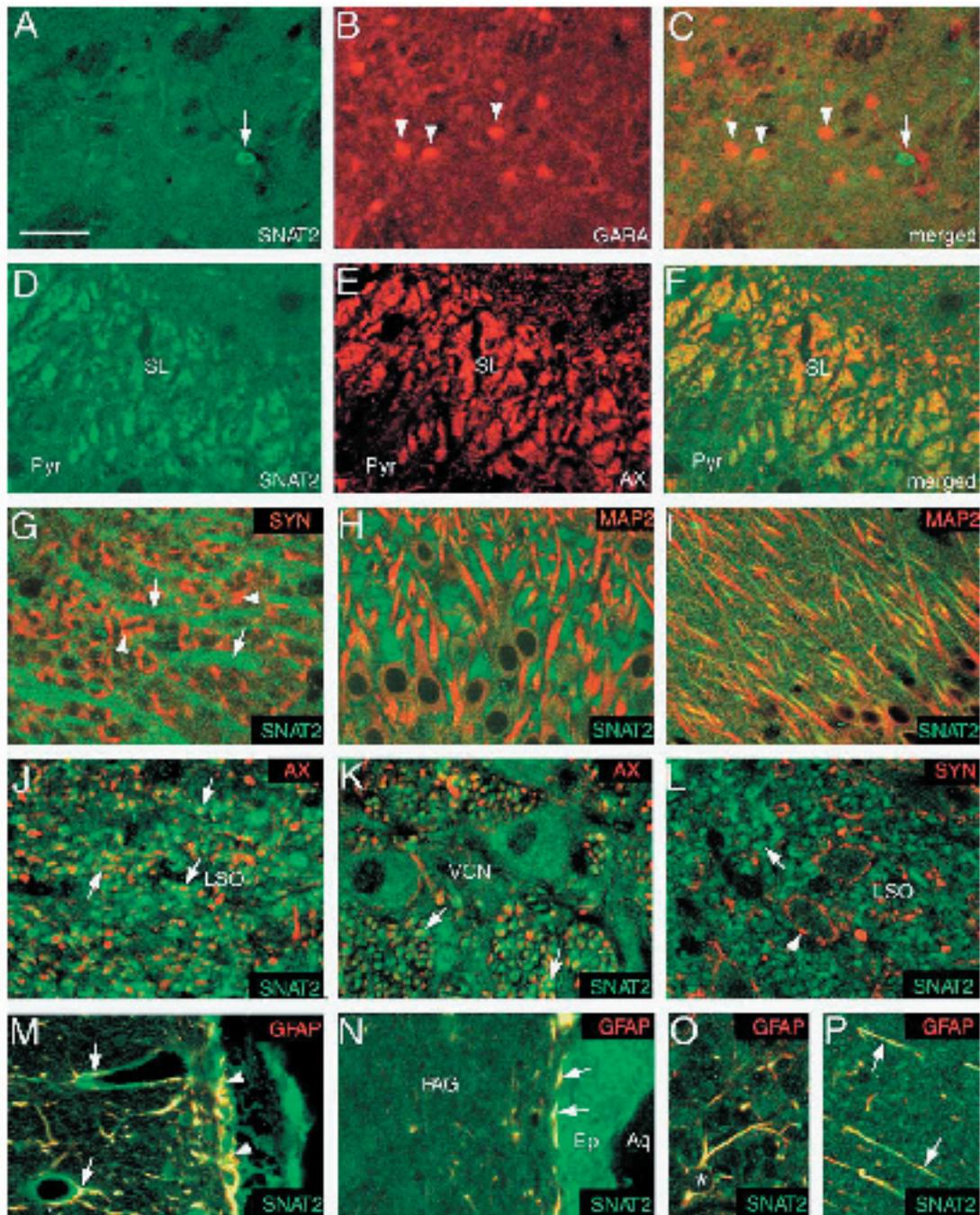


[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]





[Redacted text block]

[Redacted text block]

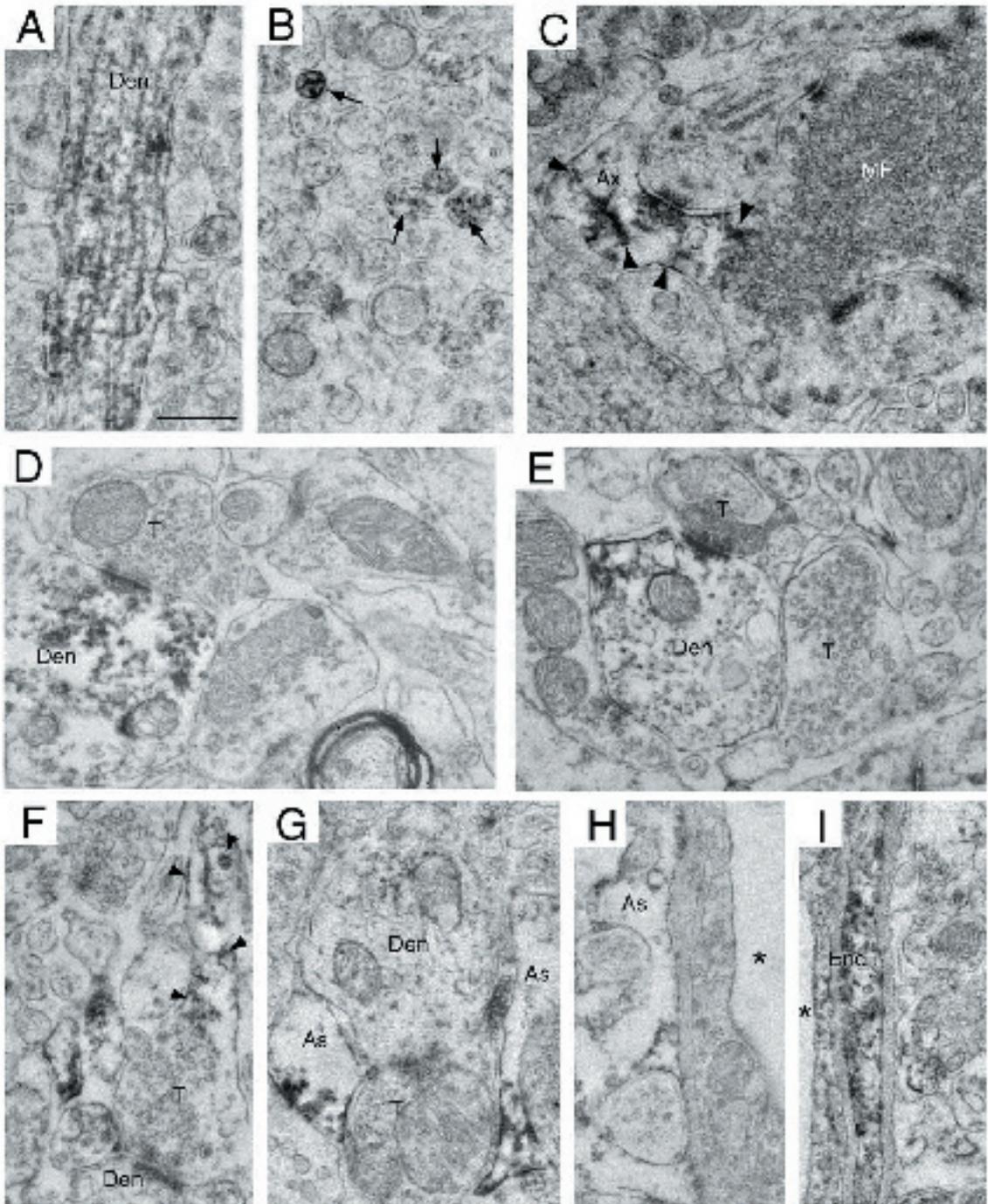
[Redacted section header]

[Redacted text block]

[Redacted section header]

[Redacted text block]

[Redacted text block]



[REDACTED]

[Redacted text block]

[Redacted text block]





[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

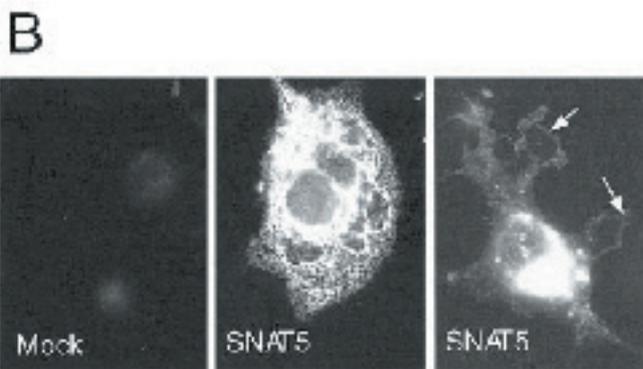
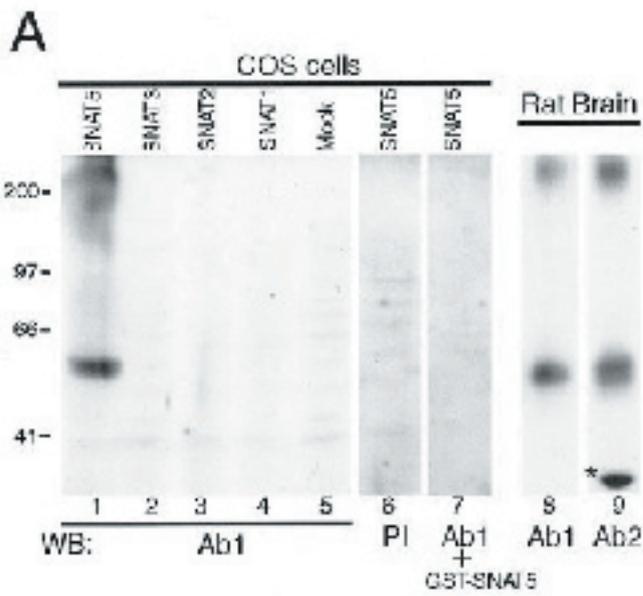
[Redacted text block]

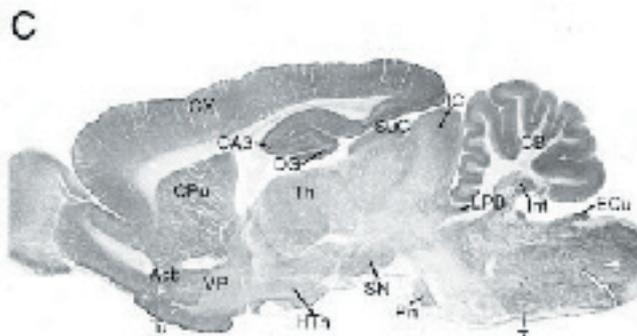
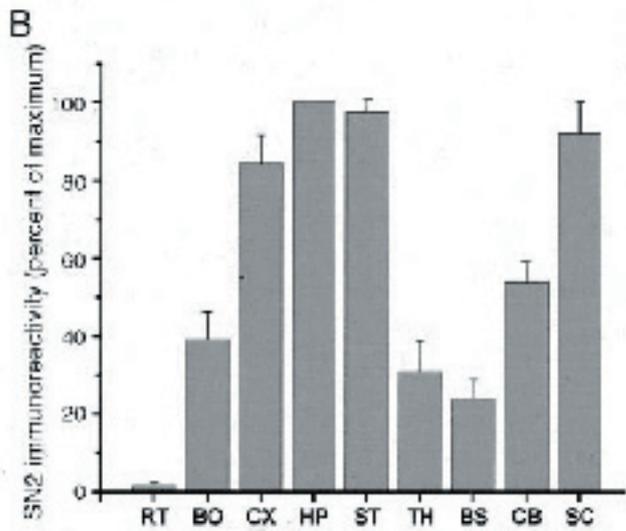
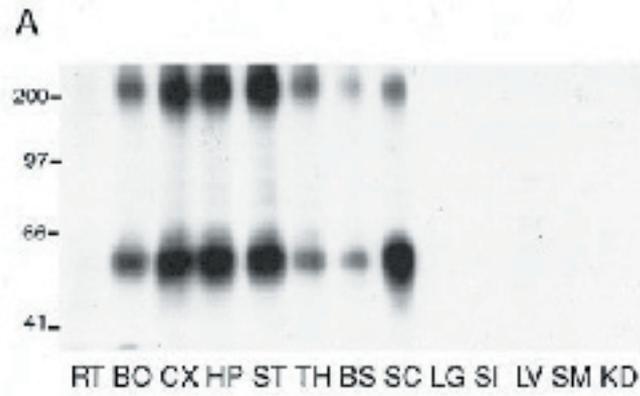
[REDACTED]

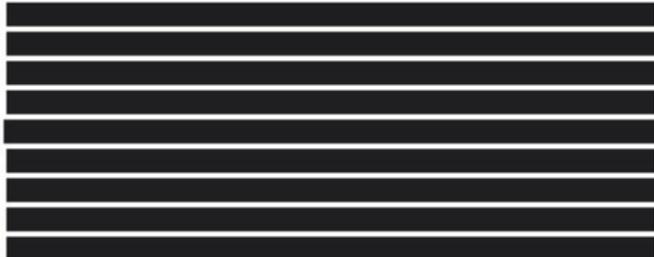
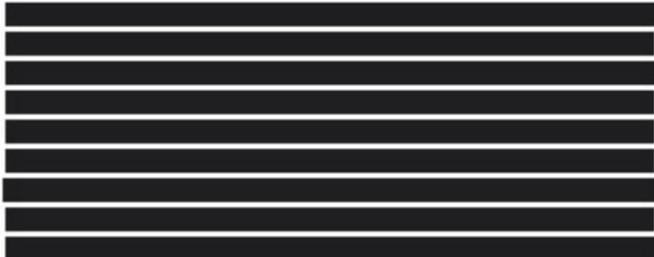
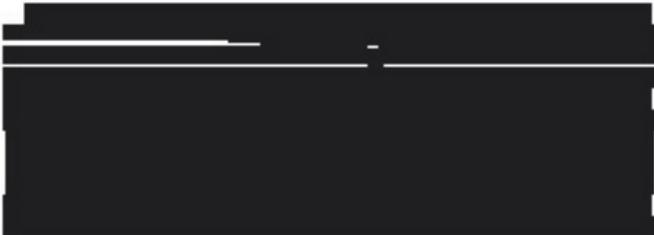
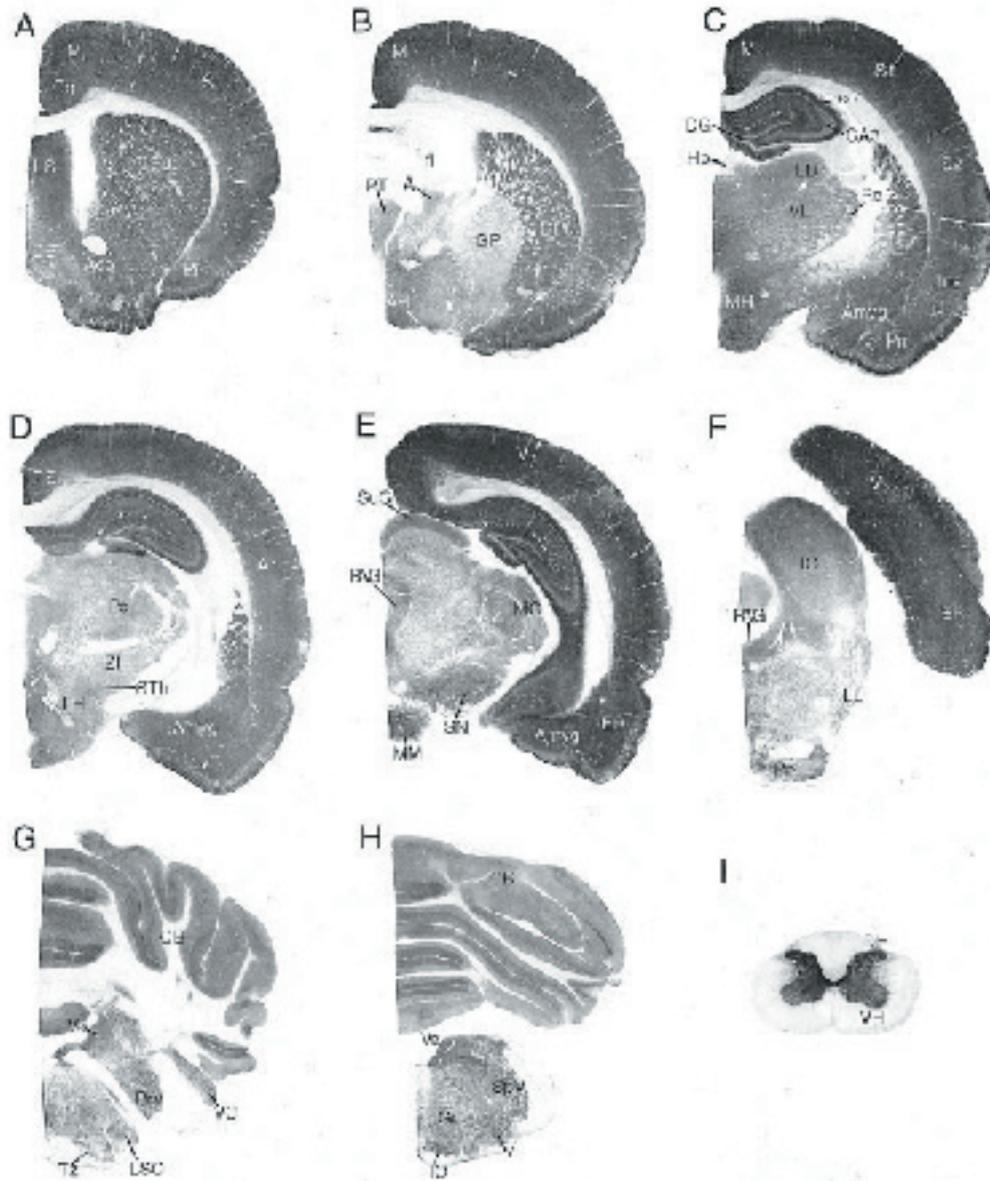
[REDACTED]

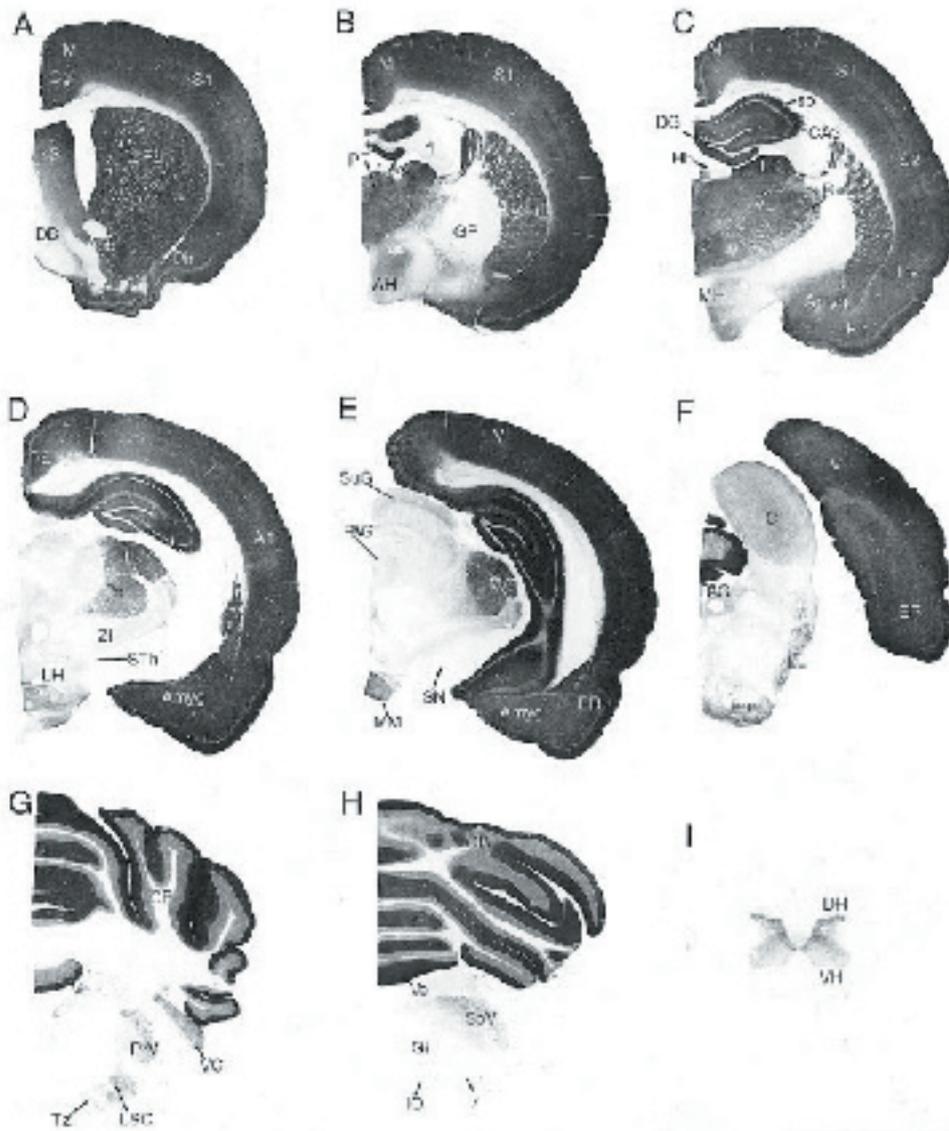
[REDACTED]

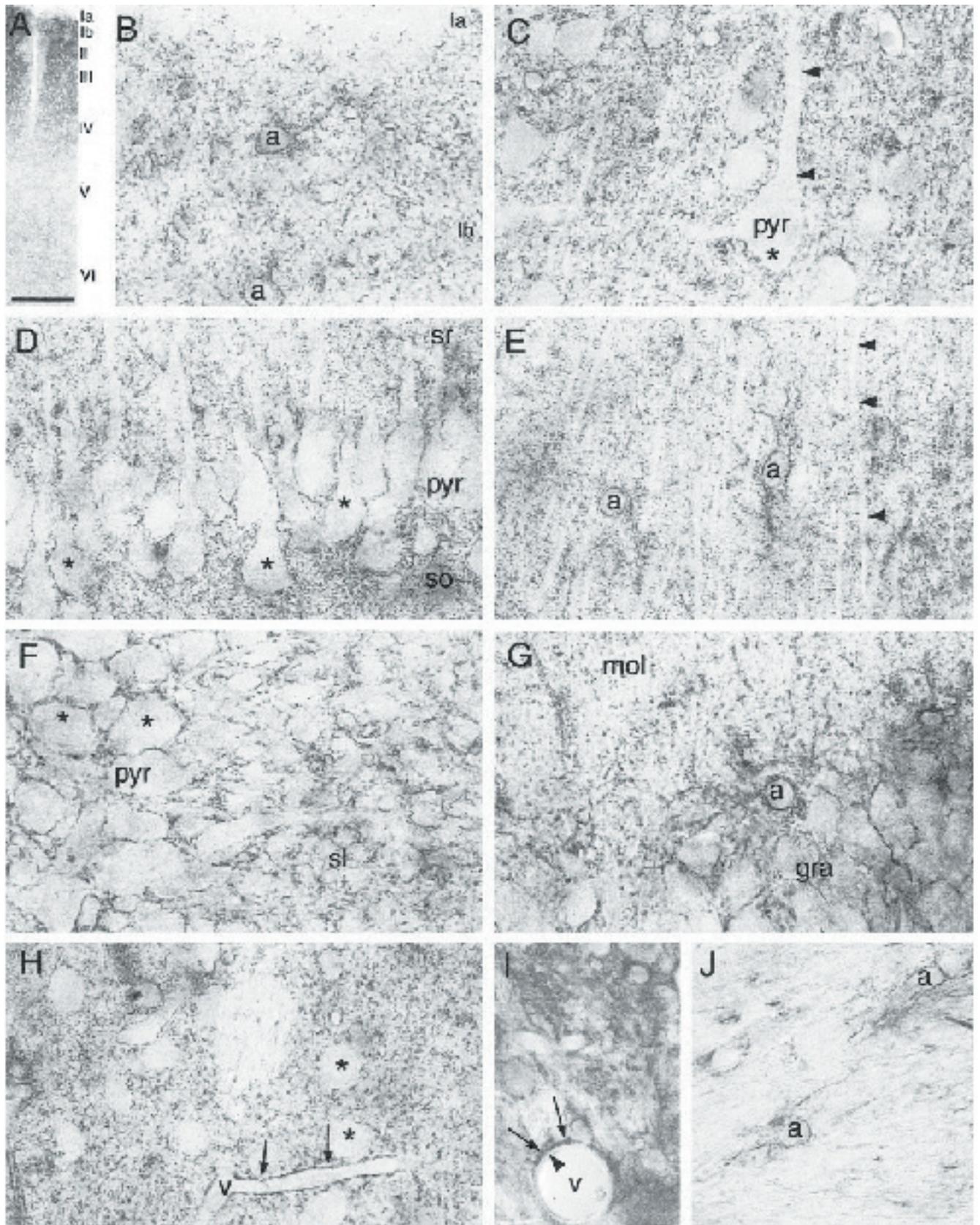
[Redacted text block]



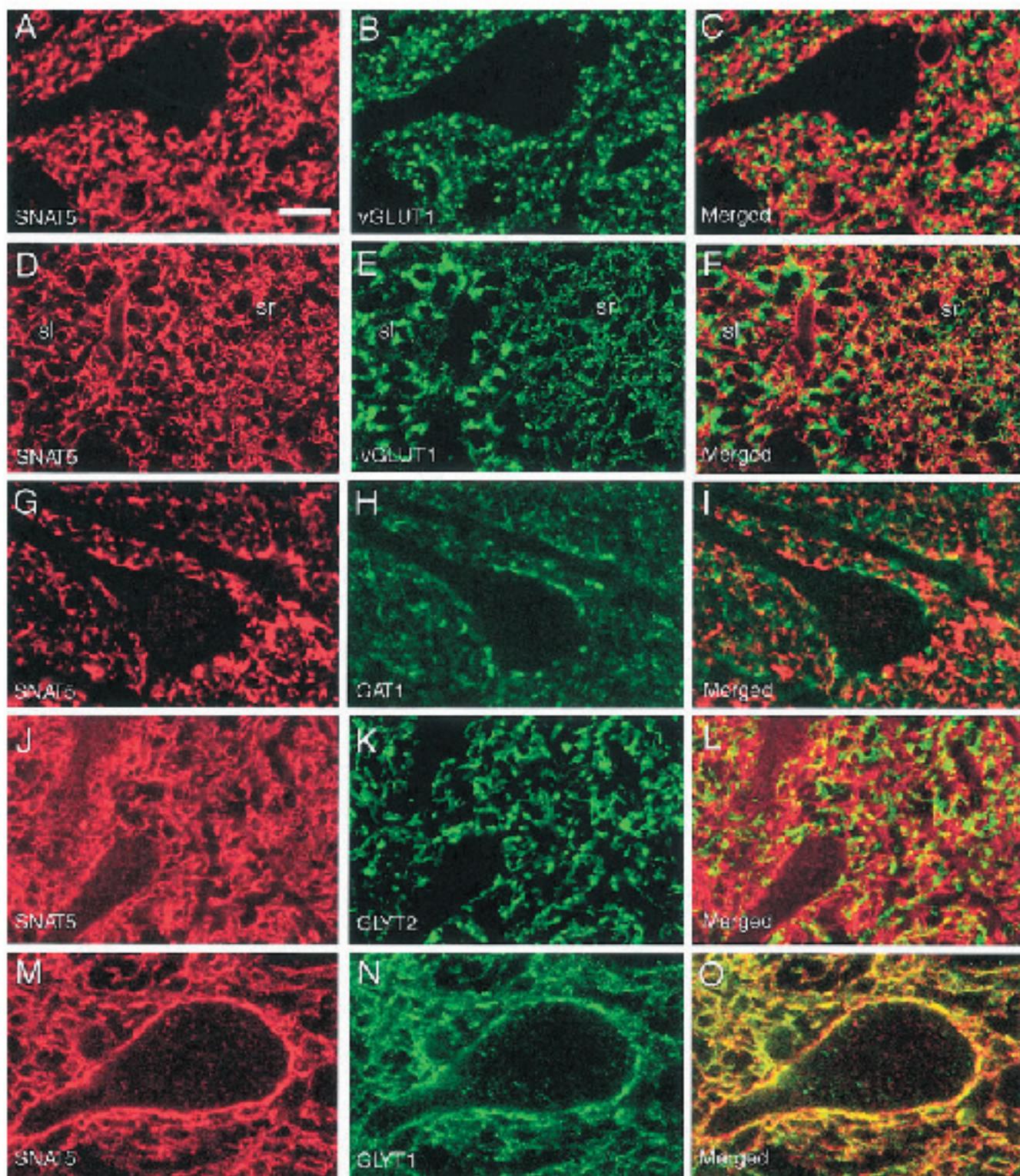


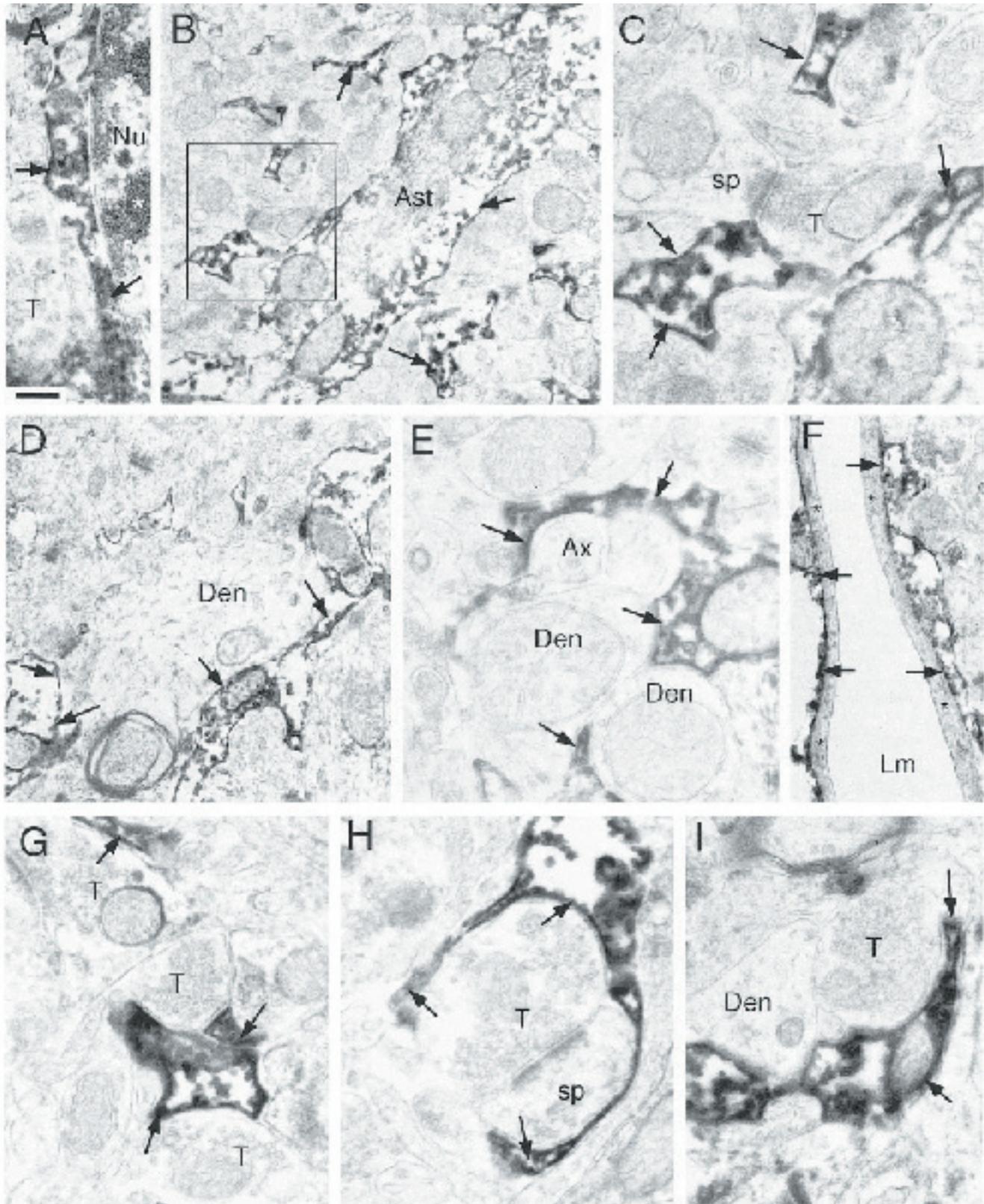








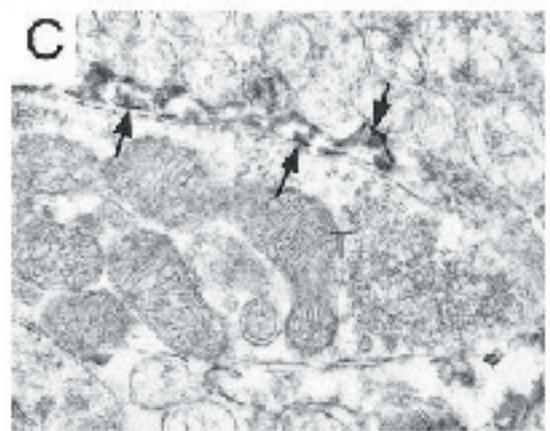
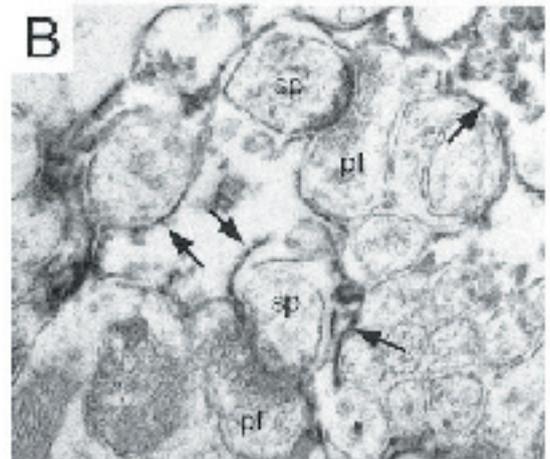
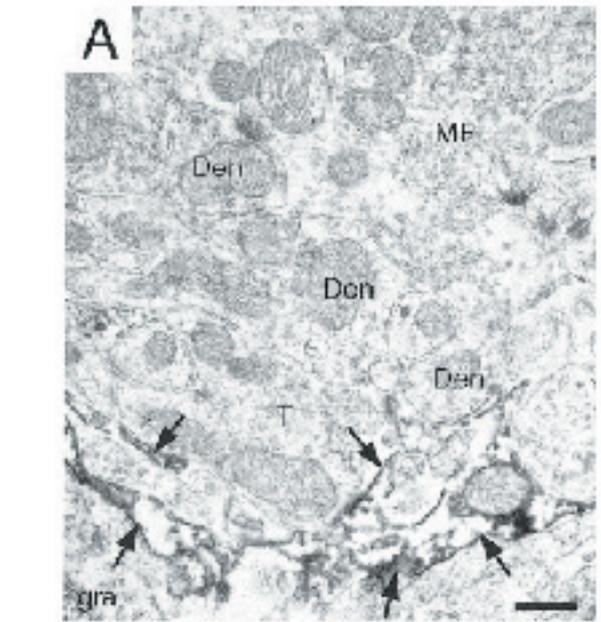




[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]



[REDACTED]

[Redacted text block]





[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

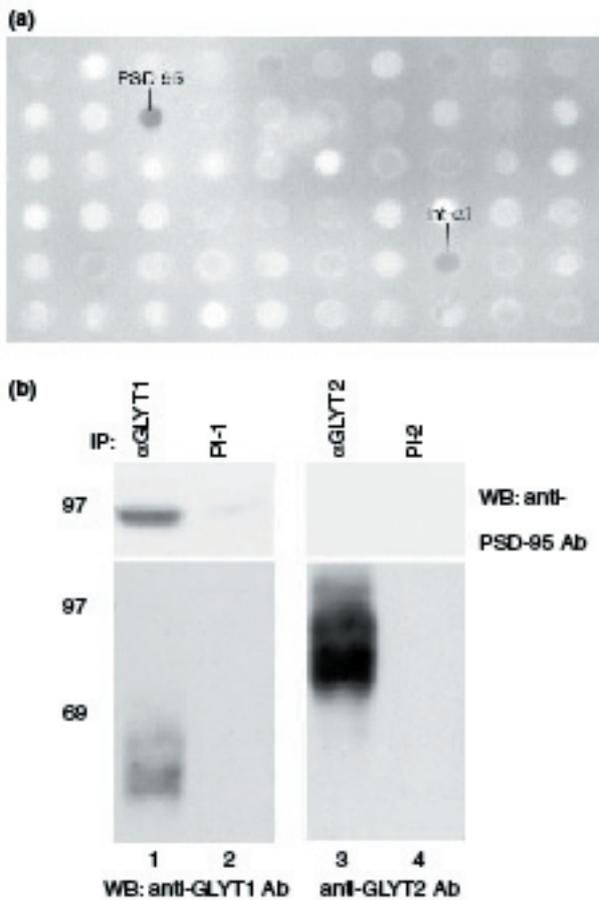
---

[Redacted]

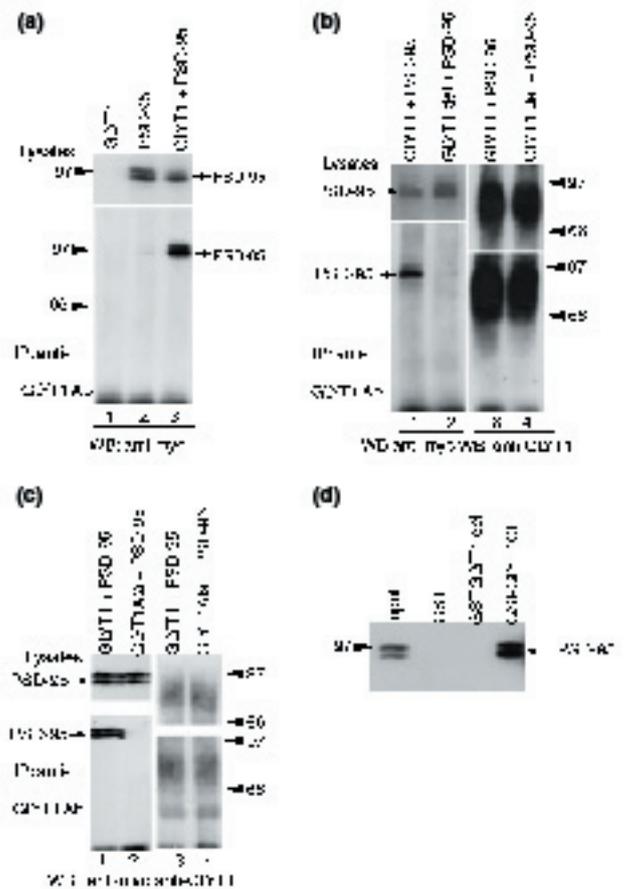
[Redacted]

---

[Redacted]



**Fig. 1** GLYT1 interacts with PSD-95 in rat brain. (a) Part of the antibody array that was incubated with an extract of rat brain synaptosomes. The protein complexes retained were visualized with biotinylated anti-GLYT1 antibodies, followed by streptavidin-peroxidase and ECL detection. In this part of the array, there was a clear reaction with the PSD-95 and integrin  $\alpha$ -1 antibody spots. (b) GLYT1 and PSD-95 forms immunoprecipitable complexes in the rat brain. Extracts from rat forebrain (lanes 1, 2) or spinal cord (lanes 3, 4) were immunoprecipitated with anti-GLYT1 antibodies ( $\alpha$ GLYT1), or anti-GLYT2 antibodies ( $\alpha$ GLYT2), or their respective pre-immune sera (PI-1 and PI-2). The proteins recovered were resolved by SDS-PAGE and immunoblotted. The blot was immunoreacted with anti-PSD-95 (upper panels, WB: anti-PSD-95 Ab) and visualized by ECL detection method. The blot was re-probed with anti-GLYT1 (lanes 1, 2, lower panel) or anti-GLYT2 (lanes 3, 4, lower panel). WB, western blot. Ab, Antibody.

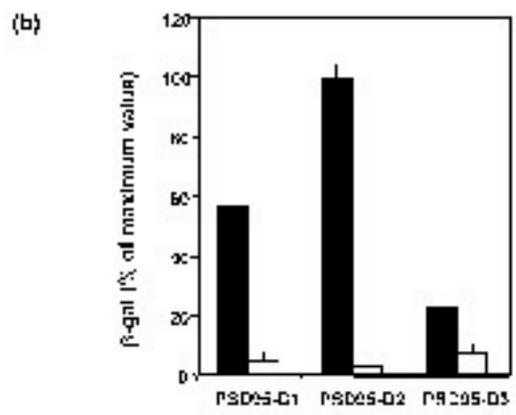
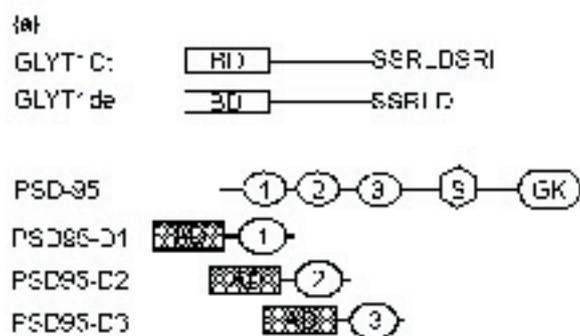


**Fig. 2** The interaction between GLYT1 and PSD-95 is mediated by the C-terminal sequence of GLYT1. (a-c) Co-immunoprecipitation of GLYT1 and PSD-95. Extracts from COS cells transfected with expression vectors for GLYT1 (wild type or mutated) and/or myc-PSD-95 were immunoprecipitated with an anti-GLYT1 antibody (IP: anti-GLYT1 Ab), and the precipitated proteins were analyzed by immunoblotting. The membranes were probed with anti-myc antibodies as indicated (WB: anti-myc in a, b and c). Upper panels correspond to cell lysates and the lower panels to the precipitated proteins. (b, c) The immunoblots were re-probed with anti-GLYT1 antibodies (lanes 3 and 4) to confirm that the immunoprecipitation had been equally efficient for the wild-type GLYT1 and for the C-terminal mutants (GLYT1del and GLYT1Ala; band c respectively). The C-terminus of GLYT1wt ended in the sequence Ser-Arg-Ile. These amino acids were truncated in the GLYT1del mutant, whereas the GLYT1Ala mutant ended in Ser-Arg-Ile-Ala. (d) Pull-down assay. Extracts of COS cells transfected with a myc-PSD-95 expression vector were incubated with GST, GST-GLYT1del or GST-GLYT1C coupled to glutathione-agarose beads. The proteins retained by the beads were blotted and detected with anti-myc antibodies. The protein bands were visualized with the ECL detection method. Input lane corresponds to the cell lysate.

[REDACTED]

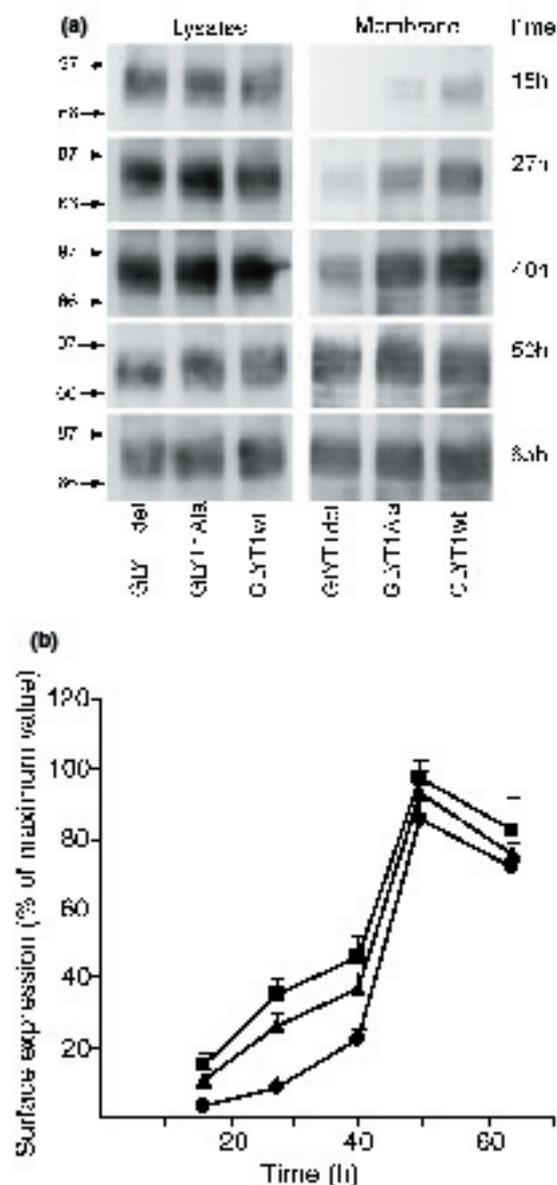
[REDACTED]

[REDACTED]



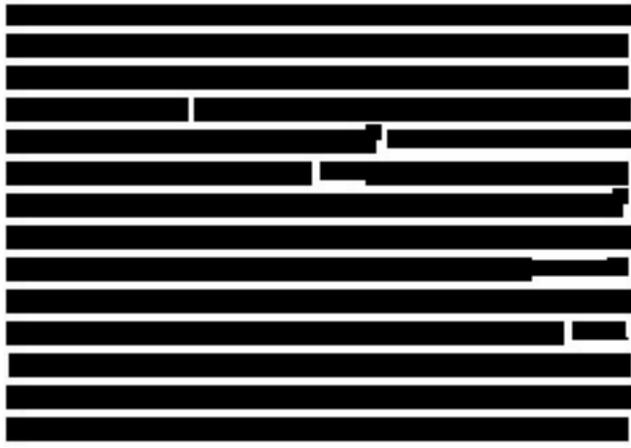
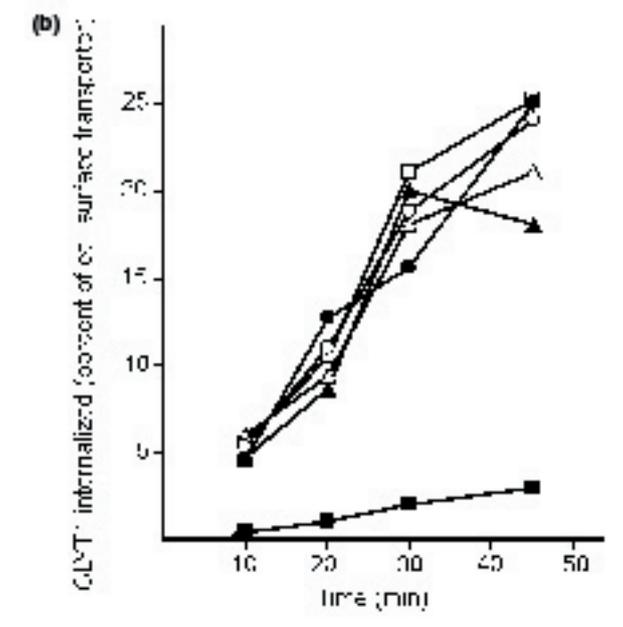
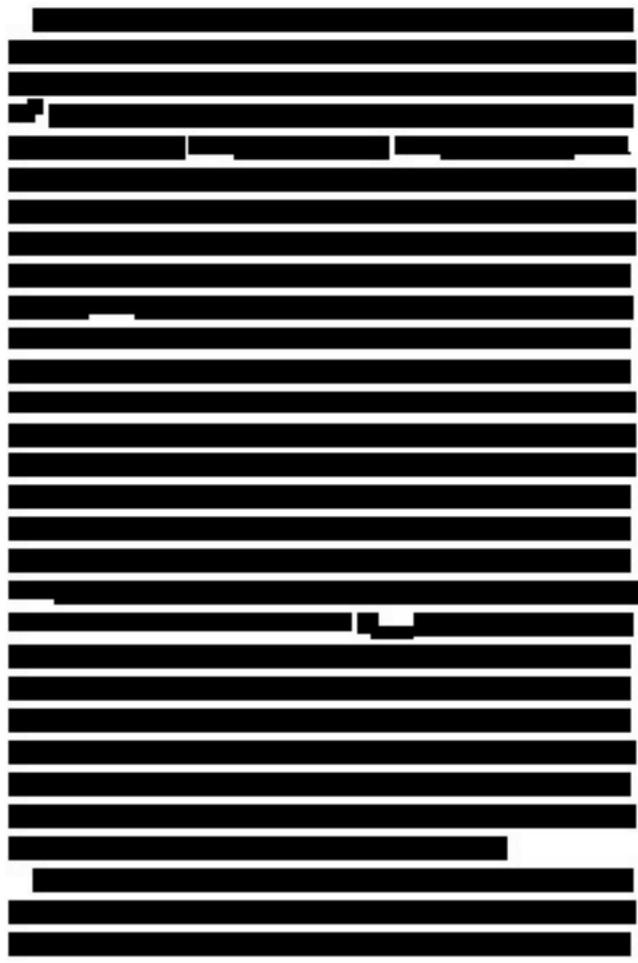
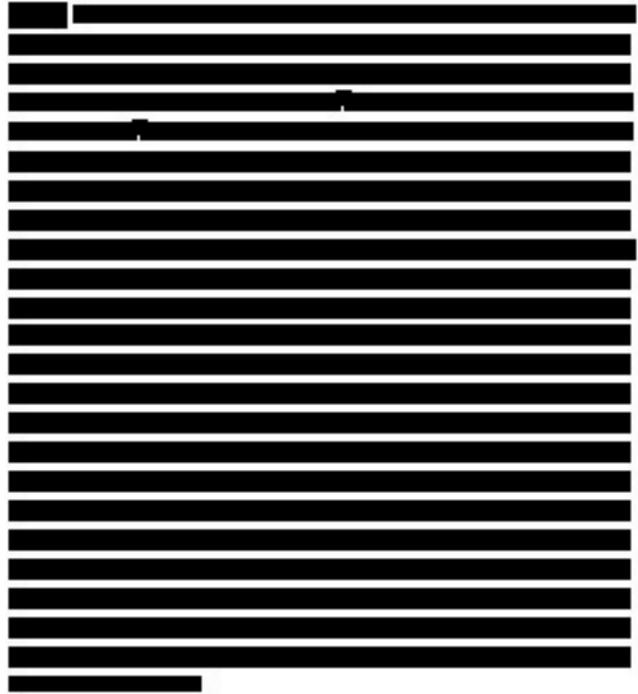
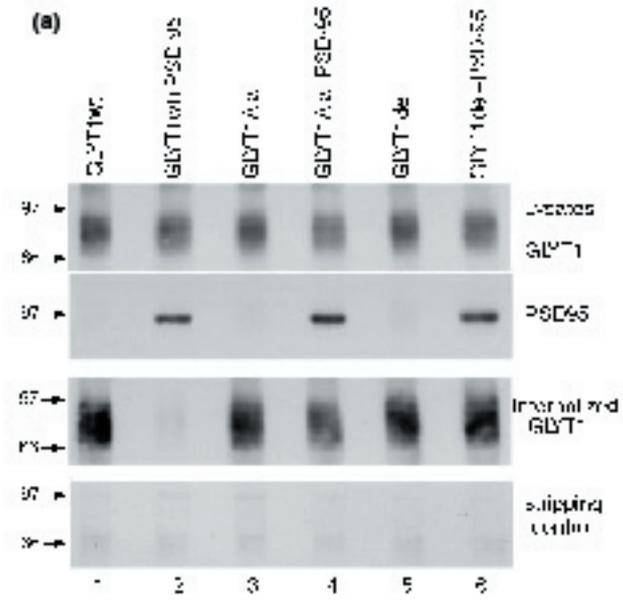
**Fig. 3** The C-terminus of GLYT1 interacts with PDZ domains I and II of PSD95 in a yeast two-hybrid assay. (a) Schematic representation of the bait (GLYT1Ct and GLYT1del) and prey (PSD95-D1, PSD95-D2 and PSD95-D3) used in a series of yeast two-hybrid assays. The bait corresponded to the C-terminal region of GLYT1 or its deletion (GLYT1del), both fused to the GAL4 DNA binding domain (BD). The prey corresponded to each of the three PDZ domains of PSD-95 fused to the GAL4 activation domain (AD). S and GK represent the SH3 and guanylate kinase domains of PSD-95, respectively. (b) Yeast co-expressing a single bait and one prey were seeded on selection plates. Positive interactions were quantified by  $\beta$ -galactosidase assay in solution, and expressed as percentage of the maximum interaction. The values are the mean  $\pm$  SE of at least three experiments performed in triplicate.





**Fig. 5** The SRI motif is involved in the efficient targeting of GLYT1 to the plasma membrane in COS cells. (a) Cell surface biotinylation of GLYT1 wt, GLYT1A1a and GLYT1del expressed in COS cells. At the indicated times, cells transfected with GLYT1 wt, GLYT1A1a or GLYT1del were incubated with the impermeable reagent sulfo-NHS-biotin for 20 min at 4°C. Biotinylated membrane proteins were recovered from lysates with streptavidin-conjugated beads and resolved by SDS-PAGE. GLYT1 bands were detected by western analysis with anti-GLYT1 antibody. To control the GLYT1 expression level in each plate, aliquots of lysates were also analyzed by western blot (Lysates). (b) Intensities of the bands in immunoblots were measured by densitometry, and values of membrane GLYT1 were normalized for the values of GLYT1 in the corresponding cellular lysate. Each point value corresponds to the mean  $\pm$  SE of three independent experiments and represents the per cent of GLYT1 in the plasma membrane by 50 h. GLYT1 wt (squares), GLYT1A1a (triangles), GLYT1del (circles).





[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

