

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS
Departamento de Biología Molecular



Estudio de la regulación dependiente de actividad del tráfico intracelular del transportador de glutamato GLT-1

Ignacio Ibáñez Sainz-Pardo

Madrid, 2016

Memoria presentada por el licenciado Ignacio Ibáñez Sainz-Pardo para optar al título de Doctor en Ciencias por la Universidad Autónoma de Madrid.

Director de la tesis:

Dr. Francisco Zafra Gómez

Codirector de la tesis:

Dr. Cecilio Giménez Martín

Este trabajo ha sido realizado en el Departamento de Biología Molecular, Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa” (C.S.I.C - U.A.M).

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	11
RESUMEN /SUMMARY.....	17
INTRODUCCIÓN.....	23
1. Sistema nervioso, neuronas y sinapsis	25
2. Transmisión sináptica.....	25
2.1. Neurotransmisión glutamatérgica	27
3. Transportadores de glutamato de alta afinidad (familia <i>SLC1</i>).....	29
4. Transportador de glutamato GLT-1	31
4.1. Co-compartimentación de GLT-1, Na ⁺ /K ⁺ ATPasa y enzimas glucolíticas.....	32
4.2. Aspectos fisiopatológicos de GLT-1: Excitotoxicidad.....	33
4.3. Regulación de GLT-1	35
5. Trafico intracelular de proteínas de membrana	37
5.1. Via secretora.....	37
5.2. Endocitosis	39
5.3. Endosomas, degradación y reciclaje	40
5.4. Difusión lateral	40
6. Ubiquitinación	41
6.1. Ubiquitina ligasas (E3): Familia Nedd4	43
6.2. Adaptadores de ubiquitinación.....	44
6.3. Regulación de transportadores de neurotransmisores por ubiquitinación	47
OBJETIVOS.....	49
MATERIAL Y MÉTODOS.....	53
1. Cultivos celulares.....	55
1.1. Cultivos primarios corticales mixtos	55
1.2. Cultivos de células HEK293T y MDCK.....	55
1.3. Transfección de células mediante lipofección.....	55
1.4. Tratamientos celulares.....	56

2. Construcciones plasmídicas.....	57
3. Anticuerpos	58
4. Ensayo de inmunoprecipitación.....	59
5. Marcaje de proteínas de la membrana plasmática mediante biotilación.....	59
6. Electroforesis, electrotransferencia e inmunodetección (<i>Western blot</i>)	60
7. Ensayo de ubiquitinación.....	61
8. Ensayo de transporte de glutamato.....	62
9. Inmunofluorescencia en células en cultivo	63
10. Obtencion de sinaptosomas de corteza cerebral.....	63
11. Inmunoprecipitación de la fracción P2 de cerebro de rata	64
12. Purificación de proteínas de fusión	64
13. Síntesis de proteínas <i>in vitro</i>	65
14. Ensayos <i>pull-down</i>	65
15. Registros electrofisiológicos	66
16. Análisis estadístico.....	66

RESULTADOS..... 69

1. Regulación dependiente de actividad del transportador de glutamato GLT-1.....71

1.1. La privación de glucosa y oxígeno provoca una disminución de la cantidad de GLT-1 en la membrana plasmática de sinaptosomas.....	71
1.2. El glutamato extracelular regula el tráfico de GLT-1 en sinaptosomas	72
1.3. La internalización de GLT-1 en respuesta a glutamato está determinada por la concentración y el tiempo de exposición	72
1.4. La endocitosis de GLT-1 mediada por glutamato es dependiente de la actividad.....	77
1.5. Señalización intracelular implicada en la regulación de GLT-1 dependiente de actividad.....	80
1.6. La ubiquitinación del carboxilo terminal de GLT-1 es necesaria para la endocitosis mediada por glutamato.....	85
1.7. La población de endocitado en presencia de glutamato coincide con la internalizada tras el tratamiento con PMAras el tratamiento con PMA	87
1.8. El tratamiento con glutamato aumenta la unión entre Nedd4-2 y el transportador GLT-1.....	88

2. Estudio funcional del complejo formado entre β-arrestina, Nedd4-2 y GLT-1	90
2.1. Interacción entre β -arrestina y Nedd4-2	90
2.2. Interacción entre β -arrestina y GLT-1.....	91
2.3. Las β -arrestinas condicionan la unión de GLT-1 y Nedd4-2	92
2.4. El complejo formado por β -arrestina-1 y GLT-1 es degradado en el lisosoma	95
2.5. Ubiquitinación de β -arrestina-1 por Nedd4-2.....	97
2.6. La unión de β -arrestina-1 y GLT-1 es más estable en presencia de la forma activa de Nedd4-2	99
2.7. Papel de β -arrestina-1 en la regulación de GLT-1 mediada por glutamato	100
2.8. β -arrestina-1 en la regulación de GLT-1 mediada por PKC.....	103
3. Estudio del papel de las α-arrestinas en la interacción entre β-arrestina-1 y Nedd4-2	106
3.1. La interacción entre β -arrestina-1 y Nedd4-2 depende del dominio WW3	106
3.2. La interacción de β -arrestina-1 y Nedd4-2 es indirecta.....	108
3.3. α -arrestina-1 interacciona con Nedd4-2.....	109
3.4. α -arrestina-1 interacciona con GLT-1	111
3.5. Efecto de la reducción de expresión de α -arrestina-1 o -3 en la interacción entre GLT-1 y Nedd4-2.....	111
DISCUSIÓN.....	115
1. Regulación dependiente de actividad de GLT-1	117
2. Adaptadores de Nedd4-2 en la ubiquitinación de GLT-1.....	123
CONCLUSIONES.....	129
BIBLIOGRAFÍA.....	133

ABREVIATURAS

- ADN:** Ácido desoxirribonucleico
- AMPA:** *α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid*
- AMPC:** Adenosín monofosfato
- AMPK:** Proteína quinasa activada por AMP (*AMP-activated protein kinase*)
- AP-2:** *Adaptor-related protein complex 2*
- AP-V:** *2-amino-5-phosphonovaleric acid*
- AR:** Receptor de andrógenos (*Androgen receptor*)
- ARN:** Ácido ribonucleico
- ARRDC:** *Arrestin-domain containing protein*
- ART:** *Arrestin-related trafficking adaptors*
- ATP:** Adenosín trifosfato
- BSA:** Albúmina de suero bovina (*Bovine Serum Albumin*)
- CHT1:** Transportador de colina 1 (*Choline transporter 1*)
- CREB:** *cAMP response element-binding*
- D,L-TBOA:** *DL-threo-β-Benzoyloxyaspartic acid*
- DAT:** Transportador de dopamina (*Dopamine transporter*)
- DIV:** Días *in vitro* (*Days in vitro*)
- DLG-1:** *Discs large homolog 1*
- DMEM:** *Dulbecco's Modified Eagle's medium*
- DTT:** Ditiotreitól
- DUB:** Desubiquitinasa
- EAAT:** Transportador de aminoácidos excitatorios (*Excitatory aminoacid transporter*)
- ECL:** *Enhanced chemiluminiscent detection system*
- EDTA:** *Ethylenediaminetetracetic acid*
- EGR:** *Early growth response protein*
- ELA:** Esclerosis lateral amiotrófica
- ENaC:** Canal epitelial de sodio (*Epithelial sodium channel*)
- ERAD:** Degradación proteica asociada al retículo endoplásmico (*Endoplasmic-reticulum-associated protein degradation*)
- ERK:** *Extracellular-signal-regulated kinase*
- FBS:** Suero bovino fetal (*Fetal Bovine Serum*)
- GABA:** Ácido gamma aminobutírico (*Gamma-aminobutyric acid*)

Abreviaturas

- GAT1:** Transportador de GABA 1 (*GABA transporter 1*)
- GFP:** Proteína fluorescente verde (*Green fluorescent protein*)
- GLAST:** Transportador glutamato aspartato (*Glutamate aspartate transporter*)
- GLT-1:** Transportador de glutamato 1 (*Glutamate transporter 1*)
- GltPh:** Transportador de glutamato de *Pyrococcus horikoshii* (*Glutamate transporter from Pyrococcus horikoshii*)
- GLYT:** Transportador de glicina (*Glycine transporter*)
- GPCR:** Receptores acoplados a proteína G (*G protein-coupled receptor*)
- GRK:** Quinasa de receptores acoplados a proteína G (*G protein-coupled receptor kinase*)
- GSK-3:** Glucógeno sintasa quinasa 3 (*Glycogen synthase kinase 3*)
- GST:** Glutación S-transferasa
- GTP:** Guanosín trifosfato
- HA:** Hemaglutinina
- HECT:** *Homologous to E6-AP C-Terminus*
- HEK293T:** *Human Embryonic Kidney 293T cells*
- HRP:** Peroxidasa de rábano (*Horseradish peroxidase*)
- IF:** Inmunofluorescencia
- IPTG:** Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
- MAPK:** *Mitogen-activated protein kinase*
- MDCK:** *Madin-Darby canine kidney cells*
- MEM:** *Minimum essential medium*
- mGluR:** Receptor metabotrópico de glutamato (*Metabotropic glutamate receptors*)
- miRNA:** Micro ARN (*Micro RNA*)
- NCX:** Intercambiador sodio-calcio (*Sodium-calcium exchanger*)
- Ndfip:** *Nedd4 family interacting protein*
- Nedd4:** *Neural precursor cell expressed developmentally down-regulated protein 4*
- NET:** Transportador de norepinefrina (*Norepinephrine transporter*)
- NFAT:** *Nuclear factor of activated T-cells*
- NF- κ b:** *Nuclear factor κ -light-chain-enhancer of activated B cells*
- NHE:** Intercambiador sodio-hidrógeno (*Sodium/hydrogen exchanger*)
- NMDA:** N-metil-D-aspartato
- OGD:** Privación de oxígeno y glucosa (*Oxygen-glucose deprivation*)

- PBS:** Tampón fosfato salino (*Phosphate buffered saline*)
- PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase chain reaction*)
- PDZ:** *Postsynaptic density 95/Disc large/Zonula occludens-1*
- PI3K:** Fosfoinosítido-3-quinasa (*Phosphoinositide-3-kinase*)
- PKA:** Proteína quinasa A (*Protein kinase A*)
- PKC:** Proteína quinasa C (*Protein kinase C*)
- PMA:** *Phorbol 12-myristate 13-acetate*
- PMSF:** *Phenylmethylsulfonyl fluoride*
- PSD-95:** *Postsynaptic Density Protein 95*
- RE:** Reticulo endoplásmico
- RING:** *Really interesting new gene*
- SDS:** *Sodium dodecyl sulfate*
- S.E.M:** Error estándar de la media (*Standard error of the mean*)
- SERT:** Transportador de serotonina (*Serotonin transporter*)
- SGK:** Proteína quinasa regulada por suero y glucocorticoides (*Serum- and glucocorticoid-regulated kinase*)
- SLC1:** *Solute carrier 1*
- SNAT:** Transportadores de aminoácidos neutros acoplado a sodio (*Sodium-coupled neutral amino acid transporter*)
- SNC:** Sistema nervioso central
- SNP:** Sistema nervioso periférico
- TXNIP:** *Thioredoxin Interacting Protein*
- WB:** *Western blot*
- β2-AR:** Receptor adrenérgico β2 (*β2-adrenergic receptor*)

RESUMEN / SUMMARY

El glutamato es el principal neurotransmisor excitador del sistema nervioso central e interviene en procesos tan importantes como la cognición, la memoria y el aprendizaje. El transportador GLT-1 es el responsable de la recaptura de más del 90% del glutamato en el cerebro anterior, modulando la transmisión glutamatérgica y evitando de esta manera sus efectos excitotóxicos. La concentración de GLT-1 en la membrana plasmática está controlada por diferentes vías de señalización que resultan en modificaciones postraduccionales del transportador (fosforilación, ubiquitinación y otras). En este sentido, estudios recientes de nuestro laboratorio han demostrado que la ubiquitinación del transportador por la acción de la ubiquitina ligasa Nedd4-2 desencadena la endocitosis de GLT-1 tras la activación de la Proteína quinasa C.

En diversas enfermedades neurológicas se producen procesos de excitotoxicidad iniciados por la exposición de las neuronas a niveles elevados de glutamato extracelular, los cuales se han visto relacionados con alteraciones en la funcionalidad de GLT-1. En el presente trabajo hemos demostrado que la concentración del transportador GLT-1 en la superficie celular es regulada por la actividad catalítica del mismo. Mediante estudios en sistemas de expresión heterólogos y en cultivos primarios de corteza cerebral hemos observado un aumento en la internalización del transportador en respuesta a sustratos transportables de GLT-1, un proceso que es anulado en presencia de un inhibidor no transportable. La actividad continuada de GLT-1 provoca la despolarización de la membrana plasmática, la entrada de calcio a través del intercambiador NCX y, como consecuencia, la activación de las enzimas CamKII y AMPK, seguidas de la internalización del transportador. El análisis en profundidad del mecanismo de endocitosis reveló que la internalización de GLT-1 iniciada por glutamato también está asociada a la ubiquitinación del transportador por Nedd4-2.

Puesto que GLT-1 no presenta las secuencias consenso (PPXY) necesarias para la unión a Nedd4-2, investigamos la posibilidad de que el reclutamiento de la ubiquitina ligasa se realizara a través de proteínas adaptadoras. En concreto, hemos identificado a β -arrestina-1 como una proteína clave en la interacción entre GLT-1 y Nedd4-2 inducida por glutamato. Además, las α -arrestinas podrían estar jugando un papel importante en la interacción entre Nedd4-2 y la β -arrestinas.

En resumen, los resultados de este estudio ponen en evidencia un nuevo mecanismo de regulación de GLT-1 dependiente de su actividad, el cual podría ser relevante en el control de los niveles de transportador en la superficie celular en situaciones excitotóxicas, como la isquemia o lesiones cerebrales, donde la concentración de glutamato extracelular se encuentra persistentemente elevada.

L-glutamate is the predominant excitatory neurotransmitter in the mammalian central nervous system and is involved in a wide variety of brain functions, including cognition, memory and plasticity. GLT-1 is the main glutamate transporter as it contributes more than 90% of the total glutamate uptake in forebrain. Therefore, it plays a central role in maintenance of extracellular glutamate homeostasis, modulating glutamatergic transmission and preventing neuronal excitotoxicity. Trafficking of GLT-1 to and from cell surface can be regulated by different effectors and post-translational modifications. Recent studies from our lab have shown that the ubiquitin ligase Nedd4-2 mediates the Protein Kinase C-dependent ubiquitination and internalization of GLT-1.

Glutamate excitotoxicity is thought to be involved in the pathogenesis of multiple neurological disorders and is associated with a dysregulation of GLT-1. In the present study we have investigated how the traffic of GLT-1 is regulated by transporter activity. Using heterologous expression systems and primary cortical cultures we have demonstrated that internalization of GLT-1 from the cell surface is accelerated by transportable substrates and blocked in the presence of a non-substrate inhibitor. Overactivation of GLT-1 triggers depolarization of the plasma membrane, calcium influx through NCX and the activation of CamKII and AMPK, which induce transporter internalization. Analysis of the mechanism of endocytosis revealed that glutamate promotes the ubiquitination of GLT-1 by Nedd4-2.

GLT-1 does not bear PY structural motifs (implicated in Nedd4-2 binding) suggesting the need for intermediate proteins to mediate the interaction. Here we report the crucial role of β -arrestin-1 in the association between the transporter and the ubiquitin ligase after glutamate stimulation. Besides, α -arrestins may be important in the interaction between Nedd4-2 and β -arrestins.

In summary, we have characterized a novel regulatory mechanism of GLT-1 trafficking, which might be relevant in controlling the amount of transporter on the cell surface in conditions such as ischemia or traumatic brain injury, where extracellular concentrations of glutamate are persistently elevated.

INTRODUCCIÓN

1. Sistema nervioso, neuronas y sinapsis

El sistema nervioso tiene como función primordial recibir, procesar e interpretar rápidamente estímulos externos e internos con el fin de ejercer una respuesta adecuada a los cambios que se producen en su entorno. Anatómicamente, el sistema nervioso humano se divide en:

- Sistema nervioso central (SNC): formado por encéfalo y la médula espinal. Es el encargado de la integración de las señales aferentes y la generación de la respuesta final, motora y/o endocrina.
- Sistema nervioso periférico (SNP): constituido por nervios craneales y espinales. Es el responsable de la recepción de los estímulos, transmisión al sistema nervioso central y activación de los efectores correspondientes.

A nivel celular, el sistema nervioso se compone principalmente de dos tipos celulares: las células gliales y las neuronas.

Las células gliales desempeñan múltiples funciones relacionadas con el soporte de las neuronas, el control del microambiente celular y la modulación de la transmisión sináptica. En el SNC se encuentran los astrocitos, oligodendrocitos, células de Müller, células endodiales y microglía; y en el SNP están las células de Schwann y las células satélites.

Las neuronas son células altamente diferenciadas que generan y transmiten el impulso nervioso. Se clasifican de diferentes maneras, según su función (sensorial, motora, interneurona), morfología, neurotransmisor que liberan (glutamatérgicas, dopaminérgicas,...), etc. A pesar de la variabilidad existente, todas ellas presentan una estructura celular similar, compuesta de un cuerpo celular (soma), un árbol dendrítico donde se encuentran los contactos sinápticos con otras neuronas, y una prolongación axónica que integra toda la señal eléctrica recibida por la célula (**Figura 1**).

2. Transmisión sináptica

La transmisión del impulso nervioso se produce gracias a la excitabilidad de la membrana plasmática de las neuronas. Las células mantienen un potencial de membrana, es decir, una diferencia de potencial eléctrico entre el interior y el exterior celular, debida a la permeabilidad selectiva de la membrana celular a moléculas e iones. Al recibir un estímulo, la membrana celular puede despolarizarse o hiperpolarizarse respecto a su potencial de membrana en reposo (en neuronas: -70 mV). En las células excitables, cuando un estímulo provoca una despolarización por encima del umbral de excitabilidad (-55 mV aproximadamente), se abren

canales de Na⁺ y K⁺ dependientes de voltaje, que generan una señal eléctrica denominada potencial de acción, la cual se propaga hasta el terminal axónico.

La sinapsis es una diferenciación morfológica y funcional constituida por el terminal del axón de una neurona (botón presináptico), en aposición directa a una región (espinas dendríticas o soma) de la neurona postsináptica. Entre la membrana pre- y postsináptica se encuentra un espacio denominado hendidura sináptica (20 a 50 nm de ancho). Cuando el potencial de acción llega al botón presináptico, se abren canales de Ca²⁺ dependientes de voltaje. La entrada del catión desencadena la fusión de vesículas sinápticas portadoras de neurotransmisores, con la membrana presináptica. Una vez liberados a la hendidura sináptica, los neurotransmisores interactúan con receptores de la membrana postsináptica, los cuales inducen cambios en el potencial de membrana de la neurona: despolarizantes (activadores) o hiperpolarizantes (inhibidores).

Los neurotransmisores pueden ser de distinta naturaleza:

- Monoaminas: dopamina, serotonina, norepinefrina.
- Aminoácidos: glutamato, glicina, ácido γ -aminobutírico (GABA).
- Purinas: ATP, adenosina.
- Péptidos: sustancia P, somatostatina, opioides.
- Gases: óxido nítrico, monóxido de carbono.
- Otros: acetilcolina, endocannabinoides,...

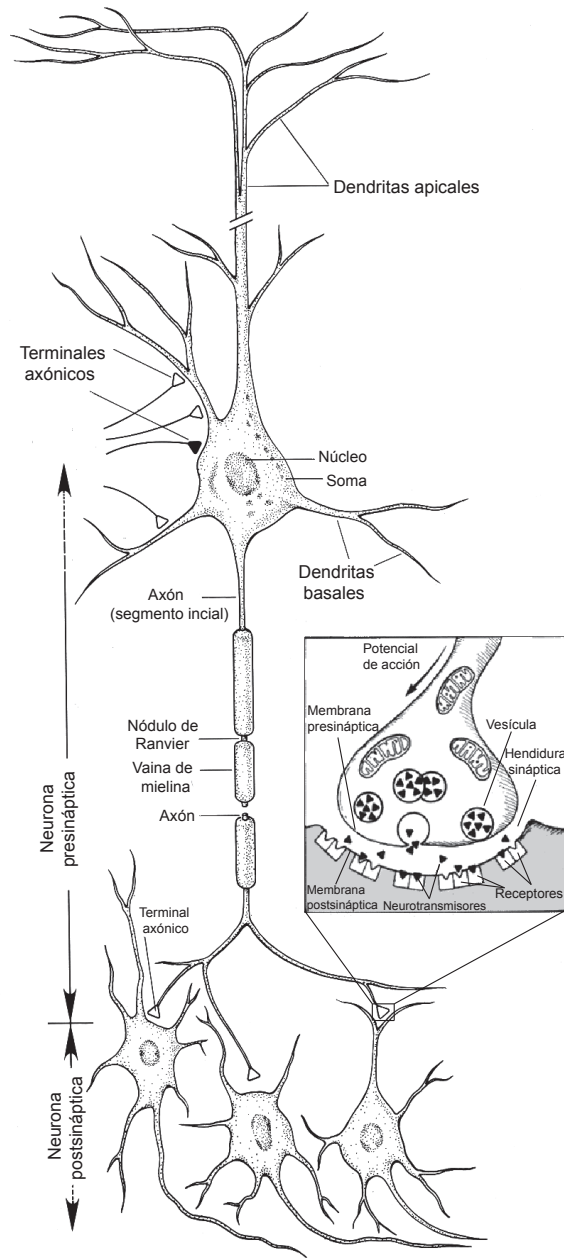


Figura 1. Estructura básica de una neurona. Imagen modificada de (Kandel *et al.*, 2000).

2.1. Neurotransmisión glutamatérgica

El L-glutamato es el principal neurotransmisor excitador del sistema nervioso central de mamíferos. Está implicado en la mayoría de los aspectos relacionados con el correcto funcionamiento del cerebro, incluyendo la cognición, el aprendizaje y la memoria. Además, juega un papel importante durante el desarrollo del sistema nervioso (Danbolt *et al.*, 2001).

En la sinapsis glutamatérgica, el glutamato liberado por el terminal presináptico ejerce su función al interactuar con receptores específicos de la neurona postsináptica. Existen dos grupos de receptores de glutamato: los receptores ionotrópicos y los receptores metabotrópicos.

Los receptores ionotrópicos forman canales catiónicos operados por ligando y se clasifican en función del análogo de glutamato que lo activa: los receptores de α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionato (AMPA), de kainato y los de N-metil-D-aspartato (NMDA). Los receptores de tipo AMPA se subdividen en 4 subunidades diferentes (GluA1-GluA4), mientras que hay 5 subunidades del receptor kainato (GluK1-GluK5). Ambos tipos de receptores forman tanto homotetrámeros como heterotetrámeros y son permeables a Na^+ , K^+ y, en menor medida, a Ca^{2+} (Traynelis *et al.*, 2010). Por otro lado, los receptores de tipo NMDA presentan una mayor complejidad. Constan de subunidades NR1 y NR2, que forman heterotetrámeros, y son más permeables a Ca^{2+} que a Na^+ . Para que estos receptores sean activados, se requiere la unión de dos agonistas, el glutamato y la glicina (o D-serina), y la despolarización de la membrana, ya que en condiciones basales el receptor está bloqueado por un ion Mg^{2+} . La entrada de Ca^{2+} a través de estos receptores es responsable de la activación de importantes procesos celulares, alterando las propiedades de la neurona, como ocurre durante la potenciación a largo plazo. No obstante, la hiperactivación de los receptores de tipo NMDA provoca una entrada excesiva de Ca^{2+} , que puede desencadenar la muerte neuronal por excitotoxicidad.

Además, el glutamato también puede activar receptores metabotrópicos (mGluR1-8), los cuales se encuentran acoplados a diversas proteínas G. Esta familia de receptores se subdivide en tres grupos según su secuencia homóloga, selectividad por ligandos y proteína G a la que se unen. El Grupo I (mGluR1 y mGluR5) activa a la fosfolipasa C, mientras que el Grupo II (mGluR2 y mGluR3) y el Grupo III (mGluR4, mGluR6, mGluR7 y mGluR8) inhiben a la adenilato ciclasa. Los mGluRs se expresan en neuronas y astrocitos, regulando aspectos críticos de la transmisión sináptica y la excitabilidad neuronal, tanto a nivel pre- como postsináptico (Niswender y Conn, 2010).

Se ha estimado que la concentración de glutamato en la hendidura sináptica se encuentra en torno a $\sim 1 \mu\text{M}$, llegando a alcanzar 1-5 mM tras la liberación de glutamato (Clements, 1996; Robinson, 2006). Para que la señalización sea eficiente, los niveles de glutamato de la hendidura tienen que ser controlados, recuperando rápidamente los niveles basales. A diferencia de lo

que ocurre con otros neurotransmisores, no existen evidencias de la presencia de enzimas extracelulares que metabolicen el glutamato. Por ello, la eliminación se produce exclusivamente mediante su recaptura a través de transportadores de glutamato de alta afinidad, presentes en la membrana plasmática de neuronas y astrocitos (Danbolt, 2001).

El glutamato recapturado puede ser utilizado con fines metabólicos o reutilizado como neurotransmisor. En astrocitos, el glutamato es convertido en glutamina mediante la glutamina sintetasa y, posteriormente, la glutamina es exportada al espacio extracelular y recapturada por las neuronas, donde se transforma de nuevo en glutamato por desaminación, manteniendo así los niveles adecuados de neurotransmisor disponible. En la exportación/importación de glutamina participan, principalmente, una serie de transportadores de baja afinidad de la familia génica *SLC38* (SNAT1-SNAT5). Este proceso descrito se conoce como el Ciclo glutamato-glutamina (Bak *et al.*, 2006) (Figura 2).

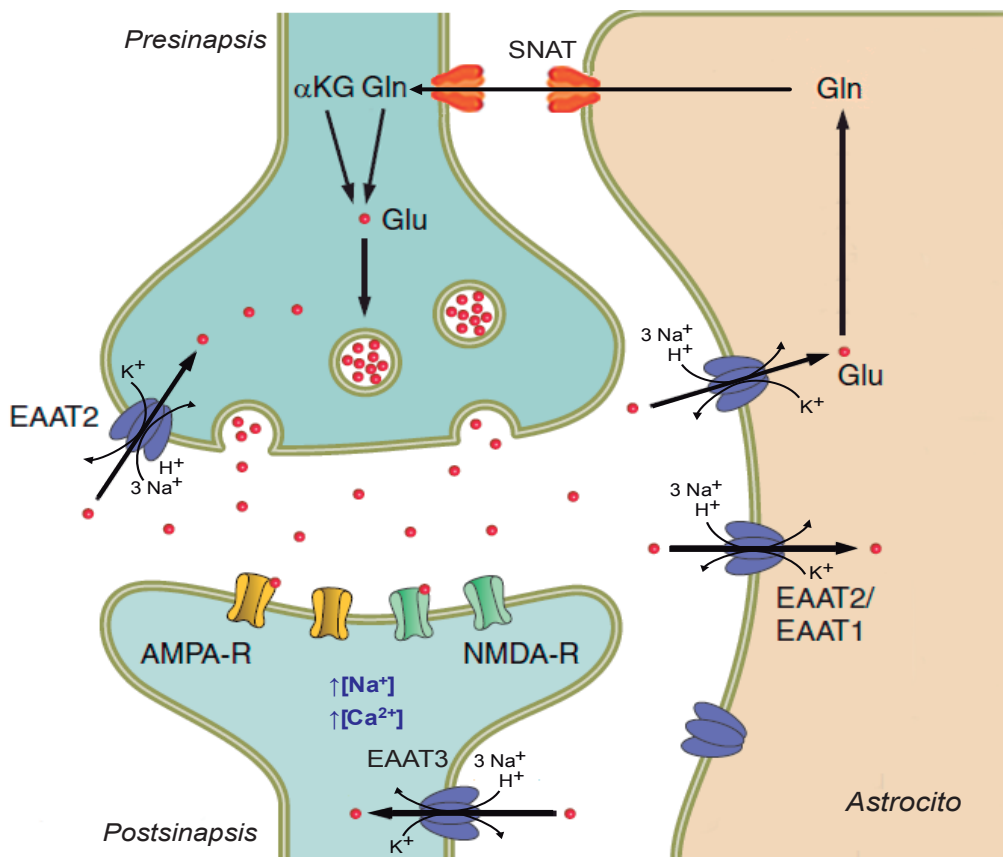


Figura 2. Esquema de una sinapsis glutamatergica y el ciclo glutamato-glutamina. El glutamato puede ser sintetizado a partir de glutamina (Gln) o α -cetoglutarato (α -KG). Tras ser liberado en la sinapsis, el glutamato interacciona con receptores específicos y es recapturado por transportadores de glutamato presentes en la membrana pre- y postsináptica y en células gliales. En los astrocitos, el glutamato es convertido a glutamina por la glutamina sintetasa, la cual es transferida a las neuronas a través de transportadores SNAT, principalmente. Imagen modificada de (Vandenberg y Ryan, 2013).

3. Transportadores de glutamato de alta afinidad (familia *SLC1*)

En mamíferos, existen cinco transportadores de alta afinidad pertenecientes a la familia génica *SLC1*: GLAST/EAAT1 (Storck *et al.*, 1992; Tanaka *et al.*, 1993), GLT-1/EAAT2 (Pines *et al.*, 1992), EAAC1/EAAT3 (Kanai y Hediger, 1992), EAAT4 (Fairman *et al.*, 1995), EAAT5 (Arriza *et al.*, 1997). Todos ellos son polipéptidos de 500-600 aminoácidos y comparten un 45-55% de homología (Kanai *et al.*, 2013). La estructura tridimensional de estos transportadores está basada en la obtenida a partir del transportador homólogo GltPh, del procarionte *Pyrococcus horikoshii*. Consiste en ocho segmentos transmembrana α -hélice (TM 1-8) y dos horquillas helicoidales (HP1-2) entre los dominios 7 y 8, estando los extremos amino y carboxilo orientados hacia el espacio intracelular (**Figura 3**). En general, los transportadores de glutamato se disponen formando trímeros, representando cada protómero una unidad transportadora independiente (Gendreau *et al.*, 2004; Yernool *et al.* 2004).

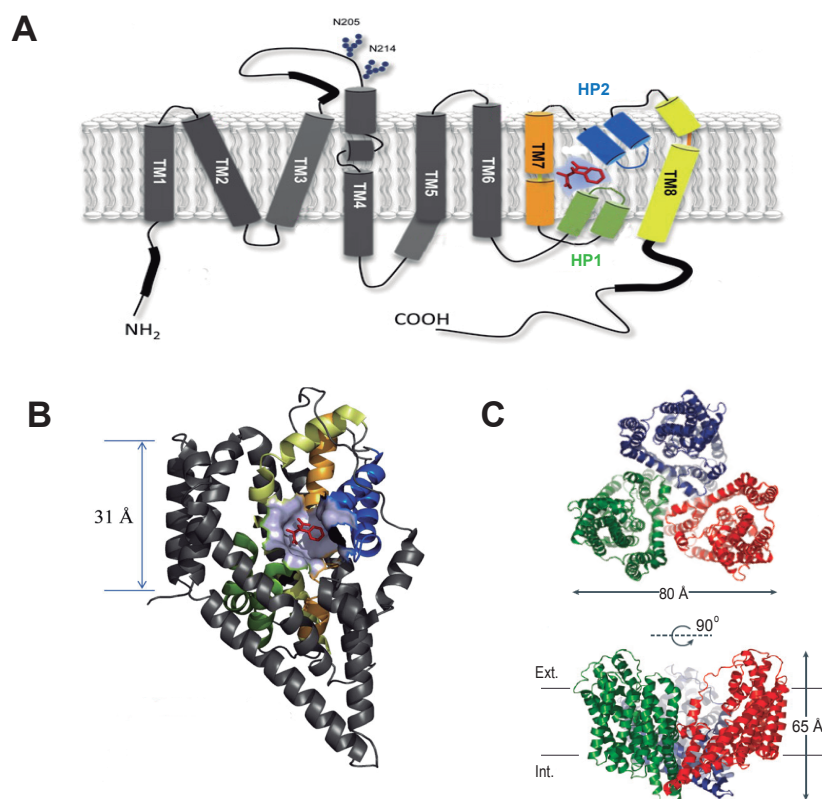


Figura 3. Modelo estructural de GLT-1, basado en el homólogo bacteriano *Pyrococcus horikoshii*. (A,B) Representación bidimensional (A) y tridimensional (B) de la topología de GLT-1. Presenta ocho dominios transmembrana α -hélice (TM1-8), y dos horquillas helicoidales (HP1-2). El dominio de unión del sustrato, indicado por el inhibidor del transportador D,L-TBOA, está marcado en verde (HP1), naranja (TM7), azul (HP2) y amarillo (TM8), en contraste con el resto de la proteína, en gris. (C) Representación del trímero de GLT-1, vista desde el lado extracelular de la membrana (arriba) y desde el plano de la membrana (abajo). Imagen modificada de (Tzingounis y Wadiche, 2007; Kanai *et al.*, 2013)

Los transportadores de glutamato recapturan tanto L-glutamato como L-aspartato en contra del gradiente de concentración mediante un proceso de transporte activo secundario. Esto es, utilizando la energía libre almacenada como gradiente electroquímico, gracias a la acción de la Na^+/K^+ ATPasa. El transporte está acoplado al simporte de tres iones Na^+ y un ión H^+ , seguido del antiporte de un ión K^+ (Kanner, 2006). Mientras que el Na^+ es imprescindible para la unión del glutamato al transportador, el K^+ es necesario para el transporte neto; es decir, sin el ión K^+ unido, sólo puede haber intercambio 1:1 de moléculas de glutamato/aspartato entre el espacio extracelular y el interior celular (Danbolt, 2001). Además, los transportadores de glutamato, principalmente EAAT4 y EAAT5, exhiben una conductancia a Cl^- no acoplada al transporte de glutamato. En los terminales presinápticos, esta corriente aniónica asociada a la activación del transportador hiperpolariza la membrana plasmática, inhibiendo la transmisión sináptica al impedir la liberación de neurotransmisores (Veruki *et al.*, 2006; Takahashi *et al.*, 2015).

A pesar de que los transportadores de glutamato de la familia génica *SCL1* tienen estructuras similares, difieren en sus propiedades funcionales. Además, se expresan en distintas regiones del sistema nervioso y tipos celulares. En la **tabla 1** se comparan sus parámetros cinéticos, localización y enfermedades relacionadas.

Gen	Proteína (homólogo humano/roedor)	Km (μM) (Inicial/estado estacionario)	Tipo celular (sistema nervioso)	Localización anatómica	Enfermedades relacionadas
<i>SCL1A3</i>	EAAT1/GLAST	20 / 7-20	Astrocitos	Cerebelo, corteza, médula espinal,	Alzheimer; Huntington; Epilepsia; Ataxia cerebelar tipo 7; Esquizofrenia
<i>SCL1A2</i>	EAAT2/ GLT-1	140 / 12-18	Astrocitos; minoritariamente en neuronas (presinapsis)	Cerebro y médula espinal	Isquemia; Alzheimer; Huntington; Esclerosis lateral amiotrófica; Epilepsia; Esquizofrenia
<i>SCL1A1</i>	EAAT3/EAAC1	20 / 8-28	Neuronas (postsinapsis y soma)	Hipocampo, estriado, cerebelo	Isquemia; Alzheimer; Huntington; Epilepsia; Niemann-Pick; Trastorno obsesivo-compulsivo
<i>SCL1A6</i>	EAAT4	5 / 0.6-2.5	Células de Purkinje	Cerebelo	Ataxia espinocerebelar tipo 5
<i>SCL1A7</i>	EAAT5	- / 61-64	Células bipolares y fotorreceptores	Retina	

Tabla 1. Características generales de los transportadores de glutamato de la familia génica *SLC1* (Kanai *et al.*, 2013; Vanderberg y Ryan, 2013; Takahashi *et al.*, 2015).

4. Transportador de glutamato GLT-1

El transportador de glutamato GLT-1 (denominado EAAT2 en humanos) es el responsable de más del 90% del transporte de glutamato en el cerebro anterior y representa el 1% de la proteína total del cerebro (Lehre y Danbolt, 1998; Danbolt, 2001). El ratón deficiente de GLT-1 (modelo *knockout*) sufre episodios epilépticos espontáneos, presentan una gran susceptibilidad al daño cortical agudo, y mueren prematuramente (50% de supervivencia tras 6 semanas) (Tanaka *et al.*, 1997).

En la rata, existen tres isoformas de GLT-1 como resultado del procesamiento alternativo del transcrito primario: GLT-1a (Pines *et al.*, 1992), GLT-1b (Schmitt *et al.*, 2002) y GLT-1c (Rauen *et al.*, 2004). Las dos primeras tienen distintas secuencias aminoacídicas del extremo carboxilo, mientras que la última se diferencia también en la región amino terminal. En el hipocampo, GLT-1a es la forma mayoritaria (90%), seguida de GLT-1b (6%) (Holmseth *et al.*, 2009). Las propiedades farmacológicas de ambas isoformas son indistinguibles (Chen *et al.*, 2002). No obstante, GLT-1b presenta en el carboxilo terminal un motivo de unión a dominios PDZ. Estos dominios, presentes en muchas proteínas de anclaje a membrana plasmática, están implicados en la regulación del tráfico y función de múltiples receptores y transportadores en la sinapsis (Kim *et al.*, 2004). En el caso de GLT-1b, se ha descrito su interacción con diferentes proteínas con dominio PDZ, como PSD-95, DLG1 y PICK1, que aumentan su estabilidad en la superficie celular y determinan su localización (Bassan *et al.*, 2008, González-González *et al.*, 2008a). Por el contrario, GLT-1a se caracteriza por un tráfico intracelular más dinámico (Underhill *et al.*, 2015).

El transportador GLT-1 no sólo actúa como **modulador de la transmisión sináptica**, sino que ejerce otras funciones claves en la homeostasis del glutamato. Éstas son:

- **Prevención de la excitotoxicidad asociada al glutamato**, manteniendo sus niveles por debajo del umbral de activación de los receptores NMDA (Moussawi *et al.*, 2011).
- **Reciclaje del neurotransmisor**, participando en el ciclo glutamato-glutamina, el cual es necesario para el mantenimiento de la neurotransmisión glutamatérgica (Bak *et al.*, 2006).
- **Aporte de glutamato como fuente de energía**. En astrocitos, se ha estimado que el metabolismo oxidativo del glutamato produce entre 24 y 27 moléculas de ATP al incorporarse en el ciclo de Krebs (McKenna, 2013).

4.1. Co-compartimentación de GLT-1, Na⁺/K⁺ ATPasa y enzimas glucolíticas

Recientemente, el laboratorio del Profesor Michael B. Robinson (Genda *et al.*, 2011; Jackson *et al.*, 2015) ha demostrado, mediante estudios de proteómica, la asociación entre el transportador de glutamato GLT-1 y un complejo multiproteico que incluye a la bomba Na⁺/K⁺ ATPasa, enzimas glucolíticas y mitocondriales.

La Na⁺/K⁺ ATPasa es una proteína integral de membrana implicada en la expulsión de 3 iones de Na⁺ al espacio extracelular y la introducción de 2 iones de K⁺. Este proceso se realiza en contra del gradiente electroquímico de ambos iones y está acoplado a la hidrólisis de ATP. En las células animales, especialmente en las neuronas, el control de los gradientes de Na⁺ y K⁺ (concentraciones intracelulares bajas de Na⁺ y altas de K⁺) es imprescindible para mantener el potencial de membrana celular.

El transporte de glutamato mediado por GLT-1 es electrogénico, ya que entran 3 iones de Na⁺ y un ión H⁺, y sale un ión de K⁺, por molécula de glutamato. Por ello, la interacción entre el transportador y la bomba Na⁺/K⁺ ATPasa facilita el proceso de transporte al restablecerse rápidamente los gradientes iónicos locales a niveles óptimos (Rose *et al.*, 2009).

Además, debido a los altos niveles de expresión del transportador GLT-1, el flujo de cationes asociado al transporte es considerable, lo que conlleva un gran consumo de energía por parte de la Na⁺/K⁺ ATPasa. La asociación física y funcional del transportador a proteínas glucolíticas y mitocondriales indica una coordinación entre el transporte de glutamato y el metabolismo energético. Diferentes estudios han demostrado que la recaptura de glutamato estimula el transporte de glucosa y la glucólisis en astrocitos (Pellerin y Magistretti, 1994; Loaiza *et al.*, 2003). Por otro lado, el propio glutamato transportado puede ser metabolizado, al transformarse en α -cetoglutarato por la acción de la glutamato deshidrogenasa, entrando de este modo en el ciclo de Krebs (McKenna, 2013) (Fig.4).

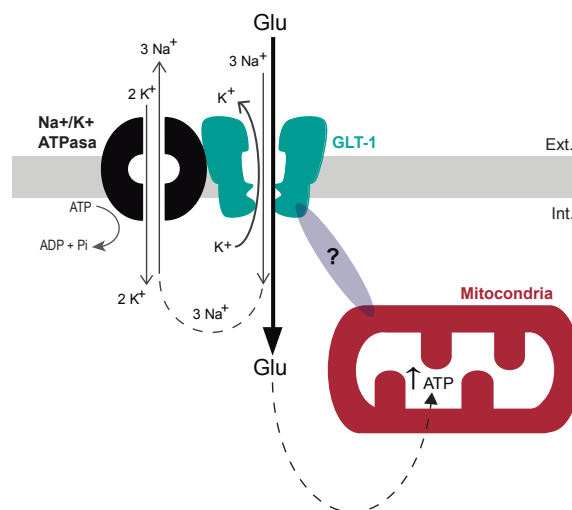


Figura 4. Representación esquemática de la interacción funcional entre el transportador GLT-1, la bomba Na⁺/K⁺ y la mitocondria. GLT-1 interacciona físicamente con la subunidad α de la Na⁺/K⁺ ATPasa. En el ciclo de transporte, por cada molécula de glutamato entran tres iones Na⁺ y un H⁺, y sale un ion K⁺. Con el fin de mantener el potencial de membrana, la bomba la Na⁺/K⁺ ATPasa expulsa tres iones Na⁺ e incorpora dos K⁺, gastando una molécula de ATP. Además, el transportador GLT-1 se encuentra asociado a la mitocondria, aunque se desconoce la proteína implicada en la interacción. El glutamato recapturado puede entrar en la mitocondria e incorporarse en el ciclo de Krebs al transformarse en α -cetoglutarato.

4.2. Aspectos fisiopatológicos de GLT-1: Excitotoxicidad

Debido al papel fundamental que juega GLT-1 en la regulación de la actividad de las sinapsis glutamatérgicas, la alteración de su función se ha visto asociada a diversos trastornos neurológicos. En la mayoría de los casos, la disfunción del transportador provoca un aumento de los niveles de glutamato extracelulares, el cual es el responsable del daño y muerte neuronal por un proceso patológico denominado excitotoxicidad. La exposición prolongada de las neuronas al glutamato induce la sobreactivación de receptores postsinápticos glutamatérgicos, aumentando los niveles de calcio intracelular y desencadenando la consecuente activación de cascadas de señalización (activación de fosfolipasas, endonucleasas, proteasas, producción de NO...), que pueden desembocar en la muerte apoptótica o necrosis celular (Dong *et al.*, 2009) (Fig.5).

4.2.1. Isquemia cerebral

La isquemia cerebral es una condición patológica caracterizada por una reducción del riego sanguíneo en el cerebro, lo que implica una disminución del aporte de oxígeno y de nutrientes en el tejido afectado. El proceso isquémico está asociado a un aumento del glutamato extracelular, el cual tiene un papel importante en la patogénesis de la lesión (Lai *et al.*, 2014). Al disminuir los niveles de glucosa y oxígeno, se genera un estrés energético que provoca un mal funcionamiento de la bomba Na⁺/K⁺ ATPasa, impidiendo así la restauración de los gradientes de Na⁺ y K⁺ y desencadenando la despolarización de la membrana plasmática. En las neuronas, esto induce la liberación de las vesículas sinápticas y, por tanto, la activación de los receptores postsinápticos. Además, en estas condiciones despolarizantes no solo se ve reducida la actividad del transportador GLT-1, sino que puede producirse transporte reverso, es decir, el glutamato puede ser transportado hacia el espacio extracelular (Rossi *et al.*, 2000). De esta manera, durante la isquemia, la concentración de glutamato puede llegar

al rango milimolar durante varias horas o incluso días (Nishizawa, 2001). En la isquemia cerebral focal, existe un gradiente de los niveles de glutamato desde la zona central isquémica a las regiones periféricas (penumbra). Los procesos excitotóxicos pueden propagarse a estas áreas, contribuyendo a la extensión de la lesión. Esto tiene una gran importancia clínica ya que se ha observado que en los pacientes en los que se restablece la circulación cerebral, el daño neuronal puede proseguir durante varias horas (Ramos-Cabrer *et al.*, 2011).

Numerosos estudios han puesto de manifiesto la existencia de una regulación del transportador de glutamato GLT-1 durante la isquemia cerebral. Se ha observado una disminución significativa de los niveles del neurotransportador en hipocampo de rata con isquemia cerebral global tras 3-6 horas de reperusión (Yeh *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2005; Han *et al.*, 2008). No obstante, los mecanismos moleculares implicados en la regulación de GLT-1 tras la isquemia no han sido esclarecidos hasta el momento.

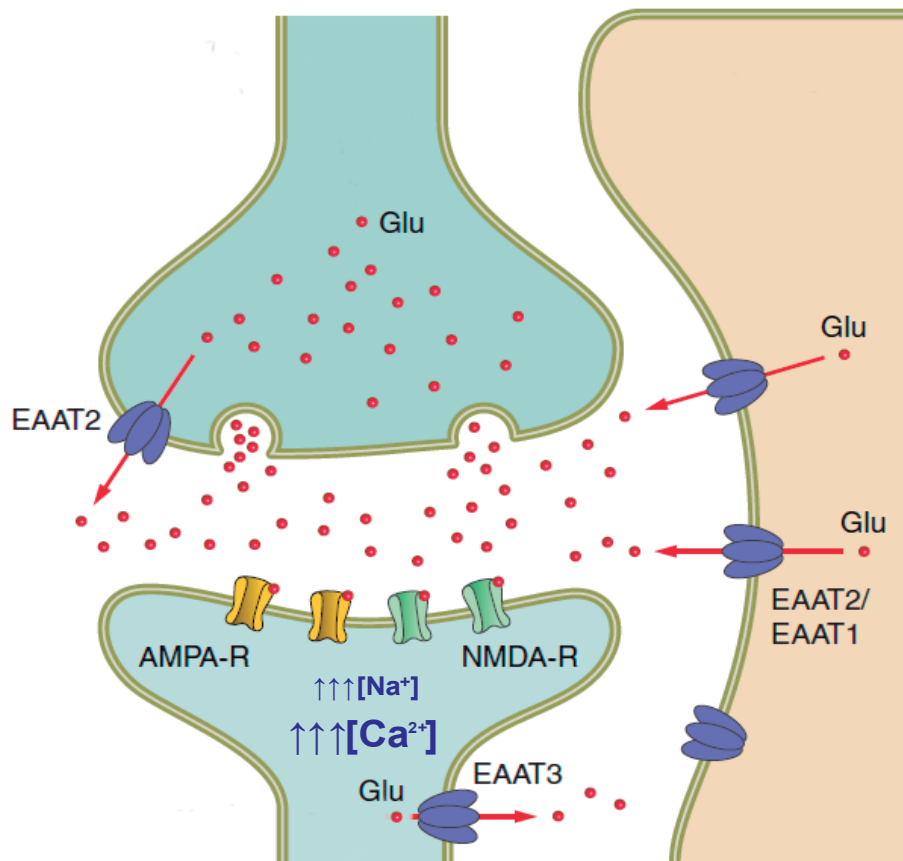


Figura 5. Esquema de una sinapsis glutamatérgica bajo condiciones isquémicas.

Durante la isquemia, las alteraciones en los gradientes de Na^+ , K^+ y H^+ inducen el transporte reverso de los transportadores de glutamato y la exocitosis de vesículas sinápticas. Esto provoca un aumento en la concentración extracelular de glutamato y la consecuente sobreactivación de receptores AMPA y NMDA, desencadenando un aumento en los niveles de Ca^{2+} y Na^+ , que pueden llegar a activar rutas proapoptóticas. Imagen modificada de (Vandenberg y Ryan, 2013).

4.2.2. Enfermedades neurodegenerativas

Las enfermedades neurodegenerativas se caracterizan por una disfunción progresiva de regiones concretas del sistema nervioso debida a la muerte neuronal. A pesar de presentar una etiología, patogenia y síntomas diferentes, en la mayoría de estas enfermedades se producen procesos de excitotoxicidad, donde el sistema glutamatérgico se encuentra alterado (Lin *et al.*, 2012). En pacientes de la enfermedad de Alzheimer, Huntington y Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA) se han detectado niveles bajos y/o disfunción del transportador GLT-1 en las regiones afectadas (Rothstein *et al.*, 1995; Arzberger *et al.*, 1997; Jacob *et al.*, 2007). También se ha descrito la reducción de la expresión del transportador en modelos animales de la enfermedad de Parkinson (Holmer *et al.*, 2005; Chung *et al.*, 2008). Se desconoce si las alteraciones encontradas en la función de GLT-1 contribuyen como factor primario en la patogénesis o bien son consecuencia del proceso de la neurodegeneración. En cualquier caso, parece claro que la disminución de la concentración de transportador exacerba los daños neurotóxicos y contribuye de manera significativa al avance de las enfermedades neurodegenerativas. Por ello actualmente, la regulación de la actividad de GLT-1 es una de las dianas terapéuticas más prometedoras.

4.2.2. Otras enfermedades neurológicas

Además, se han encontrado alteraciones en la neurotransmisión glutamatérgica relacionadas con el transportador GLT-1 en diversas enfermedades neurológicas, tales como el dolor crónico (Gegelashvili y Bjerrum, 2014), esquizofrenia (Matute *et al.*, 2005), trastorno depresivo mayor (Choudary *et al.*, 2005) o adicción a drogas (Scofield y Kalivas, 2014), entre otras.

4.3. Regulación de GLT-1

El transportador GLT-1 se concentra principalmente en la región perisináptica, donde es capaz de recapturar rápidamente el glutamato liberado incluso en situaciones de alta actividad neuronal. Sin embargo, el tiempo requerido por GLT-1 para completar un ciclo de transporte es mayor que el tiempo que tarda en producirse un evento sináptico (activación/desactivación de receptores glutamatérgicos). Mediante estudios electrofisiológicos y bioquímicos, diferentes grupos han sido capaces de explicar esta aparente contradicción (Lehre y Danbolt, 1998; Grewer *et al.*, 2000). La rápida eliminación del glutamato de la hendidura sináptica se lleva a cabo gracias a la alta afinidad por el sustrato y la gran densidad del transportador (15000-20000/ μm^2). De este modo GLT-1 actúa, inicialmente, "tamponando" el glutamato liberado.

Los niveles del transportador en la membrana plasmática condicionan la velocidad de recaptura del neurotransmisor y, por tanto, la función sináptica. Un mayor número de transportadores producirá una eliminación más rápida del neurotransmisor del espacio sináptico, limitando su tiempo de acción. Por ello, la estricta regulación de la actividad de GLT-1 es de gran importancia para una correcta neurotransmisión glutamatérgica.

4.3.1. Regulación transcripcional

Existen moduladores endógenos y farmacológicos que inducen la activación o represión de la expresión del gen *SLC1A2*, el cual contiene un promotor con varias secuencias de unión a factores de transcripción, como NF- κ B, Sp1, N-myc, CREB, EGR, y NFAT (Su *et al.*, 2005). Por ejemplo, factores proteicos liberados por neuronas, los antibióticos β -lactámicos y el AMP cíclico inducen la expresión de GLT-1 a través del factor NF- κ B (Swanson *et al.*, 1997; Zelenia *et al.*, 2000; Rothstein *et al.*, 2005). Dentro del grupo de los antibióticos β -lactámicos, la Ceftriaxona ha demostrado ser un potente inductor de la expresión de GLT-1. Se han publicado más de 100 artículos sobre el uso de este compuesto como neuroprotector en modelos animales de distintas enfermedades excitotóxicas, como la esclerosis lateral amiotrófica o la isquemia. No obstante, no ha mostrado una efectividad significativa en ensayos clínicos (Fontana, 2015).

Por otro lado, la transcripción de *SLC1A2* está regulada epigenéticamente mediante la acetilación (activación) y la metilación (inhibición) del promotor (Takahashi *et al.*, 2015).

4.3.2. Regulación traduccional

Recientemente, se ha descrito la regulación de los niveles de GLT-1 a nivel de su traducción, por compuestos como el retinol y la corticosterona, a través de la región 5'-UTR del transcrito de GLT-1 y por el microRNA miR-124a (Tian *et al.*, 2007; Morel *et al.*, 2013).

4.3.3. Regulación postraduccional

Los niveles del transportador GLT-1 en la superficie celular están controlados por una regulación dinámica del tráfico de la proteína entre la membrana plasmática y los compartimentos intracelulares. En general, esta regulación se debe a modificaciones postraduccionales de la proteína.

Datos previos de éste y otros laboratorios han puesto de manifiesto una regulación de GLT-1 por diferentes quinasas: proteína quinasa A (PKA), proteína quinasa C (PKC), fosfatidil-inositol 3 quinasa (PI3K), quinasas reguladas por suero y glucocorticoides (SGKs) y glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK-3) (Guillet *et al.*, 2005; Boehmer *et al.*, 2006; García-Tardón *et al.*, 2012; Jimenez *et al.*, 2014). Mientras que la PKA, SGKs y GSK-3 activan al transportador, la PKC y PI3K lo inhiben. La modulación de los niveles de GLT-1 por estas quinasas parece ser indirecta (ver **apartado 6.3**).

Además, GLT-1 puede ser sustrato de otras modificaciones, como la nitrosilación (adición de un grupo nitroxilo), la sumoilación (adición de SUMO) y la ubiquitinación (adición de ubiquitina), que reducen los niveles del transportador en la superficie celular y, por tanto, su actividad (González-González *et al.*, 2008b; Foran *et al.*, 2014; Raju *et al.*, 2015).

Las modificaciones postraduccionales de GLT-1 son reversibles mediante enzimas específicas (fosfatasas, denitrosilasas, desumoilasas y deubiquitinasas). Por lo tanto, la regulación espacio-temporal de la densidad de transportadores en la membrana plasmática está determinada por el grado de activación de estos moduladores postraduccionales.

En los siguientes apartados, se explicará con más detalle el tráfico de proteínas de membrana y su relación con la ubiquitinación.

5. Tráfico intracelular de proteínas de membrana

Con el fin de responder rápidamente a los cambios en el ambiente, las células ajustan continuamente la composición lipídica y proteica de la membrana plasmática mediante mecanismos celulares que les permite añadir y eliminar proteínas de membrana, tales como receptores, canales y transportadores. De este modo, la actividad de estas moléculas es regulada de una manera rápida y versátil. En neurobiología, el tráfico intracelular de proteínas ha cobrado una gran importancia, ya que juega un papel crucial en la sinaptogénesis y plasticidad sináptica (Shepherd y Huganir, 2007). En el tráfico intracelular de proteínas intervienen distintos compartimentos celulares: el retículo endoplásmico, el aparato de Golgi, los endosomas, el lisosoma y la membrana plasmática (**Fig. 6**). El transporte de proteínas de membrana entre los diferentes compartimentos es llevado a cabo por vesículas, en un proceso altamente regulado y selectivo. Las vesículas deben su selectividad a las cubiertas proteicas que las recubren, siendo cada cubierta específica de un paso determinado del transporte intracelular.

5.1. Vía secretora

Las proteínas de membrana se pliegan y procesan en el retículo endoplásmico. La salida hacia el aparato de Golgi representa un importante punto de control de calidad de las proteínas, donde las moléculas mal plegadas son reconocidas por chaperonas y factores asociados, transportadas al citosol y degradadas por el proteosoma (Vembar y Brodsky, 2008). Las proteínas exportadas al aparato de Golgi recorren la red de cisternas del orgánulo para finalizar su proceso de maduración por glicosilación y son enviadas a la superficie celular. Algunas proteínas mal plegadas pueden llegar a escapar del control del retículo endoplásmico. Éstas

son reconocidas por sistemas de control del aparato de Golgi y transportadas a endosomas tardíos para su posterior degradación lisosomal (Arvan *et al.*, 2002).

Los transportadores de glutamato son glicosilados en la región extracelular entre el tercer y el cuarto dominio transmembrana (en los residuos de asparagina 205 y 214). Se han descrito alteraciones en la glicosilación de GLT-1 en la corteza prefrontal de pacientes con esquizofrenia y en casos de ELA esporádica (Trotti *et al.*, 2001; Bauer, 2010). La falta de glicosilación de GLT-1 se asocia a una disminución de sus niveles en la superficie celular al ser retenidas en el retículo endoplásmico.

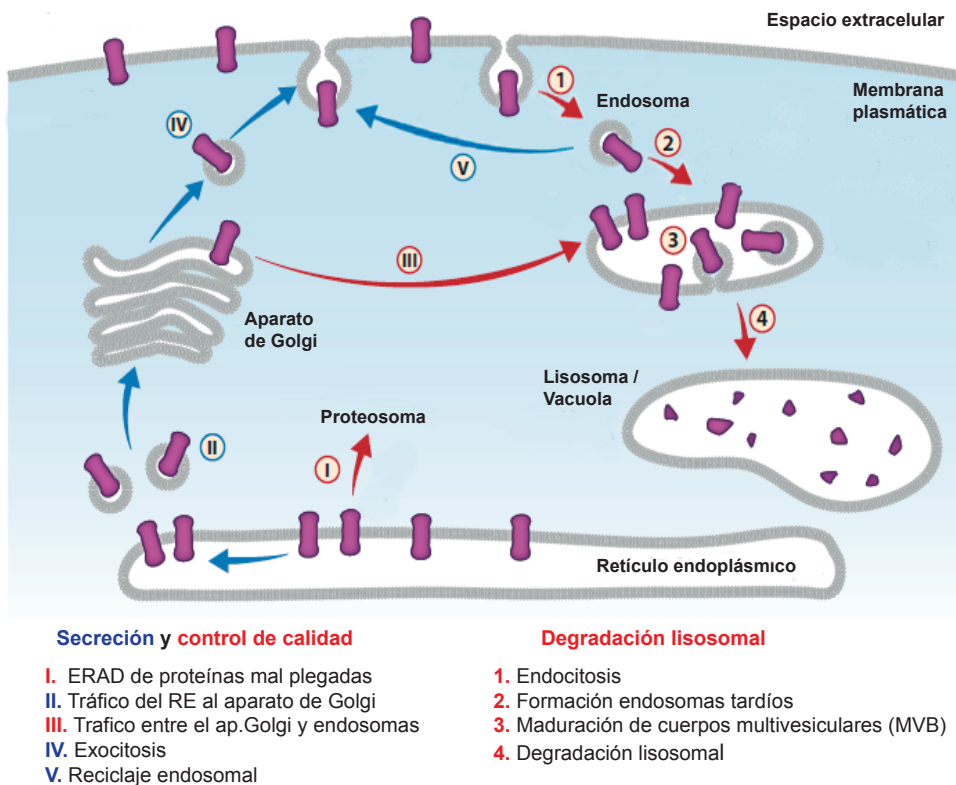


Figura 6. Tráfico intracelular de proteínas de membrana. Abreviaturas: RE, retículo endoplásmico; ERAD, degradación asociada al retículo endoplásmico. Imagen modificada de (MacGurn *et al.*, 2012).

5.2. Endocitosis

La endocitosis se basa en la internalización de macromoléculas y componentes de la membrana celular mediante la invaginación de la membrana plasmática y la formación de vesículas endocíticas. Se han identificado diversos mecanismos de endocitosis de proteínas de membrana, que se definen en función de la dependencia de distintas proteínas y lípidos.

5.2.1. Endocitosis dependiente de clatrina

La endocitosis mediada por clatrina es el mecanismo de internalización mejor caracterizado hasta la fecha (Kirchhausen *et al.*, 2014). En la sinapsis tiene una gran relevancia, ya que es el responsable del reciclaje de las vesículas sinápticas tras la liberación del neurotransmisor desde el terminal presináptico. Además, regula numerosos tipos de receptores postsinápticos y transportadores gliales y neuronales (Jung y Haucke, 2007).

Este mecanismo de endocitosis se encuentra altamente regulado. En primer lugar, las proteínas de membrana que van a ser endocitadas se unen a proteínas adaptadoras. Esta interacción se basa en el reconocimiento de motivos existentes en la proteína diana. Por ejemplo, el adaptador AP-2 reconoce secuencias basadas en tirosinas y en dileucinas. Además, existen otros adaptadores que reconocen modificaciones postraduccionales, como la ubiquitinación (epsinas y EPS15) y la fosforilación (β -arrestinas) (Traub y Bonifacino, 2013). A continuación la clatrina es reclutada por las proteínas adaptadoras y polimeriza en forma poliédrica, recubriendo la incipiente invaginación. Posteriormente, la GTPasa dinamina crea un anillo alrededor de la base de la invaginación e induce su escisión, formando una vesícula endocítica.

En relación al tráfico intracelular de GLT-1, estudios en nuestro laboratorio han demostrado que, tanto los procesos de endocitosis constitutiva como el regulado por la activación de la PKC, son dependientes de clatrina (García-Tardón *et al.*, 2012; Martínez-Villarreal *et al.*, 2012). Además, la endocitosis de otros transportadores de neurotransmisores, como los transportadores de glicina (GLYT1 y GLYT2) y el de dopamina (DAT), también son dependientes de clatrina (Sorkina *et al.*, 2005; Fernández-Sánchez *et al.*, 2009; de Juan-Sanz *et al.*, 2011).

5.2.2. Endocitosis independiente de clatrina

Dentro de las vías de endocitosis independiente de clatrina, la mejor caracterizada es la vía dependiente de caveolina (Mayor *et al.*, 2007). Esta vía está íntimamente relacionada con las balsas lipídicas (del inglés, *lipid rafts*), microdominios de membrana celular enriquecidos en colesterol, esfingolípidos y proteínas ancladas a la membrana por medio de glicosidilfosfatidilinositol (GPI). La endocitosis se inicia en las caveolas, las cuales son

balsas lipídicas en forma de pequeñas invaginaciones y cuyo principal componente es la caveolina. Al igual que en la endocitosis dependiente de clatrina, la fisión vesicular depende de la GTPasa dinamina. Sin embargo, la endocitosis dependiente de caveolina no depende de la formación de cubiertas proteicas, sino que está regulada por los niveles de colesterol, caveolina y la dinámica del citoesqueleto (Lajoie y Nabi, 2010). Entre las proteínas que se endocitan a través de esta vía, se encuentra el transportador de glutamato EAAT3 (González et al., 2007).

5.3. Endosomas, degradación y reciclaje

Las proteínas de membrana, una vez endocitadas, se dirigen a los endosomas. El sistema endosomal está conformado por una red tubulo-vesicular muy dinámica, que regula la degradación o el reciclaje de las proteínas internalizadas.

Las vesículas endocíticas, o endosomas tempranos, son compartimentos cercanos a la membrana plasmática. Desde éstos, las proteínas pueden volver a la superficie celular en un proceso denominado reciclaje endosomal o quedar retenidas en los endosomas tempranos y dirigirse a la degradación lisosomal. En la maduración de los endosomas hacia el lisosoma éstos sufren una serie de modificaciones, entre las que se encuentran: la acidificación del lumen vesicular, la incorporación de hidrolasas procedentes del aparato de Golgi y la migración a regiones perinucleares. A estos nuevos endosomas se los denomina endosomas tardíos, los cuales se fusionan con lisosomas para degradar enzimáticamente el contenido vesicular (Huotari y Helenius, 2011).

El paso de un compartimento a otro está estrechamente regulado por diferentes Rab GTPasas. Estas proteínas confieren unas propiedades funcionales a los endosomas, controlando la identidad de cada compartimento así como su movilidad y fusión vesicular (Li *et al.*, 2013). Por otro lado, la presencia de modificaciones postraduccionales como la ubiquitinación también determinan el destino de proteínas de membrana endocitadas.

5.4. Difusión lateral

Además del tráfico intracelular, las proteínas de membrana pueden movilizarse por la superficie celular mediante difusión lateral.

GLT-1 se encuentra principalmente en balsas lipídicas (no caveolares), las cuales influyen en su actividad, ya que el transportador es más activo cuando se encuentra en este entorno lipídico (Butchbach *et al.*, 2004). Las balsas lipídicas sirven como plataformas de señalización

celular y están implicadas en regulación de la localización y asociación de distintas proteínas de membrana (Allen *et al.*, 2007). Por ello, la compartimentación diferencial, modulando el desplazamiento lateral desde y hacia las balsas lipídicas, puede constituir otro mecanismo regulatorio de la función del transportador.

Además, estudios recientes han demostrado que la actividad neuronal y glial estimula la difusión lateral de GLT-1 por la superficie celular, concentrándose en las regiones perisinápticas (Benediktsson *et al.*, 2012; Murphy-Royal *et al.*, 2015).

6. Ubiquitinación

La ubiquitinación es una modificación postraducciona basada en la conjugación covalente de ubiquitina (proteína de 76 aminoácidos) a un residuo de lisina de una proteína. El marcaje con ubiquitina se ha relacionado con diversas funciones celulares, desde la reparación del ADN y regulación de la transcripción, hasta procesos de tráfico de proteínas, como la endocitosis y la degradación proteosoma y lisosoma (Komander y Rape, 2012).

La transferencia de ubiquitina es llevada a cabo por una cascada multienzimática, que consiste en una enzima activadora de ubiquitina (E1), una enzima conjugadora de ubiquitina (E2) y una ubiquitina ligasa (E3). Estas últimas, catalizan la formación de un enlace isopeptídico entre el extremo carboxilo terminal de la ubiquitina y el grupo ϵ -amino de un residuo de lisina de la proteína diana. En el genoma humano existe tan sólo una enzima E1, unas 60 enzimas E2 y más de 400 enzimas E3 (Li *et al.*, 2005). La abundancia de ubiquitina ligasas confiere una elevada especificidad de sustrato al sistema de marcaje por ubiquitinación.

La ubiquitinación de una proteína puede ocurrir mediante la adición de una molécula de ubiquitina en una lisina única (monoubiquitinación), o en varias lisinas a la vez (multi-monoubiquitinación o multiubiquitinación). Además, la ubiquitina posee siete residuos de lisina (K6, K11, K27, K29, K33, K48 y K63), los cuales pueden ser a su vez ubiquitinados, formando cadenas poliméricas de ubiquitina (poliubiquitinación). A pesar de que estas siete lisinas son susceptibles de ubiquitinarse, las cadenas unidas a través de K11, K48 y K63 son las más frecuentes. Tal y como se describe en la **figura 7**, los diferentes patrones de ubiquitinación están implicados en distintos procesos celulares.

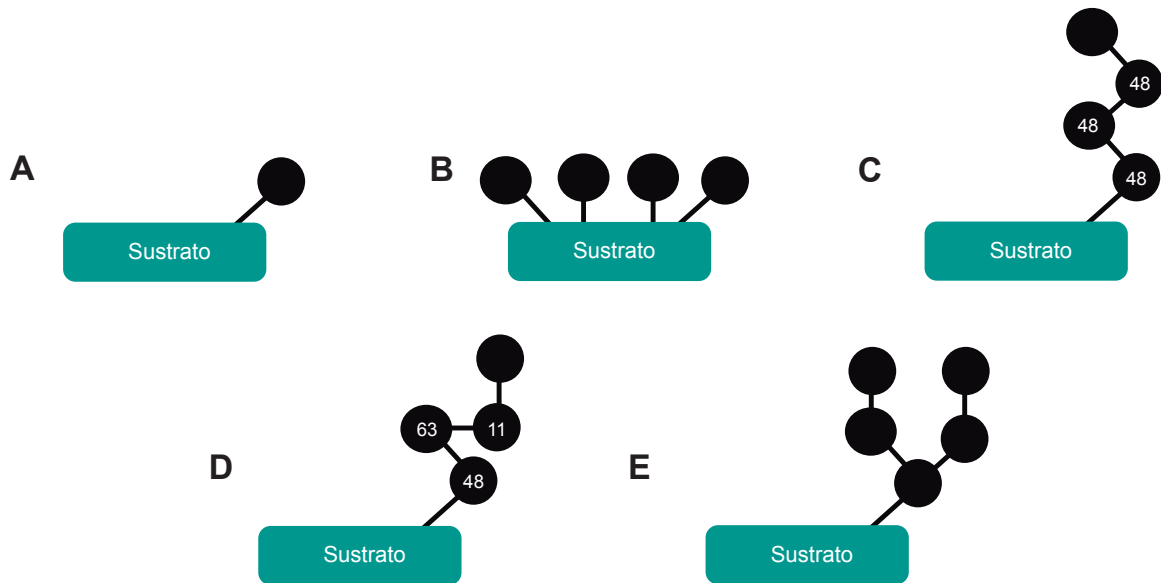


Figura 7. Diferentes topologías de ubiquitinación. **(A) Monoubiquitinación:** adición de una única molécula de ubiquitina en una lisina del sustrato. Asociada a la regulación del tráfico de proteínas, degradación lisosomal, interacción entre proteínas y expresión génica. **(B) Multimono-ubiquitinación:** adición de varias moléculas de ubiquitina en diferentes lisinas del sustrato. Generalmente asociada a procesos de endocitosis. **(C) Cadena homogénea de poliubiquitina:** formación de una cadena de ubiquitina, las cuales se unen por el mismo residuo. Asociada a regulaciones de tráfico intracelular y degradación lisosomal (K63) o degradación proteosomal (K11, K48). **(D) Cadena mixta de poliubiquitina:** formación de una cadena de ubiquitina, las cuales se unen por distintos residuos. Asociada a la modulación de interacciones entre proteínas y degradación proteosomal. **(E) Cadena ramificada de poliubiquitina:** adición de una molécula de ubiquitina al sustrato sobre la cual se unen otras moléculas a través de diferentes residuos, formando cadenas de poliubiquitina que se ramifican. Su significado fisiológico no está claro.

Las cadenas de ubiquitina pueden ser editadas o eliminadas por unas isopeptidasas denominadas desubiquitinadas (DUB), que tienen como función romper los enlaces entre ubiquitina-ubiquitina o ubiquitina-proteína, anulando de este modo la señalización mediada por la ubiquitinación y reciclando las moléculas de ubiquitina (Reyes-Turcu *et al.*, 2009). En el genoma humano, se han identificado 95 genes que codifican para distintas desubiquitinadas (Nijman *et al.*, 2005). Al igual que las ubiquitina ligasas, las DUBs reconocen específicamente a las proteínas ubiquitinadas, por lo que median funciones concretas. De hecho, mutaciones en varias DUBs se han visto asociadas a una gran variedad enfermedades, desde cáncer a enfermedades neurológicas (Shanmugham y Ovaa, 2008). No obstante, el papel fisiológico de la mayoría de las DUBs sigue sin estar bien definido.

En las sinapsis, los procesos de ubiquitinación/desubiquitinación tienen un papel muy importante en el control de la estabilidad, actividad y localización de receptores y

transportadores, por lo que constituye un mecanismo imprescindible de la plasticidad sináptica (Lin y Man, 2012). Se han descrito alteraciones en el sistema ubiquitina involucradas en el desarrollo de enfermedades neurológicas, tales como la ELA, la enfermedad de Alzheimer, Huntington o Parkinson (Lehman, 2009).

6.1. Ubiquitina ligasas (E3): Familia Nedd4

Las E3 ubiquitina ligasas se clasifican en dos grandes grupos: E3 con dominio RING (del inglés, *Really Interesting New Gene*), que transfieren directamente la ubiquitina desde E2 al sustrato tras interaccionar E3 simultáneamente con E2 y el sustrato; y E3 con dominio HECT (del inglés, *Homologous to E6-AP C-Terminus*) en cuyo mecanismo implica un paso adicional ya que la ubiquitina es transferida desde E2 a E3 y, posteriormente, de E3 al sustrato.

La familia mejor caracterizada dentro de las HECT ubiquitina ligasas es la de Nedd4 (del inglés, *Neural Precursor Cell Expressed Developmentally Downregulated gene 4*). En mamíferos, esta familia está formada por nueve miembros: Nedd4, Nedd4-2, Itch (AIP4 en humano), WWP1, WWP2, SMURF1, SMURF2, Nedl1 y Nedl2. Estas ubiquitina ligasas están implicadas principalmente en la endocitosis y el tráfico de proteínas de la membrana plasmática (Goel *et al.*, 2014). Se caracterizan por presentar un dominio C2 amino terminal, entre 2 y 4 dominios WW y un dominio catalítico HECT en el carboxilo terminal. El dominio C2 induce la unión dependiente de calcio de la ubiquitina ligasa a fosfolípidos, localizándose de esta manera en las membranas celulares, tanto de la superficie celular como de compartimentos intracelulares. Por otro lado, los dominios WW están implicados en interacciones proteína-proteína, uniéndose principalmente a motivos ricos en prolina L/PPXY (motivos PY) de proteínas reguladoras y sustratos.

Nedd4 y Nedd4-2 son ubiquitina ligasas conservadas evolutivamente, las cuales mantienen una gran similitud con su homólogo de levaduras (y única proteína ancestral de la familia Nedd4), Rsp5. La primera función fisiológica descrita para ambas ligasas fue la regulación del canal de sodio ENaC, presente en células epiteliales tubulares de riñón (Kamynina *et al.*, 2001; Snyder *et al.*, 2004). La interacción de estas ubiquitina ligasas con el motivo PY de ENaC promueve la ubiquitinación del canal y su posterior internalización y degradación. La delección del motivo PY se ha observado en pacientes con el síndrome de Liddle, una enfermedad hipertensiva hereditaria causada por una excesiva reabsorción de sodio (Staub *et al.*, 1996). Desde los estudios sobre la regulación de ENaC por ubiquitinación se han identificado un gran número de sustratos de ambas ligasas; algunos son compartidos, mientras que otros son exclusivos de una de ellas.

Diferentes estudios han determinado que, tanto Nedd4 como Nedd4-2, son proteínas críticas en el desarrollo neuronal y en la plasticidad sináptica, ya que se están involucradas en: el crecimiento de neuritas; supervivencia neuronal; regulación de canales de sodio, potasio y calcio dependientes de voltaje; y transportadores de neurotransmisores (Donovan y Poronnik, 2012). Estos procesos están modulados mediante la fosforilación de estas ubiquitina ligasas por distintas quinasas, tales como las SGKs, AMPK, PKA o PKC, entre otras (An *et al.*, 2014).

6.2. Adaptadores de ubiquitinación

Muchas de las proteínas de membrana identificadas como sustrato de Nedd4 y Nedd4-2 no presentan motivos PY en su secuencia aminoacídica. Por ello, se cree que en esos casos deben de estar actuando proteínas adaptadoras que sirven de enlace entre el sustrato y la ubiquitina ligasa.

Los primeros adaptadores identificados de ubiquitina ligasas de la familia de Nedd4 fueron Ndfip1 y Ndfip2. Estas dos proteínas presentan motivos PY y se localizan en los endosomas, lo que indica un posible papel en la regulación del tráfico intracelular de proteínas. Por ejemplo, se ha observado que ambas proteínas se unen a componentes de la señalización mediada por EGF, como el receptor EGFR y PTEN, promoviendo su ubiquitinación por Nedd4 o Itch y modulando las diferentes vías de señalización (Mund y Pelham, 2010).

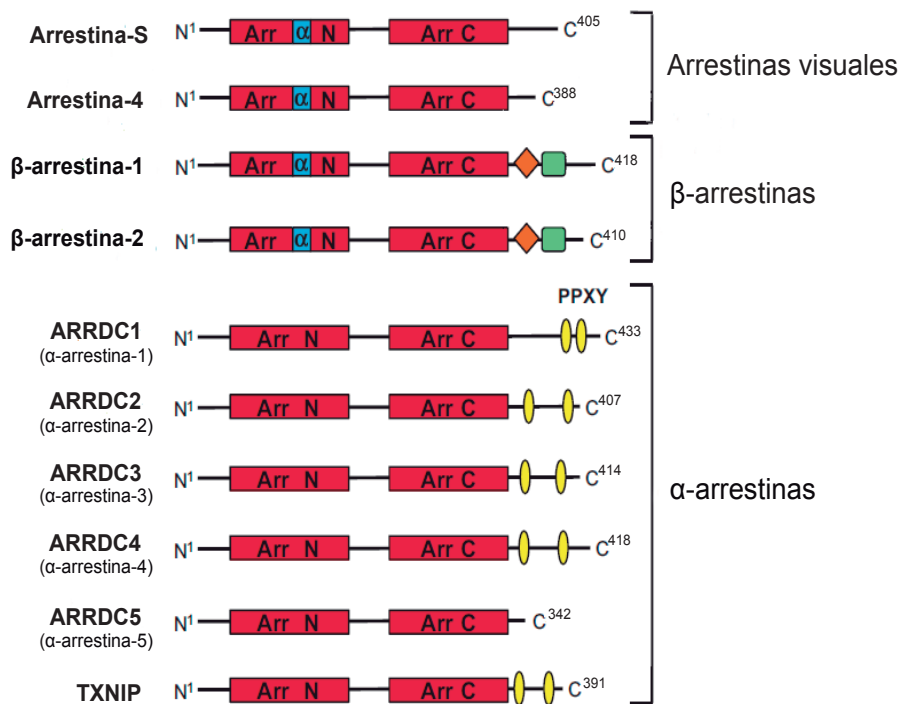


Figura 8. Miembros de la familia arrestina en mamíferos. Representación esquemática de la organización de la proteína en dominios funcionales. Los dominios arrestina N-terminal (Arr N) y C-terminal (Arr C) se muestran en rojo. Las β -arrestinas presentan sitios de unión a clatrina y AP-2 (rombos naranjas y cuadrados verdes, respectivamente). Las α -arrestinas no presentan una α -hélice dentro del dominio amino terminal (azul), pero contienen dominios PPXY (amarillo) en su extremo C-terminal (excepto α -arrestina-5). Los números indican los aminoácidos. Imagen adaptada de (Puca y Brou, 2014).

Estudios realizados en la última década han puesto en evidencia la importancia de las arrestinas como adaptadores de la ubiquitinación de proteínas de membrana. En mamíferos, la familia de las arrestinas está formada por las arrestinas visuales (arrestina-S y arrestina-4), las β -arrestinas (β -arrestina-1 y β -arrestina-2) y las α -arrestinas (ARRDCs y TXNIP) (Fig.8) (Becuwe *et al.*, 2012).

6.1.1. β -arrestinas

Las β -arrestinas fueron identificadas inicialmente como los adaptadores prototípicos de los receptores acoplados a proteínas G (GPCRs, del inglés *G protein-coupled receptors*). Tras la estimulación de estos receptores por sus agonistas específicos, la proteína G activa distintas cascadas de señalización intracelular (AMPC, Ca^{2+} ...), provocando la modulación de diferentes proteínas, como quinasas o canales iónicos. Sin embargo, a su vez, se activan las quinasas GRKs que fosforilan al receptor e induce el reclutamiento de las β -arrestinas, las cuales son las responsables de la desensibilización de la señalización asociada a la proteína G (Pitcher *et al.*, 1998). Además, las β -arrestinas sirven como adaptadores de proteínas endocíticas, como AP-2 y clatrina, y activan diferentes rutas de señalización a través de quinasas como ERK, Akt, MAPK (Laporte *et al.*, 2000; DeWire *et al.*, 2007).

Por otro lado, se ha demostrado el papel de las β -arrestinas en la ubiquitinación de diferentes GPCRs, el cual es imprescindible para su internalización y/o degradación. Por ejemplo, β -arrestina-2 actúa como adaptador en la ubiquitinación mediada por Nedd4 del receptor adrenérgico β 2-AR, desencadenando su degradación lisosomal (Shenoy *et al.*, 2008). Para otros GPCRs también se ha descrito el papel de las β -arrestinas en la ubiquitinación de los receptores, aunque se desconocen las ubiquitina ligasas implicadas.

La función de las β -arrestinas como proteínas adaptadoras de ubiquitina ligasas no se limita a GPCRs. También están implicadas en la ubiquitinación de diversas proteínas, tales como la quinasa GRK 2 (mediado por la ubiquitina ligasa Mdm2), el receptor del factor de crecimiento insulínico tipo 1 (Mdm2), el receptor de andrógenos AR (Mdm2), o el canal intercambiador Na^+/H^+ NHE-1 (Nedd4-1) (Girnit *et al.*, 2005; Salcedo *et al.*, 2006; Lakshminathan *et al.*, 2009; Simonin y Fuster, 2010).

6.2.1. α -arrestinas

Recientemente, la familia de las arrestinas ha incluido uno nuevo grupo de proteínas denominadas α -arrestinas. A pesar de la divergencia existente entre la estructura primaria de las α - y β -arrestinas (11-15% identidad), las predicciones mediante análisis cristalográficos apuntan a la existencia de propiedades estructurales similares. Las principales diferencias entre ambos grupos son: el sensor de fosfatos (reconocimiento de regiones fosforiladas) en el dominio amino terminal y los dominios de unión a AP-2 y clatrina, presentes solo en las β -arrestinas; y los motivos PPXY del carboxilo terminal, exclusivos de las α -arrestinas (Puca y Brou, 2014).

En levaduras, las arrestinas están representadas únicamente por las α -arrestinas, denominadas ART (del inglés *Arrestin related trafficking adaptors*), por lo que se les considera los factores ancestrales de toda la familia. Estas arrestinas sirven como adaptadoras de la ubiquitina ligasa Rsp5 en la ubiquitinación y posterior endocitosis y degradación de transportadores de la membrana plasmática, como el transportador de arginina Can1, el de metionina Mup1 y el de lisina Lyn1 (Lin et al., 2008).

En mamíferos, existen seis α -arrestinas: α -arrestina1-5 (o ARRDC1-5) y TXNIP. Excepto α -arrestina-5, estas proteínas interactúan, mediante motivos PY, con los dominios WW de diferentes ubiquitina ligasas de la familia de Nedd4 (Rauch y Martin-Serrano, 2011). α -arrestina-1 se localiza principalmente en la membrana plasmática; α -arrestina-2, α -arrestina-3 y α -arrestina-4 se encuentran en endosomas y en la membrana plasmática; y TXNIP es predominantemente nuclear. Diferentes trabajos han demostrado que α -arrestina-3 y α -arrestina-4 participan junto a las β -arrestinas en el tráfico y ubiquitinación del receptor β 2-AR al interactuar directamente con Nedd4 (Nabhan *et al.*, 2010; Shea *et al.*, 2012; Han *et al.*, 2013). Por otro lado, en la degradación del receptor Notch mediado por ubiquitinación es necesaria la acción conjunta de β -arrestina-1 y α -arrestina-1 en el reclutamiento de la ubiquitina ligasa Itch (Puca *et al.*, 2013). A pesar de los resultados conflictivos sobre la posible acción secuencial de las α - y β -arrestinas, se ha demostrado que ambos tipos de arrestinas pueden heterodimerizar, por lo que es probable que funcionen como complejos funcionales (Álvarez, 2008).

6.3. Regulación de transportadores de neurotransmisores por ubiquitinación

Los transportadores de neurotransmisores están sujetos a un tráfico intracelular constitutivo, el cual se ha visto asociado a ciclos de ubiquitinación/desubiquitinación en GLT-1, GLYT-1 y GLYT-2 (Fernández-Sánchez *et al.*, 2009; Martínez-Villarreal *et al.*, 2012; de Juan-Sanz *et al.*, 2013).

Por otro lado, la activación de la PKC promueve la internalización de varios transportadores de neurotransmisores (GLT-1, GLAST, DAT, GLYT1, GLYT2, el transportador de GABA (GAT1), el receptor de serotonina (SERT) y el receptor de norepinefrina (NET)). En la mayoría de los casos, la endocitosis regulada por la PKC va acompañada de la fosforilación de los transportadores. No obstante, estudios realizados mediante mutagénesis dirigida de los residuos fosforilados apuntan a que la fosforilación por la PKC no es necesaria para la internalización (Chang *et al.*, 2000; Melikian, 2004; Gonzalez y Robinson, 2004; Fornés *et al.*, 2008; Barrera *et al.*, 2015).

En el caso de los transportadores GLT-1, DAT, GLYT1 y GLYT2, se ha demostrado que la endocitosis inducida por la PKC está ligada a procesos de ubiquitinación del transportador. De hecho, la mutación de las lisinas ubiquitinadas en respuesta a la activación de la quinasa, bloquea la internalización (Miranda *et al.*, 2007; Fernández-Sánchez *et al.*, 2009; González-González *et al.*, 2008b; de Juan-Sanz *et al.*, 2013). Estudios recientes de nuestro laboratorio han identificado a Nedd4-2 como la ubiquitina ligasa responsable de la ubiquitinación de GLT-1 tras la activación de la PKC. Esta quinasa promueve la fosforilación de Nedd4-2 aumentando la interacción con GLT-1, lo que se traduce en la ubiquitinación del transportador y en su endocitosis (García-Tardón *et al.*, 2012). Además, Nedd4-2 también está implicada en la ubiquitinación del transportador DAT inducida por la activación de la PKC (Sorkina *et al.*, 2006). Sin embargo, ni GLT-1 ni DAT presentan motivos PY en sus terminales citoplasmáticas, lo que sugiere la existencia de proteínas intermediarias en la interacción entre los transportadores y la ubiquitina ligasa.

OBJETIVOS

La homeostasis del glutamato en el sistema nervioso es crucial para la correcta neurotransmisión sináptica y la viabilidad neuronal. Esta función es ejercida, principalmente, por el transportador de glutamato GLT-1. Por ello, resulta de gran interés el estudio de los mecanismos reguladores del tráfico intracelular de este transportador con el fin de comprender el desarrollo de patologías asociadas a alteraciones en la funcionalidad del mismo. A lo largo de la última década se ha puesto de manifiesto que la endocitosis por ubiquitinación de diversos transportadores (entre ellos, los de neurotransmisores) representa un mecanismo central en la regulación de su actividad. Concretamente, la ubiquitinación de DAT y GLT-1 mediada por la ubiquitina ligasa Nedd4-2 es imprescindible en la regulación de estos transportadores tras la activación de la ruta de señalización de la proteína quinasa C.

Además, numerosas evidencias relacionan los procesos excitotóxicos mediados por el glutamato con una disminución de los niveles y/o la actividad de GLT-1. No obstante, se desconocen los mecanismos implicados. En el presente trabajo, decidimos estudiar el efecto del propio sustrato, el glutamato, en la regulación del tráfico intracelular de GLT-1a. Además, nos propusimos clarificar la existencia de posibles intermediarios en la interacción, previamente descrita en nuestro laboratorio, entre GLT1 y la ubiquitina ligasa Nedd4-2, que actúa como desencadenante de la internalización por ubiquitinación del transportador. Así pues, en esta Tesis Doctoral se han abordado los siguientes objetivos específicos:

- I. Análisis de la posible regulación del transportador GLT-1a por glutamato y caracterización del proceso.
- II. El estudio del papel de la ubiquitinación en la proceso de endocitosis mediada por glutamato.
- III. Análisis del papel potencial de las α - y β -arrestinas como proteínas adaptadoras de Nedd4-2 en la ubiquitinación e internalización de GLT-1.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Cultivos celulares

1.1. Cultivos primarios corticales mixtos

Los cultivos primarios se obtuvieron a partir de embriones de ratas Wistar de 18 días (E18). Se extraían los cerebros de los mismos y, tras retirar las meninges, se diseccionaban las cortezas cerebrales en medio Hanks incompleto (137 mM NaCl; 5.3 mM KCl; 0.45 mM KH_2PO_4 ; 0.35 mM Na_2HPO_4 ; 1 mM NaHCO_3). A continuación se disociaba el tejido en presencia de 0.25% tripsina y 4mg/ml de DNasa con ayuda de una pipeta Pasteur de vidrio. Tras un lavado, las células se sembraban a una densidad de 1.5×10^6 células en placas p60 (Corning) previamente tratadas con 13 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de polilisina y se incubaban en medio de plaqueo (DMEM, 10% suero bovino fetal (FBS), 10 mM glucosa, 10 mM piruvato sódico, 0.5 mM glutamina, 0.05 mg/ml gentamicina, 0.01% estreptomina, 100 $\mu\text{U}/\text{ml}$ penicilina G) a 37°C y 5% de CO_2 . Transcurridas 4 horas el medio se reemplazaba por medio de cultivo (Neurobasal/B27 en proporción 50:1 (Gibco), 0.5 mM glutamina). Cada 5 días *in vitro* (DIV) se añadía medio nuevo a los cultivos, los cuales eran utilizados a los 14 DIV. El medio no se suplementaba con ningún inhibidor de crecimiento de células proliferantes (no neuronales) con el fin de obtener un cultivo mixto de neuronas y células gliales.

1.2. Cultivos de células HEK293T y MDCK

La línea celular HEK293T (ATCC) se cultivaba en medio DMEM suplementado con 10% FBS. La línea celular MDCK (ATCC) proviene de epitelio renal de perro y se caracteriza por crecer en monocapa por lo que son ideales para estudiar el tráfico de proteínas de membrana mediante técnicas de microscopía. Estas células se cultivaban en medio MEM suplementado con 10% FBS. Ambas líneas celulares se mantuvieron a 37°C y 5% de CO_2 .

1.3. Transfección de células mediante lipofección

La transfección transitoria se llevaba a cabo usando el sistema comercial de lipofección TrueFect (United Biosystems) para las células HEK293T y Lipofectamine 2000 (Invitrogen) para las células MDCK. Los cultivos celulares se transfectaban a 60-70% de confluencia; se incubaban con la mezcla de ADN y reactivos de lipofección disueltos en el medio de transfección en la relación indicada por el fabricante durante 4-6 horas a 37°C y 5% de CO_2 . Transcurrido ese tiempo, el medio se reemplazaba por DMEM o MEM con 10% de FBS. El ensayo con estas células se realizaba 48 horas después de ser transfectadas.

1.3.1. Transfección de ARN de interferencia

El ARN de interferencia de β -arrestina-1 (AAAGCCUUCUGCGCGGAGAAU), α -arrestina-1 (CAACAAGGCUAAUGACACA), α -arrestina-3 (GAACUGCUCUCCCCGAAUG) y del control (GAACUGUCGGAACCGUGACUA) fueron obtenidos de Sigma-Aldrich.

Los cultivos celulares de HEK293T se transfectaban a una confluencia de 60-70% con Lipofectamine 2000 en Opti-MEM (Thermo Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante. Tras 24 horas, las células se transfectaban de nuevo con el plásmido de HA-GLT1 según el protocolo descrito en el apartado anterior. El análisis del efecto de la inhibición de la expresión de β -arrestina-1 era determinado a las 48 horas de la transfección con el ARN de interferencia.

1.4. Tratamientos celulares

Los tratamientos se realizaban en medio de cultivo sin suero y en Optimem en las líneas celulares y en los cultivos primarios, respectivamente. Los compuestos se administraban tal y como se detalla en la **Tabla 2**. En las muestras no tratadas se utilizó el vehículo correspondiente como control.

Tratamiento	Concentración	Tiempo	Casa comercial
PMA	1 μ M	30 min	Calbiochem
L- Glutamato	100 μ M; 1 y 10 mM	5, 10, 20, 30, 60 min	Sigma-Aldrich
L- Aspartato	10 mM	30 min	Sigma-Aldrich
Glicina	10 mM	30 min	Panreac
WAY 213613	100 μ M	15, 30 min	Tocris
PDC	250 μ M	30 min	Tocris
MG132	10 μ M	4 h	Sigma-Aldrich
Cloroquina	100 μ M	1, 3, 4 h	Sigma-Aldrich
PYR-41	25 μ M	90 min	Calbiochem
2-desoxi-D-glucosa	10 mM	30 min	Sigma-Aldrich
AICAR	1 mM	60 min	Sigma-Aldrich
Compuesto C	10 μ M	90 min	Sigma-Aldrich
KN-93	2 μ M	45 min	Tocris
KB-R7943	10 μ M	5, 20 min	Tocris
Cicloheximida	25 μ M	3, 6, 24 h	Sigma-Aldrich
AP-V	20 μ M	10, 30, 60 min	Sigma-Aldrich
Ácido kinurénico	200 μ M	10, 30, 60 min	Sigma-Aldrich

Tabla 2. Tratamientos aplicados a los cultivos celulares.

2. Construcciones plasmídicas

ADNc	Vector	Procedencia	Observaciones
HA-GLT1a	pcDNA3	Generado en el laboratorio	Epítipo en el N-terminal
HA-GLT1a 7KR	pcDNA3	Generado en el laboratorio	Sustitución de 7 lisinas de HA-GLT-1a (K497, K517, K526, K550, K558, K570, K573) por argininas
Flag-Nedd4-2	pCMV2	Dr. J.Carlos Arévalo (INCyL)	Epítipo en el N-terminal
Flag-Nedd4-2 C822S	pCMV2	Generado como parte de esta tesis	Obtenido por mutagénesis dirigida a partir de Flag-Nedd4-2
GST-Nedd4-2 (GST-1)	pGEX-5X	Generado como parte de esta tesis	Gen completo (residuos del 1 al 855)
Delección GST-Nedd4-2 (GST-2)	pGEX-5X	Generado como parte de esta tesis	Comprende los residuos 520-855 de GST-1
Delección GST-Nedd4-2 (GST-3)	pGEX-5X	Generado como parte de esta tesis	Comprende los residuos 1-507 de GST-1
Delección GST-Nedd4-2 (GST-4)	pGEX-5X	Generado como parte de esta tesis	Comprende los residuos 1-420 de GST-1
Delección GST-Nedd4-2 (GST-5)	pGEX-5X	Generado como parte de esta tesis	Comprende los residuos 1-376 de GST-1
Delección GST-Nedd4-2 (GST-6)	pGEX-5X	Generado como parte de esta tesis	Comprende los residuos 1-308 de GST-1
Delección GST-Nedd4-2 (GST-7)	pGEX-5X	Generado como parte de esta tesis	Comprende los residuos 106-308 de GST-1
Delección GST-Nedd4-2 (GST-8)	pGEX-5X	Generado como parte de esta tesis	Comprende los residuos 1-105 de GST-1
GST-Nedd4-2 W405Y/P408A (GST-9)	pGEX-5X	Generado como parte de esta tesis	Obtenido por mutagénesis dirigida a partir de GST-1
Flag- β -arrestina-1	pcDNA3	Dr. Federico Mayor, Jr (CBMSO)	Epítipo en el N-terminal
GFP- β -arrestina-1	pEGFP-N3	Dr. Balbino Alarcón (CBMSO)	Epítipo en el N-terminal
GST- β -arrestina-1	pGEX-5X	Generado como parte de esta tesis	Epítipo en el N-terminal
Flag- β -arrestina-2	pcDNA3	Generado como parte de esta tesis	Epítipo en el N-terminal
GFP- β -arrestina-2	pS65T	Dr. Federico Mayor, Jr (CBMSO)	Epítipo en el C-terminal
GFP- α -arrestina-1	pCR3.1	Dr. Juan Martín-Serrano (King's College, London)	Epítipo en el N-terminal. Gen completo (433 aminoácidos)
GFP- α -arrestina-1- Δ PY	pCR3.1	Generado como parte de esta tesis	Forma truncada de GFP- α -arrestina-1 (residuos del 1 al 394)

Tabla 3. Descripción de los plásmidos utilizados.

Los mutantes de sustitución se generaron mediante mutagénesis dirigida utilizando el sistema comercial QuickChange (Agilent Technologies), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Por otro lado, los mutantes de delección se obtuvieron por PCR, usando oligonucleótidos específicos en cada caso y clonadas en el vector final. Todas las construcciones han sido comprobadas mediante secuenciación.

3. Anticuerpos

Los anticuerpos primarios utilizados tanto en la detección de proteínas en *western blot* (WB) como en inmunofluorescencia (IF) se recogen en la **Tabla 4**.

Antígeno	Especie	Dilución	Referencia	Procedencia
Calnexina	Conejo	WB (1:2000)	SPA-860	Enzo
Flag	Ratón	WB (1:1000)	(M2): F 3165	Sigma-Aldrich
GFP	Ratón	WB (1:1000)	Clon 7.1 + 13.1	Roche
GLT-1	Rata	WB (1:500)	-	Producido en el laboratorio
HA	Ratón	WB (1:2000) IF (1:1000)	Clon 12CA5	Producido por el Servicio de Microscopía (CBMSO)
Nedd4-2	Conejo	WB (1:2000)	A302-513A	Bethyl
Ubiquitin	Ratón	WB (1:250)	(P4D1): sc-8017	Santa Cruz
α -Tubulina	Ratón	WB (1:2000)	(B-5-1-2): T6074	Sigma-Aldrich
β -arrestina-1	Ratón	WB (1:1000)	610550	BD Bioscience
β -arrestina-1	Cabra	WB (1:200)	(K-16): sc-9182	Santa Cruz

Tabla 4. Anticuerpos y diluciones empleadas en Western Blot (WB) e inmunofluorescencia (IF).

En los ensayos de WB se utilizaban los siguientes anticuerpos secundarios acoplados a la peroxidasa de rábano (HRP) a una dilución 1:5000:

- Anticuerpo de conejo anti-ratón (Life Technologies).
- Anticuerpo de cabra anti-conejo (Bethyl).
- Anticuerpo de conejo anti-rata (Sigma-Aldrich).
- Anticuerpo de conejo anti-cabra (Sigma-Aldrich).

En los ensayos de IF, se utilizaba el anticuerpo secundario cabra anti-mouse *Alexa 488* y *Alexa 594* (Invitrogen).

4. Ensayo de inmunoprecipitación

Las líneas celulares transfectadas y los cultivos primarios se lavaban con PBS (137 mM NaCl; 2.7 mM KCl; 10 mM Na₂HPO₄; 1.8 mM KH₂PO₄) frío y levantados de la placa en medio de resuspensión (50 mM Tris-HCl, pH 7.5; 150 mM NaCl y 1 mM EDTA; 25 mM N-Etilmaleimida; 1 mM PMSF; 1:200 cóctel de inhibidores de proteasas (Sigma-Aldrich)). La concentración de proteínas se determinaba por el método de Bradford (BioRad) usando albúmina de suero bovino como estándar. A continuación las células eran solubilizadas en una solución de lisis (1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich); 50 mM Tris-HCl, pH 7.5; 150 mM NaCl; 1 mM EDTA; 25 mM N-Etilmaleimida; 1 mM PMSF; 1:200 cóctel de inhibidores de proteasas) durante 30 minutos a 4°C tras lo cual se centrifugaban 15 minutos a 18000 x g. El sobrenadante se incubaba toda la noche a 4°C con los anticuerpos correspondientes (1 µg anticuerpo/ 1 mg proteína). Transcurrido ese tiempo, se añadía 30 µl de una suspensión de bolas de agarosa unidas a proteína G (ABT) 50% (v/v) y se incubaba durante 1 hora a 4°C. La proteína G tiene una gran afinidad por la fracción constante de las inmunoglobulinas. Finalmente, las bolas se lavaban 3 veces con medio de lisis frío y se resuspendieron en 40µl de tampón de carga Laemmli (65 mM Tris; 10% glicerol; 2.3% SDS; 100 mM DTT; 0.01% azul bromofenol). Las muestras se calentaban a 75°C durante 15 minutos para desnaturalizar las proteínas y disociarlas de las bolas y, posteriormente, se sometía a electrotransferencia e inmunodetección tal y como se describe en el **apartado 6**.

5. Marcaje de proteínas de la membrana plasmática mediante biotilación

Con el fin de marcar selectivamente las proteínas presentes en la superficie celular se utilizaba el reactivo EZ-Link Sulfo-NHS-SS-Biotina (Life technologies). Este compuesto derivado de la biotina presenta un éster *N*-hidroxisuccinimida (NHS), que forma enlaces tipo amida con grupos amino libres. Además, gracias a su grupo sulfonato es impermeable por lo que reaccionan con los grupos ε-amino de residuos de lisina expuestos al medio extracelular. La técnica se basa en la alta afinidad de la avidina por biotina, permitiendo separar las proteínas integrales de membrana biotiladas de aquellas que residen en el citoplasma o en compartimentos subcelulares, las cuales no han sido marcadas. Los transportadores de neurotransmisores

presentan bucles extracelulares que contienen múltiples residuos de lisina y son susceptibles de ser biotinilados.

Se siguió el mismo procedimiento en el marcaje de proteínas de células HEK293T transfectadas con los plásmidos de interés, cultivos primarios corticales y sinaptosomas.

Las muestras se lavaban e incubaban durante 15 minutos con PBS completo (PBS; 0.1 mM CaCl_2 ; 1 mM MgCl_2) frío. A continuación se trataban con Sulfo-NHS-SS-Biotina en PBS completo (1 mg/ml) durante 30 minutos a 4°C, temperatura que detiene el tráfico vesicular. Una vez marcadas las proteínas de membrana se realizaba dos lavados con 100 mM L-lisina en PBS completo durante 30 minutos a 4°C para bloquear la biotina que no hubiera reaccionado. Después de dos lavados con PBS las muestras se resuspendían en medio de resuspensión (50 mM Tris-HCl, pH 7.5; 150 mM NaCl y 1 mM EDTA; 1 mM PMSF; 1:200 cóctel de inhibidores de proteasas), se determinaba la concentración de proteína y se lisaban en tampón de lisis RIPA (1% Triton X-100; 0.1% SDS; 0.5% deoxicolato sódico; 50 mM Tris-HCl, pH 7.5; 150 mM NaCl y 1 mM EDTA; 1 mM PMSF; 1:200 cóctel de inhibidores de proteasas) durante 30 minutos a 4°C. Tras centrifugarlas, parte del lisado se reservaba para su análisis mediante electroforesis e inmunodetección. El resto del sobrenadante se incubaba con 40 μl de bolas de agarosa unidas a estreptavidina 50% (v/v) durante 90 minutos a temperatura ambiente con agitación rotatoria. Transcurrido ese tiempo, las bolas se lavaban 3 veces con tampón de lisis y las proteínas unidas a la estreptavidina se eluían con tampón de carga Laemmli durante 15 minutos a 75°C. Finalmente, las muestras se analizaban por electrotransferencia e inmunodetección (ver **apartado 6**). En las condiciones descritas, la señal obtenida del transportador correspondía a la proteína presente en la superficie celular, sin detectarse marcaje de calnexina, una proteína intracelular usada como control.

6. Electroforesis, electrotransferencia e inmunodetección (*Western blot*)

Las muestras de proteínas se separaban según su masa molecular por electroforesis en minigeles (sistema de electroforesis MiniProtean3; BioRad) de poliacrilamida al 7.5% o 10% en presencia de SDS y en condiciones reductoras, sometiéndolas a una corriente constante de 30mA durante 1 hora aproximadamente en tampón de electroforesis (25 mM Tris-HCl, pH 7.5; 192 mM glicina; SDS 0.1%). Posteriormente, las proteínas se transferían a una membrana de nitrocelulosa (Pall Corporation) mediante un sistema de electrotransferencia semiseca (Nyx technik) a un amperaje constante de 1.2 mA/cm² durante 90 minutos en tampón de transferencia (48 mM Tris; 40 mM glicina; 15% metanol; 1.3 mM SDS). A continuación la

membrana se bloqueaba con leche al 5% (p/v) en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente. El siguiente paso era la incubación con el anticuerpo primario diluido en medio de bloqueo a 4°C en agitación durante toda la noche. Al día siguiente la membrana se lavaba 3 veces durante 10 minutos con leche al 2% en PBS y se incubaba con el anticuerpo secundario unido a peroxidasa diluido en solución de bloqueo. Por último, se lavaba la membrana 3 veces con leche al 2% en PBS y se visualizaban las proteínas inmunoreactivas utilizando el sistema ECL (*Enhanced Chemiluminescence Detection*) de BioRad. Las exposiciones se realizaban en películas de autorradiografía (Afga Curix RP2).

7. Ensayo de ubiquitinación

Para detectar el grado de ubiquitinación de una proteína hay que tomar ciertas precauciones. En primer lugar, las proteínas ubiquitinadas pueden ser rápidamente degradadas por el proteosoma o el lisosoma, haciendo difícil analizar este evento transitorio. Por ello, las células HEK293T transfectadas fueron tratadas con el inhibidor proteosomal MG132 (10 µM) y el inhibidor lisosomal Cloroquina (100 µM) durante 4 horas. Otro factor a tener en cuenta es la presencia de desubiquitininas en el extracto celular, las cuales pueden eliminar la ubiquitina unida a la proteína de interés. Este problema se evita añadiendo N-Etilmaleimida (25 mM) al tampón de lisis, que bloquea el residuo de cisteína crítico presente en el sitio activo de dichas enzimas.

Células HEK293T pretratadas en placas de 6 pocillos se lavaban con PBS frío y se levantaban en medio de resuspensión (50 mM Tris-HCl, pH 7.5; 150 mM NaCl y 1 mM EDTA; 25 mM N-Etilmaleimida; 1 mM PMSF; 1:200 cóctel de inhibidores de proteasas). Tras determinar la concentración de proteína, el extracto se desnaturalizaba añadiendo 1% SDS en un volumen final de 100 µl e incubándolo a 95°C durante 10 minutos. Este paso es imprescindible para separar las proteínas asociadas y así poder demostrar que la ubiquitinación que detectamos es específica de la proteína de interés. A continuación se añadía 1 ml de tampón de lisis (1% Triton X-100; 50 mM Tris-HCl, pH 7.5; 150 mM NaCl; 1 mM EDTA; 25 mM N-Etilmaleimida; 1 mM PMSF; 1:200 cóctel de inhibidores de proteasas) para diluir el SDS de la muestra y se lisaba durante 30 minutos a 4°C. Una vez centrifugada a 18000 x g, el sobrenadante se incubaba con el anticuerpo primario (1 µg/ 1 mg lisado) toda la noche a 4°C y con 30 µl de bolas de proteína G-agarosa 50% (v/v) durante 1 hora a 4°C. Por último, las bolas se lavaban 3 veces con medio de lisis frío, se resuspendían en 40 µl de tampón de carga Laemmli y se incubaban a 75°C durante 15 minutos.

Las muestras se sometieron a electroforesis y electrotransferencia, tal y como se describe en el apartado anterior. No obstante, antes de bloquear la membrana de nitrocelulosa, ésta se incubaba con una solución desnaturalizante (6 M Cloruro de guanidinio; 20 mM Tris-HCl, pH 7.5; 5 mM β -mercaptoetanol; 1 mM PMSF) durante 30 minutos a 4°C con el fin de hacer más accesibles los epítomos de la ubiquitina al anticuerpo anti-ubiquitina.

8. Ensayo de transporte de glutamato

Células HEK293T cultivadas en placas de 24 pocillos (Corning) se transfectaban con los plásmidos de interés. Cada condición experimental se analizaba por triplicado. Transcurridas 48 horas, se procedía a realizar el ensayo de transporte en un baño con agitación constante a 37°C. Las células se lavaban con PBS dos veces y se incubaban durante 10 minutos con 300 μ l de medio de transporte (0.05 μ M L-[³H]-Glutamato (50.6 Ci/mmol, 1 mCi/ml; PerkinElmer); 10 mM glucosa; en PBS completo). Para detener el transporte de glutamato las células se lavaban dos veces con PBS frío y se lisaban con 250 μ l de 0.2 N NaOH. Tras 24 horas a 4°C, se utilizaba una alícuota de cada pocillo para la determinación de la concentración de proteína mediante ensayo de Bradford y 100 μ l para cuantificar el glutamato marcado radioactivamente incorporado por las células mediante un contador de centelleo líquido (1450 Microbeta Trilux, PerkinElmer). Para medir el transporte de glutamato específico de GLT-1 se le restó la actividad obtenida por células transfectadas con el vector de expresión pcDNA3 vacío.

9. Inmunofluorescencia en células en cultivo

Células MDCK crecidas sobre cubreobjetos de 10 mm (Thermo Scientific) en placas de 24 pocillos se transfectaban durante 48 horas. Posteriormente, se lavaban con PBS y se fijaban con 4% paraformaldehído (Merck) durante 15 minutos a temperatura ambiente. Tras un lavado en PBS, las células se permeabilizaban durante 10 minutos con 0.25% Triton X-100 en PBS y se bloqueaban en 10% BSA durante 45 minutos. A continuación se incubaban con el anticuerpo primario en 3% BSA en PBS durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, se realizaban 3 lavados con PBS de 5 minutos cada uno y se incubaban con un anticuerpo secundario conjugado a un fluoróforo durante 1 hora a temperatura ambiente en oscuridad. Por último, los cristales se lavaban de nuevo 3 veces durante 5 minutos y se montaban sobre portaobjetos (Thermo Scientific), empleando como medio de montaje Fluoromount-G (SouthernBiotech).

Para la obtención de imágenes digitales de colocalización se utilizó un microscopio de barrido laser confocal LSM510 acoplado a un microscopio invertido AxioVert200 (Zeiss).

Las imágenes se analizaban mediante los programas ImageJ y Methamorph.

En la cuantificación de vesículas positivas para GLT-1 se utilizó un microscopio invertido AxioVert200, tomando las imágenes mediante una cámara Photometrix Coolsnap FX. Por cada célula analizada se obtuvieron 25 imágenes de distinto enfoque ($z = 0.2 \mu\text{m}$), que fueron apiladas (máxima proyección en z). A continuación se usó la aplicación "Granularity" de Metamorph, analizando sólo las partículas entre 6 y 50 píxeles con una intensidad media al menos 3.5 veces la intensidad media de la célula

10. Obtencion de sinaptosomas de corteza cerebral

Se sacrificaban ratas Wistar de 60 días por el método de dislocación cervical. Tras la extracción y disección del cerebro el tejido se homogeneizaba mecánicamente con un homogenizador de vidrio (Wheaton) en un medio con sacarosa (0.32 M sacarosa; 10 mM Hepes-NaOH, pH 7.4; 1 mM PMSF; 1:200 cóctel de inhibidores de proteasas) en frío. Las muestras se centrifugaban a 2000 x g durante 5 minutos, recogándose el sobrenadante (S1). Para aumentar el rendimiento el sedimento (P1) se resuspendía de nuevo en medio sacarosa y se volvía a centrifugar. Los dos sobrenadantes resultantes se juntaban y se centrifugaban 25 minutos a 10000 x g. El sedimento obtenido (P2) se resuspendía en medio con sacarosa y se depositaba sobre un gradiente discontinuo de Percoll preparado en un medio compuesto por 0.32M sacarosa, 1 mM EDTA, 0.25 mM DTT y formado por bandas al 5%, 13% y 27% de Percoll (Sigma-Aldrich). Los gradientes se centrifugaban a 25000 x g durante 10 minutos a 4°C. A continuación se recogían los sinaptosomas presentes en la interfase entre la banda de Percoll al 13% y 27%, se diluían en medio HBM (20 mM HEPES-NaOH, pH 7.4; 140 mM NaCl; 5 mM KCl; 1 mM MgCl₂; 1.2 mM Na₂HPO₄; 5 mM NaHCO₃) y se centrifugaban a 25000 x g durante 30 minutos a 4°C. El sedimento (P3) se resuspendía en 10 ml de HBM y, tras determinarse la concentración de proteínas por el método de Bradford, se preparaban alícuotas con 500 µg (2mg/ml) en medio HBM.

Los sinaptosomas se preincubaban con 10 mM glucosa durante 30 minutos a 37°C en agitación continua, excepto la condición de privación de glucosa el cual se preincubaba con 2 mM lactato y 0.2 mM piruvato. A continuación se realizaban los tratamientos correspondientes durante 30 minutos y se añadía 1 ml de HBM frío para detener el tráfico de membranas. Posteriormente se marcaban las proteínas de membrana mediante biotilación (ver **apartado 5**).

11. Inmunoprecipitación de la fracción P2 de cerebro de rata

El sedimento P2, una fracción enriquecida en membranas celulares, se obtenía tal y como se describe en el apartado anterior y se resuspendía en medio de resuspensión (50 mM Tris-HCl, pH 7.5; 150 mM NaCl y 1 mM EDTA; 25 mM N-Etilmaleimida; 1 mM PMSF; 1:200 cóctel de inhibidores de proteasas). Tras determinar su concentración de proteínas se solubilizaba en medio de lisis (1% Triton X-100; 50 mM Tris-HCl, pH 7.5; 150 mM NaCl; 1 mM EDTA; 25 mM N-Etilmaleimida; 1 mM PMSF; 1:200 cóctel de inhibidores de proteasas) durante 30 minutos a 4°C. A continuación las muestras se centrifugaban a 12000 x g y los sobrenadantes se ultracentrifugaban a 100000 x g durante 20 minutos a 4°C. De esta manera se eliminaban restos celulares y membranas no solubilizadas. Posteriormente, los lisados se prelavaban con 40 µl de proteína G-agarosa 50% (v/v) durante 30 minutos a 4°C y se incubaban con el anticuerpo primario toda la noche a 4°C en agitación. Al día siguiente, se añadían 40 µl de proteína-G agarosa 50% (v/v) y se incubaba la mezcla durante 1 hora a 4°C. Tras lavar las bolas 4 veces con medio de lisis frío, se calentaban a 75°C en tampón de carga Laemmli durante 15 minutos. Las muestras se analizaban mediante electrotransferencia e inmunodetección.

12. Purificación de proteínas de fusión

Para la purificación de proteínas de fusión utilizadas en los ensayos de *pull-down* se transformaban cultivos bacterianos de *E.Coli* BL21 (Servicio de Fermentación, CBMSO) mediante electroporación con construcciones clonadas en el vector de expresión bacteriano pGEX-5x (ver **apartado 2**). Este vector permite añadir a uno de los extremos de la proteína la enzima Glutación-S-transferasa (GST), que es necesaria para la purificación. La expresión de la proteína se inducía con 1mM de IPTG (Boehringer) durante 5 horas a 37°C. A continuación las bacterias se centrifugaban a 6000 x g y se lisaban en tampón de lisis (0.2mg/ml lisozima (Boehringer); 10mM EDTA; 0.1mg/ml PMSF; en PBS). Después de 20 minutos a 4°C, se añadía 5mM DTT y 0.1% Triton X-100, tras lo cual se incubaban nuevamente durante 10 minutos. Para romper las células se utilizaba un homogeneizador de alta presión (GEA Niro Soavi). Posteriormente, el lisado se centrifugaba a 12000 x g durante 15 minutos y el sobrenadante, que contenía la proteína de interés, se incubaba con una columna de glutatión-sefarosa (GE Healthcare) durante 2 horas a 4°C. Finalmente, la columna se lavaba 3 veces con 10 volúmenes de PBS y la proteína de fusión unida se eluía con tampón de elución (50 mM Tris-HCl, pH 8; 10 mM glutatión (Sigma-Aldrich)). La purificación de la proteína GST control se realizó de forma análoga partiendo de bacterias transformadas con el vector pGEX sin inserto.

13. Síntesis de proteínas *in vitro*

La síntesis de proteínas *in vitro* se llevaba a cabo utilizando el kit comercial TNT T7 Quick Coupled Transcription/Translation System (Promega). Este sistema consiste en una sola mezcla de reacción que contiene ARN polimerasa T7, nucleótidos, sales, inhibidor de ribonucleasas recombinante (RNasin) y una solución de lisado de reticulocito. Es decir, contiene todo los componentes necesarios para la transcripción del ADN molde y la traducción del ARN resultante. Con el fin de detectar el producto de la reacción se añade metionina marcada radioactivamente con ^{32}S , la cual es incorporada durante la traducción de la proteína.

Para sintetizar la proteína de interés se mezclaba 1 μg de ADN plasmídico con 30 μCi de [^{35}S]-Metionina (1175 Ci/mmol, 10.2 mCi/ml; PerkinElmer) y 40 μl de reactivo en un volumen final de 50 μl . La reacción se incubaba durante 90 minutos a 30°C. Se verificaba la presencia de proteína mediante electrotransferencia a una membrana de nitrocelulosa y revelado en películas de autorradiografía. A continuación el producto de la reacción se solubilizaba en solución de lisis (1% Triton X-100; 50 mM Tris-HCl, pH 7.5; 300 mM NaCl; 1 mM EDTA; 1 mM PMSF; 1:200 cóctel de inhibidores de proteasas) 30min a 4°C y centrifugado 15 minutos a 18000 x g. Los lisados se utilizaban en ensayos *pull-down*.

14. Ensayos *pull-down*

Células HEK293T transfectadas con los plásmidos de interés se lavaban con PBS y se levantaban en medio de resuspensión (50 mM Tris-HCl, pH 7.5; 300 mM NaCl y 1 mM EDTA; 1 mM PMSF; 1:200 cóctel de inhibidores de proteasas). Tras determinar la concentración de proteína las células se solubilizaban en solución de lisis (1% Triton X-100; 50 mM Tris-HCl, pH 7.5; 300 mM NaCl; 1 mM EDTA; 1 mM PMSF; 1:200 cóctel de inhibidores de proteasas) durante 30 minutos a 4°C y se centrifugaban 15 minutos a 18000 x g.

El lisado, procedente de las células HEK293T o de la síntesis de proteínas *in vitro* (ver apartado 9), se prelavaba con 20 μg de GST unido a 40 μl de bolas glutatión-sefarosa 50% (v/v) durante 2 horas a 4°C en agitación. Después de centrifugar 10 minutos a 18000 x g, el lisado se incubaba con 10 μg de GST (condición control) o de la proteína fusión y con 40 μl de bolas glutatión-sefarosa 50% (v/v) durante 2 horas a 4°C en agitación. Posteriormente las bolas se lavaban 4 veces con 1ml de solución de lisis y se calentaban a 75°C en tampón de carga Laemmli. Las muestras se analizaban por electroforesis e inmunodetección.

15. Registros electrofisiológicos

La técnica de electrofisiología de *voltage-clamp* (*whole-cell patch*) permite mantener de forma estable el potencial de membrana de la célula y registrar las corrientes eléctricas generadas por el flujo de iones a través de los canales y transportadores presentes en la célula. Para ello, se utilizó como electrodo una micropipeta de vidrio cuya punta presentaba una resistencia entre 3-7 M Ω rellena de una solución iónica (10 mM HEPES, pH 7.4 (ajustado con KOH); 155 mM gluconato potásico; 4 mM KCl; 5 mM ATP-Mg; 0.1 mM EGTA).

El día del experimento, las células transfectadas adheridas a cubreobjetos de 15mm, se transferían a una cámara de registro donde se perfundían con solución aCSF (10 mM HEPES, pH 7.4; 10 mM glucosa; 140 mM NaCl; 2.4 mM KCl; 2 mM CaCl₂; 1 mM MgCl₂; 20 μ M CdCl₂) a 25°C. Mediante un microscopio de fluorescencia (Olympus BX51WI) se localizaban células transfectadas con GFP (indicador de transfección) y se procedía a la formación de un sello de elevada resistencia entre la micropipeta y la membrana celular. A continuación el parche de membrana delimitado por el sello era eliminado. En los registros de la corriente asociada al transporte de GLT-1 el potencial de membrana se fijaba a -60 mV. Durante los tratamientos celulares la monitorización de los cambios de potencial se realizaba sin fijar el potencial de membrana.

Los registros electrofisiológicos se realizaban con un amplificador de *patch-clamp* (MultiClamp 700B) y un digitalizador (Digidata 1440A) controlados desde un ordenador mediante el programa pClamp10.3. Las micropipetas empleadas se fabricaron a partir de capilares de borosilicato (Sutter Instrument), mediante un estirador de pipetas P-97 (Sutter Instrument).

16. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los resultados se llevaba a cabo utilizando el programa GraphPad Prism 5. Previamente, se analizaba la normalidad de los datos mediante el test de Saphiro-Wilk. Para la comparación entre dos grupos experimentales se aplicaba la prueba t-Student. En los casos en los que se requería la comparación múltiple de distintas condiciones se realizaba un análisis de la varianza (ANOVA) de una vía utilizando el test de corrección Bonferroni.

En los gráficos se representan los valores medios \pm error estándar de la media (S.E.M; del inglés *standard error of the mean*).

RESULTADOS

1. Regulación dependiente de actividad del transportador de glutamato GLT-1

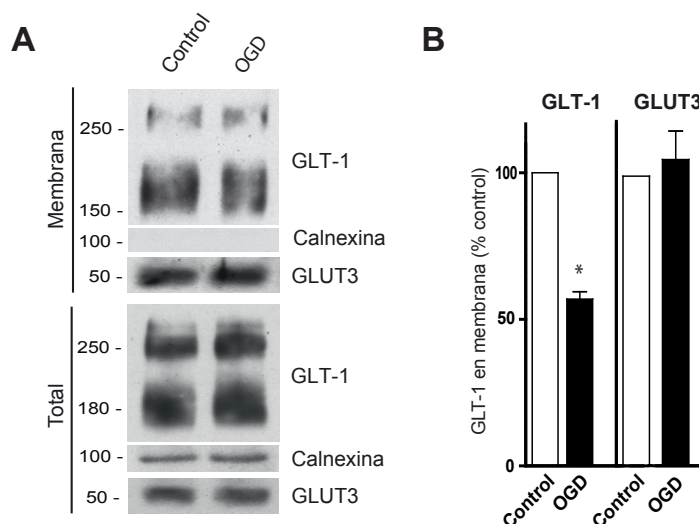
1.1. La privación de glucosa y oxígeno provoca una disminución de la cantidad de GLT-1 en la membrana plasmática de sinaptosomas

En un proceso isquémico, la reducción del riego sanguíneo conlleva una disminución del aporte de oxígeno y de nutrientes. Por ello, en los modelos *in vitro* de isquemia cerebral, los efectos celulares se inducen por privación de oxígeno y glucosa (OGD; del inglés *oxygen/glucose deprivation*).

Con el fin de estudiar el efecto de la privación de oxígeno y glucosa en el tráfico intracelular de GLT-1, se utilizaron sinaptosomas extraídos de la corteza cerebral de ratas adultas. Los sinaptosomas de la condición restrictiva (OGD) fueron incubados con 10 mM 2-desoxi-D-glucosa, un análogo de la glucosa que inhibe la glucólisis, en un medio sin oxigenar durante 30 minutos a 37°C. A continuación se procedió al marcaje de las proteínas de la membrana plasmática mediante el reactivo impermeable Sulfo-NHS-SS-biotina y su posterior purificación con estreptavidina-agarosa. Al cuantificar la proteína GLT-1 presente en la superficie de los sinaptosomas se observó una reducción en la condición OGD, en comparación con el control (**Fig.9**). Además, los niveles del transportador de glucosa GLUT3 no se vieron afectados, lo que indica un efecto específico sobre GLT-1.

Figura 9. Estudio del efecto de la privación de oxígeno y glucosa (OGD) sobre el transportador GLT-1 en sinaptosomas corticales.

(A) Sinaptosomas de corteza cerebral de rata fueron incubados durante 30 minutos a 37°C con glucosa (10 mM) en agitación (condición control) o con 2-desoxi-D-glucosa (10 mM) en un medio sin oxigenar (OGD). Las proteínas de la membrana plasmática se marcaron con sulfo-NHS-biotina y se aislaron con estreptavidina-agarosa. En el análisis de la inmunotransferencia, se utilizaron los anticuerpos anti-GLT-1 y anti-GLUT-3. La inmunodetección de Calnexina se usó como control de la fracción no biotinilada. **(B)** Representación gráfica del análisis densitométrico de la biotinilación, expresada como porcentaje de variación respecto a la condición control. Los asteriscos indican diferencias significativas: *, $p < 0.05$.



1.2. El glutamato extracelular regula el tráfico de GLT-1 en sinaptosomas

Como se ha comentado en la Introducción (**apartado 4.2.1**), la isquemia cerebral está asociada a un aumento del glutamato extracelular. De hecho, se ha demostrado que el modelo de privación de glucosa y oxígeno ensayado en el apartado anterior promueve la liberación de glutamato endógeno (Rubio *et al.*, 1991).

Para comprobar si el glutamato extracelular tiene un efecto sobre GLT-1, se trataron sinaptosomas corticales con 1 mM glutamato durante 30 minutos a 37°C y se marcaron las proteínas de la membrana plasmática por biotilación. Tal y como se observa en la **figura 10**, el glutamato provoca una clara disminución de la cantidad de transportador presente en la membrana plasmática, mientras que los niveles de GLUT3 no se ven afectados.

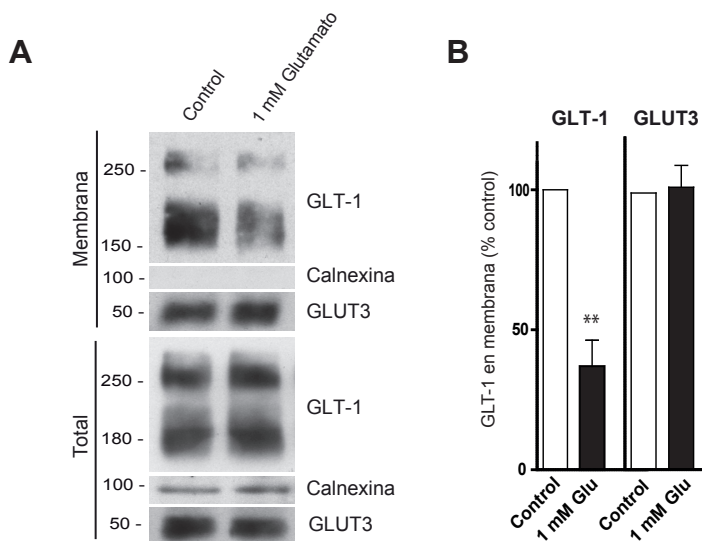


Figura 10. Estudio del efecto del glutamato sobre GLT-1 en sinaptosomas corticales.

(A) Sinaptosomas de corteza cerebral de rata fueron incubados con el vehículo (Control) o con glutamato (1 mM) durante 30 minutos a 37°C. Las proteínas de la superficie celular se marcaron mediante biotilación y se aislaron con estreptavidina-agarosa. En el análisis de la inmunotransferencia se utilizaron los anticuerpos anti-GLT-1 y anti-GLUT-3. La inmunodetección de Calnexina se utilizó como control de la fracción no biotilada. **(B)** Representación gráfica del análisis densitométrico de la biotilación, expresada como porcentaje de variación respecto a la condición control. Los asteriscos indican diferencias significativas: **, $p < 0.01$.

1.3. La internalización de GLT-1 en respuesta a glutamato está determinada por la concentración y el tiempo de exposición

Los sinaptosomas presentan varios receptores de glutamato, tanto ionotrópicos (AMPA y NMDA) como metabotrópicos (mGluR1-8). Estudios anteriores han descrito la regulación de GLT-1 en respuesta a la activación de algunos de estos receptores. Por ejemplo, se ha visto que mGluR3 y mGluR5 modulan a GLT-1 activando e inhibiendo su expresión, respectivamente (Aronica *et al.*, 2003). Para poder analizar el efecto directo del glutamato sobre el transportador se utilizaron las células HEK239T como sistema de expresión heterólogo de GLT-1. Los resultados obtenidos fueron comprobados en cultivos primarios corticales mixtos.

En primer lugar, se estudió la respuesta del transportador a diferentes concentraciones de glutamato. Células HEK293T transfectadas transitoriamente con GLT-1 unido al epítipo HA fueron tratadas con 0.1, 1 y 10 mM de glutamato durante 1 hora a 37°C. Tras el marcaje de las proteínas de la superficie celular por biotilación, se observó que 0.1 mM de glutamato era suficiente para desencadenar la endocitosis de GLT-1 ($10.9\pm 2.8\%$). Sin embargo, es con 1-10 mM cuando se alcanza la máxima respuesta (1mM: internalización del $26.5\pm 5.8\%$ / 10 mM: $33.1\pm 3.7\%$) (**Fig.11**).

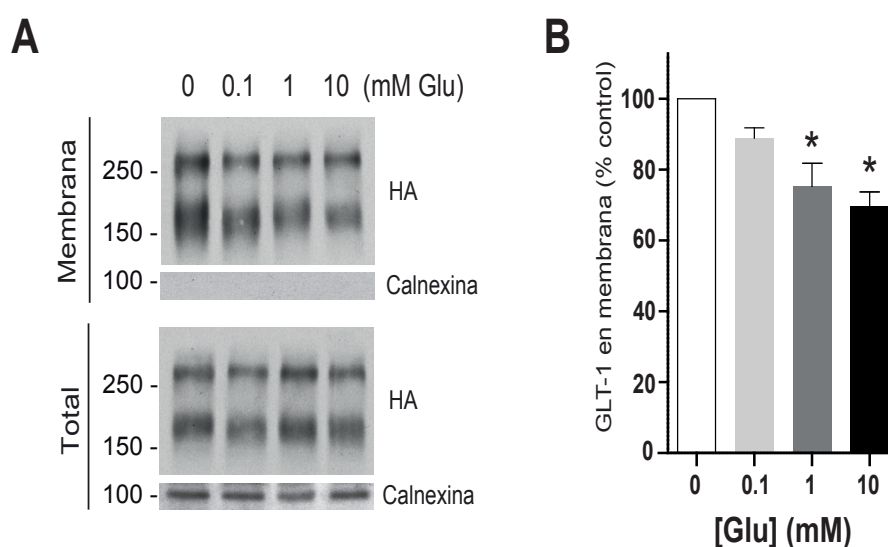


Figura 11. Efecto de la concentración extracelular de glutamato en los niveles de GLT-1 en la superficie celular de HEK293T. (A) Células HEK293T transfectadas con HA-GLT-1 fueron tratadas con distintas concentraciones de glutamato (0.1, 1, 10 mM) durante 60 min a 37°C. Las proteínas de la membrana se marcaron con sulfo-NHS-biotina y se aislaron con estreptavidina-agarosa. El análisis de la inmunotransferencia se realizó con el anticuerpo anti-HA. La inmunodetección de Calnexina se utilizó como control de la fracción no biotinilada. (B) Representación gráfica del análisis densitométrico de la biotilación, expresada como porcentaje de variación respecto a la condición control. Los asteriscos indican diferencias significativas: *, $p < 0.05$.

Posteriormente, se estudió la endocitosis de GLT-1 mediada por glutamato a distintos tiempos: células HEK293T transfectadas con HA-GLT-1 fueron incubadas con 1 mM glutamato durante 5, 20 y 60 minutos a 37°C. El análisis de la fracción marcada con Sulfo-NHS-SS-biotina reveló que a los 20 minutos se producía la internalización del $32.4\pm 7.4\%$ de GLT-1, sin aumentar con el tiempo (**Fig.12**). Esto parece indicar que no todo el transportador presente en la membrana plasmática es susceptible de ser regulado por glutamato, viéndose afectado una subpoblación específica de GLT-1.

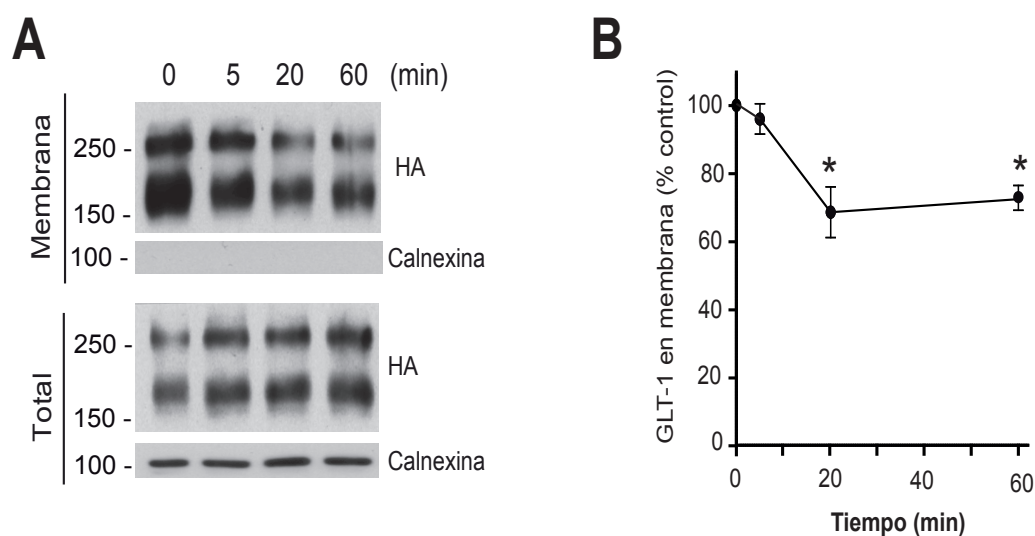


Figura 12. Análisis temporal del efecto del glutamato sobre el transportador GLT-1 en la superficie celular de HEK293T. (A) Células HEK293T transfectadas con HA-GLT-1 fueron tratadas con 1 mM glutamato durante 5, 20 y 60 minutos a 37°C. Las proteínas de la membrana fueron biotiniladas y aisladas con estreptavidina-agarosa. En el análisis de la inmunotransferencia se utilizó el anticuerpo anti-HA. La inmunodetección de Calnexina se utilizó como control de la fracción no biotinilada. (B) Representación gráfica del análisis densitométrico de la biotinilación, expresada como porcentaje de variación respecto a la condición control. Los asteriscos indican diferencias significativas: *, $p < 0.05$.

Como ya se ha comentado anteriormente, GLT-1 se expresa principalmente en astrocitos, aunque también está presente en neuronas. Por lo tanto, quisimos comprobar los resultados obtenidos en cultivos primarios mixtos de neuronas y glía procedentes de la corteza cerebral de rata. Para ello, se utilizaron cultivos primarios corticales de 14 DIV (días in vitro) en placas de 6 pocillos (densidad de 5×10^5 células/pocillo), donde se estudió el curso temporal del efecto del glutamato sobre el GLT-1 endógeno. Las células se trataron con 1 mM glutamato durante 10, 30 y 60 minutos a 37°C, en presencia de bloqueantes de receptores NMDA (20 μ M AP-V, 200 μ M ácido kinurénico) para evitar la neurotoxicidad. A continuación se marcaron las proteínas de la membrana con Sulfo-NHS-SS-biotina. En efecto, de modo similar a lo obtenido en células HEK293T transfectadas con GLT-1, el neurotransportador endógeno es endocitado en presencia de glutamato (Fig.13). En los primeros 30 minutos es internalizado el $18 \pm 3.9\%$, llegando al $28 \pm 5\%$ transcurridos 60 minutos. Además, al analizar la fracción intracelular del transportador, se observó un aumento a los 30 minutos de tratamiento con glutamato, desapareciendo a los 60 minutos de incubación. Este resultado sugiere una acumulación del transportador endocitado, el cual podría ser progresivamente degradado.

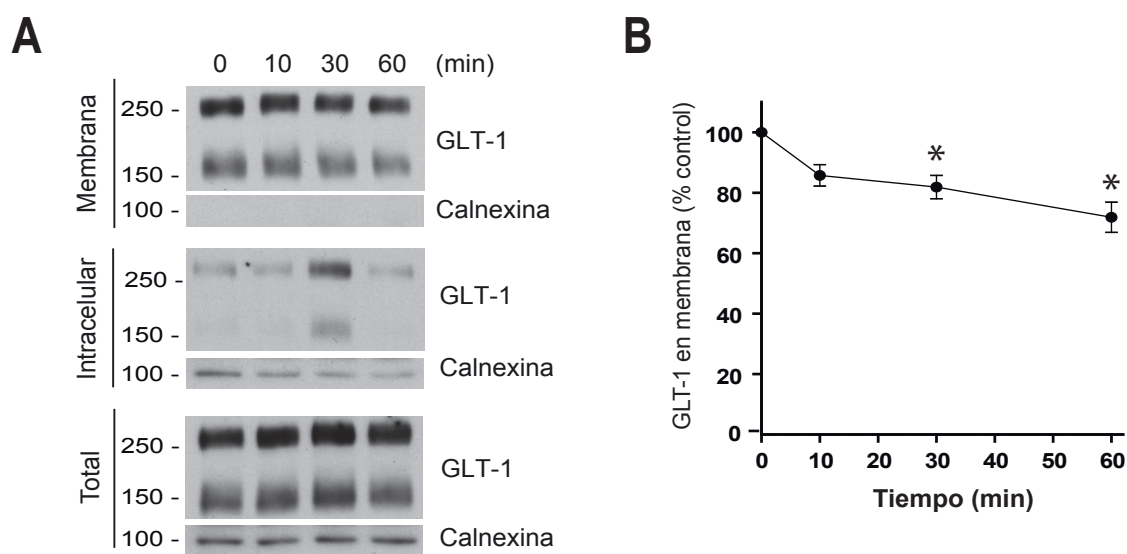


Figura 13. Análisis temporal del efecto del glutamato sobre el transportador GLT-1 en cultivos mixtos corticales. (A) Cultivos mixtos corticales de rata (14 DIV) tratados con 1 mM glutamato durante 10, 30 y 60 minutos 37°C. Las proteínas de la membrana fueron biotiniladas y aisladas con estreptavidina-agarosa. El análisis de la inmunotransferencia se realizó con el anticuerpo anti-GLT-1. La inmunodetección de Calnexina se utilizó como control de la fracción no biotinilada. (B) Representación gráfica del análisis densitométrico de la biotinilación, expresada como porcentaje de variación respecto a la condición control. Los asteriscos indican diferencias significativas: *, $p < 0.05$.

Con el fin de reforzar los resultados obtenidos en el marcaje de las proteínas de la superficie celular, se procedió a analizar la internalización del transportador mediante inmunofluorescencia.

Células MDCK transfectadas con HA-GLT-1, fueron cultivadas en placas de 24 pocillos con cristales y tratadas con 1 mM glutamato durante 30 minutos a 37°C. Tras ser fijadas con 4% paraformaldehído, se marcó el transportador mediante el anticuerpo anti-HA y un anticuerpo secundario conjugado al fluoróforo *Alexa-488*. Gracias a la colaboración con el Dr. Díez Guerra, pudimos discriminar mediante la aplicación “Granularity” del programa Metamorph, entre las agrupaciones de GLT-1 presentes en la membrana plasmática y las vesículas intracelulares positivas para GLT-1. Los resultados obtenidos mediante el uso de este abordaje, mostraron nuevamente la endocitosis de GLT-1 mediada por glutamato. En las células sin tratar el transportador aparece en agrupaciones localizadas en la superficie celular (Fig.14A), aunque también se aprecian algunas vesículas positivas para el transportador. Esto es debido a la existencia de un tráfico constitutivo de GLT-1, el cual ha sido caracterizado previamente en nuestro laboratorio (Martinez-Villarreal *et al.*, 2012). No obstante, tras el tratamiento con glutamato el número de vesículas inmunoreactivas aumentan significativamente, particularmente en la región perinuclear (Fig.14B).

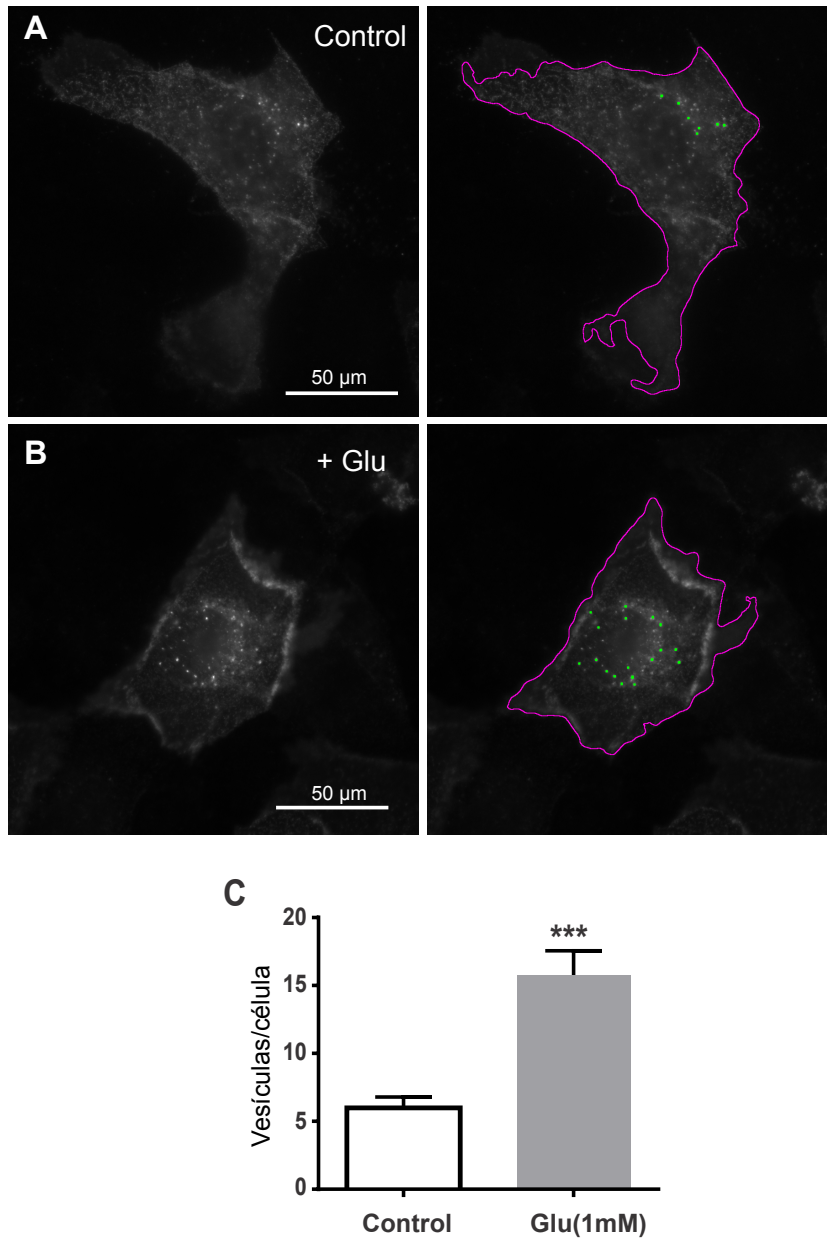


Figura 14. Estudio por inmunofluorescencia de la internalización de GLUT-1 mediada por glutamato. Células MDCK transfectadas con HA-GLT-1 fueron tratadas con el vehículo **(A)** o con 1 mM glutamato **(B)** durante 30 minutos 37°C. Posteriormente, las células fueron fijadas con 4% paraformaldehído, permeabilizadas, y sometidas a inmunofluorescencia con el anticuerpo anti-HA seguido del secundario conjugado al fluoróforo *Alexa-488*. Cada imagen corresponde al apilamiento de 25 imágenes con distinto enfoque ($z=0.2 \mu\text{m}$). En los paneles de la derecha, se observa la superficie que ocupa cada célula (línea magenta) y las partículas identificadas como vesículas (puntos verdes) por la aplicación “Granularity” de Metamorph. **(C)** Representación gráfica de la cuantificación del promedio de vesículas por célula, en cada condición ($n=76$). Los asteriscos indican diferencias significativas: ***, $p < 0.001$.

1.4. La endocitosis de GLT-1 mediada por glutamato es dependiente de la actividad

Los resultados descritos hasta este punto ponen de manifiesto una regulación del tráfico de GLT-1 en presencia de glutamato. Con el objetivo de esclarecer si se debía a un efecto específico, decidimos probar diferentes sustratos e inhibidores del transportador.

GLT-1, al igual que el resto de transportadores pertenecientes a la familia génica *SLC1*, transportan tanto L-glutamato como L-aspartato con una eficacia similar. Además, existen agentes farmacológicos que modulan la actividad del transportador, los cuales se clasifican en sustratos inhibidores y bloqueantes. Los primeros presentan una estructura parecida al glutamato y aspartato y pueden ser transportados por GLT-1, por lo que compiten con los sustratos endógenos. Entre ellos destaca, por su especificidad y potencia, el ácido L-trans-Pirrolidin-2,4-dicarboxílico (PDC). Por otro lado, los agentes bloqueantes no son transportables por GLT-1, pero son capaces de unirse al transportador impidiendo el transporte de glutamato. Recientemente se ha desarrollado un potente agente bloqueante muy selectivo para GLT-1: el N4-[4-(2-bromo-4,5-difluorofenil)]-L-asparagina (WAY-213613) (Dunlop *et al.*, 2005; Kanai *et al.*, 2013).

Células HEK293T transfectadas con HA-GLT-1 fueron tratadas con 1 mM glutamato, 10 mM L-aspartato, 200 μ M PDC, 10 mM de glicina o 100 μ M WAY-213613 durante 30 minutos a 37°C. En la biotinylación de las proteínas de la superficie se observó que, tanto el aspartato como el PDC, ambos sustratos transportables, promovieron la internalización de GLT-1 hasta niveles similares a los obtenidos con el glutamato (**Fig.15A,C**). Sin embargo, el tratamiento con glicina, utilizado como control negativo puesto que no interacciona con GLT-1, no tuvo ningún efecto sobre el tráfico del transportador. Además, al analizar el efecto del inhibidor WAY-213613 observamos que, si bien por sí solo no afecta al tráfico de GLT-1, es capaz de bloquear la endocitosis mediada por glutamato (**Fig.15B,D**).

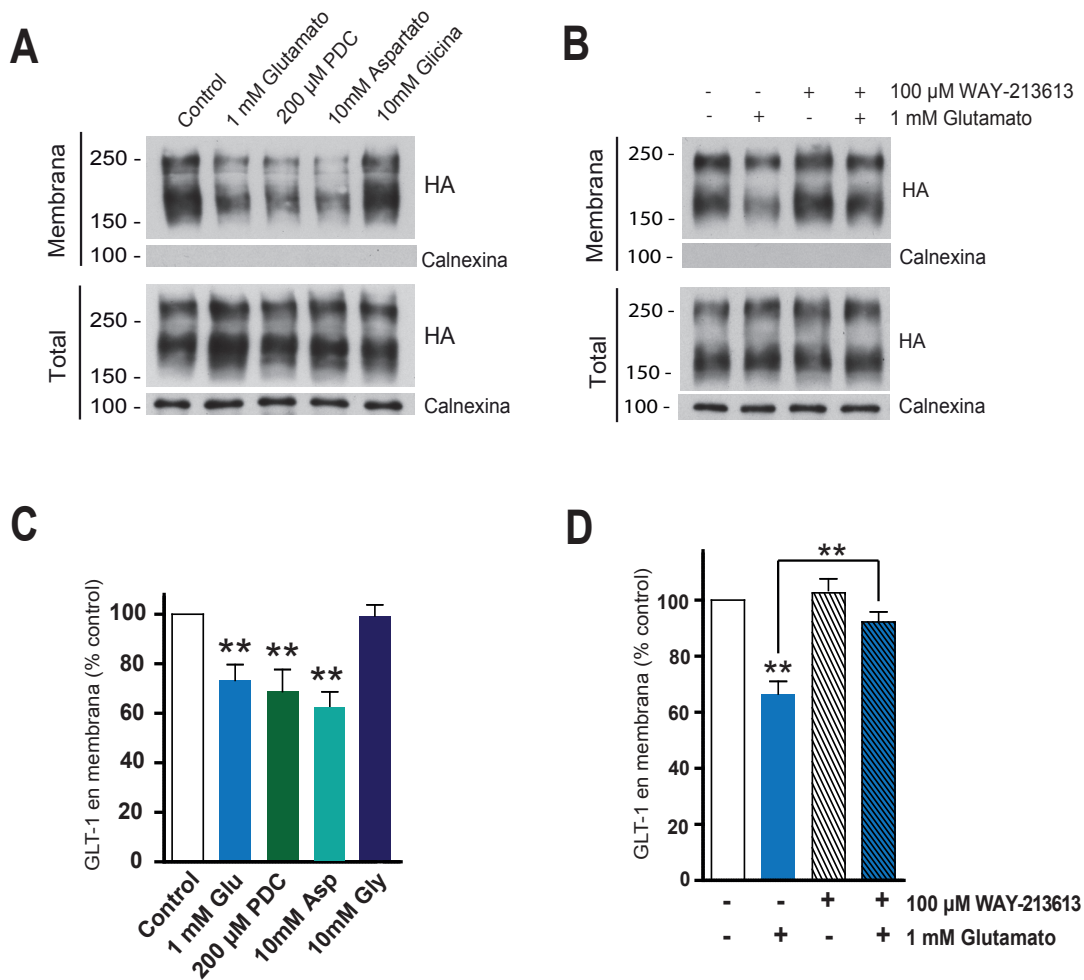


Figura 15. Internalización dependiente de actividad del transportador GLT-1 en HEK293T. (A,B) Células HEK293T transfectadas con HA-GLT-1 fueron tratadas con los compuestos indicados durante 30 minutos a 37°C. Las proteínas de la superficie celular fueron marcadas por biotilación y aisladas con estreptavidina-agarosa. En el análisis de la inmunotransferencia se utilizó el anticuerpo anti-HA y anti-Calnexina (control fracción no biotilada). (C,D) Representación gráfica del análisis densitométrico de las biotilaciones, expresada como porcentaje de variación respecto a la condición control. Los asteriscos indican diferencias significativas: **, $p < 0.01$.

En este punto, nos propusimos contrastar los resultados obtenidos en HEK293T recurriendo de nuevo a los cultivos mixtos de neuronas y glía. Para ello, se trataron cultivos primarios corticales de 14 DIV en placas de 6 pocillos con 1 mM glutamato, 200 μM PDC y/o 100 μM WAY-213613, en presencia de bloqueantes de receptores NMDA, durante 30 minutos a 37°C. En este caso, el sustrato inhibitor PDC también fue capaz de inducir la endocitosis de GLT-1 (Fig.16). Además, el tratamiento con PDC y glutamato no aumentaba significativamente la internalización del transportador, respecto a la condición tratada sólo con glutamato. Esto indica que ambos sustratos comparten el mecanismo de acción en la regulación de GLT-1. Por otro lado, el bloqueante WAY-213613, al igual que ocurría en los experimentos en HEK293T, impedía la endocitosis del transportador mediada por glutamato.

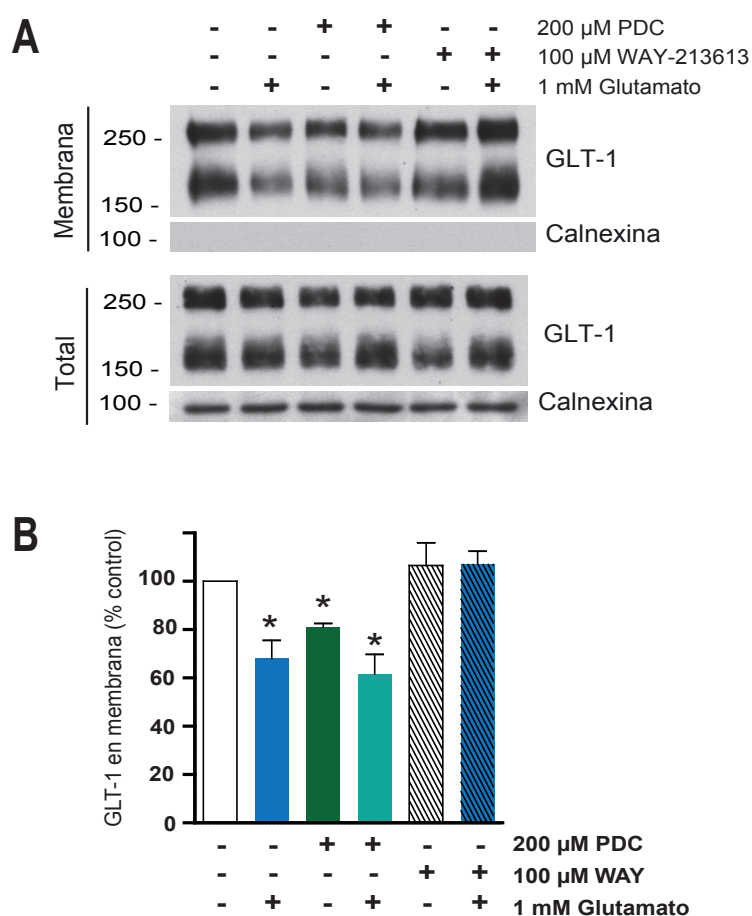


Figura 16. Internalización dependiente de actividad del transportador GLT-1 en cultivos mixtos corticales. **(A)** Cultivos mixtos corticales de rata (14DIV) fueron tratados con los compuestos indicados durante 30 minutos a 37°C. Las proteínas de la superficie celular fueron marcadas por biotilación y aisladas con estreptavidina-agarosa. El análisis de la inmunotransferencia se realizó con el anticuerpo anti-GLT1. La inmunodetección de Calnexina fue utilizada como control de la fracción no biotilada. **(B)** Representación gráfica del análisis densitométrico de la biotilación, expresada como porcentaje de variación respecto a la condición control. Los asteriscos indican diferencias significativas: *, $p < 0.05$.

En resumen, todos estos datos sugieren que la internalización de GLT-1 en respuesta al glutamato se produce por la activación del transportador, pudiendo ser desencadenada por cualquiera de sus sustratos transportables. Además, el bloqueo del efecto por el inhibidor selectivo WAY-213613 ratifica una regulación directa sobre GLT-1.

1.5. Señalización intracelular implicada en la regulación de GLT-1 dependiente de actividad

El transporte de glutamato por GLT-1 es electrogénico al entrar dos cargas positivas netas por cada molécula de glutamato (ver **apartado 4.1** de Introducción). Por lo tanto, es posible medir la actividad del transportador GLT-1 mediante el registro electrofisiológico de las corrientes eléctricas asociadas al transporte de glutamato. Gracias a la colaboración con el Dr. Bartolomé Martín, pudimos realizar el estudio electrofisiológico del transportador GLT-1. Para ello, se cotransfectaron células HEK293T con HA-GLT-1 y GFP en placas de 12 pocillos, sobre cubreobjetos de 15 mm, durante 48 horas.

1.5.1. Estudio electrofisiológico del efecto del glutamato sobre la actividad de GLT-1 y el potencial de membrana celular

En primer lugar, el potencial de membrana fue fijado a -60 mV y se registró la corriente en respuesta a 1 mM de glutamato durante 1 minuto. A continuación se monitorizó el potencial de membrana celular durante la incubación de las células en presencia de 1 mM glutamato (10 min) y durante el posterior lavado (5 min). Para finalizar, el potencial de membrana fue de nuevo fijado a -60 mV y se realizó un segundo registro de la corriente al aplicar 1 mM de glutamato (1 min). Como se observa en la **figura 17A**, la corriente (amplitud máxima) asociada al transporte de glutamato era menor en el segundo registro (58±8.8%). Estos resultados indican que, tras el tratamiento con glutamato, el número de transportadores activos es menor, lo que vuelve a confirmar los resultados obtenidos mediante biotinylación e inmunofluorescencia. Además, durante la monitorización del potencial de membrana se observó que el tratamiento con glutamato despolarizaba a la célula (12.6±3.8 mV, respecto al potencial en reposo), el cual volvía a sus valores iniciales tras el lavado (**Figura 17B**).

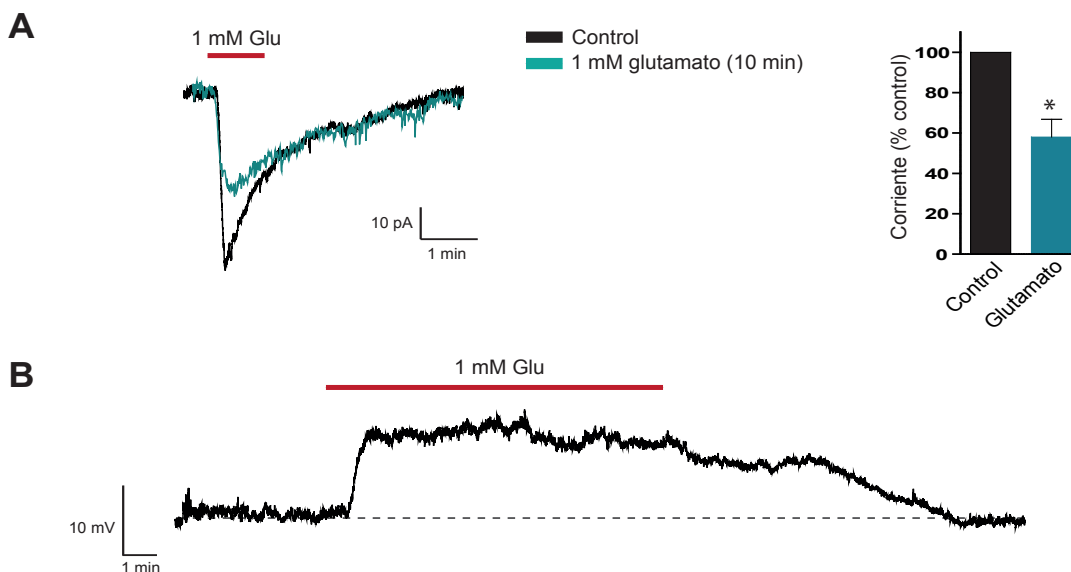


Figura 17. Estudio electrofisiológico del efecto del glutamato sobre la actividad de GLT-1 y el potencial de membrana celular (A) Registro representativo y diagrama de barras de la respuesta a glutamato (1 mM), antes (negro) y después (verde) de la incubación con glutamato (1 mM, 10 min), de células HEK293T transfectadas con HA-GLT-1 (n=3). Los asteriscos indican diferencias significativas: *, $p < 0.05$. **(B)** Registro representativo del potencial de membrana de células HEK293T transfectadas con HA-GLT-1 durante la incubación con glutamato (1 mM, 10 minutos) y el lavado posterior.

1.5.2. Papel del intercambiador NCX en la regulación de GLT-1 dependiente de actividad

El hecho de que la endocitosis de GLT-1 mediada por glutamato fuese desencadenada por la activación del transportador, independientemente del sustrato, nos hizo pensar que el mecanismo regulatorio podría estar relacionado con la despolarización observada durante el transporte. Esta despolarización se produce por el intenso flujo de iones Na^+ a través de GLT-1, el cual no es capaz de contrarrestar la bomba Na^+/K^+ ATPasa. En estas condiciones, se ha demostrado que se activa un mecanismo compensatorio en el que el intercambiador de Na^+ y Ca^{2+} (NCX) introduce un ion Ca^{2+} para expulsar tres Na^+ , lo que provoca un aumento de los niveles de Ca^{2+} intracelular activando diferentes rutas de señalización (Parpura y Verkhratsky, 2012). Para estudiar si, efectivamente, el intercambiador NCX estaba implicado en la regulación del transportador, se realizaron medidas electrofisiológicas similares a las descritas en el apartado anterior. En este caso, se fijó el potencial de membrana a -60 mV y se registró la respuesta a glutamato (1 mM, 1 min) de las células HEK293T transfectadas con GLT-1. A continuación se preincubaron en presencia o ausencia del inhibidor de NCX, KB-R7943 (10 μM ; 5 min), y con glutamato (1 mM; 5 min), tras lo cual se lavaron durante otros 5 minutos. Por último, se fijó de nuevo el potencial de membrana a -60 mV y se registró la corriente inducida por glutamato (1mM, 1min). En las células preincubadas con el inhibidor de NCX y con glutamato, el segundo registro de la corriente resultó ser mayor ($131 \pm 14.2\%$), mientras que las células incubadas solo con glutamato presentaron una corriente menor que la inicial ($82.5 \pm 5.3\%$) (**Figura 18A**).

El siguiente paso fue comprobar la implicación de NCX en la endocitosis de GLT-1 mediante estudios de biotinylación. Células HEK293T transfectadas con HA-GLT-1 fueron preincubadas con 10 μM KB-R7943 durante 20 minutos y tratadas con 1 mM glutamato durante 30 minutos a 37°C. El análisis de la biotinylación demostró que el inhibidor de NCX bloqueaba totalmente la internalización de GLT-1 mediada por glutamato (**Figura 18B**). Estos resultados apuntan a NCX como posible desencadenante de la regulación de GLT-1 mediada por glutamato.

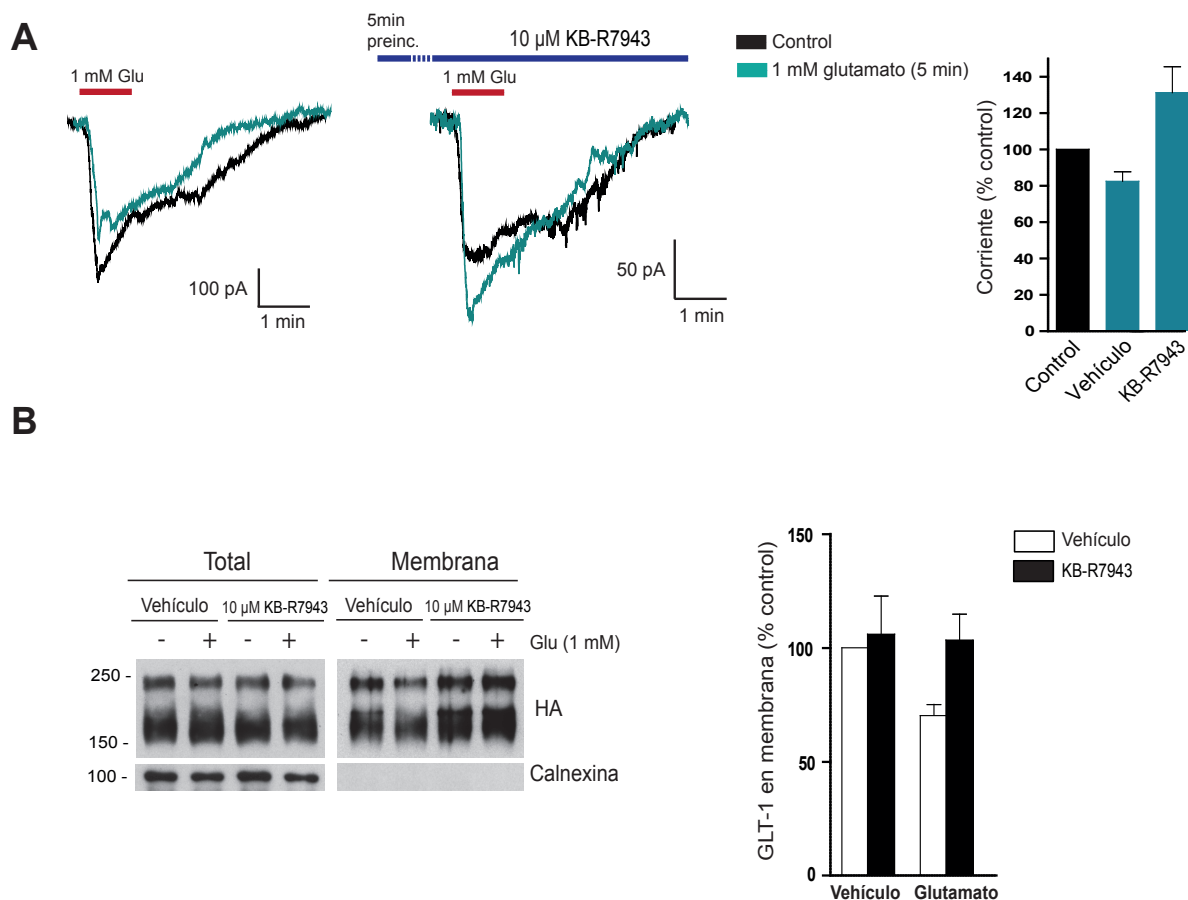


Figura 18. Estudio del papel del intercambiador NCX en la internalización de GLT-1 dependiente de actividad. (A) Registro representativo y diagrama de barras de la respuesta a glutamato (1 mM), antes (negro) y después (verde) del tratamiento celular. Células HEK293T transfectadas con HA-GLT-1 fueron preincubadas en presencia (derecha) o ausencia (izquierda) de KB-R7943 (10 μ M; 5 min) y tratadas con glutamato (1 mM, 5 min) (n=4). (B) Células HEK293T transfectadas con HA-GLT1 fueron preincubadas con el vehículo o con KB-R7943 (10 μ M; 20 min) e incubadas en presencia o ausencia de 1 mM glutamato durante 30 minutos a 37°C. Las proteínas de la superficie celular fueron marcadas por biotilación y aisladas con estreptavidina-agarosa. La inmunotransferencia fue analizada con el anticuerpo anti-HA. La inmunodetección de Calnexina fue utilizada como control de la fracción no biotilada. En el panel derecho se representa el análisis densitométrico de la biotilación, expresada como porcentaje de variación respecto a la condición control.

1.5.3. Papel de la enzima CaMKII en la regulación de GLT-1 mediada por glutamato

Una vez puesto de manifiesto el papel de la NCX en la regulación dependiente de actividad del GLT-1, nos propusimos identificar la ruta de señalización responsable de la activación de la maquinaria endocítica. El aumento de la concentración de Ca^{2+} intracelular puede modular diversas cascadas de señalización celular. Una de ellas es a través la activación de la enzima la Ca^{2+} /Calmodulina quinasa II (CaMKII), la cual está relacionada con el tráfico intracelular de GLT-1b al desestabilizar su unión con la proteína de anclaje DLG1 (Underhill *et al.*, 2015), lo que la convierte en un buen candidato como posible regulador de GLT-1a.

Células HEK293T transfectadas con HA-GLT-1 fueron preincubadas con el inhibidor de la CaMKII, KN-93 (2 μ M; 45 min), y tratadas con 1 mM glutamato durante 30 minutos a 37°C. Mediante experimentos de marcaje de las proteínas de membrana por biotilación, se observó que la inhibición de la CaMKII impedía la internalización GLT-1 mediada por glutamato (**Figura 19**). Por lo tanto, esto demuestra que esta quinasa debe de estar implicada en la regulación del transportador dependiente de actividad.

1.5.4. Papel del la AMPK en la regulación de GLT-1

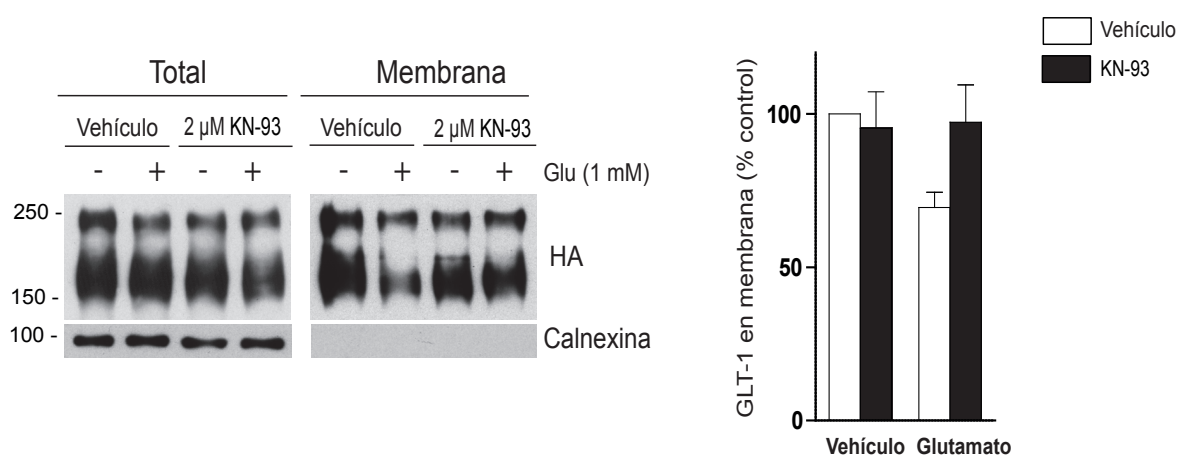


Figura 19. Estudio del papel de la CAMKII en la internalización de GLT-1 mediada por glutamato. Células HEK293T transfectadas con HA-GLT1 fueron tratadas con el vehículo o con el inhibidor de CAMKII KB-R7943 (2 μ M; 45 min) e incubadas en presencia o ausencia de 1 mM glutamato durante 30 minutos a 37°C. Las proteínas biotiladas fueron aisladas con estreptavidina-agarosa y la inmunotransferencia fue revelada con el anticuerpo anti-HA y anti-Calnexina (control de la fracción no biotilada). En el panel derecho se representa el análisis densitométrico de la biotilación, expresada como porcentaje de variación respecto a la condición control.

Una de las dianas moleculares de CaMKII es la proteína quinasa activada por AMP (AMPK, del inglés: *AMP-activated protein kinase*). Esta quinasa se ha visto involucrada en la regulación de los transportadores de glutamato EAAT3 y EAAT4 (Sopjani *et al.*, 2010). Por ello, decidimos analizar el efecto de la quinasa en la internalización de GLT-1 mediada por glutamato. Siguiendo un abordaje similar al apartado anterior, realizamos una biotilación de células HEK293T transfectadas con HA-GLT-1, las cuales fueron preincubadas con el Compuesto C (10 μ M; 90 min), el cual actúa como inhibidor de AMPK, y tratadas con 1 mM glutamato durante 30 minutos a 37°C. El revelado de las muestras puso en evidencia el papel de la AMPK en la regulación del transportador, ya que el Compuesto C bloqueaba la endocitosis de GLT-1 inducida por glutamato (**Fig.20A**).

Para comprobar la implicación de la AMPK en la regulación de GLT-1, realizamos estudios de biotinilación de células HEK293T transfectadas con HA-GLT-1 e incubadas con glutamato 30 minutos a 37°C, tras una preincubación con el activador de la AMPK, AICAR (1 mM; 60 min). El análisis de las proteínas de membrana demostró que la activación de la quinasa provocaba una reducción de los niveles de GLT-1 en la superficie celular (84.1±4.3%) (Fig.20B). Además, estos resultados se corroboraron mediante otro abordaje experimental: la medición directa de la actividad del transportador mediante ensayos de transporte con L-[³H]-Glutamato (10 minutos a 37°C). La preincubación de las células transfectadas con 1 mM AICAR durante 60 minutos redujo la incorporación del glutamato (83.3±5.1% respecto al control) (Fig.20C). Estos datos sugieren una regulación, directa o indirecta, del tráfico de GLT-1 por parte de la AMPK.

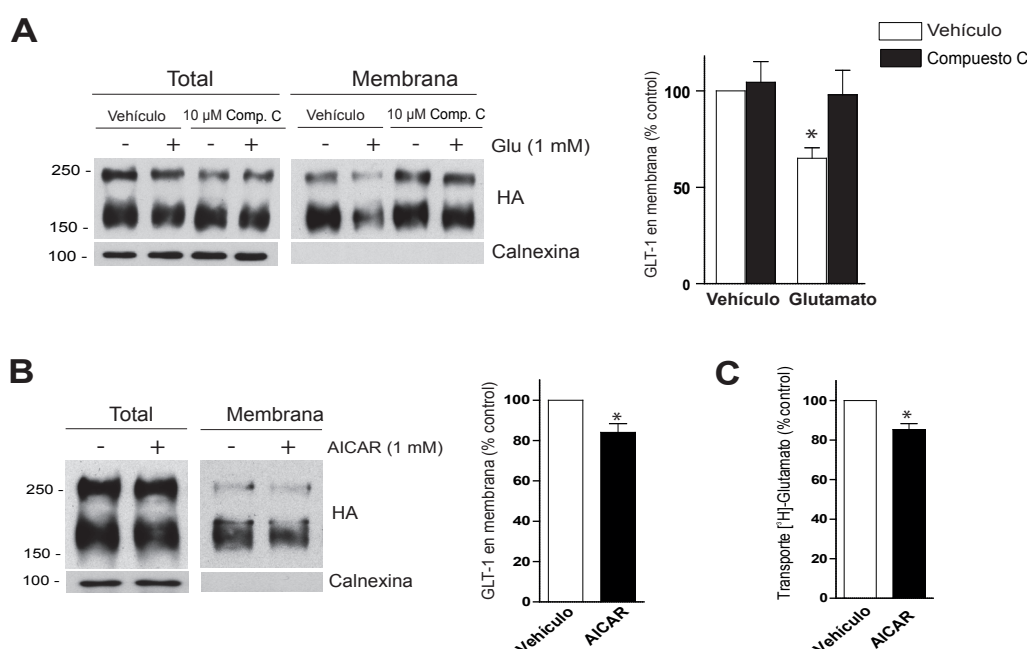


Figura 20. Estudio del papel de la AMPK como regulador de GLT-1. (A) Células HEK293T transfectadas con HA-GLT-1 fueron pretratadas con el vehículo o con el inhibidor de la AMPK, Compuesto C (10 μM, 90 min), e incubadas en presencia o ausencia de 1 mM glutamato durante 30 minutos a 37°C. Las proteínas de la membrana fueron biotiniladas y aisladas con estreptavidina-agarosa. En el análisis de la inmunotransferencia se utilizó el anticuerpo anti-HA. La inmunodetección de Calnexina se utilizó como control de la fracción no biotinilada. En el panel derecho se representa el análisis densitométrico de la biotinilación, expresada como porcentaje de variación respecto a la condición control. Los asteriscos indican diferencias significativas: *, p < 0.05. (B) Células HEK293T transfectadas con HA-GLT-1 fueron incubadas en presencia o ausencia del activador de la AMPK, AICAR (1 mM; 60 min). Las proteínas de la superficie celular fueron marcadas mediante biotinilación y aisladas con estreptavidina agarosa. La inmunotransferencia fue revelada con los anticuerpos anti-HA y anti-Calnexina. En el panel derecho se representa el análisis densitométrico de la biotinilación, expresada como porcentaje de variación respecto a la condición control. Los asteriscos indican diferencias significativas: *, p < 0.05. (C) Células HEK293T transfectadas con HA-GLT-1 fueron tratadas con AICAR (1 mM; 60 min) e incubadas con L-[³H]-glutamato durante 10 minutos a 37°C. Los resultados se presentan como el porcentaje de los valores control. Los asteriscos indican diferencias significativas: *, p < 0.05.

1.6. La ubiquitinación del carboxilo terminal de GLT-1 es necesaria para la endocitosis mediada por glutamato.

Trabajos previos en nuestro laboratorio han demostrado que, tanto el tráfico intracelular constitutivo de GLT-1 como el mediado por PKC, dependen de la ubiquitinación del transportador (González-González *et al.*, 2008b; Martínez-Villarreal *et al.*, 2012). Por ello, nos planteamos el posible papel de la ubiquitinación en la endocitosis de GLT-1 mediada por glutamato.

Como ya hemos comentado en la Introducción (**apartado 6**), la ubiquitinación es una modificación postraduccional llevada a cabo por tres enzimas diferentes. La enzima E1 es la encargada de activar las moléculas de ubiquitina libre, siendo un paso limitante de la reacción. Con el fin de determinar si la ubiquitinación era necesaria para la internalización de GLT-1 activada por glutamato, se utilizó un inhibidor específico de la enzima E1: PYR-41 (Yang *et al.*, 2007). De este modo se buscaba inhibir todos los procesos de ubiquitinación celulares.

Células HEK293T transfectadas con HA-GLT1 fueron preincubadas en presencia o ausencia de 25 μ M PYR-41 durante 90 minutos, tras lo cual se trataron con 1 mM glutamato durante 30 minutos a 37°C. A continuación se analizaron los niveles de transportador mediante biotilación. Los resultados muestran que la inhibición de la ubiquitinación mediante PYR-41 bloquea totalmente la endocitosis de GLT-1 activada por glutamato (**Fig.21A**). Sin embargo, mediante este abordaje experimental no se podía discriminar si la dependencia de ubiquitinación del proceso de endocitosis de GLT-1 se debía a la ubiquitinación del propio transportador, o bien de alguna de las proteínas que participan en el proceso de endocitosis.

El neurotransportador GLT-1 presenta 16 residuos de lisina expuestos hacia el espacio intracelular: 4 en su región amino terminal, 5 situados en bucles intracelulares y 7 en la región carboxilo terminal. Estudios anteriores han determinado que los residuos de lisina del extremo carboxilo de GLT-1 son los que intervienen en el tráfico basal de GLT-1 y en la internalización tras la activación de la PKC (Sheldon *et al.*, 2008; González-González *et al.*, 2008b; Martínez-Villarreal *et al.*, 2012). Para comprobar si la endocitosis de GLT-1 mediada por glutamato dependía de su ubiquitinación, se utilizó un mutante del transportador, GLT-1 7KR, en el que las lisinas del extremo carboxilo han sido sustituidas por argininas.

Las células HEK293T se transfectaron con HA-GLT-1 nativo o con el mutante HA-GLT-1 7KR y posteriormente se incubaron en presencia de glutamato (1 mM o 10 mM) durante 30 minutos a 37°C. Finalmente, se analizaron los niveles del transportador en membrana mediante biotilación. El mutante GLT-1 7KR permaneció estable en la membrana sin apreciarse ningún efecto en presencia de glutamato (**Fig.22B**). Este resultado evidencia la importancia de la ubiquitinación del carboxilo terminal del transportador GLT-1 en su endocitosis mediada por glutamato.

No obstante, estos datos apoyan el papel de la ubiquitinación en el tráfico de GLT-1 en respuesta al glutamato de una manera indirecta. Así pues, el siguiente paso en nuestro estudio fue detectar directamente la ubiquitinación del transportador.

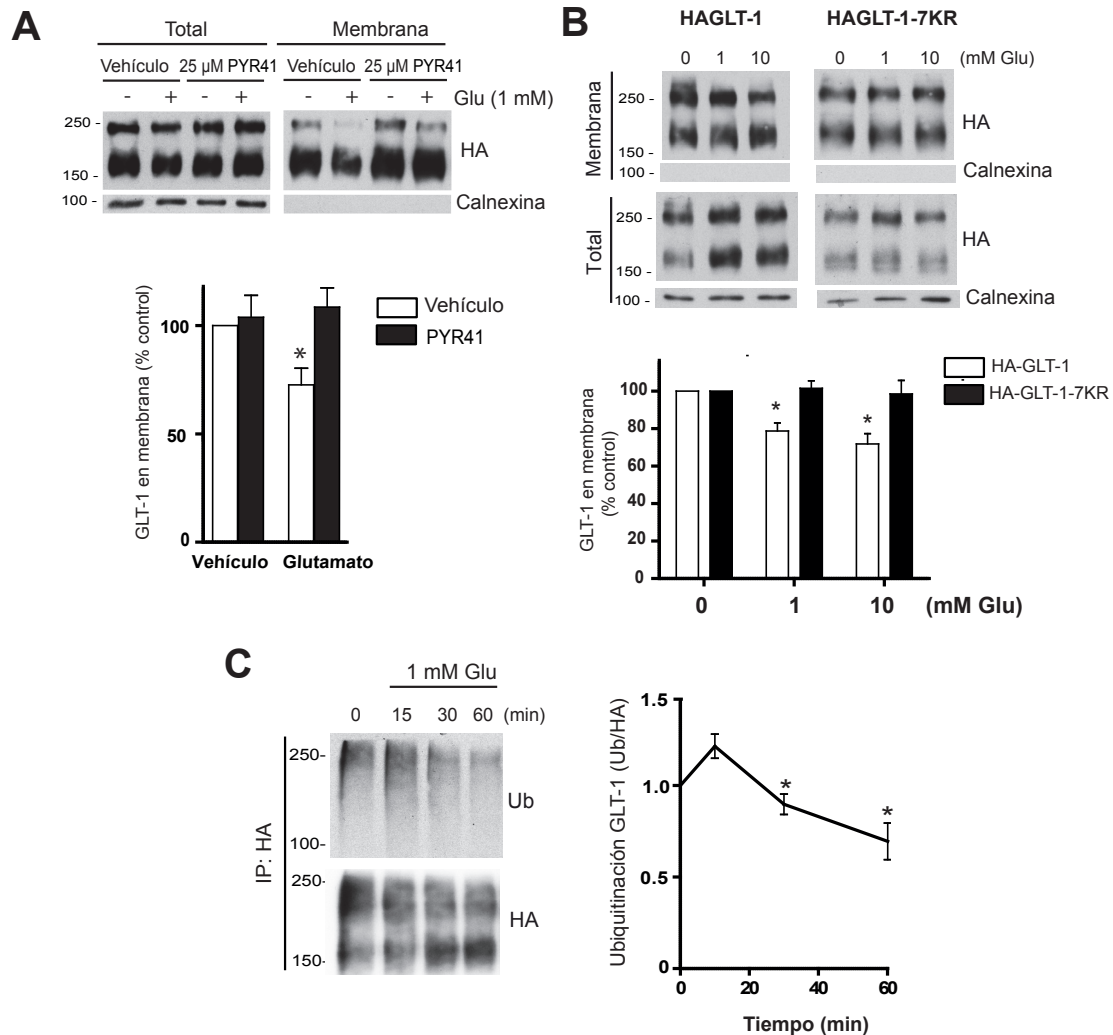


Figura 22. Ubiquitinación del transportador GLT-1 en respuesta al glutamato extracelular. **(A)** Células HEK293T transfectadas con HA-GLT1 fueron pretratadas el vehículo o con PYR41 (25 μ M; 90 min) e incubadas en presencia o ausencia de 1 mM glutamato durante 30 minutos a 37°C. Las proteínas de la superficie celular fueron marcadas por biotilación y aisladas con estreptavidina-agarosa. La inmunotransferencia fue analizada con el anticuerpo anti-HA y anti-Calnexina (utilizada como control de la fracción no biotilada). En el panel inferior, se representa el análisis densitométrico de la biotilación, expresada como porcentaje de variación respecto a la condición control. Los asteriscos indican diferencias significativas: *, $p < 0.05$. **(B)** Células HEK293T transfectadas con HA-GLT1 o HA-GLT1 7KR fueron incubadas en presencia o ausencia de 1 o 10 mM glutamato durante 30 minutos a 37°C. Las proteínas marcadas mediante biotilación fueron aisladas con estreptavidina agarosa. El análisis de la inmunotransferencia se realizó con el anticuerpo anti-HA y anti-Calnexina. En el panel inferior se representa el análisis densitométrico de la biotilación, expresada como porcentaje de variación respecto a la condición control. Los asteriscos indican diferencias significativas: *, $p < 0.05$. **(C)** Células HEK293T transfectadas con HA-GLT1 fueron incubadas con 1 mM glutamato durante 15, 30 o 60 minutos a 37°C. Los lisados, obtenidos en condiciones desnaturalizantes, se inmunoprecipitaron con el anticuerpo anti-HA. La inmunotransferencia fue analizada mediante los anticuerpos anti-Ubiquitina (Ub) y anti-HA. En el panel derecho, se representan los niveles relativos de la ubiquitinación de GLT-1, normalizados y expresados respecto al control. Los asteriscos indican diferencias significativas: *, $p < 0.05$.

Las células HEK293T transfectadas con HA-GLT-1 se preincubaron con 10 μ M MG-132 y 100 μ M Cloroquina durante 2 horas para inhibir la degradación de las proteínas ubiquitinadas. A continuación se trataron con 1 mM glutamato durante 15, 30 y 60 minutos a 37°C, y se lisaron en presencia del inhibidor de deubiquitinasas N-etilmaleimida (25 mM). Para poder asegurar que la ubiquitinación ocurría directamente sobre GLT-1 y no sobre proteínas asociadas, los lisados fueron expuestos a condiciones muy desnaturalizantes, solubilizando las células en 1% SDS a 95°C durante 10 minutos. Posteriormente, se inmunoprecipitó con el anticuerpo anti-HA y, tras proceder con la electroforesis e inmunotransferencia de las muestras, se reveló con un anticuerpo específico anti-ubiquitina. Puesto que por cada molécula de ubiquitina añadida al transportador incrementa su tamaño en 8 kDa y que cada monómero de GLT-1 puede ser ubiquitinado varias veces, la ubiquitinación del transportador se detecta como manchas difusas distribuidas a lo largo del carril. Como se puede observar en la **figura 22C**, el glutamato provoca un aumento en la ubiquitinación de GLT-1 a los 15 minutos, perdiéndose progresivamente a los 30 y 60 minutos. Sin embargo, el revelado de la membrana de nitrocelulosa con anticuerpos anti-HA no evidenciaba cambios en la cantidad total de proteína HA-GLT-1. Empleando esta aproximación se pudo comprobar directamente la ubiquitinación de GLT-1 en respuesta al glutamato, la cual ocurría en los primeros 15 minutos. La pérdida de ubiquitinación transcurrido ese tiempo podría deberse a la desubiquitinación de GLT-1 endocitado, el cual, al no degradarse por el sistema lisosomal debido a la presencia de inhibidores, es acumulado en vesículas endosomales donde podría ser sustrato de las desubiquitinasas.

1.7. La población de GLT-1 endocitado en presencia de glutamato coincide con la internalizada tras el tratamiento con PMA

A la vista de los resultados anteriores, la respuesta del transportador GLT-1 a glutamato era muy similar a la observada tras la activación de la PKC por ésteres de forbol, como el forbol-12-miristato-13-acetato (PMA; del inglés *Phorbol 12-Myristate 13-Acetate*). Por ello, para comprobar si ambos efectores compartían el mismo mecanismo de acción en la activación de la endocitosis de GLT-1, células HEK293T transfectadas con HA-GLT-1 fueron incubadas con 1 mM glutamato y/o 1 μ M PMA. Los tratamientos fueron de 30 minutos, de manera que el tratamiento con ambos compuestos se realizó secuencialmente. Como se muestra en la **figura 23**, el tratamiento con glutamato o PMA inducía la endocitosis del 26.2 \pm 4.5% y 26.7 \pm 3.2% del transportador, respectivamente. Además, el tratamiento secuencial también provocaba una respuesta similar, independientemente del orden en el que realizasen, induciendo la internalización del 29.7 \pm 8.3% (PMA \rightarrow Glutamato) y 24.7 \pm 3% (Glutamato \rightarrow PMA) del transportador en membrana.

En definitiva, estos resultados parecen indicar que el glutamato y la activación de PKC por ésteres de forbol actúan sobre la misma población de GLT-1, promoviendo su ubiquitinación y posterior endocitosis.

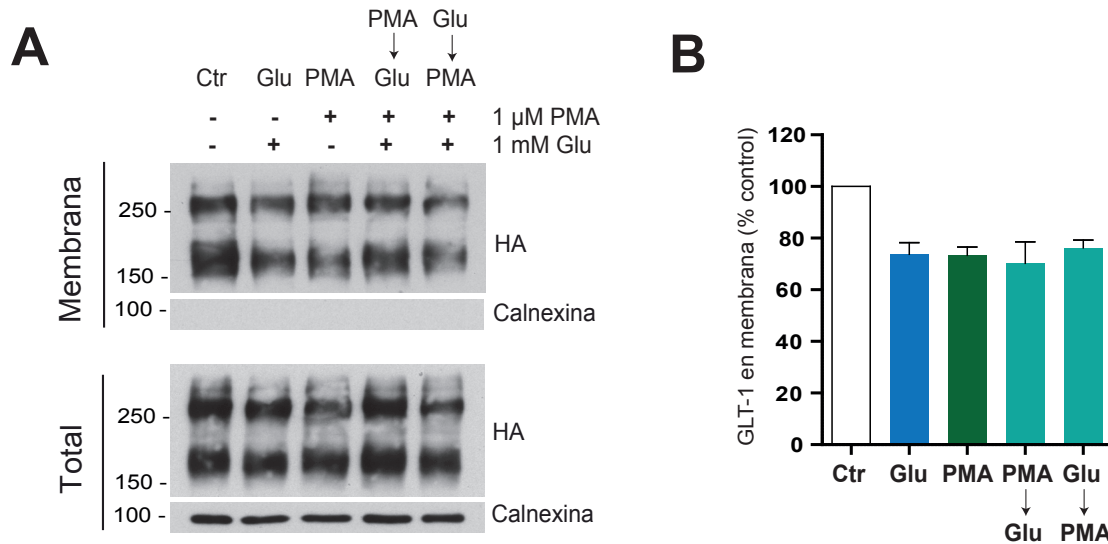


Figura 23. Internalización del transportador GLT-1 en respuesta a PMA y/o glutamato. (A) Células HEK293T transfectadas con HA-GLT1 fueron expuestas a tratamientos de 30 minutos con el vehículo (Ctr), 1 mM glutamato (Glu), 1 μM PMA (PMA), 1 μM PMA seguido de 1 mM glutamato (PMA→Glu), 1 mM glutamato seguido de 1 μM PMA (Glu→PMA). Las proteínas de la superficie celular fueron marcadas por biotilación y aisladas con estreptavidina-agarosa. El análisis de la inmunotransferencia se realizó con el anticuerpo anti-HA. La inmunodetección de Calnexina fue utilizada como control de la fracción no biotilada. (B) Representación gráfica del análisis densitométrico de la biotilación, expresada como porcentaje de variación respecto a la condición control. No se encontraron diferencias significativas entre los diferentes tratamientos.

1.8. El tratamiento con glutamato aumenta la unión entre Nedd4-2 y el transportador GLT-1

Estudios previos de nuestro laboratorio habían demostrado que la ubiquitina ligasa Nedd4-2 era la responsable de la ubiquitinación de GLT-1 tras la activación de PKC por ésteres de forbol (García-Tardón *et al.*, 2012). En células COS7, se había observado que Nedd4-2 coimmunoprecipitaba con el transportador, siendo esta asociación mayor en presencia de PMA. Por tanto, nos propusimos analizar el posible papel que desempeñaba esta ubiquitina ligasa en la ubiquitinación de GLT-1 dependiente de glutamato.

Para ello, se transfectaron células HEK293T con la construcción HA-GLT-1 y, tras ser tratadas con 1 mM glutamato durante 30 minutos, se solubilizaron y se inmunoprecipitaron con el anticuerpo anti-HA. Al revelar la inmunotransferencia con el anticuerpo anti-Nedd4-2, se

observó que la ubiquitina ligasa coimmunoprecipitaba con GLT-1 en condiciones control, y que la interacción aumentaba al tratar las células con glutamato, sin que se apreciaran cambios en la proteína total del transportador ni de Nedd4-2 (**Fig.24**). Estos datos sugieren que Nedd4-2 podría ser la ubiquitina ligasa responsable de la ubiquitinación de GLT-1 en respuesta al glutamato.

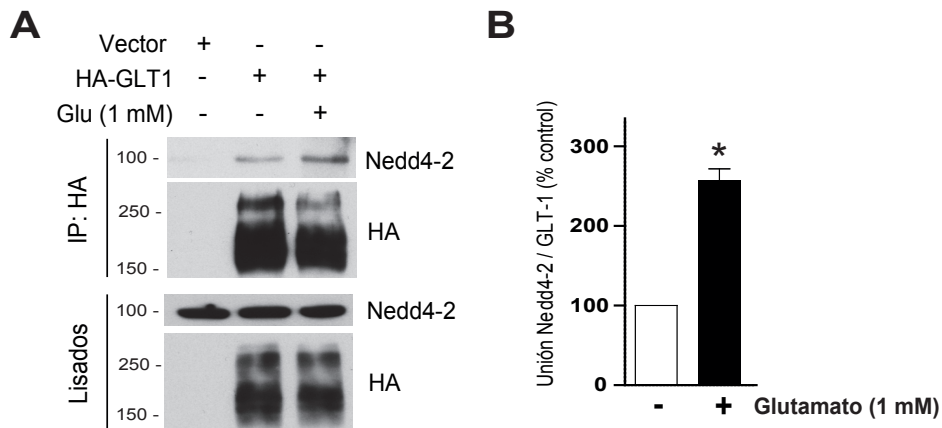


Figura 24. Análisis de la interacción entre GLT-1 y Nedd4-2 tras el tratamiento con glutamato. **(A)** Células HEK293T transfectadas con HA-GLT1 fueron incubadas en presencia o ausencia de 1 mM glutamato (Glu) durante 30 minutos a 37°C. Los lisados se inmunoprecipitaron con anti-HA (IP:HA). El análisis de la inmunotransferencia se llevó a cabo con los anticuerpos anti-HA y anti-Nedd4-2. **(B)** Representación gráfica de la unión entre Nedd4-2 y GLT-1, expresado como porcentaje respecto a la condición control. Los asteriscos indican diferencias significativas: *, $p < 0.05$.

2. Estudio funcional del complejo formado entre β -arrestina, Nedd4-2 y GLT-1

Como ya se ha comentado en el apartado 6.1 de Introducción, Nedd4-2 es una HECT ligasa que requiere motivos PY para unirse a la proteína diana. No obstante, se ha descrito la ubiquitinación por parte de esta ubiquitina ligasa de diferentes proteínas que carecen de dichos motivos, entre los que se encuentran GLT-1 y el transportador de dopamina DAT.

En el presente trabajo, se pretende estudiar el posible papel de las β -arrestinas como proteínas adaptadoras en la unión de Nedd4-2 y GLT-1.

2.1. Interacción entre β -arrestina y Nedd4-2

Estudios anteriores habían descrito la interacción entre las β -arrestinas y diferentes ubiquitina ligasas de la familia de Nedd4, como Nedd4-1 (Shenoy *et al.*, 2008) o Itch (Puca *et al.*, 2013). Así pues, con estos antecedentes, nos propusimos investigar la interacción entre Nedd4-2, β -arrestina-1 y β -arrestina-2.

Células HEK293T transfectadas con las construcciones Flag- β -arrestina-1 o Flag- β -arrestina-2 fueron solubilizadas e inmunoprecipitadas con anti-Nedd4-2 o con anti-Flag. Mediante su análisis por inmunotransferencia, se observó que ambas arrestinas coimmunoprecipitan con la ubiquitina ligasa Nedd4-2 endógena (Fig.25). Igualmente, se comprobó con la inmunoprecipitación inversa, es decir, de las β -arrestinas, la detección de Nedd4-2. Por tanto, Nedd4-2 interacciona con β -arrestina-1 y con β -arrestina-2.

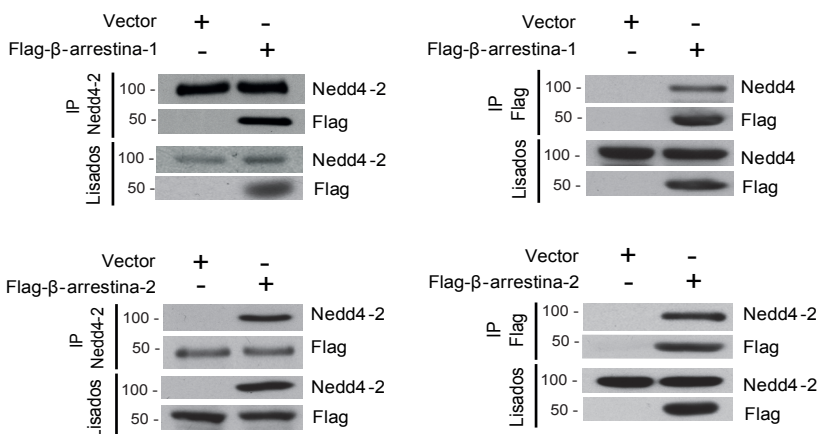


Figura 25. Estudio de la interacción entre Nedd4-2 y las β -arrestinas 1 y 2. Células HEK293 transfectadas con el vector control (pcDNA3), Flag- β -arrestina-1 o Flag- β -arrestina-2 fueron lisadas e inmunoprecipitadas con anti-Flag (IP:Flag) o anti-Nedd4-2 (IP:Nedd4-2). En el análisis de las inmunotransferencias se utilizaron los anticuerpos anti-Flag y anti-Nedd4-2.

2.2. Interacción entre β -arrestina y GLT-1

El siguiente paso fue el estudio de la interacción entre las β -arrestinas y GLT-1. Para ello se transfectaron células HEK293T con las construcciones HA-GLT-1 y Flag- β -arrestina-1 o Flag- β -arrestina-2. Tras la solubilización, los lisados se inmunoprecipitaron con anti-HA o anti-Flag. Tal y como se muestra en la **figura 26A**, mediante el revelado de las inmunotransferencias se observó interacción entre ambas β -arrestinas y el transportador, siendo detectada tanto en los inmunoprecipitados de GLT-1 como en el de las arrestinas.

Además, para comprobar este resultado en tejido nativo, se lisaron sinaptosomas purificados de la corteza cerebral de rata. En este caso, se inmunoprecipitó con un anticuerpo anti- β -arrestina-1 utilizando inmunoglobulinas G como control negativo. Al revelar con un anticuerpo anti-GLT-1, generado en nuestro laboratorio, se observó que el transportador coinmunoprecipitaba con la arrestina (**Fig.26B**).

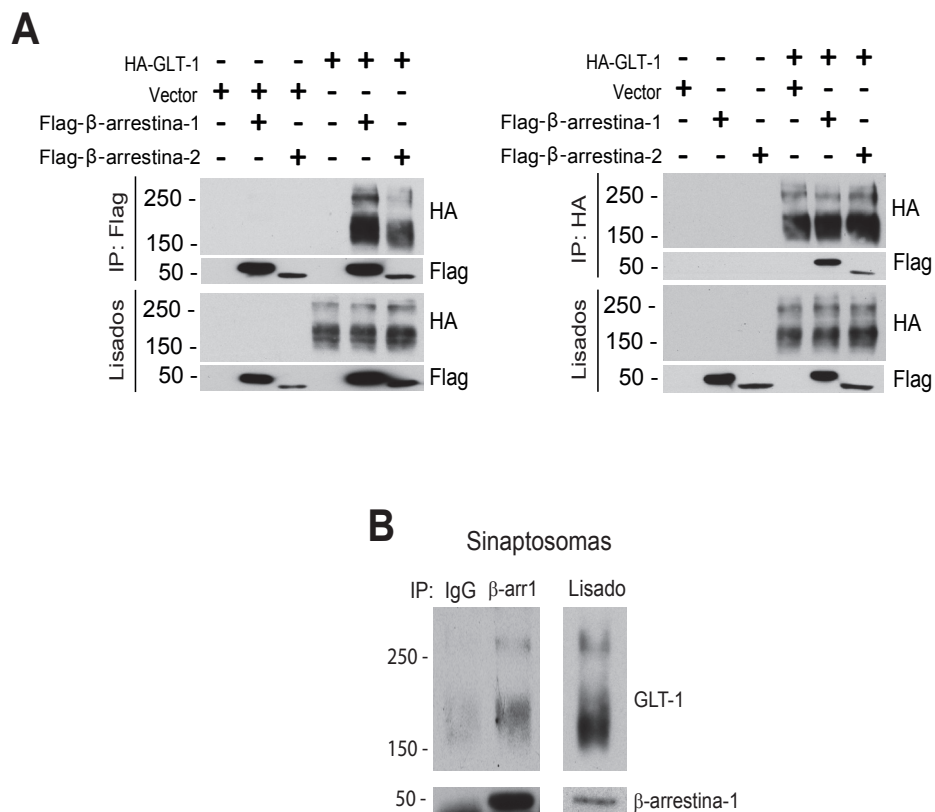


Figura 26. Estudio de la interacción entre GLT-1 y las β -arrestinas 1 y 2. **(A)** Células HEK293T transfectadas con el vector control (pcDNA3), Flag- β -arrestina-1 o Flag- β -arrestina-2, y/o HA-GLT-1 fueron lisadas e inmunoprecipitadas con anti-Flag (IP:Flag) o anti-HA (IP:HA). En el análisis de las inmunotransferencias se utilizaron los anticuerpos anti-Flag y anti-HA. **(B)** Sinaptosomas corticales de rata fueron lisados e inmunoprecipitados con anti-IgG (IgG) o anti- β -arrestina-1 (β -arr1). La inmunotransferencia se analizó con los anticuerpos anti-GLT-1 y anti- β -arrestina-1.

2.3. Las β -arrestinas condicionan la unión de GLT-1 y Nedd4-2

Una vez demostrada la existencia de una interacción entre Nedd4-2, GLT-1 y las β -arrestinas, resultó lógico plantearse el papel de las arrestinas como proteínas adaptadoras. Con ese fin, nos propusimos estudiar la dependencia de las β -arrestinas en la unión del transportador y la ubiquitina ligasa.

2.3.1. La sobreexpresión de las β -arrestinas favorece la unión de GLT-1 y Nedd4-2

En primer lugar, decidimos estudiar el efecto de la sobreexpresión de las β -arrestinas en células HEK293T transfectadas con HA-GLT-1. La inmunoprecipitación de los lisados con anti-Nedd4-2 y el revelado de la inmunotransferencia con anti-HA mostró que la sobreexpresión de Flag- β -arrestina-1 o Flag- β -arrestina-2 aumentaba la coinmunoprecipitación de GLT-1 y Nedd4-2 (**Fig.27**). Es decir, la presencia de las β -arrestinas favorece la unión entre las dos proteínas.

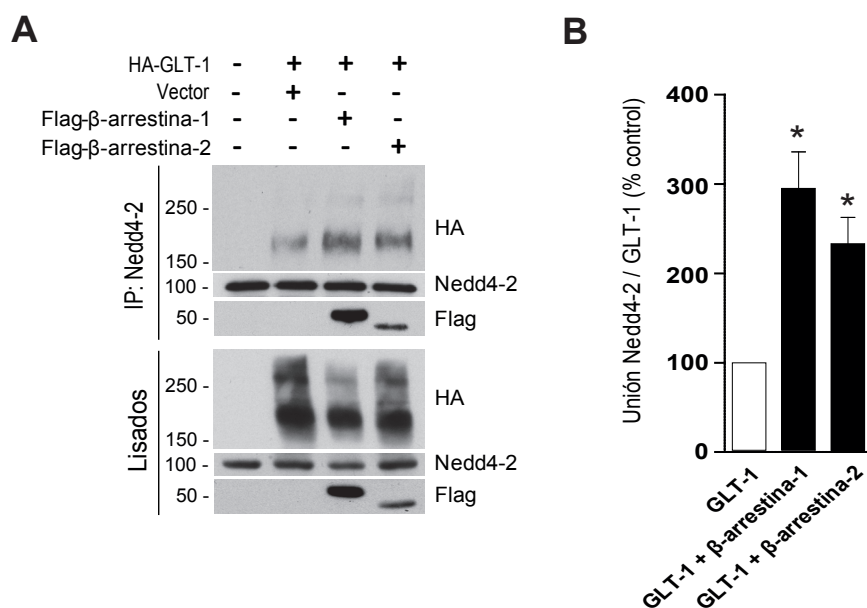


Figura 27. Estudio de la influencia de las β -arrestinas en la interacción entre GLT-1 y Nedd4-2. (A) Células HEK293 cotransfectadas con HA-GLT-1 y con el vector control (pcDNA3), Flag- β -arrestina-1 o Flag- β -arrestina-2, fueron lisadas e inmunoprecipitadas con anti-Nedd4-2 (IP:Nedd4-2). En el análisis de la inmunotransferencia se utilizaron los anticuerpos anti-Nedd4-2, anti-HA y anti-Flag. (B) Representación gráfica de la unión entre Nedd4-2 y GLT-1, expresado como porcentaje respecto a la condición control. Los asteriscos indican diferencias significativas: *, $p < 0.05$.

2.3.2. La ausencia de β -arrestina-1 disminuye la unión de GLT-1 a Nedd4-2

Con los resultados obtenidos, decidimos, por cuestiones técnicas, utilizar la proteína β -arrestina-1 como modelo de estudio en la caracterización de la función de las β -arrestinas como proteínas adaptadoras de la ubiquitinación de GLT-1.

Para confirmar el resultado anterior, se recurrió al análisis de la interacción del transportador y la ubiquitina ligasa tras la reducción de la expresión endógena de β -arrestina-1 mediante el uso de un ARN de interferencia específico (siRNA; del inglés *small interfering RNA*). En efecto, se observó cómo la disminución de la expresión de β -arrestina-1 en células HEK293T transfectadas con HA-GLT-1 se traducía en una menor unión entre Nedd4-2 y el transportador, respecto al control (**Fig.28**). De modo similar a lo obtenido en el caso anterior, este resultado demostró el papel de la β -arrestina-1 como proteína adaptadora en la interacción entre GLT-1 y Nedd4-2.

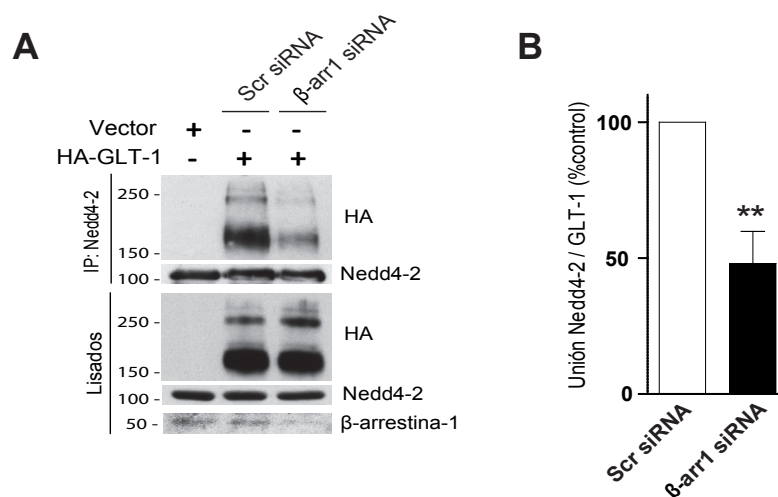


Figura 28. Estudio de la dependencia de β -arrestina-1 en la interacción entre GLT-1 y Nedd4-2. (A) Células HEK293 fueron transfectadas con el vector control (pcDNA3) o HA-GLT-1, y con un ARN de interferencia de β -arrestina-1 (β -arr1 siRNA) o control (Scr siRNA). Los lisados se inmunoprecipitaron con anti-Nedd4-2 (IP:Nedd4-2). En el análisis de la inmunotransferencia se utilizaron los anticuerpos anti-Nedd4-2, anti-HA y anti- β -arrestina-1. (B) Representación gráfica de la unión entre Nedd4-2 y GLT-1, expresado como porcentaje respecto a la condición control. Los asteriscos indican diferencias significativas: **, $p < 0.01$.

2.3.3. La sobreexpresión de β -arrestina-1 aumenta la ubiquitinación de GLT-1

Una vez más, para reforzar los resultados obtenidos, se procedió a analizar la influencia de β -arrestina-1 en la ubiquitinación de GLT-1 mediada por Nedd4-2. Con ese fin, se cotransfectaron células HEK293T con HA-GLT-1 y con Flag- β -arrestina-1 y/o Flag-Nedd4-2. Tras ser solubilizadas, las muestras se incubaron en condiciones desnaturizantes (1% SDS, 95°C) durante 10 minutos y se inmunoprecipitaron con el anticuerpo anti-HA. El revelado de la inmunotransferencia con anti-ubiquitina mostró un aumento en la ubiquitinación de GLT-1 en presencia de Flag- β -arrestina (Fig.29). Además, en las condiciones en las que Nedd4-2 era sobreexpresada, la arrestina también favorecía la ubiquitinación del transportador.

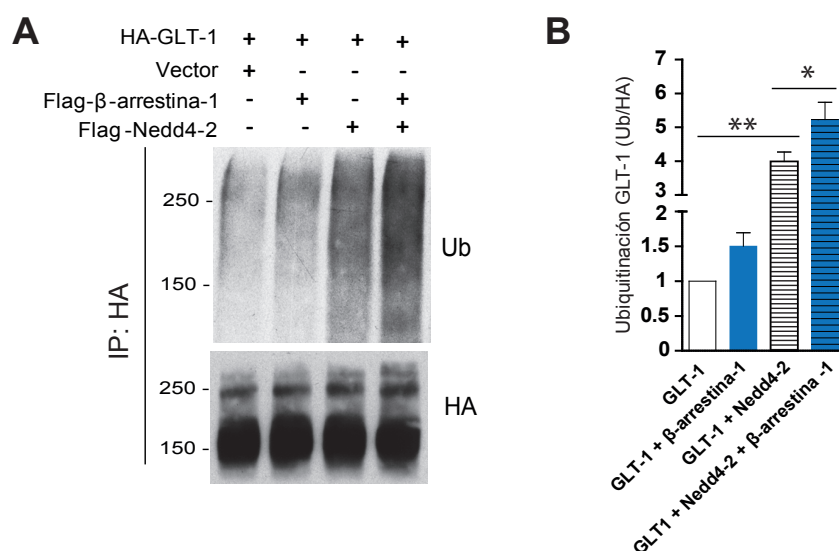


Figura 29. Efecto de la sobreexpresión de β -arrestina-1 y Nedd4-2 en la ubiquitinación de GLT-1. (A) Células HEK293 fueron cotransfectadas con HA-GLT-1 y con el vector control (pcDNA3), Flag- β -arrestina-1 y/o Flag-Nedd4-2, tal y como se indica. Los lisados, obtenidos en condiciones desnaturizantes, se inmunoprecipitaron con anti-HA (IP:HA). En el análisis de la inmunotransferencia se utilizaron los anticuerpos anti-ubiquitina (Ub) y anti-HA. (B) Representación gráfica de los niveles relativos de ubiquitinación de HA-GLT-1, normalizados y expresados respecto a la condición control. Los asteriscos indican diferencias significativas: *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$.

2.3.4. La sobreexpresión de β -arrestina-1 reduce la actividad del transporte de glutamato de GLT-1

A continuación quisimos profundizar sobre la relevancia funcional de la interacción de β -arrestina-1 y GLT-1. Para ello, transfectamos células HEK293T con HA-GLT-1, Flag- β -arrestina-1 y Flag-Nedd4-2, y analizamos la actividad del transportador mediante

ensayos de transporte con L-[³H]-Glutamato durante 10 minutos a 37°C. La sobreexpresión de Flag-β-arrestina-1 disminuye el transporte de GLT-1 en un 14.1±4.2%, mientras que la sobreexpresión de Flag-Nedd4-2 reduce la actividad del transportador hasta un 23.1±5% (Fig.30). La sobreexpresión de ambas proteínas no tiene un efecto mayor sobre el transporte de GLT-1 (reducción de la actividad de 23.2±5.6%).

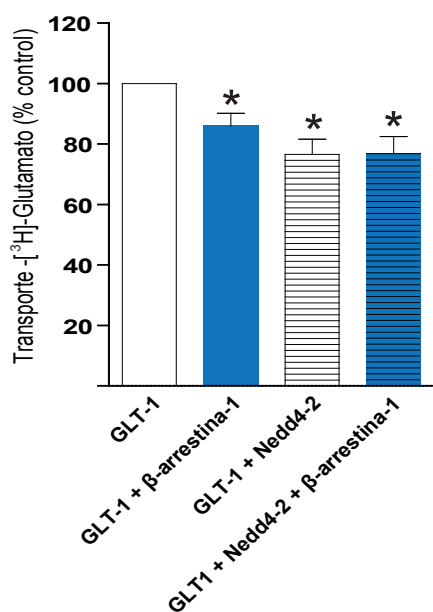


Figura 30. Análisis del efecto de la sobreexpresión de β-arrestina-1 en la actividad de transporte de GLT-1. Células HEK293 cotransfectadas con HA-GLT-1 y con el vector control (pcDNA3), Flag-β-arrestina-1 y/o Flag-Nedd4-2, fueron incubadas con L-[³H]-Glutamato durante 10 minutos a 37°C. Los resultados se presentan como el porcentaje de los valores control. Los asteriscos indican diferencias significativas: *, p < 0.05.

2.4. El complejo formado por β-arrestina-1 y GLT-1 es degradado en el lisosoma

Como se ha comentado anteriormente, la eliminación de las lisinas del extremo carboxilo de GLT-1 anula tanto el incremento de ubiquitinación como la endocitosis del transportador. Con el fin de estudiar la interacción entre el mutante GLT-1 7KR y β-arrestina-1, se transfectaron células HEK293T con Flag-β-arrestina-1, y HA-GLT-1 o HA-GLT1 7KR. Una vez lisadas e inmunoprecipitadas con anti-Flag, se analizó la coimmunoprecipitación del transportador revelando con el anticuerpo anti-HA. Como se aprecia en la figura 31A, el mutante GLT-1 7KR se une más a β-arrestina-1 que la forma nativa.

En primer lugar, pensamos que podría deberse a que este mutante presentase una mayor afinidad por β-arrestina-1, ya que la ausencia de ubiquitinación podría favorecer la unión

de la arrestina. Para comprobar esta hipótesis, realizamos un ensayo de *pull-down*. De este modo, se puede estudiar la unión de ambas proteínas independientemente de la dinámica del transportador en la célula. Se incubaron lisados de células HEK293T transfectadas con HA-GLT-1 o HA-GLT-1 7KR con la proteína de fusión GST- β -arrestina-1 y GST purificada. Una vez revelada la inmunotransferencia con anti-HA, se observó que la interacción del mutante y la forma nativa de GLT-1 con GST- β -arrestina-1 era similar (**Fig.31B**).

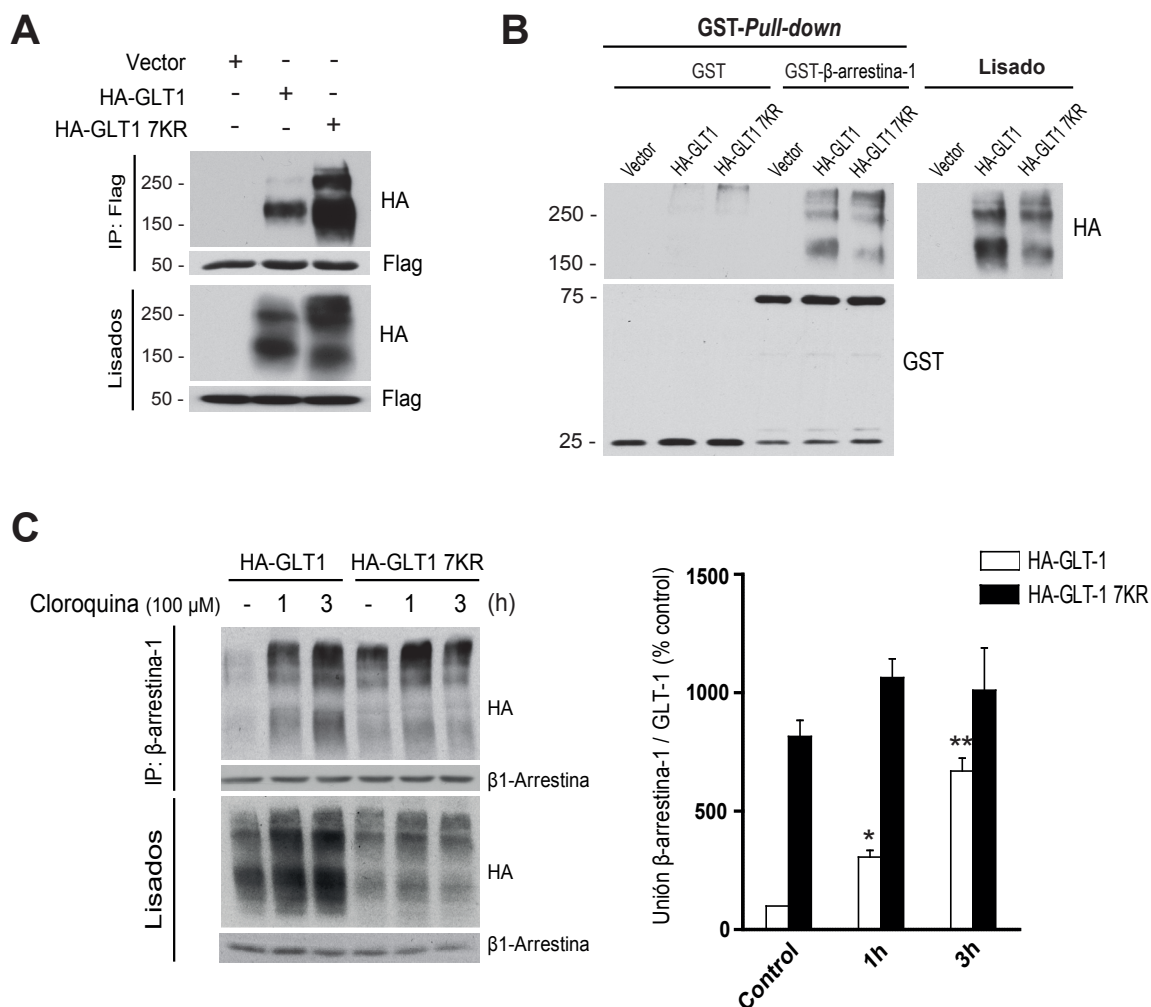


Figura 31. Estudio comparativo de la interacción entre β -arrestina-1 y GLT-1 o GLT-1 7KR. **(A)** Células HEK293 cotransfectadas con Flag- β -arrestina-1 y con el vector control (pcDNA3), HA-GLT-1 o HA-GLT-1 7KR fueron lisadas e inmunoprecipitadas con anti-Flag (IP:Flag). La inmunotransferencia fue analizada con los anticuerpos anti-HA y anti-Flag. **(B)** Ensayo *pull-down* con lisados de células HEK293T transfectadas con el vector control (pcDNA3), HA-GLT-1 o HA-GLT-1 7KR. Los extractos fueron incubados con GST o GST- β -arrestina-1. El análisis de la inmunotransferencia fue realizada con el anticuerpo anti-HA y anti-GST. **(C)** Células HEK293T tranfectadas con HA-GLT-1 o HA-GLT-1 7KR fueron incubadas con 100 μ M Cloroquina durante 1 o 3 horas a 37°C. Los lisados se inmunoprecipitaron con el anticuerpo anti- β -arrestina-1 y la inmunotransferencia se analizó con anti-HA y anti- β -arrestina-1. En el panel derecho, se representa la unión de β -arrestina-1 y GLT-1, normalizado respecto a la condición control (GLT-1 sin tratamiento). Los asteriscos indican diferencias significativas: *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$.

Una vez descartadas las diferencias en la afinidad del neurotransportador por la arrestina, nos planteamos la posibilidad de que el aumento de unión observado se debiera a que el complejo entre β -arrestina-1 y GLT-1 7KR fuese más estable, puesto que el mutante no se degrada por ubiquitinación. Trabajos anteriores de otros laboratorios han descrito que la degradación de GLT-1 tras la endocitosis inducida por PMA es bloqueada por inhibidores del lisosoma, como la cloroquina o el cloruro amónico (Susarla y Robinson, 2008). Empleando esta aproximación, células HEK293T transfectadas con HA-GLT-1 o HA-GLT-1 7KR fueron tratadas con 100 μ M de cloroquina durante 1 y 3 horas a 37°C. Posteriormente, se inmunoprecipitaron los lisados con anti- β -arrestina-1 y la inmunotransferencia se reveló con anti-HA. La **figura 31C** muestra cómo la inhibición lisosomal aumenta gradualmente la coinmunoprecipitación de GLT-1 nativo con β -arrestina. En cambio, la interacción de GLT-1 7KR con la arrestina también tiende a aumentar, pero no de una manera significativa. Cabe destacar el hecho de que los niveles de unión de GLT-1 y β -arrestina-1 tras 3 horas de tratamiento con cloroquina son comparables a la asociación en condiciones basales del mutante GLT-1 KR7 y la arrestina.

En conjunto, estos resultados demuestran la dependencia de la ubiquitinación del carboxilo terminal de GLT-1 en la degradación lisosomal de los complejos formados por β -arrestina-1 y el transportador. Además, pone en evidencia la inestabilidad de la unión, causada por la rápida degradación del transportador.

2.5. Ubiquitinación de β -arrestina-1 por Nedd4-2

La ubiquitinación de las arrestinas fue demostrada por primera vez por el grupo de Lefkowitz en el año 2001 (Shenoy *et al.*, 2001). β -arrestina-2 es ubiquitinada por la ubiquitina ligasa Mdm2, tras la activación de los receptores adrenérgicos β 2ARs. Desde entonces, se ha descrito la unión de las arrestinas a diferentes ubiquitina ligasas, sirviendo como proteínas adaptadoras en la ubiquitinación de receptores acoplados a proteínas G. No obstante, estas interacciones no parecen inducir la ubiquitinación de la arrestina (Bhandari *et al.*, 2007; Shenoy *et al.*, 2008; Ahmed *et al.*, 2011).

Para determinar si β -arrestina-1 era ubiquitinada por Nedd4-2, se transfectaron células HEK293T con GFP- β -arrestina-1 y Flag-Nedd4-2. Los lisados se obtuvieron en condiciones desnaturalizantes y se inmunoprecipitaron con el anticuerpo anti-GFP. A continuación se reveló la inmunotransferencia con anti-ubiquitina. La **figura 32A,B** muestra cómo la contranfección de β -arrestina-1 con la ubiquitina ligasa Nedd4-2 promueve de manera clara su ubiquitinación.

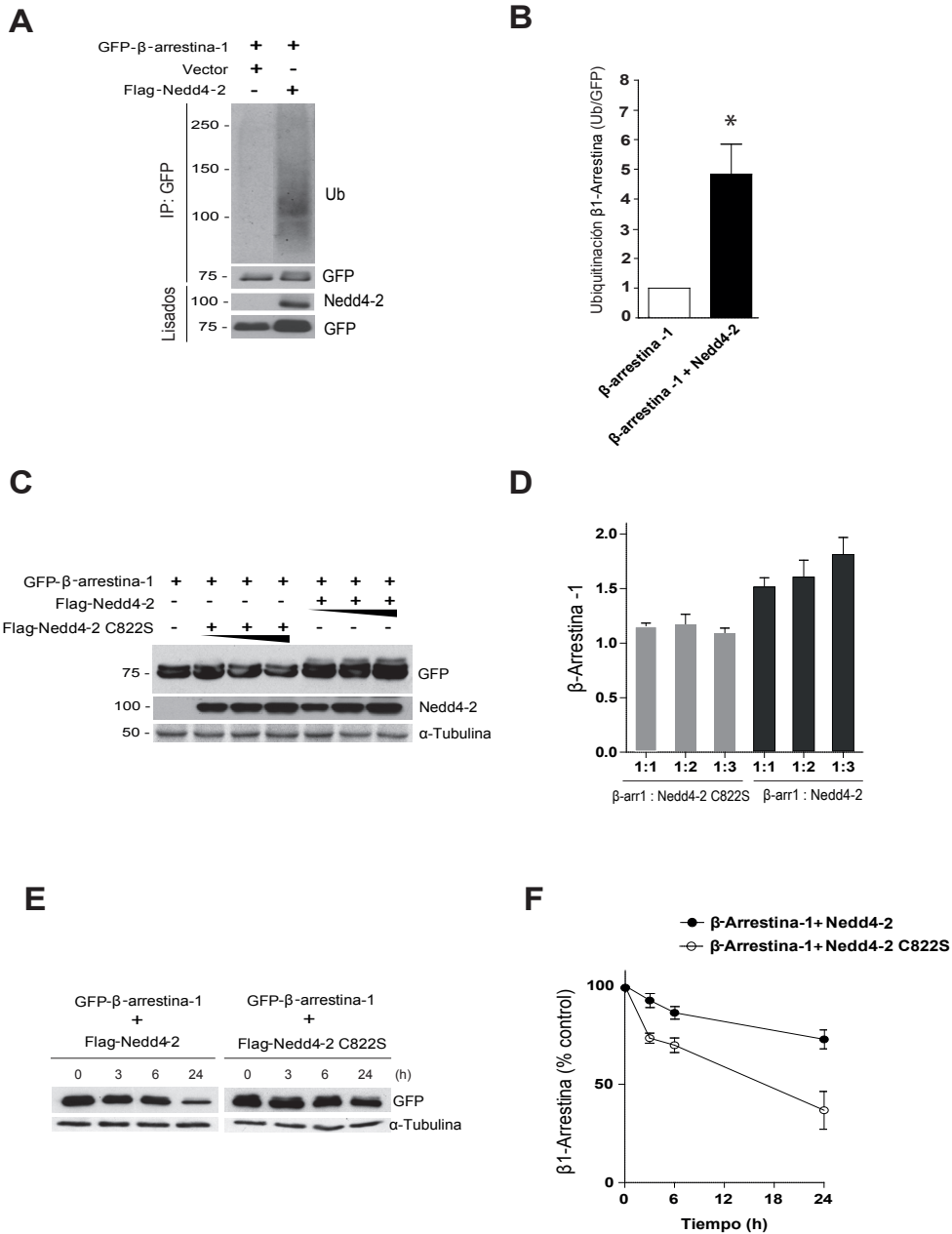


Figura 32. Estudio de la ubiquitinación de β-arrestina-1 mediada por Nedd4-2.

(A) Células HEK293T cotransfectadas con GFP-β1-arrestina y con el vector control (pcDNA3) o Flag-Nedd4-2 fueron lisadas en condiciones desnaturalizantes, e inmunoprecipitadas con el anticuerpo anti-GFP (IP:GFP). En el análisis de la inmunotransferencia, se utilizó anti-ubiquitina (Ub), anti-GFP y anti-Nedd4-2. (B) Representación gráfica de los niveles relativos de la ubiquitinación de β-arrestina-1, expresados respecto al control. Los asteriscos indican diferencias significativas: *, p < 0.05. (C) Células HEK293T fueron cotransfectadas con GFP-β1-arrestina y distintas relaciones de Flag-Nedd4-2 o Flag-Nedd4-2 C822S (1:1, 1:2, 1:3). La inmunotransferencia fue analizada con los anticuerpos anti-GFP, anti-Flag y anti-α-tubulina (control de carga). (D) Representación gráfica de los niveles relativos de β-arrestina-1, normalizados con su correspondiente control de carga. Los resultados están expresados respecto a la condición control. (E) Células HEK293T cotransfectadas con GFP-β1-arrestina y Flag-Nedd4-2 o Flag-Nedd4-2 C822S fueron tratadas con 25 μM Cicloheximida durante 3, 6 o 24 horas a 37°C. La inmunotransferencia fue analizada mediante los anticuerpos anti-GFP y anti-α-tubulina (control de carga). (F) Representación gráfica de los niveles relativos de β-arrestina-1, normalizados con su correspondiente control de carga, y expresados como porcentaje de la condición control (sin tratamiento).

En los experimentos de ubiquitinación se observaba de manera sistemática que la cantidad total de β -arrestina-1 era mayor en aquellas condiciones en las que había sobreexpresión de Nedd4-2 (por ejemplo, lisados de **figura 32A**). Por ello, nos propusimos profundizar en el efecto de la ubiquitinación en la estabilidad de β -arrestina-1. En primer lugar, transfectamos células HEK293T con GFP- β -arrestina-1 y concentraciones crecientes del plásmido Flag-Nedd4-2 o de su mutante inactivo Flag-Nedd4-2 C822S, y evaluamos los niveles de la arrestina transcurridas 48 horas de la transfección. En efecto, la sobreexpresión de la forma nativa de Nedd4-2 aumentó la cantidad de β -arrestina-1 en las células, mientras que la forma inactiva no afectó a los niveles de la proteína (**Fig.32C,D**). Sin embargo, este resultado no aclaraba si el aumento observado se debía a una acción sobre la síntesis de la proteína o sobre su degradación. Para resolver esta cuestión se utilizó cicloheximida, un agente inhibidor de la síntesis de proteínas, y se analizaron los niveles de β -arrestina-1 a distintos tiempos de incubación. Como se esperaba, la inhibición de la síntesis provocó la disminución progresiva de los niveles de la β -arrestina-1 (**Fig.32E,F**). Al cuantificar los niveles de la proteína, determinamos que, en presencia de la forma inactiva de Nedd4-2 la vida media de β -arrestina-1 era de 17.9 ± 3 horas, mientras que la cotransfección con Nedd4-2 aumentaba la vida media a 55.4 ± 9.6 horas. Estos datos indican que la ubiquitinación de β -arrestina-1 por Nedd4-2 aumenta la estabilidad de la proteína al disminuir su degradación.

2.6. La unión de β -arrestina-1 y GLT-1 es más estable en presencia de la forma activa de Nedd4-2

El siguiente paso fue estudiar el efecto de la ubiquitinación en la unión entre β -arrestina-1 y GLT-1. Células HEK293T transfectadas con HA-GLT-1 y con Flag-Nedd4-2 o su forma inactiva Flag-Nedd4-2 C822A fueron lisadas e inmunoprecipitadas con anti- β -arrestina-1. El análisis de la inmunotransferencia con el anticuerpo anti-HA reveló que la unión de β -arrestina-1 endógeno con GLT-1 aumentaba en presencia de la forma nativa de Nedd4-2 (**Fig.33**). Es decir, la ubiquitinación mediada por Nedd4-2 favorece la unión entre la arrestina y el transportador. No obstante, mediante este abordaje no se pudo discriminar si el efecto observado se debe a la ubiquitinación de la arrestina o del transportador.

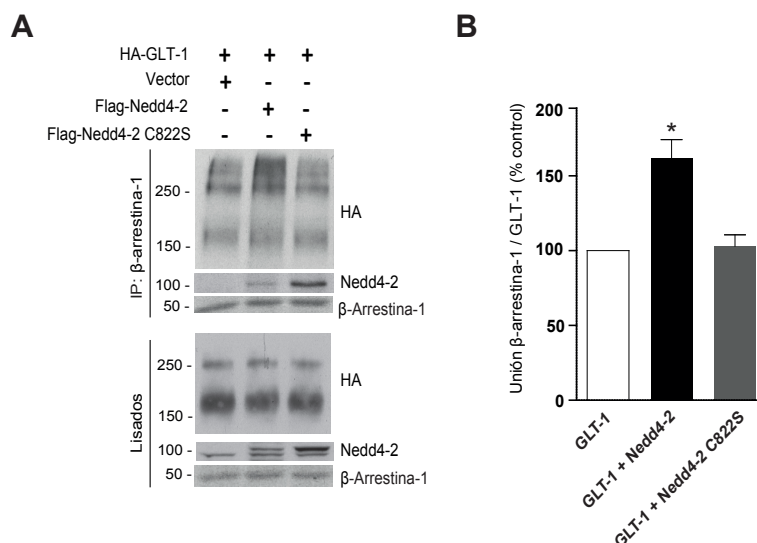


Figura 33. Efecto de la ubiquitinación mediada por Nedd4-2 en la interacción entre GLT-1 y β -arrestina-1. (A) Células HEK293T cotransfectadas con HA-GLT-1 y con el vector control (pcDNA3), Flag-Nedd4-2 o Flag-Nedd4-2 C822S fueron lisadas e inmunoprecipitadas con el anticuerpo anti- β -arrestina-1 (IP: β -arrestina-1). En el análisis de la inmunotransferencia, se utilizó anti-HA, anti- β -arrestina-1 y anti-Nedd4-2. (B) Representación gráfica de la unión entre β -arrestina-1 y GLT-1, normalizado respecto a la condición control. Los asteriscos indican diferencias significativas: *, $p < 0.05$.

2.7. Papel de β -arrestina-1 en la regulación de GLT-1 mediada por glutamato

Hasta el momento, se ha demostrado que β -arrestina-1 actúa como una proteína adaptadora en la interacción entre la ubiquitina ligasa Nedd4-2 y GLT-1, desencadenando la ubiquitinación y la endocitosis del transportador. Partiendo de estos resultados nos propusimos estudiar el posible papel de β -arrestina-1 en la regulación de GLT-1 mediada por glutamato.

2.7.1. Aumento de unión de β -arrestina-1 a GLT-1 tras el tratamiento con glutamato

Como se puso en evidencia en el experimento descrito en el apartado 1.8, la interacción de Nedd4-2 con el transportador GLT-1 aumenta tras el tratamiento con glutamato. Con el fin de investigar el papel de β -arrestina-1 en dicha unión, utilizamos un abordaje experimental similar: células HEK293T se transfectaron con HA-GLT1 y GFP- β -arrestina-1 y se sometieron a un tratamiento con 1 mM glutamato durante 30 minutos. Los lisados obtenidos tras la solubilización se inmunoprecipitaron con el anticuerpo anti-HA. Al revelar la inmunotransferencia con anti-GFP, se observó que, efectivamente, β -arrestina-1 se unía más fuertemente al transportador en presencia de glutamato (Fig.34). Además, al revelar con el anticuerpo anti-Nedd4-2 confirmamos el aumento de la interacción de Nedd4-2 con GLT-1.

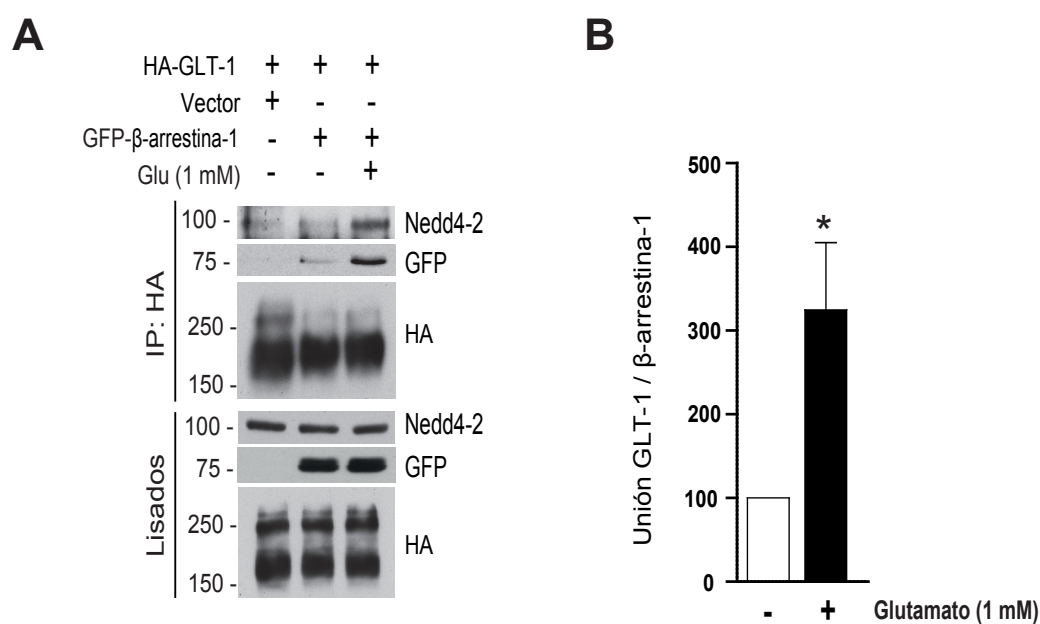


Figura 34. Análisis de la interacción entre GLT-1 y β -arrestina-1 tras el tratamiento con glutamato. (A) Células HEK293T cotransfectadas con HA-GLT-1 y con el vector control (pEGFP) o GFP- β -arrestina-1 fueron incubadas con 1mM glutamato durante 30 minutos. Los lisados se inmunoprecipitaron con el anticuerpo anti-HA (IP:HA). La inmunotransferencia fue analizada con los anticuerpos anti-HA, anti-Nedd4-2 y anti-GFP. (B) Representación gráfica de la unión entre β -arrestina-1 y GLT-1, expresado como porcentaje respecto a la condición control. Los asteriscos indican diferencias significativas: *, $p < 0.05$.

2.7.2. Ubiquitinación de β -arrestina-1 por glutamato

Tal y como se ha comentado anteriormente, estudios previos habían demostrado que la activación de los receptores β 2-ARs provocaba un aumento en la ubiquitinación de β -arrestina-2. Por ello, decidimos analizar los niveles de ubiquitinación de β -arrestina-1 tras la incubación con glutamato (20 minutos) en células HEK293T transfectadas con GFP- β -arrestina-1 y HA-GLT1. Como control se utilizaron células transfectadas sólo con la arrestina. Como se observa en la [figura 35](#), el tratamiento con glutamato aumentó la ubiquitinación de β -arrestina-1 en las células que expresaban también el transportador, lo que parece indicar un efecto específico del transporte de glutamato mediado por GLT-1 en el incremento de la ubiquitinación de β -arrestina-1.

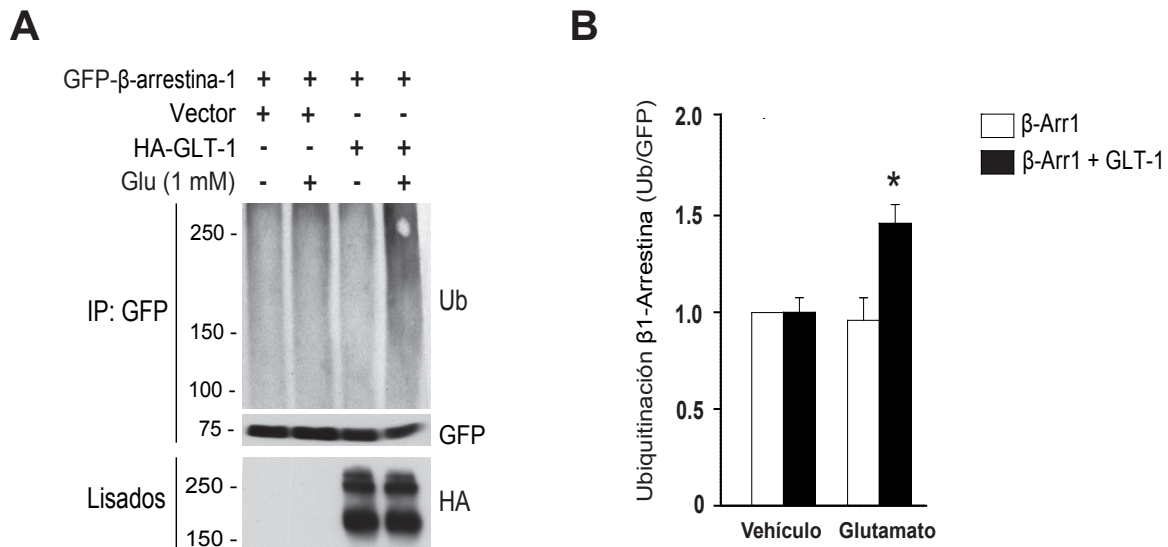


Figura 35. Ubiquitinación de β-arrestina-1 tras el tratamiento con glutamato. (A) Células HEK293T cotransfectadas con GFP-β-arrestina-1 y el vector (pcDNA3) o HA-GLT-1 fueron incubadas con 1 mM glutamato durante 30 minutos. Los lisados, obtenidos en condiciones desnaturalizantes, se inmunoprecipitaron con el anticuerpo anti-GFP (IP:GFP). En el análisis de la inmunotransferencia se utilizó los anticuerpos anti-Ubiquitina (Ub), anti-HA, y anti-GFP. (B) Representación gráfica de los niveles relativos de ubiquitinación de β-arrestina-1, expresados respecto a la condición control. Los asteriscos indican diferencias significativas: *, p < 0.05.

2.7.2. Disminución de la internalización mediada por glutamato en ausencia de β-arrestina-1

Finalmente, para completar el estudio sobre la función de β-arrestina-1 en la regulación de GLT-1 mediada por glutamato, transfectamos células HEK293T con GLT-1 y con un ARN de interferencia específico para β-arrestina-1 o con un ARN control (*scrambled*). El marcaje de las proteínas de membrana mediante biotilación mostró que la reducción de la expresión de β-arrestina-1 disminuía de manera significativa la internalización de GLT-1 inducida por el tratamiento de glutamato (Fig.36).

En resumen, estos datos demuestran la importancia de β-arrestina-1 en la regulación de GLT-1 dependiente de actividad.

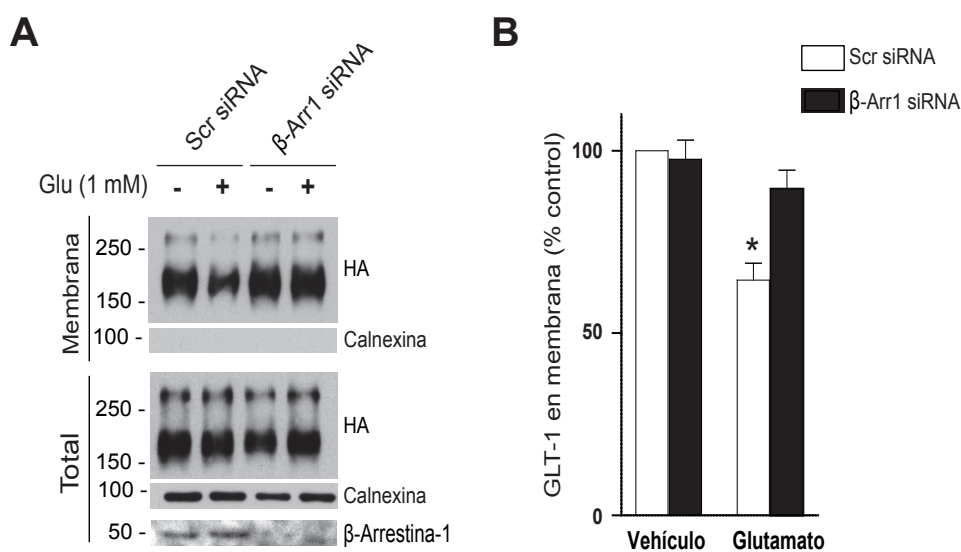


Figura 36. Estudio de la dependencia de β -arrestina-1 en la internalización de GLT-1 mediada por glutamato. (A) Células HEK293T transfectadas con HA-GLT-1 y un ARN de interferencia de β -arrestina-1 (β -arr1 siRNA) o control (Scr siRNA), fueron incubadas con 1 mM glutamato durante 30 minutos a 37°C. Los lisados se inmunoprecipitaron con el anticuerpo anti-HA (IP:HA). En el análisis de la inmunotransferencia, se utilizaron los anticuerpos anti-HA, anti-Calnexina y anti- β -arrestina-1. (B) Representación gráfica del análisis densitométrico de la biotinilación, expresada como porcentaje de variación respecto a la condición control. Los asteriscos indican diferencias significativas: *, $p < 0.05$.

2.8. β -arrestina-1 en la regulación de GLT-1 mediada por PKC

Asimismo, teniendo en cuenta resultados previos de nuestro laboratorio que demostraban la implicación de la ubiquitina ligasa Nedd4-2 en la internalización de GLT1 activada por PKC, decidimos comprobar si β -arrestina-1 también intervenía en el proceso.

2.8.1. Aumento de unión de β -arrestina-1 a GLT-1 con PMA

De manera similar al abordaje realizado en el apartado anterior, se transfectaron células HEK293T con HA-GLT-1 y GFP- β -arrestina-1 y se trataron con 1 μ M PMA durante 20 minutos. Los lisados se sometieron a inmunoprecipitación con el anticuerpo anti-HA y las inmunotransferencias se revelaron con anti-GFP. Los resultados indican que la activación de PKC incrementa la unión de GFP- β -arrestina-1 al transportador (Fig.37). Por tanto, esto confirma la implicación de la arrestina en la regulación de GLT-1 dependiente de la interacción con Nedd4-2.

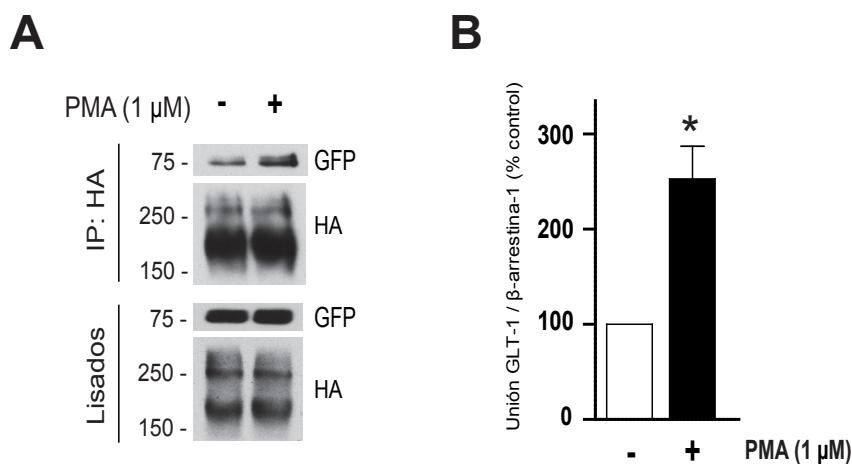


Figura 37. Análisis de la interacción entre GLT-1 y β-arrestina-1 tras el tratamiento con PMA.

(A) Células HEK293T transfectadas con HA-GLT1 y GFP-β-arrestina-1 fueron incubadas en presencia o ausencia de 1 μM PMA durante 30 minutos a 37°C. Los lisados se inmunoprecipitaron con anti-HA (IP:HA). El análisis de la inmunotransferencia se llevó a cabo con los anticuerpos anti-HA y anti-GFP. **(B)** Representación gráfica de la unión entre β-arrestina-1 y GLT-1, expresado como porcentaje respecto a la condición control. Los asteriscos indican diferencias significativas: *, $p < 0.05$.

2.8.2. Colocalización entre GLT-1 y β-arrestina-1

Para finalizar, quisimos estudiar la localización celular de los complejos formados por el transportador GLT-1 y β-arrestina-1. Con ese fin, transfectamos células MDCK con HA-GLT-1 y GFP-β-arrestina-1 o GFP como control. A continuación se fijaron las células con 4% paraformaldehído y se marcaron con el anticuerpo anti-HA y un anticuerpo secundario conjugado al fluoróforo *Alexa-594*. En las células que expresan solo el transportador se observa que el marcaje se encuentra principalmente en la membrana plasmática, con algunas vesículas positivas para GLT-1 (**Fig.38**). En estas células, GFP se expresa de manera homogénea por el citosol sin existir colocalización con el transportador (Coeficiente de correlación de Pearson = 0.23 ± 0.03). Por otro lado, las células que expresan GFP-β-arrestina-1 presentan un mayor número de vesículas positivas para HA-GLT1, en las cuales también se encuentra presente la arrestina (Coeficiente de correlación de Pearson = 0.47 ± 0.025). La acumulación intracelular corresponde, por tanto, a complejos del transportador y la arrestina en vesículas de endocitosis.

Además, decidimos analizar la localización de GFP-β-arrestina-1 en células tratadas con ésteres de forbol. La activación de PKC por PMA (1 μM; 20 minutos) genera un claro patrón vesicular en la región perinuclear de HA-GLT-1. En las células que expresan también GFP-β-arrestina-1 se observa que la arrestina, a pesar de encontrarse distribuida por toda la célula, colocaliza con el transportador en las vesículas (Coeficiente de correlación de Pearson = 0.54 ± 0.028). Como en el caso anterior, estos resultados vuelven a poner de manifiesto la implicación de β-arrestina-1 en la regulación de GLT-1 por Nedd4-2.

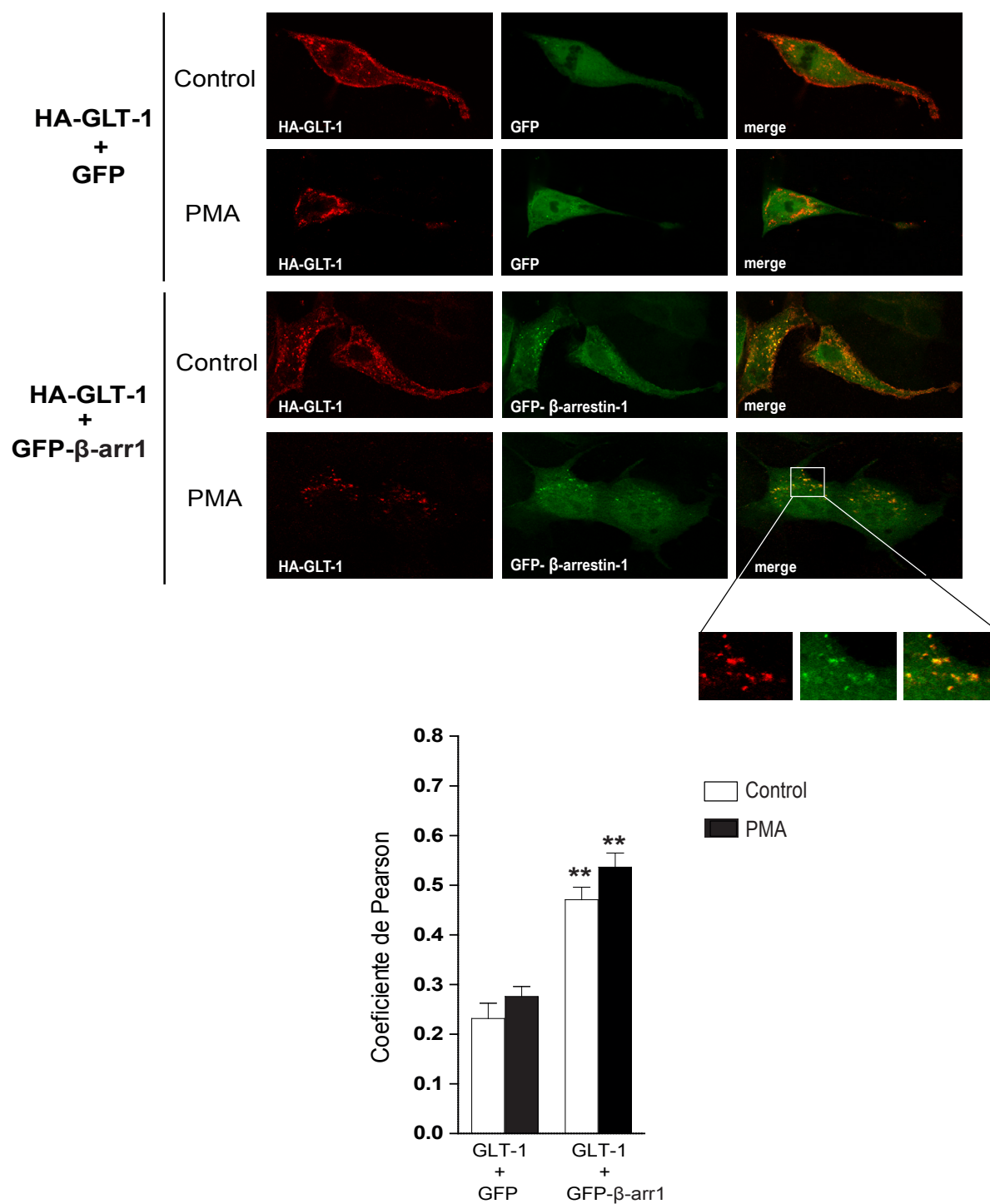


Figura 38. Estudio por inmunofluorescencia de la colocalización de GLT-1 y β -arrestina tras el tratamiento con PMA. Células MDCK cotransfectadas con HA-GLT-1 y GFP o con HA-GLT1 y GFP- β -arrestina-1 fueron tratadas con el vehículo o con 1 μ M PMA durante 30 minutos 37°C. Posteriormente, las células fueron fijadas con 4% paraformaldehído, permeabilizadas, y sometidas a inmunofluorescencia con el anticuerpo anti-HA y el secundario conjugado al fluoróforo *Alexa-594*. En el panel inferior, se representa el coeficiente de Pearson de las distintas condiciones (n=15). Los asteriscos indican diferencias significativas: **, p < 0.01.

3. Estudio del papel de las α -arrestinas en la interacción entre β -arrestina-1 y Nedd4-2

3.1. La interacción entre β -arrestina-1 y Nedd4-2 depende del dominio WW3

Como ya se ha comentado anteriormente, existen evidencias de la unión de β -arrestinas con diferentes ubiquitina ligasas. Sin embargo, en ningún estudio se ha determinado la región por la interaccionan ambas proteínas. Con el objetivo de profundizar un poco más en la interacción entre Nedd4-2 y β -arrestina-1, generamos una serie de formas truncadas de GST-Nedd4-2, tal y como se muestra en la [figura 39A](#).

Realizamos ensayos *pull-down*, incubando lisados de células HEK293T transfectadas con GFP- β -arrestina-1 con las proteínas purificadas de los mutantes de delección de GST-Nedd4-2. Mediante el revelado de la inmunotransferencia con el anticuerpo anti-GFP, se observó que la interacción de β -arrestina-1 con la ubiquitina ligasa se perdía en los mutantes de Nedd4-2 que carecían del dominio WW3 ([Fig.39B](#)). La presencia de la correspondiente proteína de fusión a GST se comprobó reprobando los inmunoblots con anti-GST, observándose en todos los casos una banda del tamaño correspondiente a cada mutante y varias bandas adicionales que presumiblemente corresponden a degradación parcial de la proteína de fusión.

Posteriormente, se generó un mutante de GST-Nedd4-2 denominado GST-9 con mutaciones puntuales en los residuos esenciales para la unión al dominio WW3: W405Y/P408A. El ensayo *pull-down* de extractos de células transfectadas con GFP- β -arrestina-1 y la proteína purificada de GST-Nedd4-2 nativa o la forma mutada GST-9, demostró que la unión se produce principalmente a través del dominio WW3 funcional, ya que el mutante apenas interacciona con β -arrestina-1 ([Fig.39C](#)).

Además, se realizaron ensayos *pull-down* utilizando extractos de células HEK293T transfectadas con HA-GLT-1, los cuales se incubaron con GST-Nedd4-2 o GST-9. Al igual que ocurría en el caso anterior, la unión de Nedd4-2 al transportador prácticamente se pierde con el mutante del dominio WW3 ([Fig.39C](#)).

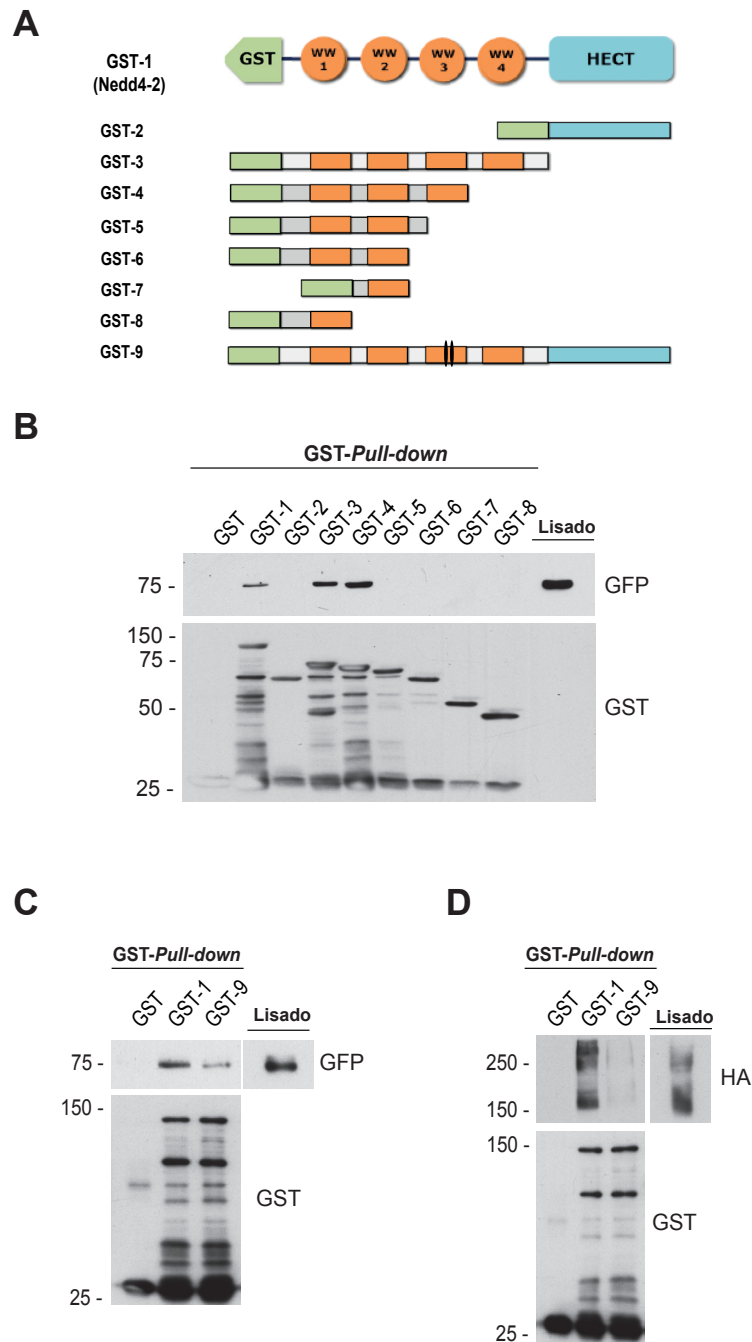


Figura 39. Análisis de la interacción entre β -arrestina-1 y mutantes de Nedd4-2. (A) Representación esquemática de los mutantes de GST-Nedd4-2 utilizados en ensayos *pull-down*. **(B)** Ensayo *pull-down* con lisados de células HEK293T transfectadas con el GFP- β -arrestina-1. Los extractos fueron incubados con las proteínas fusión GST indicadas. El análisis de la inmunotransferencia fue realizada con los anticuerpos anti-GFP y anti-GST. **(C,D)** Ensayo *pull-down* con lisados de células HEK293T transfectadas con GFP- β -arrestina 1 (C) o HA-GLT-1 (D). Los extractos se incubaron con GST, GST-1 o GST-9. La inmunotransferencia fue analizada con los anticuerpos anti-GFP (C), anti-HA (D) y anti-GST (C,D).

3.2. La interacción de β -arrestina-1 y Nedd4-2 es indirecta

La importancia del dominio WW3 en la interacción entre Nedd4-2 y el complejo β -arrestina-1/GLT-1 sugiere la existencia de una proteína que contenga un motivo PY, necesario para el reclutamiento de Nedd4-2. Sin embargo, ni GLT-1 ni β -arrestina-1 contiene dicho motivo, lo que parece indicar que la interacción observada en los ensayos *pull-down* podría ser indirecta, y en la que podrían estar participando proteínas adicionales.

Por ello, decidimos estudiar la posible implicación de las α -arrestinas. Como candidato de estudio, elegimos a α -arrestina-1 ya que se localiza principalmente en la membrana plasmática y existen evidencias de su oligomerización con β -arrestina-1 en procesos de tráfico intracelular mediados por ubiquitinación, además de presentar un motivo PY (Puca *et al*, 2013).

Con el fin de analizar la unión directa entre dos proteínas, evitando las interferencias derivadas de las posibles proteínas adaptadoras expresadas de manera endógena y presentes en los lisados celulares de HEK293T, realizamos la síntesis *in vitro* de la proteína α -arrestina-1 y β -arrestina-1, tal y como se explica en el **apartado 13 de Material y Métodos**. El producto marcado con azufre radioactivo (^{35}S) fue utilizado en un ensayo *pull-down*, incubándolo con GST-Nedd4-2 o GST como control. La autorradiografía mostró que, mientras α -arrestina-1 interaccionaba con GST-Nedd4-2, no se detectó unión de β -arrestina-1 (**Fig.40**), indicando que la interacción entre Nedd4-2 y β -arrestina-1 es indirecta.

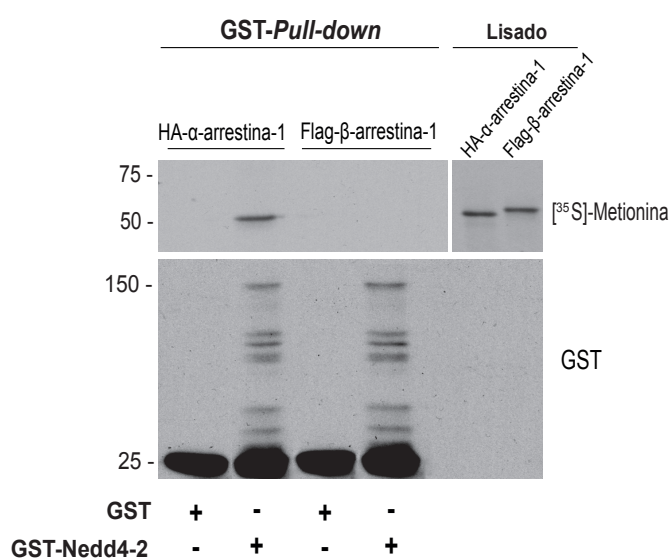


Figura 40. Estudio de la interacción directa entre Nedd4-2 y las arrestinas β -arrestina-1 y α -arrestina-1. Ensayo *pull-down* de la proteína fusión GST o GST-Nedd4-2, las cuales fueron incubadas con los extractos de reticulocito de conejo usados en la síntesis *in vitro* de HA- α -arrestina-1 o Flag- β -arrestina-1. Las bandas corresponden al marcaje de las arrestinas con [^{35}S], visualizadas por autorradiografía. La inmunotransferencia fue analizada mediante el anticuerpo anti-GST.

3.3. α -arrestina-1 interacciona con Nedd4-2

Mediante la técnica de doble híbrido en levadura se ha conseguido demostrar la interacción de α -arrestinas con varios miembros de la familia HECT de ubiquitina ligasas como WWP1, WWP2, Nedd4 o Itch (Rauch y Martin-Serrano, 2011). No obstante, hay pocos estudios que hayan validado estas interacciones mediante experimentos de co-inmunoprecipitación.

Una vez puesto de manifiesto la unión directa entre Nedd4-2 y α -arrestina-1 *in vitro*, quisimos reforzar los resultados obtenidos en un sistema celular. Para ello, se lisaron células HEK293T transfectadas con GFP- α -arrestina-1 y se inmunoprecipitó con los anticuerpos anti-GFP o anti-Nedd4-2. De modo similar al resultado anterior, al revelar la inmunotransferencia observamos que ambas proteínas interaccionan, ya que co-inmunoprecipitan tanto en los inmunoprecipitados de α -arrestina-1 como en los de Nedd4-2 (**Fig.41A**).

Las proteínas α -arrestinas presentan dominios PY en su carboxilo terminal, mediante el cual interaccionan con las ubiquitina ligasas de la familia HECT. Para comprobarlo, generamos un mutante truncado de α -arrestina-1 que carecía de los dominios PY (α -arrestina-1- Δ PY). Ensayos *pull-down* de extractos de HEK293T transfectados con GFP- α -arrestina-1 o GFP- α -arrestina-1- Δ PY fueron incubados con GST-Nedd4-2. El revelado de la inmunotransferencia con anti-GFP mostró que, en efecto, la unión de la ubiquitina ligasa a α -arrestina-1 se perdía totalmente al eliminar los dominios PY (**Fig.41B**).

Finalmente, analizamos la posible ubiquitinación de α -arrestina-1 por parte de Nedd4-2. Células HEK293T transfectadas con GFP- α -arrestina-1a o GFP- α -arrestina-1- Δ PY, y Flag-Nedd4-2, fueron lisadas y los extractos celulares se inmunoprecipitaron con el anticuerpo anti-GFP. Al revelar con el anticuerpo anti-ubiquitina se observó que α -arrestina-1 era claramente ubiquitinada por Nedd4-2 (**Fig.41C**). Además, se comprobó la importancia de los motivos PY en la unión de la ubiquitina ligasa, ya que el mutante no era ubiquitinado al sobreexpresar Nedd4-2.

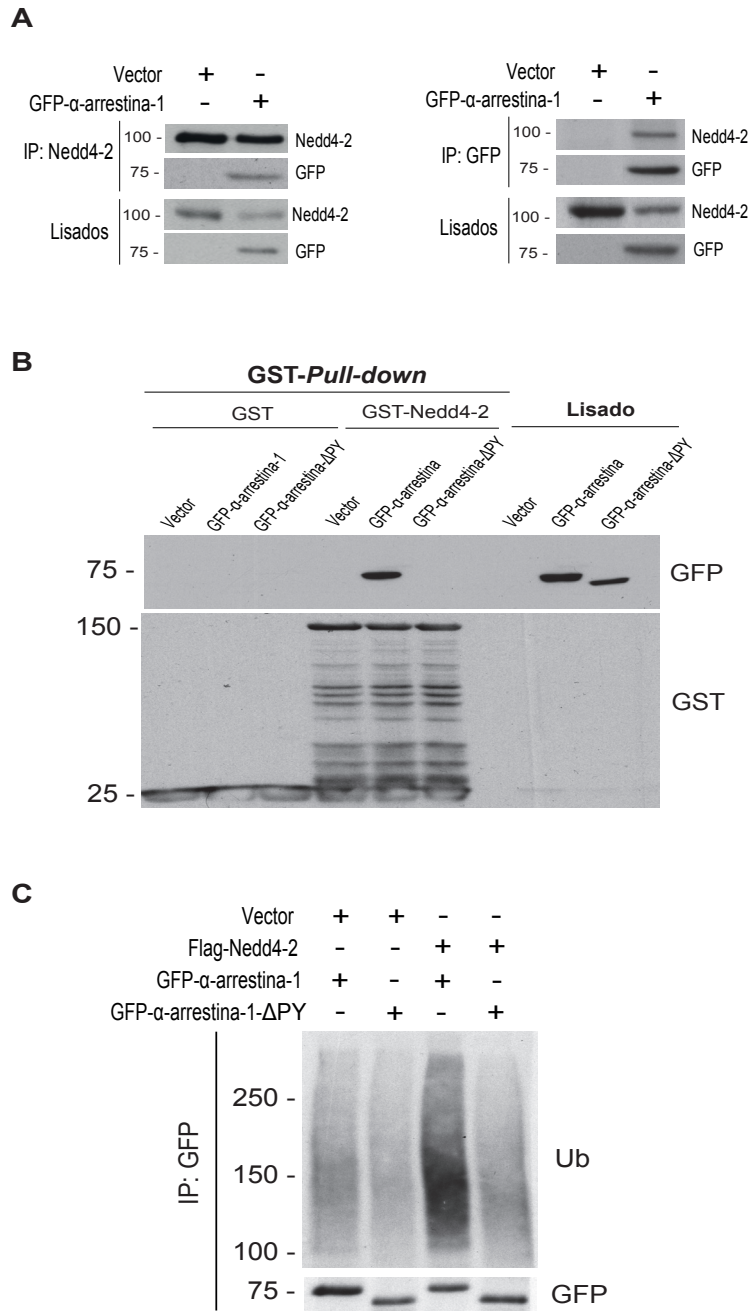


Figura 41. Estudio de la interacción entre Nedd4-2 y la α -arrestina-1.

(A) Células HEK293T transfectadas con el vector control (pEGFP) o GFP- α -arrestina-1 fueron lisadas e inmunoprecipitadas con anti-Nedd4-2 (IP:Nedd4-2) o anti-Flag (IP:Flag). En el análisis de las inmunotransferencias se utilizaron los anticuerpos anti-GFP y anti-Nedd4-2. **(B)** Ensayo *pull-down* con lisados de células HEK293T transfectadas con el vector control (pEGFP), GFP- α -arrestina-1 o GFP- α -arrestina-1- Δ PY. Los extractos fueron incubados con GST o GST-Nedd4-2. La inmunotransferencia fue analizada con los anticuerpos anti-GFP y anti-GST. **(C)** Células HEK293T fueron transfectadas con el vector control (pcDNA3), Flag-Nedd4-2, GFP- α -arrestina-1 o GFP- α -arrestina-1- Δ PY, tal y como se indica en la figura. Los lisados, obtenidos en condiciones desnaturizantes, fueron inmunoprecipitados con anti-GFP (IP:GFP). En el análisis de la inmunotransferencia se utilizaron los anticuerpos anti-Ubiquitina (Ub) y anti-GFP.

3.4. α -arrestina-1 interacciona con GLT-1

Los datos anteriores sugieren un posible papel de las α -arrestinas en la interacción entre Nedd4-2 y β -arrestina-1. Por ello, nos planteamos la posibilidad de que interaccionase también con GLT-1. Células HEK293T transfectadas con HA-GLT-1 y GFP- α -arrestina-1 fueron lisadas e inmunoprecipitado con el anticuerpo anti-GFP o anti-HA. Tal y como se muestra en la **figura 42**, en ambas inmunoprecipitaciones se pudieron detectar complejos co-inmunoprecipitados de GLT-1 y α -arrestina-1.

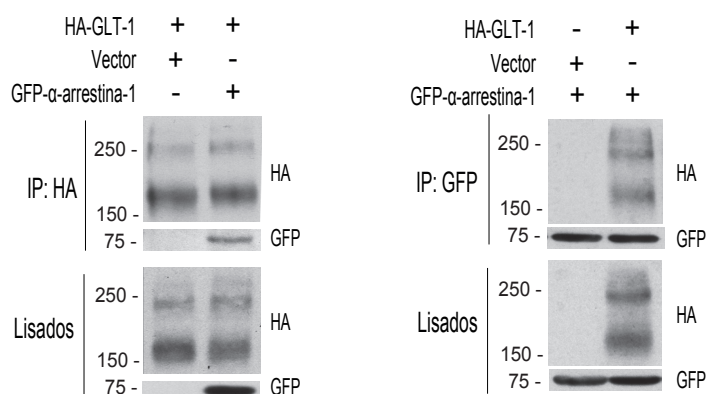


Figura 42. Estudio de la interacción entre GLT-1 y α -arrestina-1.

Células HEK293T fueron cotransfectadas con HA-GLT-1 y con el vector control (pEGFP) o GFP α -arrestina-1. Los lisados se inmunoprecipitaron con anti-HA (IP:HA) o anti-GFP (IP:GFP). En el análisis de las inmunotransferencias se utilizaron los anticuerpos anti-HA y anti-GFP.

3.5. Efecto de la reducción de expresión de α -arrestina-1 o -3 en la interacción entre GLT-1 y Nedd4-2

Por último, siguiendo el mismo abordaje que en el estudio de las β -arrestinas, nos propusimos analizar el posible efecto de la reducción de la expresión endógena de las α -arrestinas en la unión entre GLT-1 y Nedd4-2. En este caso, entre las diferentes α -arrestinas, decidimos estudiar la α -arrestina-1 y la α -arrestina-3 ya que trabajos previos de otros laboratorios habían demostrado su papel, junto a las β -arrestinas, como complejos adaptadores de la ubiquitinación de distintos receptores como Notch o β 2-AR (Shea *et al.*, 2012; Puca *et al.*, 2013).

Células HEK293T transfectadas con HA-GLT-1 y el ARN interferente específico de α -arrestina-1, α -arrestina-3 o el ARN control (*scrambled*) fueron lisadas e inmunoprecipitadas con anti-Nedd4-2. Al revelar la inmunotransferencia con anti-HA no se observaron diferencias en la unión entre GLT-1 y Nedd4-2 (**Fig.43**). Debido a la baja sensibilidad de los anticuerpos utilizados contra las arrestinas no pudimos comprobar la efectividad de los ARNs de interferencia. Por lo tanto, estos resultados deben considerarse preliminares.

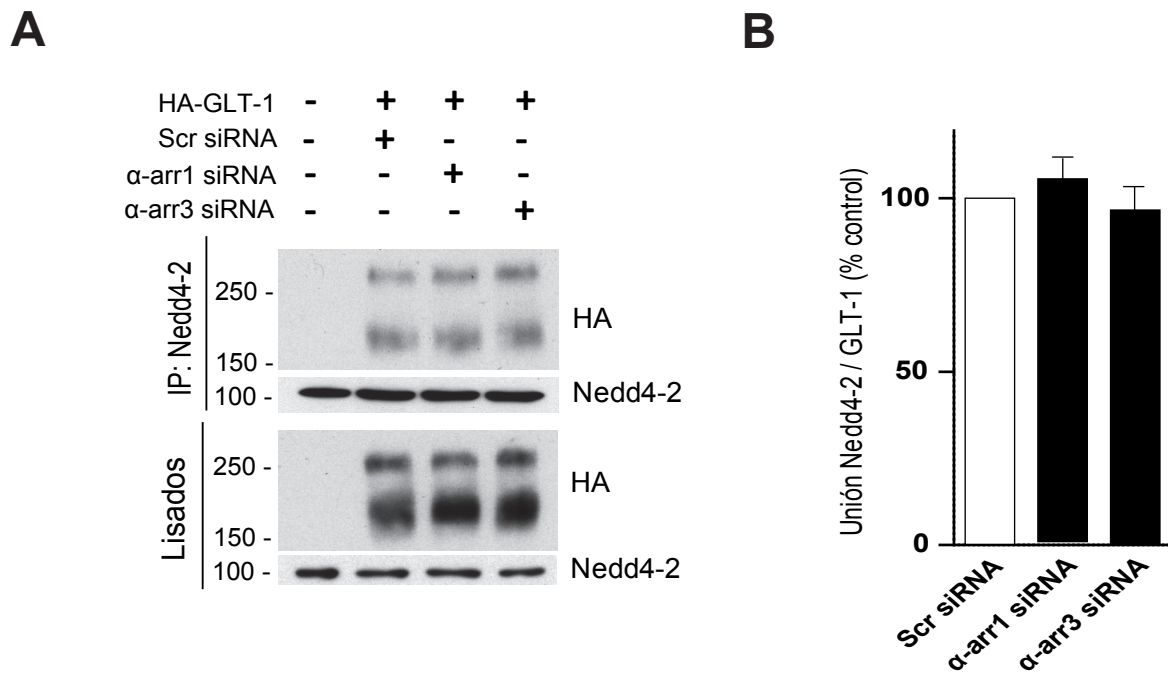


Figura 43. Estudio de la dependencia de α -arrestina-1 y α -arrestina-3 en la interacción entre GLT-1 y Nedd4-2. (A) Células HEK293 fueron transfectadas con HA-GLT-1, y con un ARN de interferencia de α -arrestina-1 (α -arr1 siRNA), α -arrestina-3 (α -arr3 siRNA) o control (Scr siRNA). Los lisados se inmunoprecipitaron con anti-Nedd4-2 (IP:Nedd4-2). En el análisis de la inmunotransferencia se utilizaron los anticuerpos anti-Nedd4-2, anti-HA y anti- β -arrestina-1. (B) Representación gráfica de la unión entre Nedd4-2 y GLT-1, expresado como porcentaje respecto a la condición control. No se encontraron diferencias significativas.

DISCUSIÓN

1. Regulación dependiente de actividad de GLT-1

El glutamato es el principal mediador de la neurotransmisión excitadora y de la plasticidad sináptica en el sistema nervioso central. Sin embargo, la sobreestimulación de los receptores de glutamato puede provocar la muerte neuronal por excitotoxicidad (Choi *et al.*, 1987). Para controlar los niveles del neurotransmisor, los transportadores de glutamato, entre los que destaca GLT-1, lo recapturan rápidamente del espacio extracelular. La actividad de GLT-1 viene determinada por su densidad en la superficie celular. Por ello, la regulación del tráfico intracelular supone la forma más rápida de modular su función. La sinapsis glutamatérgica es un sistema dinámico donde los transportadores están sujetos a un tráfico activo, respondiendo rápidamente a estímulos externos y al ambiente celular (Tzingounis y Wadiche, 2007).

Los niveles en membrana de GLT-1 y su localización en la superficie celular son procesos altamente regulados que resultan del balance entre la biosíntesis y la endocitosis, bien con destino a la degradación o al reciclaje del transportador. Algunos de estos mecanismos reguladores se basan en modificaciones postraduccionales de la proteína tales como la fosforilación o la ubiquitinación, que se activan tanto en situaciones fisiológicas como patológicas. Las enfermedades neurológicas en las que se ha detectado excitotoxicidad por glutamato se han visto relacionadas con una disminución en la expresión de GLT-1 en membrana. No obstante, no se ha demostrado que las alteraciones del transportador sean la causa primaria de estas enfermedades y más bien podrían ser consecuencia de la neurodegeneración. En cualquier caso, la disminución de la concentración de GLT-1 podría contribuir al avance del proceso patológico al hacer al tejido más vulnerable a la excitotoxicidad (Zhou y Danbolt, 2014). De la misma manera, en la patogénesis de la isquemia cerebral, la excitotoxicidad mediada por altas concentraciones de glutamato juega un papel preeminente. Diferentes trabajos en modelos animales de isquemia-hipoxia han demostrado una reducción en los niveles de membrana de GLT-1. Estos modelos han permitido analizar el efecto de la excitotoxicidad sobre el transportador a lo largo del proceso isquémico. Tras un episodio isquémico se ha detectado una disminución de la expresión de GLT-1 a partir de 1 hora de reperusión, manteniéndose el efecto durante más de 24 horas (Krzyżanowska *et al.*, 2014). Aunque hasta la fecha no se han esclarecido totalmente los mecanismos de regulación de GLT-1 durante la isquemia cerebral, probablemente se trate de un proceso multifactorial regulado a muy diversos niveles. Así, algunos autores apuntan a una regulación de la expresión génica a través de citoquinas, como TNF- α , liberadas durante la isquemia (Boycott *et al.*, 2008). Otra posibilidad es la modulación del transportador por receptores de glutamato mGluR III, ya que el pretratamiento con un antagonista específico de estos receptores metabotrópicos bloquea la disminución de la expresión del GLT-1 tras 3-6 horas de reperusión (Chen *et al.*, 2004).

Los resultados presentados en esta Memoria de Tesis ponen de manifiesto un mecanismo regulador de GLT-1 desencadenado por la actividad del transportador, el cual promueve su internalización en vesículas intracelulares. En sinaptosomas, cultivos primarios corticales y mediante la sobreexpresión de GLT-1 en sistemas heterólogos, hemos demostrado que concentraciones altas de glutamato provocan una disminución de los niveles del transportador en membrana. El proceso es relativamente rápido (10-30 min) y se produce en un rango de concentraciones (0.1-1 mM) similar al alcanzado durante la isquemia cerebral, lo que sugiere que este mecanismo de regulación de GLT-1 podría ser relevante en condiciones patológicas asociadas a excitotoxicidad por glutamato (Nishizara, 2001). Además, nuestros resultados son consistentes con un estudio reciente en el que se describe una rápida reducción de la V_{max} del transporte de glutamato en sinaptosomas corticales e hipocampales aislados tras 5-15 minutos de un traumatismo cerebral (Fontana *et al.*, 2015). Por otro lado, hemos demostrado que la regulación de GLT-1 mediada por glutamato es debida a la actividad del transportador, ya que el proceso era mimetizado por otros sustratos transportables y bloqueado por ligandos no transportables, como el inhibidor específico WAY 213613.

Estos resultados no son los primeros en evidenciar una regulación de GLT-1 por glutamato. Recientemente se ha relacionado la actividad del transportador con la estimulación de su difusión lateral por la membrana plasmática, disociándose las agrupaciones de GLT-1 de la superficie de los astrocitos y concentrándose en regiones perisinápticas (Benediktsson *et al.*, 2012; Murphy-Royal *et al.*, 2015). Esta respuesta dinámica del transportador modula la neurotransmisión sináptica al optimizar la recaptura del glutamato. Durante los eventos sinápticos, el glutamato liberado es rápidamente recapturado, por lo que es poco probable que se activen procesos de endocitosis. Por el contrario, en condiciones en las que los niveles de glutamato extracelular se encuentren aumentados durante varios minutos superando la capacidad transportadora de la célula, es posible que la difusión lateral de GLT-1 preceda a la internalización mediada por su actividad. Además, también se ha descrito la regulación de la variante del transportador GLT-1b por glutamato en la postsinapsis glutamatérgicas (Underhill *et al.*, 2015). En este caso, la entrada de calcio debida a la activación de los receptores glutamatérgicos activa a la enzima CamKII, la cual provoca la disociación de GLT1b con DLG-1, una proteína de anclaje a la membrana. Esto conlleva la desestabilización del transportador y su posterior endocitosis. GLT-1a no interacciona con DLG-1 al carecer del motivo de unión a dominios PDZ. Por lo tanto, la regulación por glutamato de las variantes de GLT-1 es debida a la activación de rutas de señalización diferenciales.

La entrada de glutamato a través de GLT-1 está asociada a una despolarización de la membrana plasmática debida a la entrada de Na^+ , y al gasto de ATP por la acción de la Na^+/K^+ ATPasa. En los últimos años se ha publicado varios artículos que han relacionado los flujos de glutamato

con la entrada de calcio a través del intercambiador $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^+$ (NCX). Las tres isoformas (NCX1-3) se expresan en astrocitos y se localizan en regiones perisinápticas (Minelli *et al.*, 2007). El NCX intercambia tres iones Na^+ por un ion Ca^{2+} , operando en ambos sentidos; generalmente actúa expulsando calcio de la célula, mientras que en situaciones despolarizantes incorpora calcio. El potencial de reversión de NCX está cerca del potencial en membrana del astrocito (~ -80 mV), por lo que el intercambiador fluctúa dinámicamente entre ambos estados (Parpura y Verkhratsky, 2012). En periodos de alta actividad sináptica o en condiciones excitotóxicas, se produce un intenso flujo de Na^+ asociado al transporte de glutamato por GLT-1. El aumento de la concentración citosólica de Na^+ puede llegar a saturar a la bomba Na^+/K^+ debido a su baja tasa de transporte ($\sim 170 \text{ Na}^+/\text{s}$) (Skou, 1990). Esto desencadenaría una despolarización de la membrana y la activación del NCX como mecanismo compensatorio, expulsando rápidamente iones Na^+ e incorporando iones Ca^{2+} ($2000\text{-}5000 \text{ Na}^+ \cdot \text{s}^{-1}$) (Hilgemann, 1996). De este modo, el transporte de glutamato por GLT-1 puede provocar indirectamente un aumento de los niveles de Ca^{2+} , el cual puede activar diferentes rutas de señalización. Recientemente, se ha demostrado que, en situaciones de alta actividad sináptica, este proceso podría estar implicado en la inmovilización de las mitocondrias en regiones cercanas a los transportadores de glutamato (Jackson y Robinson, 2015). El Ca^{2+} promueve la producción de ATP en la mitocondria al activar enzimas del ciclo de Krebs, por lo que el posicionamiento mitocondrial cerca de GLT-1 permitiría coordinar localmente la actividad del transportador con el metabolismo energético. Igualmente, otro estudio ha confirmado que los transportadores de glutamato, entre los que destaca EAAT3, y el NCX están involucrados en el aumento de ATP inducido por glutamato en líneas celulares gliales y neuronales (Magi *et al.*, 2013).

En este trabajo hemos demostrado la implicación del NCX en la regulación del transportador GLT-1 mediado por glutamato. Además, mediante inhibidores específicos, hemos identificado a las proteínas que constituyen la señalización intracelular activada por el Ca^{2+} . El transporte prolongado de glutamato provocaría la entrada de Ca^{2+} a través del NCX, activando a la enzima CamKII y a AMPK. La quinasa CamKII juega un papel esencial en procesos de plasticidad sináptica, tanto en la potenciación como en la depresión a largo plazo (Shonesy *et al.*, 2014). Su actividad está relacionada con la endocitosis dependiente de actividad de los receptores de AMPA y de la variante GLT-1b, como hemos comentado anteriormente (Underhill *et al.*, 2015; Widagdo *et al.*, 2015). Durante la isquemia, la entrada masiva de Ca^{2+} activa a la CamKII, la cual se ha visto implicada tanto en la regulación de la supervivencia neuronal como en procesos proapoptóticos (Coultrap *et al.*, 2014). La enzima AMPK, otro miembro de la familia de las quinasas CaM (subfamilia CaML), también se activa durante la isquemia (Li y McCullough, 2010). Esta quinasa actúa como un sensor de estrés metabólico promoviendo principalmente procesos catabólicos e inhibiendo rutas anabólicas con el fin de restablecer los niveles de ATP. Se activa por la disminución de ATP celular (aumento del ratio AMP/ATP) y por la

acción de quinasas como LKB, CamKII o CamKK β (Woods *et al.*, 2003; Woods *et al.*, 2005; Raney y Turcotte, 2008). Aparte de regular rutas metabólicas, la AMPK se ha relacionado con la regulación del tráfico intracelular de una gran variedad de canales iónicos y transportadores de membrana, tales como ENaC, hERG, GLUT2, GLUT4, EAAT3 o EAAT4 (Lang y Föller, 2014). En nuestro modelo proponemos que la AMPK, activada por la CamKII, es la responsable de la movilización de la maquinaria de endocitosis de GLT-1. En la internalización de los EAAT3 y EAAT4 mediada por AMPK no se ha demostrado su fosforilación directa. Los autores del trabajo sugieren la posible participación de Nedd4-2 en el proceso de endocitosis (Sopjani *et al.*, 2010). Esta ubiquitina ligasa está regulada por diferentes quinasas que pueden activar o inhibir su función. Entre ellas, se ha demostrado que la AMPK fosforila y activa a Nedd4-2 (Bhalla *et al.*, 2006). Por lo tanto, la activación de la AMPK podría inducir la regulación de GLT-1 a través de la fosforilación de Nedd4-2.

Uno de los mecanismos de regulación de GLT-1 mejor caracterizados es la endocitosis mediada por la enzima PKC. Estudios en nuestro laboratorio han descrito el papel de Nedd4-2 en la ubiquitinación e internalización de GLT-1 tras la activación de la PKC (García-Tardón *et al.*, 2012). Mediante la inhibición de la ubiquitinación celular y estudios con el mutante de GLT-1 de las lisinas susceptibles a ser ubiquitinadas (GLT-1 7KR), hemos demostrado que la regulación de transportador por glutamato es dependiente de su ubiquitinación. Además, al igual que en la regulación por PKC, Nedd4-2 es la ubiquitina ligasa implicada en el proceso, ya que aumenta su interacción con GLT-1 en respuesta al glutamato. No obstante, es necesario analizar con más detalle la activación secuencial de las diferentes enzimas que componen la cascada de señalización activada por el transporte de glutamato. Actualmente se están realizando experimentos con el ARN de interferencia de Nedd4-2 para determinar su importancia en el proceso. Además, sería interesante estudiar la diana molecular de CamKII y AMPK, ya sea comprobando la fosforilación de AMPK y Nedd4-2, respectivamente, como la posible fosforilación del propio transportador GLT-1.

En resumen, en condiciones excitotóxicas, en las que los niveles de glutamato extracelular se mantienen altos, la alta tasa de transporte de glutamato podría desencadenar la internalización de GLT-1 al activar una cascada de señalización mediada por Ca²⁺, que promueve la ubiquitinación del transportador por Nedd4-2 (Fig.44). Además, cabe destacar el hecho de que las proteínas que comprenden la cascada de señalización (CamKII, AMPK, Nedd4-2) se encuentran estimuladas durante la isquemia cerebral (Lackovic *et al.*, 2012).

Existe cierta controversia en relación al papel de GLT-1 durante la isquemia ya que, dependiendo de la duración del insulto isquémico y el estado energético celular, el transportador puede funcionar recapturando o expulsando glutamato. En la mayoría de los modelos animales se ha demostrado una relación entre los niveles de GLT-1 y la susceptibilidad a la isquemia.

Estudios realizados en modelos animales de sobreexpresión del transportador mediante vectores virales (AAV-GLT-1) o inductores de la expresión como la ceftriaxona, han observado una disminución en la muerte celular, volumen infartado y niveles de glutamato extracelular (Chu *et al.*, 2007; Harvey *et al.*, 2011). Además, en modelos de preconditionamiento isquémico (proceso neuroprotector basado cambios celulares adaptativos tras un breve episodio isquémico) se ha observado un aumento en la expresión génica de GLT-1 (Romera *et al.*, 2007). Sin embargo, se cree que la función de GLT-1 cambia de neuroprotector a neurodegenerativo durante la isquemia. En las fases iniciales (~ 5 min), los astrocitos recapturarían eficientemente el glutamato al preservar su potencial de membrana gracias a sus reservas energéticas. Transcurrido ese período, comenzaría un estrés metabólico glial que desencadenaría el transporte reverso de GLT-1, exacerbándose de esta manera la excitotoxicidad por glutamato (Mitani y Tanaka, 2003). En este contexto, la internalización de GLT-1 regulada por glutamato descrita en esta Tesis, podría servir como mecanismo compensatorio en la disminución de la liberación de glutamato en las fases tardías del episodio isquémico. A nivel celular, la reducción del transporte de glutamato, el cual supone un alto gasto de ATP, contribuiría a la recuperación energética del astrocito.

Existen otros transportadores de neurotransmisores que también presentan una regulación de tráfico intracelular dependiente de actividad, tales como DAT, GAT1 o SERT (Hu y Quick, 2008; Jorgensen *et al.*, 2014). En neuronas dopaminérgicas, los niveles en membrana del transportador DAT disminuyen en presencia de dopamina o anfetamina (sustrato), bloqueándose el proceso en presencia de cocaína (inhibidor) (Saunders *et al.*, 2000; Richards y Zahniser, 2009). Al igual que en el caso de GLT-1, los sustratos actúan rápidamente sobre DAT, siendo el efecto dependiente de la concentración (endocitosis del ~25% de DAT tras la incubación con 100 μ M dopamina o 3 μ M anfetamina durante 30 minutos) (Chi y Reith, 2003). De manera similar, estudios preliminares en nuestro laboratorio parecen indicar que la regulación de DAT por dopamina y anfetamina es un proceso dependiente de la ubiquitinación por Nedd4-2 (resultados no mostrados). Un estudio reciente ha demostrado, mediante marcadores de endosomales, que la proteína DAT internalizada se dirige a distintos compartimentos según el mecanismo de regulación activado (Hong y Amara, 2013). La enzima PKC induce la degradación lisosomal de DAT, mientras que la endocitosis mediada por sustrato dirige al transportador a endosomas de reciclaje, desde donde vuelve a la superficie celular. Una posibilidad es que el patrón de ubiquitinación diferencial de DAT por la ubiquitina ligasa tras la activación de las diferentes rutas de señalización sea determinante en el destino del transportador internalizado. En experimentos de biotilación en cultivos primarios de neuronas y astrocitos, hemos observado una acumulación de GLT-1 intracelular a los 30 minutos de incubación con glutamato, que desaparece a los 60 minutos, lo que podría estar indicando un proceso de degradación progresiva del transportador endocitado. Por otro lado, el patrón

marcaje vesicular obtenido por inmunofluorescencia de GLT-1 tras el tratamiento con PMA y la incubación con glutamato son muy diferentes. Con el activador de la PKC, las vesículas positivas para GLT-1 se encontraban concentradas en la región perinuclear. En cambio, en la regulación mediada por actividad, el marcaje vesicular de GLT-1 era menos patente cerca del núcleo. Es posible que, en este caso, la mayoría del transportador endocitado se encontrase en endosomas tempranos y/o de reciclaje, cerca de la superficie celular, el cual no se pudo discriminar del marcaje de GLT-1 en la membrana plasmática. Sin embargo, estos resultados son insuficientes para llegar a una conclusión. El uso de marcadores endosomales específicos y análisis cuantitativos de reciclaje y degradación del transportador nos permitirán clarificar el destino de GLT-1 endocitado tras la activación de diferentes mecanismos de regulación.

En definitiva, la caracterización de la regulación dependiente de actividad del transportador GLT-1 abre nuevas posibilidades para el estudio de la relación entre el transportador y las patologías asociadas a la neurotransmisión glutamatérgica. Además, la identificación de los componentes moleculares implicados podría tener una gran relevancia en la búsqueda de nuevas dianas farmacológicas para el tratamiento de la progresión de procesos excitotóxicos, como la isquemia cerebral.

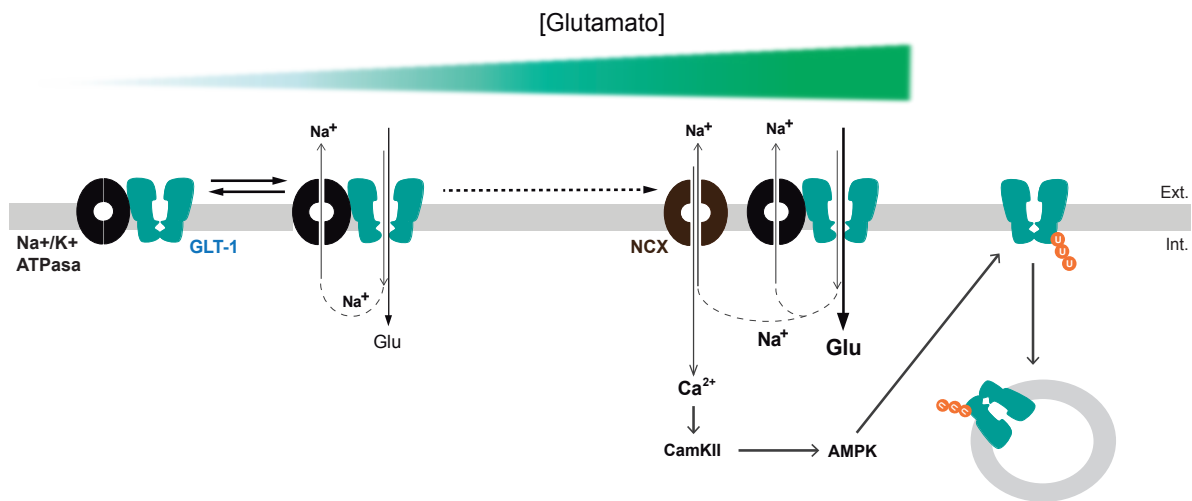


Figura 44. Modelo de la regulación dependiente de actividad del transportador de glutamato GLT-1. En condiciones fisiológicas, el glutamato liberado en las sinapsis es rápidamente recapturado por GLT-1. Los iones Na⁺ acoplados al transporte de glutamato son eliminados por la bomba Na⁺/K⁺ ATPasa. Sin embargo, cuando los niveles extracelulares de glutamato se mantienen altos, el flujo masivo de Na⁺ asociado al transportador no es compensado por la bomba Na⁺/K⁺ provocando la despolarización de la membrana plasmática. En esta situación se activa el NCX, el cual intercambia Na⁺ por Ca²⁺. El aumento de la concentración de Ca²⁺ intracelular activa una cascada de señalización compuesta por la enzima CamKII y la AMPK. Esta última induce la ubiquitinación de GLT-1 por Nedd4-2 y su posterior internalización.

2. Adaptadores de Nedd4-2 en la ubiquitinación de GLT-1

El mecanismo de regulación dependiente de actividad del transportador GLT-1 es similar al observado en levaduras como *S.cerevisiae*, en el que se ha descrito una internalización inducida por sustrato de diferentes permeasas de aminoácidos (Ghaddar *et al.*, 2014). El desencadenante de la endocitosis es la ubiquitinación de las permeasas por la única HECT ubiquitina ligasa Rsp5 (homólogo de la familia Nedd4). Las permeasas carecen de motivos PY, por lo que en el reclutamiento de Rsp5 participan unas proteínas adaptadoras denominadas ART (Lin *et al.*, 2008). A la familia Art se la considera el ancestro común de la familia de arrestinas en mamíferos (α -arrestinas, β -arrestinas y arrestinas visuales) (Becuwe *et al.*, 2012).

Este mecanismo también se ha observado en los GPCRs, donde la activación por la unión del ligando induce el reclutamiento de la ubiquitina ligasa, generalmente HECT ligasas, provocando la ubiquitinación e internalización del receptor. En este proceso también intervienen adaptadores de ubiquitinación: las α -arrestinas y las β -arrestinas (Kommaddi y Shenoy, 2013).

Datos previos de nuestro laboratorio, junto a resultados aportados como parte de esta Tesis, han demostrado la importancia de la ubiquitinación de GLT-1 mediada por Nedd4-2, tanto en su endocitosis constitutiva como regulada por la PKC y por sustrato (García-Tardón *et al.*, 2012). Además, nuestros resultados indican la existencia de una misma población de GLT-1 susceptible de ser regulada tanto por PMA como por glutamato.

Nedd4-2 es una HECT ubiquitina ligasa implicada en la regulación de diversos procesos neurales, como la supervivencia neuronal y la transmisión sináptica (Donovan y Poronnik, 2012). Se ha asociado a la internalización de diferentes transportadores de neurotransmisores, como el de dopamina (DAT), de glutamato (GLAST, GLT-1, EAAT3, EAAT4) y el de acetilcolina (CHT1) (Boehmer *et al.*, 2003; Boehmer *et al.*, 2006; Sorkina *et al.*, 2006; Rajamanickam *et al.*, 2007; Sopjani *et al.*, 2010; Yamada *et al.*, 2012). Sin embargo, ninguno de ellos presenta motivos PY en sus terminales citoplasmáticas, los cuales son necesarios para la interacción directa con Nedd4-2. Por ello, se cree que existen proteínas adaptadoras que intervendrían en la unión entre los transportadores y la ubiquitina ligasa.

En el presente trabajo hemos demostrado el papel de las β -arrestinas como proteínas adaptadoras de Nedd4-2 en la ubiquitinación de GLT-1. Sus niveles de expresión modulan la interacción entre estas dos proteínas. Además, el complejo multiproteico GLT-1, Nedd4-2 y β -arrestina-1 es susceptible de una degradación dependiente de ubiquitinación ya que la inhibición lisosomal aumenta la estabilidad del complejo con la forma nativa del transportador, mientras que el complejo formado por β -arrestina-1 con el mutante de GLT-1 resistente a ubiquitinación (GLT-1 7KR) es significativamente más estable en condiciones basales.

Una vez identificadas a las β -arrestinas como adaptadores de ubiquitinación de Nedd4-2 comprobamos que, efectivamente, tanto el glutamato como la activación de la PKC promueven la interacción entre GLT-1 y β -arrestina-1. En los estudios realizados sobre la regulación de los GPCRs se ha observado que los diferentes receptores presentan una distinta afinidad por las β -arrestinas; mientras que algunos interaccionan preferentemente con una de las isoformas, otros receptores pueden unirse a ambas β -arrestinas. A pesar de la aparente redundancia, estudios recientes han establecido una clara especialización funcional de ambas isoformas. De esta manera, para un mismo receptor, diferentes ligandos inducen el reclutamiento de β -arrestina-1 o β -arrestina-2, activando rutas de señalización diferentes (Groer *et al.*, 2011; Srivastava *et al.*, 2015). En el caso de GLT-1, hemos observado que interacciona con ambas β -arrestinas. La reducción de los niveles de β -arrestina-1 endógena mediante ARN de interferencia, solo disminuye la unión de GLT-1 con Nedd4-2 un 50% aproximadamente, lo que indicaría un posible papel de β -arrestina-2. Por otro lado, la reducción de la expresión de β -arrestina-1 bloqueó la internalización de GLT-1 dependiente de actividad. Por lo tanto, en la regulación del transportador por glutamato, β -arrestina-1 tiene un papel primordial. No obstante, es necesario realizar estudios similares con el ARN de interferencia de β -arrestina-2 para comprobar la preferencia del transportador por cada una de las β -arrestinas.

Tras la estimulación de los GPCRs por sus agonistas específicos se activan las quinasas GRKs que fosforilan al receptor. En general, los residuos fosforilados se consideran la señal de reclutamiento de las β -arrestinas. Sin embargo, también se ha descrito la unión de las arrestinas a receptores sin fosforilar. Esta unión se produce en regiones enriquecidas en aminoácidos ácidos, los cuales podrían mimetizar a los grupos fosfatos (Walther y Ferguson, 2013). Trabajos anteriores de nuestro laboratorio, han demostrado que la PKC fosforila tanto a Nedd4-2 como a GLT-1. La fosforilación del transportador no es necesaria para la internalización activada por la PKC, por lo que se desconoce su función (García-Tardón *et al.*, 2012). Por lo tanto, el reclutamiento de las β -arrestinas no parece depender de la fosforilación GLT-1. El análisis mediante ensayos *pull-down* con los diferentes dominios citoplasmáticos del transportador nos permitirán definir la región por la interaccionan ambas proteínas.

Nedd4-2 no solo actúa sobre GLT-1, sino que también ubiquitina a la proteína adaptadora β -arrestina-1. No existen evidencias sobre papel de la ubiquitinación de esta arrestina. Sin embargo, la ubiquitinación de β -arrestina-2 ha sido extensamente estudiada. Se ha demostrado que, tras la activación del receptor β 2-AR, β -arrestina-2 es ubiquitinada específicamente por Mdm2 (Shenoy *et al.*, 2001). En relación con la activación de otros GPCRs, también se ha observado la ubiquitinación de β -arrestina-2, aunque no se ha identificado la ubiquitina ligasa implicada. Cabe destacar el hecho de que, a diferencia de nuestros resultados sobre β -arrestina-1 y Nedd4-2, la ubiquitina ligasa que participa en la ubiquitinación de la β -arrestina-2 no es la

misma que la que ubiquitina a los GPCRs. Según el receptor, la ubiquitinación de las lisinas de β -arrestina-2 puede producirse de manera específica o inespecífica. En este último caso, la modificación solo se pierde cuando todas las lisinas son mutadas a argininas (β -arrestina-2-0K). Este mutante ha permitido conocer el efecto funcional de la ubiquitinación de la arrestina: (1) aumenta la estabilidad de su interacción con el receptor; (2) desencadena la endocitosis al favorecer la unión con clatrina y AP-2; (3) promueve la asociación y activación de proteínas implicadas en rutas de señalización; (4) disminuye la vida media de β -arrestina-2 (Shenoy y Lefkowitz, 2003; Kommaddi y Shenoy, 2013). Respecto a β -arrestina-1, nuestros resultados indican que la ubiquitinación por Nedd4-2 aumenta la vida media de la proteína. Esto es consistente con un estudio reciente en el que encuentran una correlación negativa entre el grado de ubiquitinación y los niveles de expresión de β -arrestina-2, mientras que esta correlación es positiva en el caso de β -arrestina-1 (Golan *et al.*, 2013). Además, la sobreexpresión de la forma activa de Nedd4-2 estabiliza la unión entre β -arrestina-1 y GLT-1. No obstante, no pudimos discriminar si el efecto se debía a la ubiquitinación de la arrestina o del transportador. Como hemos visto, el mutante GLT-1 7KR forma complejos estables con β -arrestina-1 al no internalizarse y degradarse por el lisosoma. Por ello, el estudio con este mutante podrían enmascarar el efecto de la ubiquitinación de β -arrestina-1. Una posible alternativa es analizar la interacción entre GLT-1 y el mutante de las lisinas susceptibles a ubiquitinación de β -arrestina-1. Es probable que, al igual que β -arrestina-2, su ubiquitinación no sea específica de un residuo concreto, por lo que sería necesario realizar un mutante múltiple de las lisinas de β -arrestina-1.

Mediante ensayos *pull-down* hemos demostrado que Nedd4-2 interacciona con β -arrestina-1 a través del dominio WW3. Numerosos estudios han descrito la asociación de las β -arrestinas con diferentes HECT ubiquitina ligasas, como Nedd4-1, Itch, o Smurf2 (Kommaddi y Shenoy, 2013). Estas arrestinas no presentan motivos PY en su secuencia aminoacídica, por lo que se desconoce el dominio por el que interaccionan ambas proteínas. Se cree que podría estar determinado por cambios conformacionales en las arrestinas inducidos por la unión a los GPCRs (Shenoy *et al.*, 2008). Sin embargo, dado que los dominios WW de las HECT ligasas interaccionan específicamente con motivos PY, nuestros resultados sugieren la existencia de una proteína adicional en el complejo que contenga dicho motivo. Efectivamente, los ensayos *pull-down* en los que se utilizaron la proteína β -arrestina-1 sintetizada *in vitro* indican que la unión entre la arrestina y Nedd4-2 es indirecta. Estudios recientes apoyan la posibilidad de que las α -arrestinas y las β -arrestinas actúen conjuntamente en el reclutamiento de las ubiquitina ligasas a distintos receptores (Puca y Brou, 2014). Las α -arrestinas se localizan principalmente en la membrana plasmática y endosomas, presentan motivos PY (excepto α -arrestina-5) y heterodimerizan con las β -arrestinas, lo que les convierte en buenos candidatos como proteínas adaptadoras en la regulación de proteínas de membrana. A pesar de que hay

ejemplos como el receptor de Notch, en el que se ha observado una clara función cooperativa entre las α - y las β -arrestinas, existe controversia sobre su papel en la regulación de GPCRs (Puca *et al.*, 2013). Mientras que algunos autores han observado una acción coordinada de β -arrestina-2 y α -arrestina-3 en la internalización dependiente de ubiquitinación del receptor β 2-AR, otros defienden una acción secuencial de ambas arrestinas (Shea *et al.*, 2012; Han *et al.*, 2013). Resultados preliminares de nuestro laboratorio han demostrado la asociación de α -arrestina-1 con Nedd4-2 y con GLT-1. Además, la arrestina es ubiquitinada específicamente por Nedd4-2 al interactuar a través su motivo PY. No obstante, la reducción de la expresión de α -arrestina-1 o α -arrestina-3 no afecta a la interacción entre GLT-1 y Nedd4-2. Cabe la posibilidad de que exista cierta redundancia en las funciones de las distintas α -arrestinas, o que en la regulación de GLT-1 intervengan otras isoformas como α -arrestina-2 o α -arrestina-4. Estudios en profundidad de las diferentes α -arrestinas nos permitirán definir en el futuro el posible papel de estas arrestinas en la regulación del transportador por ubiquitinación.

El reclutamiento de las β -arrestinas por parte de GLT-1 podría tener consecuencias adicionales ya que estas proteínas también pueden actuar como plataformas de activación de rutas de señalización intracelulares, como ERK/MAPK o Akt/mTOR. En procesos de excitotoxicidad se ha detectado una activación de ERK y Akt, la cual es dependiente de la actividad de los transportadores de glutamato (Szydłowska *et al.*, 2010; Meeker *et al.*, 2015). A su vez, se ha descrito que las cascadas de señalización activadas por estas dos proteínas promueven la expresión de GLT-1 (Ji *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2013). Por ello, nuestros resultados abren nuevas perspectivas de estudio para esclarecer la relación entre el transporte de glutamato y los procesos celulares activados durante los procesos excitotóxicos, en los que las β -arrestinas podrían tener un papel relevante.

En resumen, los resultados descritos en esta Tesis ponen de manifiesto que los mecanismos de internalización dependientes de ubiquitinación en los que interviene Nedd4-2, son mediados por el reclutamiento de proteínas adaptadoras de la familia de las arrestinas (**Fig.45**). Este proceso se ha mantenido en la evolución de las células eucariotas, por lo que puede estar jugando un papel importante en la regulación del metabolismo del glutamato. En humanos, este proceso es particularmente relevante en situaciones excitotóxicas. Los adaptadores de ubiquitina ligasas son esenciales para la localización subcelular y actividad de la enzima, por lo que constituyen un nuevo nivel de regulación en el proceso de ubiquitinación del transportador.

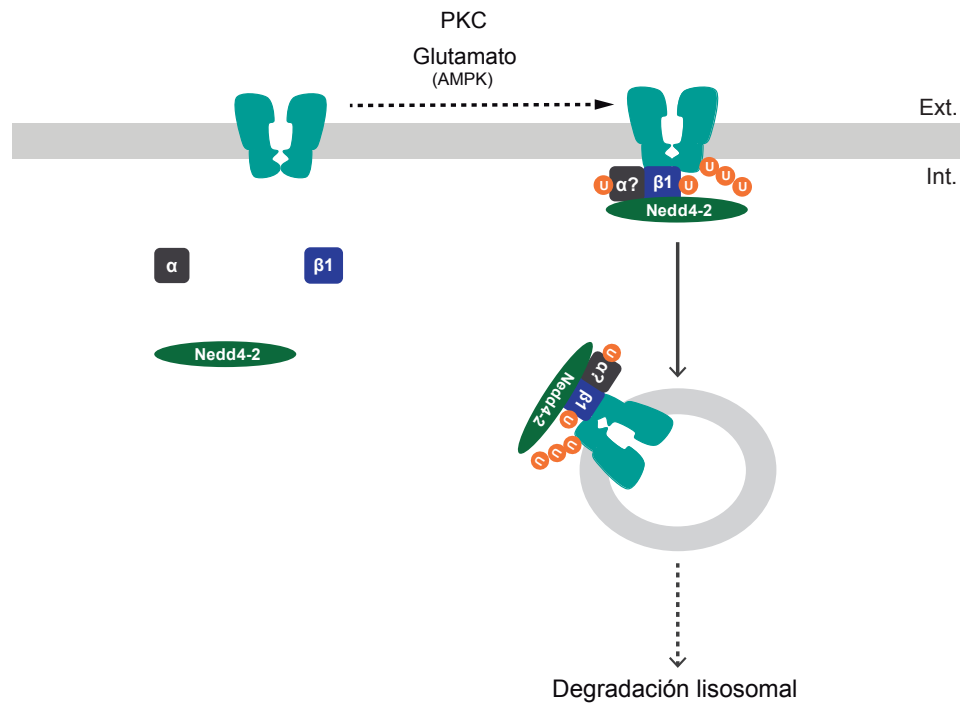


Figura 45. Modelo de la endocitosis dependiente de ubiquitinación del transportador de glutamato GLT-1. La activación de PKC o AMPK activa el reclutamiento de Nedd4-2, gracias a la interacción de proteínas adaptadoras de la familia de las arrestinas. Tanto β -arrestina-1 como β -arrestina-2 pueden mediar en el complejo. El papel de las α -arrestinas está aún por determinar. Una vez formado el complejo, la ubiquitinación de GLT-1 por Nedd4-2 promueve la endocitosis y degradación del transportador.

CONCLUSIONES

1. El transportador de glutamato GLT-1 está sujeto a un proceso de endocitosis dependiente de su actividad catalítica.
2. La actividad continuada de GLT-1 provoca la despolarización de la membrana plasmática, lo que promueve la entrada de calcio a través del intercambiador NCX y, como consecuencia, la activación de las enzimas CamKII y AMPK seguidas de la internalización del transportador.
3. La endocitosis de GLT-1 activado por el glutamato requiere la ubiquitinación de la región carboxilo terminal del transportador por la ubiquitina ligasa Nedd4-2.
4. GLT-1 interacciona con proteínas adaptadoras de la familia de las β -arrestinas, las cuales actúan como mediadoras del acoplamiento entre el transportador y Nedd4-2.
5. La formación del complejo multiproteico GLT-1 / β -arrestina-1 / Nedd4-2 es favorecida por el glutamato.
6. Además de GLT-1, β -arrestina-1 es sustrato de Nedd4-2. La ubiquitinación de β -arrestina-1 aumenta la estabilidad de la proteína.
7. La interacción entre β -arrestina-1 y Nedd4-2 es indirecta, lo que sugiere la presencia de una proteína intermediaria. Basándonos en consideraciones evolutivas y en nuestros resultados, las α -arrestinas constituyen proteínas candidatas prometedoras.

BIBLIOGRAFÍA

- Ahmed, M.R., Zhan, X., Song, X., Kook, S., Gurevich, V.V., y Gurevich, E.V. (2011). Ubiquitin ligase parkin promotes Mdm2-arrestin interaction but inhibits arrestin ubiquitination. *Biochemistry* 50, 3749-3763.
- Alvarez, C.E. (2008). On the origins of arrestin and rhodopsin. *BMC evolutionary biology* 8, 222.
- Allen, J.A., Halverson-Tamboli, R.A., y Rasenick, M.M. (2007). Lipid raft microdomains and neurotransmitter signalling. *Nature reviews Neuroscience* 8, 128-140.
- An, H., Krist, D.T., y Statsyuk, A.V. (2014). Crosstalk between kinases and Nedd4 family ubiquitin ligases. *Molecular bioSystems* 10, 1643-1657.
- Aronica, E., Gorter, J.A., Ijlst-Keizers, H., Rozemuller, A.J., Yankaya, B., Leenstra, S., y Troost, D. (2003). Expression and functional role of mGluR3 and mGluR5 in human astrocytes and glioma cells: opposite regulation of glutamate transporter proteins. *European Journal of Neuroscience* 17, 2106-2118.
- Arriza, J.L., Eliasof, S., Kavanaugh, M.P., y Amara, S.G. (1997). Excitatory amino acid transporter 5, a retinal glutamate transporter coupled to a chloride conductance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 4155-4160.
- Arvan, P., Zhao, X., Ramos-Castaneda, J., y Chang, A. (2002). Secretory pathway quality control operating in Golgi, plasmalemmal, and endosomal systems. *Traffic* 3, 771-780.
- Arzberger, T., Krampfl, K., Leimgruber, S., y Weindl, A. (1997). Changes of NMDA receptor subunit (NR1, NR2B) y glutamate transporter (GLT1) mRNA expression in Huntington's disease--an in situ hybridization study. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 56, 440-454.
- Bak, L.K., Schousboe, A., y Waagepetersen, H.S. (2006). The glutamate/GABA-glutamine cycle: aspects of transport, neurotransmitter homeostasis and ammonia transfer. *Journal of neurochemistry* 98, 641-653.
- Barrera, S.P., Castrejon-Tellez, V., Trinidad, M., Robles-Escajeda, E., Vargas-Medrano, J., Varela-Ramirez, A., y Miranda, M. (2015). PKC-Dependent GlyT1 Ubiquitination Occurs Independent of Phosphorylation: Inespecificity in Lysine Selection for Ubiquitination. *PLoS one* 10.
- Bassan, M., Liu, H., Madsen, K.L., Armsen, W., Zhou, J., Desilva, T., Chen, W., Paradise, A., Brasch, M.A., Staudinger, J., *et al.* (2008). Interaction between the glutamate transporter GLT1b and the synaptic PDZ domain protein PICK1. *The European journal of neuroscience* 27, 66-82.
- Bauer, D., Haroutunian, V., Meador-Woodruff, J.H., y McCullumsmith, R.E. (2010). Abnormal glycosylation of EAAT1 and EAAT2 in prefrontal cortex of elderly patients with schizophrenia. *Schizophrenia research* 117, 92-98.
- Becuwe, M., Herrador, A., Haguenaer-Tsapis, R., Vincent, O., y Leon, S. (2012). Ubiquitin-mediated regulation of endocytosis by proteins of the arrestin family. *Biochemistry research international* 2012.
- Benediktsson, A.M., Marrs, G.S., Tu, J.C., Worley, P.F., Rothstein, J.D., Bergles, D.E., y Dailey, M.E. (2012). Neuronal activity regulates glutamate transporter dynamics in developing astrocytes. *Glia* 60, 175-188.

- Bhalla, V., Oyster, N.M., Fitch, A.C., Wijngaarden, M.A., Neumann, D., Schlattner, U., Pearce, D., y Hallows, K.R. (2006). AMP-activated kinase inhibits the epithelial Na⁺ channel through functional regulation of the ubiquitin ligase Nedd4-2. *The Journal of biological chemistry* 281, 26159-26169.
- Bhandari, D., Trejo, J., Benovic, J.L., y Marchese, A. (2007). Arrestin-2 interacts with the ubiquitin-protein isopeptide ligase atrophin-interacting protein 4 and mediates endosomal sorting of the chemokine receptor CXCR4. *The Journal of biological chemistry* 282, 36971-36979.
- Boehmer, C., Henke, G., Schniepp, R., Palmada, M., Rothstein, J.D., Broer, S., y Lang, F. (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. *Journal of neurochemistry* 86, 1181-1188.
- Boehmer, C., Palmada, M., Rajamanickam, J., Schniepp, R., Amara, S., y Lang, F. (2006). Post-translational regulation of EAAT2 function by co-expressed ubiquitin ligase Nedd4-2 is impacted by SGK kinases. *Journal of neurochemistry* 97, 911-921.
- Boycott, H.E., Wilkinson, J.A., Boyle, J.P., Pearson, H.A., y Peers, C. (2008). Differential involvement of TNF α in hypoxic suppression of astrocyte glutamate transporters. *Glia* 56, 998-1004.
- Butchbach, M.E., Tian, G., Guo, H., y Lin, C.L. (2004). Association of excitatory amino acid transporters, especially EAAT2, with cholesterol-rich lipid raft microdomains: importance for excitatory amino acid transporter localization and function. *The Journal of biological chemistry* 279, 34388-34396.
- Clements, J.D. (1996). Transmitter timecourse in the synaptic cleft: its role in central synaptic function. *Trends in neurosciences* 19, 163-171.
- Chang, M.Y., Lee, S.H., Kim, J.H., Lee, K.H., Kim, Y.S., Son, H., y Lee, Y.S. (2001). Protein kinase C-mediated functional regulation of dopamine transporter is not achieved by direct phosphorylation of the dopamine transporter protein. *Journal of neurochemistry* 77, 754-761.
- Chen, W., Aoki, C., Mahadomrongkul, V., Gruber, C.E., Wang, G.J., Blitzblau, R., Irwin, N., y Rosenberg, P.A. (2002). Expression of a variant form of the glutamate transporter GLT1 in neuronal cultures and in neurons and astrocytes in the rat brain. *The Journal of neuroscience* 22, 2142-2152.
- Chen, J.C., Hsu-Chou, H., Lu, J.L., Chiang, Y.C., Huang, H.M., Wang, H.L., Wu, T., Liao, J.J., y Yeh, T.S. (2005). Down-regulation of the glial glutamate transporter GLT-1 in rat hippocampus and striatum and its modulation by a group III metabotropic glutamate receptor antagonist following transient global forebrain ischemia. *Neuropharmacology* 49, 703-714.
- Chi, L., y Reith, M.E. (2003). Substrate-induced trafficking of the dopamine transporter in heterologously expressing cells and in rat striatal synaptosomal preparations. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 307, 729-736.
- Choi, D.W., Maulucci-Gedde, M., y Kriegstein, A.R. (1987). Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture. *The Journal of neuroscience* 7, 357-368.
- Choudary, P.V., Molnar, M., Evans, S.J., Tomita, H., Li, J.Z., Vawter, M.P., Myers, R.M., Bunney, W.E., Jr., Akil, H., Watson, S.J., *et al.* (2005). Altered cortical glutamatergic and GABAergic signal transmission with glial involvement in depression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 15653-15658.

- Chu, K., Lee, S.T., Sinn, D.I., Ko, S.Y., Kim, E.H., Kim, J.M., Kim, S.J., Park, D.K., Jung, K.H., Song, E.C., *et al.* (2007). Pharmacological Induction of Ischemic Tolerance by Glutamate Transporter-1 (EAAT2) Upregulation. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 38, 177-182.
- Chung, E.K., Chen, L.W., Chan, Y.S., y Yung, K.K. (2008). Downregulation of glial glutamate transporters after dopamine denervation in the striatum of 6-hydroxydopamine-lesioned rats. *The Journal of comparative neurology* 511, 421-437.
- Coultrap, S.J., Vest, R.S., Ashpole, N.M., Hudmon, A., y Bayer, K.U. (2011). CaMKII in cerebral ischemia. *Acta pharmacologica Sinica* 32, 861-872.
- Danbolt, N.C. (2001). Glutamate uptake. *Progress in neurobiology* 65, 1-105.
- de Juan-Sanz, J., Zafra, F., Lopez-Corcuera, B., y Aragon, C. (2011). Endocytosis of the neuronal glycine transporter GLYT2: role of membrane rafts and protein kinase C-dependent ubiquitination. *Traffic* 12, 1850-1867.
- de Juan-Sanz, J., Nunez, E., Lopez-Corcuera, B., y Aragon, C. (2013). Constitutive endocytosis and turnover of the neuronal glycine transporter GlyT2 is dependent on ubiquitination of a C-terminal lysine cluster. *PloS one* 8.
- DeWire, S.M., Ahn, S., Lefkowitz, R.J., y Shenoy, S.K. (2007). β -arrestins and cell signaling. *Annual review of physiology* 69, 483-510.
- Dong, X.X., Wang, Y., y Qin, Z.H. (2009). Molecular mechanisms of excitotoxicity and their relevance to pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Acta pharmacologica Sinica* 30, 379-387.
- Donovan, P., y Poronnik, P. (2013). Nedd4 and Nedd4-2: ubiquitin ligases at work in the neuron. *The international journal of biochemistry & cell biology* 45, 706-710.
- Dunlop, J., McIlvain, H.B., Carrick, T.A., Jow, B., Lu, Q., Kowal, D., Lin, S., Greenfield, A., Grosanu, C., Fan, K., *et al.* (2005). Characterization of novel aryl-ether, biaryl, and fluorene aspartic acid and diaminopropionic acid analogs as potent inhibitors of the high-affinity glutamate transporter EAAT2. *Molecular pharmacology* 68, 974-982.
- Fairman, W.A., Vandenberg, R.J., Arriza, J.L., Kavanaugh, M.P., y Amara, S.G. (1995). An excitatory amino-acid transporter with properties of a ligand-gated chloride channel. *Nature* 375, 599-603.
- Fernandez-Sanchez, E., Martinez-Villarreal, J., Gimenez, C., y Zafra, F. (2009). Constitutive and regulated endocytosis of the glycine transporter GLYT1b is controlled by ubiquitination. *The Journal of biological chemistry* 284, 19482-19492.
- Fontana, A.C. (2015). Current approaches to enhance glutamate transporter function and expression. *Journal of neurochemistry* 134, 982-1007.
- Foran, E., Rosenblum, L., Bogush, A., Pasinelli, P., y Trotti, D. (2014). Sumoylation of the astroglial glutamate transporter EAAT2 governs its intracellular compartmentalization. *Glia* 62, 1241-1253.
- Fornes, A., Nunez, E., Alonso-Torres, P., Aragon, C., y Lopez-Corcuera, B. (2008). Trafficking properties and activity regulation of the neuronal glycine transporter GLYT2 by protein kinase C. *The Biochemical journal* 412, 495-506.

- Garcia-Tardon, N., Gonzalez-Gonzalez, I.M., Martinez-Villarreal, J., Fernandez-Sanchez, E., Gimenez, C., y Zafra, F. (2012). Protein kinase C (PKC)-promoted endocytosis of glutamate transporter GLT-1 requires ubiquitin ligase Nedd4-2-dependent ubiquitination but not phosphorylation. *The Journal of biological chemistry* 287, 19177-19187.
- Gegelashvili, G., y Bjerrum, O.J. (2014). High-affinity glutamate transporters in chronic pain: an emerging therapeutic target. *Journal of neurochemistry* 131, 712-730.
- Genda, E.N., Jackson, J.G., Sheldon, A.L., Locke, S.F., Greco, T.M., O'Donnell, J.C., Spruce, L.A., Xiao, R., Guo, W., Putt, M., *et al.* (2011). Co-compartmentalization of the astroglial glutamate transporter, GLT-1, with glycolytic enzymes and mitochondria. *The Journal of neuroscience* 31, 18275-18288.
- Gendreau, S., Voswinkel, S., Torres-Salazar, D., Lang, N., Heidtmann, H., Detro-Dassen, S., Schmalzing, G., Hidalgo, P., y Fahlke, C. (2004). A trimeric quaternary structure is conserved in bacterial and human glutamate transporters. *The Journal of biological chemistry* 279, 39505-39512.
- Ghaddar, K., Merhi, A., Saliba, E., Krammer, E.M., Prevost, M., y Andre, B. (2014). Substrate-induced ubiquitylation and endocytosis of yeast amino acid permeases. *Molecular and cellular biology* 34, 4447-4463.
- Girnita, L., Shenoy, S.K., Sehat, B., Vasilcanu, R., Girnita, A., Lefkowitz, R.J., y Larsson, O. (2005). β -Arrestin is crucial for ubiquitination and down-regulation of the insulin-like growth factor-1 receptor by acting as adaptor for the MDM2 E3 ligase. *The Journal of biological chemistry* 280, 24412-24419.
- Goel, P., Manning, J.A., y Kumar, S. (2015). NEDD4-2 (NEDD4L): the ubiquitin ligase for multiple membrane proteins. *Gene* 557, 1-10.
- Golan, M., Schreiber, G., y Avissar, S. (2013). Antidepressant-induced differential ubiquitination of β -arrestins 1 and 2 in mononuclear leucocytes of patients with depression. *The international journal of neuropsychopharmacology / official scientific journal of the Collegium Internationale Neuropsychopharmacologicum* 16, 1745-1754.
- Gonzalez-Gonzalez, I.M., Garcia-Tardon, N., Cubelos, B., Gimenez, C., y Zafra, F. (2008a). The glutamate transporter GLT1b interacts with the scaffold protein PSD-95. *Journal of neurochemistry* 105, 1834-1848.
- Gonzalez-Gonzalez, I.M., Garcia-Tardon, N., Gimenez, C., y Zafra, F. (2008b). PKC-dependent endocytosis of the GLT1 glutamate transporter depends on ubiquitylation of lysines located in a C-terminal cluster. *Glia* 56, 963-974.
- Gonzalez, M.I., y Robinson, M.B. (2004). Protein kinase C-dependent remodeling of glutamate transporter function. *Molecular interventions* 4, 48-58.
- Gonzalez, M.I., Krizman-Genda, E., y Robinson, M.B. (2007). Caveolin-1 regulates the delivery and endocytosis of the glutamate transporter, excitatory amino acid carrier 1. *The Journal of biological chemistry* 282, 29855-29865.
- Greuer, C., Watzke, N., Wiessner, M., y Rauen, T. (2000). Glutamate translocation of the neuronal glutamate transporter EAAC1 occurs within milliseconds. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 9706-9711.

- Groer, C.E., Schmid, C.L., Jaeger, A.M., y Bohn, L.M. (2011). Agonist-directed interactions with specific β -arrestins determine mu-opioid receptor trafficking, ubiquitination, and dephosphorylation. *The Journal of biological chemistry* 286, 31731-31741.
- Guillet, B.A., Velly, L.J., Canolle, B., Masméjean, F.M., Nieoullon, A.L., y Pisano, P. (2005). Differential regulation by protein kinases of activity and cell surface expression of glutamate transporters in neuron-enriched cultures. *Neurochemistry international* 46, 337-346.
- Han, F., Shioda, N., Moriguchi, S., Qin, Z.H., y Fukunaga, K. (2008). Downregulation of glutamate transporters is associated with elevation in extracellular glutamate concentration following rat microsphere embolism. *Neuroscience letters* 430, 275-280.
- Han, S.O., Kommaddi, R.P., y Shenoy, S.K. (2013). Distinct roles for β -arrestin2 and arrestin-domain-containing proteins in β 2 adrenergic receptor trafficking. *EMBO reports* 14, 164-171.
- Harvey, B.K., Airavaara, M., Hinzman, J., Wires, E.M., Chiocco, M.J., Howard, D.B., Shen, H., Gerhardt, G., Hoffer, B.J., y Wang, Y. (2011). Targeted over-expression of glutamate transporter 1 (GLT-1) reduces ischemic brain injury in a rat model of stroke. *PloS one* 6.
- Hicke, L. (2001). Protein regulation by monoubiquitin. *Nature reviews Molecular cell biology* 2, 195-201.
- Hilgemann, D.W. (1996). Unitary cardiac Na^+ , Ca^{2+} exchange current magnitudes determined from channel-like noise and charge movements of ion transport. *Biophysical journal* 71, 759-768.
- Holmer, H.K., Keyghobadi, M., Moore, C., y Meshul, C.K. (2005). L-dopa-induced reversal in striatal glutamate following partial depletion of nigrostriatal dopamine with 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Neuroscience* 136, 333-341.
- Holmseth, S., Scott, H.A., Real, K., Lehre, K.P., Leergaard, T.B., Bjaalie, J.G., y Danbolt, N.C. (2009). The concentrations and distributions of three C-terminal variants of the GLT1 (EAAT2; slc1a2) glutamate transporter protein in rat brain tissue suggest differential regulation. *Neuroscience* 162, 1055-1071.
- Hong, W.C., y Amara, S.G. (2013). Differential targeting of the dopamine transporter to recycling or degradative pathways during amphetamine- or PKC-regulated endocytosis in dopamine neurons. *FASEB journal* 27, 2995-3007.
- Hu, J., y Quick, M.W. (2008). Substrate-mediated regulation of gamma-aminobutyric acid transporter 1 in rat brain. *Neuropharmacology* 54, 309-318.
- Huotari, J., y Helenius, A. (2011). Endosome maturation. *The EMBO journal* 30, 3481-3500.
- Jackson, J.G., y Robinson, M.B. (2015). Reciprocal Regulation of Mitochondrial Dynamics and Calcium Signaling in Astrocyte Processes. *The Journal of neuroscience* 35, 15199-15213.
- Jackson, J.G., O'Donnell, J.C., Krizman, E., y Robinson, M.B. (2015). Displacing hexokinase from mitochondrial voltage-dependent anion channel impairs GLT-1-mediated glutamate uptake but does not disrupt interactions between GLT-1 and mitochondrial proteins. *Journal of neuroscience research* 93, 999-1008.
- Jacob, C.P., Koutsilieri, E., Bartl, J., Neuen-Jacob, E., Arzberger, T., Zander, N., Ravid, R., Roggendorf, W., Riederer, P., y Grunblatt, E. (2007). Alterations in expression of glutamatergic transporters and receptors in sporadic Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's disease : JAD* 11, 97-116.

- Ji, Y.F., Zhou, L., Xie, Y.J., Xu, S.M., Zhu, J., Teng, P., Shao, C.Y., Wang, Y., Luo, J.H., y Shen, Y. (2013). Upregulation of glutamate transporter GLT-1 by mTOR-Akt-NF- κ B cascade in astrocytic oxygen-glucose deprivation. *Glia* 61, 1959-1975.
- Jimenez, E., Nunez, E., Ibanez, I., Draffin, J.E., Zafra, F., y Gimenez, C. (2014). Differential regulation of the glutamate transporters GLT-1 and GLAST by GSK3 β . *Neurochemistry international* 79, 33-43.
- Jorgensen, T.N., Christensen, P.M., y Gether, U. (2014). Serotonin-induced down-regulation of cell surface serotonin transporter. *Neurochemistry international* 73, 107-112.
- Jung, N., y Haucke, V. (2007). Clathrin-mediated endocytosis at synapses. *Traffic* 8, 1129-1136.
- Kamynina, E., Debonneville, C., Bens, M., Vandewalle, A., y Staub, O. (2001). A novel mouse Nedd4 protein suppresses the activity of the epithelial Na⁺ channel. *FASEB journal* 15, 204-214.
- Kanai, Y., y Hediger, M.A. (1992). Primary structure and functional characterization of a high-affinity glutamate transporter. *Nature* 360, 467-471.
- Kanai, Y., Clemencon, B., Simonin, A., Leuenberger, M., Lochner, M., Weisstanner, M., y Hediger, M.A. (2013). The SLC1 high-affinity glutamate and neutral amino acid transporter family. *Molecular aspects of medicine* 34, 108-120.
- Kandel, E. R., Schwartz, J. H. 1., & Jessell, T. M. (2000). *Principles of neural science (4th ed.)*. New York: McGraw-Hill, Health Professions Division.
- Kanner, B.I. (2006). Structure and function of sodium-coupled GABA and glutamate transporters. *The Journal of membrane biology* 213, 89-100.
- Kim, E., y Sheng, M. (2004). PDZ domain proteins of synapses. *Nature reviews Neuroscience* 5, 771-781.
- Kirchhausen, T., Owen, D., y Harrison, S.C. (2014). Molecular structure, function, and dynamics of clathrin-mediated membrane traffic. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 6.
- Kommaddi, R.P., y Shenoy, S.K. (2013). Arrestins and protein ubiquitination. *Progress in molecular biology and translational science* 118, 175-204.
- Komander, D., y Rape, M. (2012). The ubiquitin code. *Annual review of biochemistry* 81, 203-229.
- Krzyzanowska, W., Pomierny, B., Filip, M., y Pera, J. (2014). Glutamate transporters in brain ischemia: to modulate or not? *Acta pharmacologica Sinica* 35, 444-462.
- Lackovic, J., Howitt, J., Callaway, J.K., Silke, J., Bartlett, P., y Tan, S.S. (2012). Differential regulation of Nedd4 ubiquitin ligases and their adaptor protein Ndfip1 in a rat model of ischemic stroke. *Experimental neurology* 235, 326-335.
- Lai, T.W., Zhang, S., y Wang, Y.T. (2014). Excitotoxicity and stroke: identifying novel targets for neuroprotection. *Progress in neurobiology* 115, 157-188.
- Lajoie, P., y Nabi, I.R. (2010). Lipid Rafts, Caveolae, and Their Endocytosis. *282*, 135-163.
- Lakshmikanthan, V., Zou, L., Kim, J.I., Michal, A., Nie, Z., Messias, N.C., Benovic, J.L., y Daaka, Y. (2009). Identification of β Arrestin2 as a corepressor of androgen receptor signaling in prostate cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 9379-9384.

- Lang, F., y Foller, M. (2014). Regulation of ion channels and transporters by AMP-activated kinase (AMPK). *Channels* 8, 20-28.
- Laporte, S.A., Oakley, R.H., Holt, J.A., Barak, L.S., y Caron, M.G. (2000). The interaction of β -arrestin with the AP-2 adaptor is required for the clustering of β 2-adrenergic receptor into clathrin-coated pits. *The Journal of biological chemistry* 275, 23120-23126.
- Lehman, N.L. (2009). The ubiquitin proteasome system in neuropathology. *Acta neuropathologica* 118, 329-347.
- Lehre, K.P., y Danbolt, N.C. (1998). The Number of Glutamate Transporter Subtype Molecules at Glutamatergic Synapses: Chemical and Stereological Quantification in Young Adult Rat Brain. *The Journal of Neuroscience* 18, 8751-8757.
- Li, J., y McCullough, L.D. (2010). Effects of AMP-activated protein kinase in cerebral ischemia. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 30, 480-492.
- Li, W., Chanda, S.K., Micik, I., y Joazeiro, C.A. (2005). Methods for the functional genomic analysis of ubiquitin ligases. *Methods in enzymology* 398, 280-291.
- Li, X., Garrity, A.G., y Xu, H. (2013). Regulation of membrane trafficking by signalling on endosomal and lysosomal membranes. *The Journal of physiology* 591, 4389-4401.
- Lin, A.W., y Man, H.Y. (2013). Ubiquitination of neurotransmitter receptors and postsynaptic scaffolding proteins. *Neural plasticity* 2013.
- Lin, C.H., MacGurn, J.A., Chu, T., Stefan, C.J., y Emr, S.D. (2008). Arrestin-related ubiquitin-ligase adaptors regulate endocytosis and protein turnover at the cell surface. *Cell* 135, 714-725.
- Lin, C.L., Kong, Q., Cuny, G.D., y Glicksman, M.A. (2012). Glutamate transporter EAAT2: a new target for the treatment of neurodegenerative diseases. *Future medicinal chemistry* 4, 1689-1700.
- Loaiza, A., Porras, O.H., y Barros, L.F. (2003). Glutamate Triggers Rapid Glucose Transport Stimulation in Astrocytes as Evidenced by Real-Time Confocal Microscopy. *The Journal of Neuroscience* 23, 7337-7342.
- MacGurn, J.A., Hsu, P.C., y Emr, S.D. (2012). Ubiquitin and membrane protein turnover: from cradle to grave. *Annual review of biochemistry* 81, 231-259.
- Magi, S., Lariccia, V., Castaldo, P., Arcangeli, S., Nasti, A.A., Giordano, A., y Amoroso, S. (2012). Physical and functional interaction of NCX1 and EAAC1 transporters leading to glutamate-enhanced ATP production in brain mitochondria. *PloS one* 7.
- Martinez-Villarreal, J., Garcia Tardon, N., Ibanez, I., Gimenez, C., y Zafra, F. (2012). Cell surface turnover of the glutamate transporter GLT-1 is mediated by ubiquitination/deubiquitination. *Glia* 60, 1356-1365.
- Matute, C., Melone, M., Vallejo-Illarramendi, A., y Conti, F. (2005). Increased expression of the astrocytic glutamate transporter GLT-1 in the prefrontal cortex of schizophrenics. *Glia* 49, 451-455.
- Mayor, S., y Pagano, R.E. (2007). Pathways of clathrin-independent endocytosis. *Nature reviews Molecular cell biology* 8, 603-612.

- McKenna, M.C. (2013). Glutamate pays its own way in astrocytes. *Frontiers in endocrinology* 4, 191.
- Meeker, K.D., Meabon, J.S., y Cook, D.G. (2015). Partial Loss of the Glutamate Transporter GLT-1 Alters Brain Akt and Insulin Signaling in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's disease : JAD* 45, 509-520.
- Melikian, H.E. (2004). Neurotransmitter transporter trafficking: endocytosis, recycling, and regulation. *Pharmacology & therapeutics* 104, 17-27.
- Minelli, A., Castaldo, P., Gobbi, P., Salucci, S., Magi, S., y Amoroso, S. (2007). Cellular and subcellular localization of Na⁺-Ca²⁺ exchanger protein isoforms, NCX1, NCX2, and NCX3 in cerebral cortex and hippocampus of adult rat. *Cell calcium* 41, 221-234.
- Miranda, M., Dionne, K.R., Sorkina, T., y Sorkin, A. (2007). Three ubiquitin conjugation sites in the amino terminus of the dopamine transporter mediate protein kinase C-dependent endocytosis of the transporter. *Molecular biology of the cell* 18, 313-323.
- Mitani, A., y Tanaka, K. (2003). Functional Changes of Glial Glutamate Transporter GLT-1 during Ischemia: An In Vivo Study in the Hippocampal CA1 of Normal Mice and Mutant Mice Lacking GLT-1. *The Journal of Neuroscience* 23, 7176 -7182.
- Morel, L., Regan, M., Higashimori, H., Ng, S.K., Esau, C., Vidensky, S., Rothstein, J., y Yang, Y. (2013). Neuronal exosomal miRNA-dependent translational regulation of astroglial glutamate transporter GLT1. *The Journal of biological chemistry* 288, 7105-7116.
- Moussawi, K., Riegel, A., Nair, S., y Kalivas, P.W. (2011). Extracellular glutamate: functional compartments operate in different concentration ranges. *Frontiers in systems neuroscience* 5.
- Mund, T., y Pelham, H.R. (2010). Regulation of PTEN/Akt and MAP kinase signaling pathways by the ubiquitin ligase activators Ndfip1 and Ndfip2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 11429-11434.
- Murphy-Royal, C., Dupuis, J.P., Varela, J.A., Panatier, A., Pinson, B., Baufreton, J., Groc, L., y Oliet, S.H. (2015). Surface diffusion of astrocytic glutamate transporters shapes synaptic transmission. *Nature neuroscience* 18, 219-226.
- Nabhan, J.F., Pan, H., y Lu, Q. (2010). Arrestin domain-containing protein 3 recruits the NEDD4 E3 ligase to mediate ubiquitination of the β₂-adrenergic receptor. *EMBO reports* 11, 605-611.
- Nijman, S.M., Luna-Vargas, M.P., Velds, A., Brummelkamp, T.R., Dirac, A.M., Sixma, T.K., y Bernards, R. (2005). A genomic and functional inventory of deubiquitinating enzymes. *Cell* 123, 773-786.
- Nishizawa, Y. (2001). Glutamate release and neuronal damage in ischemia. *Life Sciences* 69, 369-381.
- Niswender, C.M., y Conn, P.J. (2010). Metabotropic glutamate receptors: physiology, pharmacology, and disease. *Annual review of pharmacology and toxicology* 50, 295-322.
- Parpura, V., y Verkhratsky, A. (2012). Homeostatic function of astrocytes: Ca²⁺ and Na⁺ signalling. *Translational neuroscience* 3, 334-344.

- Pellerin, L., y Magistretti, P.J. (1994). Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: A mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, 10625-10629.
- Pines, G., Danbolt, N.C., Bjoras, M., Zhang, Y., Bendahan, A., Eide, L., Koepsell, H., Storm-Mathisen, J., Seeberg, E., y Kanner, B.I. (1992). Cloning and expression of a rat brain L-glutamate transporter. *Nature* 360, 464-467.
- Pitcher, J.A., Freedman, N.J., y Lefkowitz, R.J. (1998). G protein-coupled receptor kinases. *Annual review of biochemistry* 67, 653-692.
- Puca, L., Chastagner, P., Meas-Yedid, V., Israel, A., y Brou, C. (2013). α -arrestin 1 (ARRDC1) and β -arrestins cooperate to mediate Notch degradation in mammals. *Journal of cell science* 126, 4457-4468.
- Puca, L., y Brou, C. (2014). α -arrestins - new players in Notch and GPCR signaling pathways in mammals. *Journal of cell science* 127, 1359-1367.
- Rajamanickam, J., Palmada, M., Lang, F., y Boehmer, C. (2007). EAAT4 phosphorylation at the SGK1 consensus site is required for transport modulation by the kinase. *Journal of neurochemistry* 102, 858-866.
- Raju, K., Doulias, P.T., Evans, P., Krizman, E.N., Jackson, J.G., Horyn, O., Daikhin, Y., Nissim, I., Yudkoff, M., Nissim, I., *et al.* (2015). Regulation of brain glutamate metabolism by nitric oxide and S-nitrosylation. *Science signaling* 8.
- Ramos-Cabrer, P., Campos, F., Sobrino, T., y Castillo, J. (2011). Targeting the ischemic penumbra. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 42, S7-11.
- Raney, M.A., y Turcotte, L.P. (2008). Evidence for the involvement of CaMKII and AMPK in Ca²⁺-dependent signaling pathways regulating FA uptake and oxidation in contracting rodent muscle. *Journal of Applied Physiology* 104, 1366-1373.
- Rauch, S., y Martin-Serrano, J. (2011). Multiple interactions between the ESCRT machinery and arrestin-related proteins: implications for PPXY-dependent budding. *Journal of virology* 85, 3546-3556.
- Rauen, T., Wiessner, M., Sullivan, R., Lee, A., y Pow, D.V. (2004). A new GLT1 splice variant: cloning and immunolocalization of GLT1c in the mammalian retina and brain. *Neurochemistry international* 45, 1095-1106.
- Reyes-Turcu, F.E., Ventii, K.H., y Wilkinson, K.D. (2009). Regulation and cellular roles of ubiquitin-specific deubiquitinating enzymes. *Annual review of biochemistry* 78, 363-397.
- Richards, T.L., y Zahniser, N.R. (2009). Rapid substrate-induced down-regulation in function and surface localization of dopamine transporters: rat dorsal striatum versus nucleus accumbens. *Journal of neurochemistry* 108, 1575-1584.
- Robinson, M.B. (2006). Acute Regulation of Sodium-Dependent Glutamate Transporters: A Focus on Constitutive and Regulated Trafficking. *HEP* 175, 251-275.
- Romera, C., Hurtado, O., Mallolas, J., Pereira, M.P., Morales, J.R., Romera, A., Serena, J., Vivancos, J., Nombela, F., Lorenzo, P., *et al.* (2007). Ischemic preconditioning reveals that GLT1/EAAT2 glutamate transporter is a novel PPAR γ target gene involved in neuroprotection. *Journal of cerebral blood flow and metabolism* 27, 1327-1338.

- Rose, E.M., Koo, J.C., Antflick, J.E., Ahmed, S.M., Angers, S., y Hampson, D.R. (2009). Glutamate transporter coupling to Na,K-ATPase. *The Journal of neuroscience* 29, 8143-8155.
- Rossi, D.J., Oshima, T., y Attwell, D. (2000). Glutamate release in severe brain ischaemia is mainly by reversed uptake. *Nature* 403, 316-321.
- Rothstein, J.D., Van Kammen, M., Levey, A.I., Martin, L.J., y Kuncl, R.W. (1995). Selective loss of glial glutamate transporter GLT-1 in amyotrophic lateral sclerosis. *Annals of neurology* 38, 73-84.
- Rothstein, J.D., Patel, S., Regan, M.R., Haenggeli, C., Huang, Y.H., Bergles, D.E., Jin, L., Dykes Hoberg, M., Vidensky, S., Chung, D.S., *et al.* (2005). β -lactam antibiotics offer neuroprotection by increasing glutamate transporter expression. *Nature* 433, 73-77.
- Rubio, I., Torres, M., Miras-Portugal, M.T., y Sanchez-Prieto, J. (1991). Ca^{2+} -independent release of glutamate during in vitro anoxia in isolated nerve terminals. *Journal of neurochemistry* 57, 1159-1164.
- Salcedo A, Mayor Jr F, y Penela P. (2006) Mdm2 is involved in the ubiquitination and degradation of G-protein-coupled receptor kinase 2. *The EMBO journal* 25, 4752-4762.
- Saunders, C., Ferrer, J.V., Shi, L., Chen, J., Merrill, G., Lamb, M.E., Leeb-Lundberg, L.M., Carvelli, L., Javitch, J.A., y Galli, A. (2000). Amphetamine-induced loss of human dopamine transporter activity: an internalization-dependent and cocaine-sensitive mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 6850-6855.
- Scofield, M.D., y Kalivas, P.W. (2014). Astrocytic dysfunction and addiction: consequences of impaired glutamate homeostasis. *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry* 20, 610-622.
- Schmitt, A., Asan, E., Lesch, K.P., y Kugler, P. (2002). A splice variant of glutamate transporter GLT1/EAAT2 expressed in neurons: cloning and localization in rat nervous system. *Neuroscience* 109, 45-61.
- Shanmugham, A., y Ovaa, H. (2008). DUBs and disease: activity assays for inhibitor development. *Current opinion in drug discovery & development* 11, 688-696.
- Shea, F.F., Rowell, J.L., Li, Y., Chang, T.H., y Alvarez, C.E. (2012). Mammalian α arrestins link activated seven transmembrane receptors to Nedd4 family e3 ubiquitin ligases and interact with β arrestins. *PloS one* 7.
- Sheldon, A.L., Gonzalez, M.I., Krizman-Genda, E.N., Susarla, B.T., y Robinson, M.B. (2008). Ubiquitination-mediated internalization and degradation of the astroglial glutamate transporter, GLT-1. *Neurochemistry international* 53, 296-308.
- Shenoy, S.K., McDonald, P.H., Kohout, T.A., y Lefkowitz, R.J. (2001). Regulation of Receptor Fate by Ubiquitination of Activated β 2-Adrenergic Receptor and β -Arrestin. *Science* 294, 1307-1313.
- Shenoy, S.K., y Lefkowitz, R.J. (2003). Trafficking patterns of β -arrestin and G protein-coupled receptors determined by the kinetics of β -arrestin deubiquitination. *The Journal of biological chemistry* 278, 14498-14506.
- Shenoy, S.K., Xiao, K., Venkataramanan, V., Snyder, P.M., Freedman, N.J., y Weissman, A.M. (2008). Nedd4 mediates agonist-dependent ubiquitination, lysosomal targeting, and degradation of the β 2-adrenergic receptor. *The Journal of biological chemistry* 283, 22166-22176.

- Shepherd, J.D., y Huganir, R.L. (2007). The cell biology of synaptic plasticity: AMPA receptor trafficking. *Annual review of cell and developmental biology* 23, 613-643.
- Shonesy, B.C., Jalan-Sakrikar, N., Cavener, V.S., y Colbran, R.J. (2014). CaMKII: a molecular substrate for synaptic plasticity and memory. *Progress in molecular biology and translational science* 122, 61-87
- Simonin, A., y Fuster, D. (2010). Nedd4-1 and β -arrestin-1 are key regulators of Na⁺/H⁺ exchanger 1 ubiquitylation, endocytosis, and function. *The Journal of biological chemistry* 285, 38293-38303.
- Skou, J.C. (1990). The fourth Datta lecture. The energy coupled exchange of Na⁺ for K⁺ across the cell membrane. The Na⁺, K⁺-pump. *FEBS letters* 268, 314-324.
- Snyder, P.M., Steines, J.C., y Olson, D.R. (2004). Relative contribution of Nedd4 and Nedd4-2 to ENaC regulation in epithelia determined by RNA interference. *The Journal of biological chemistry* 279, 5042-5046.
- Sopjani, M., Alesutan, I., Dermaku-Sopjani, M., Fraser, S., Kemp, B.E., Foller, M., y Lang, F. (2010). Down-regulation of Na⁺-coupled glutamate transporter EAAT3 and EAAT4 by AMP-activated protein kinase. *Journal of neurochemistry* 113, 1426-1435.
- Sorkina, T., Hoover, B.R., Zahniser, N.R., y Sorkin, A. (2005). Constitutive and protein kinase C-induced internalization of the dopamine transporter is mediated by a clathrin-dependent mechanism. *Traffic* 6, 157-170.
- Sorkina, T., Miranda, M., Dionne, K.R., Hoover, B.R., Zahniser, N.R., y Sorkin, A. (2006). RNA interference screen reveals an essential role of Nedd4-2 in dopamine transporter ubiquitination and endocytosis. *The Journal of neuroscience* 26, 8195-8205.
- Srivastava, A., Gupta, B., Gupta, C., y Shukla, A.K. (2015). Emerging Functional Divergence of β -arrestin Isoforms in GPCR Function. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 26, 628-642.
- Staub, O., Dho, S., Henry, P., Correa, J., Ishikawa, T., McGlade, J., y Rotin, D. (1996). WW domains of Nedd4 bind to the proline-rich PY motifs in the epithelial Na⁺ channel deleted in Liddle's syndrome. *The EMBO journal* 15, 2371-2380.
- Storck, T., Schulte, S., Hofmann, K., y Stoffel, W. (1992). Structure, expression, and functional analysis of a Na⁺-dependent glutamate/aspartate transporter from rat brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, 10955-10959.
- Su, Z.Z., Leszczyniecka, M., Kang, D.C., Sarkar, D., Chao, W., Volsky, D.J., y Fisher, P.B. (2003). Insights into glutamate transport regulation in human astrocytes: cloning of the promoter for excitatory amino acid transporter 2 (EAAT2). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 1955-1960.
- Susarla, B.T., y Robinson, M.B. (2008). Internalization and degradation of the glutamate transporter GLT-1 in response to phorbol ester. *Neurochemistry international* 52, 709-722.
- Swanson, R.A., Liu, J., Miller, J.W., Rothstein, J.D., Farrell, K., Stein, B.A., y Longuemare, M.C. (1997). Neuronal regulation of glutamate transporter subtype expression in astrocytes. *The Journal of neuroscience* 17, 932-940.

- Szydłowska, K., Goźdz, A., Dąbrowski, M., Zawadzka, M., y Kamińska, B. (2010). Prolonged activation of ERK triggers glutamate-induced apoptosis of astrocytes: neuroprotective effect of FK506. *Journal of neurochemistry* 113, 904-918.
- Takahashi, K., Foster, J.B., y Lin, C.L. (2015). Glutamate transporter EAAT2: regulation, function, and potential as a therapeutic target for neurological and psychiatric disease. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 72, 3489-3506.
- Tanaka, K. (1993). Expression cloning of a rat glutamate transporter. *Neuroscience research* 16, 149-153.
- Tanaka, K., Watase, K., Manabe, T., Yamada, K., Watanabe, M., Takahashi, K., Iwama, H., Nishikawa, T., Ichihara, N., Kikuchi, T., *et al.* (1997). Epilepsy and Exacerbation of Brain Injury in Mice Lacking the Glutamate Transporter GLT-1. *Science* 276, 1699-1702.
- Tian, G., Lai, L., Guo, H., Lin, Y., Butchbach, M.E., Chang, Y., y Lin, C.L. (2007). Translational control of glial glutamate transporter EAAT2 expression. *The Journal of biological chemistry* 282, 1727-1737.
- Traub, L.M., y Bonifacino, J.S. (2013). Cargo recognition in clathrin-mediated endocytosis. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 5.
- Traynelis, S.F., Wollmuth, L.P., McBain, C.J., Menniti, F.S., Vance, K.M., Ogden, K.K., Hansen, K.B., Yuan, H., Myers, S.J., y Dingledine, R. (2010). Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. *Pharmacological reviews* 62, 405-496.
- Trotti, D., Aoki, M., Pasinelli, P., Berger, U.V., Danbolt, N.C., Brown, R.H., Jr., y Hediger, M.A. (2001). Amyotrophic lateral sclerosis-linked glutamate transporter mutant has impaired glutamate clearance capacity. *The Journal of biological chemistry* 276, 576-582.
- Tzingounis, A.V., y Wadiche, J.I. (2007). Glutamate transporters: confining runaway excitation by shaping synaptic transmission. *Nature reviews Neuroscience* 8, 935-947.
- Underhill, S.M., Wheeler, D.S., y Amara, S.G. (2015). Differential regulation of two isoforms of the glial glutamate transporter EAAT2 by DLG1 and CaMKII. *The Journal of neuroscience* 35, 5260-5270.
- Vandenberg, R.J., y Ryan, R.M. (2013). Mechanisms of glutamate transport. *Physiological reviews* 93, 1621-1657.
- Vembar, S.S., y Brodsky, J.L. (2008). One step at a time: endoplasmic reticulum-associated degradation. *Nature reviews Molecular cell biology* 9, 944-957.
- Veruki, M.L., Morkve, S.H., y Hartveit, E. (2006). Activation of a presynaptic glutamate transporter regulates synaptic transmission through electrical signaling. *Nature neuroscience* 9, 1388-1396.
- Walther, C., y Ferguson, S.S. (2013). Arrestins: role in the desensitization, sequestration, and vesicular trafficking of G protein-coupled receptors. *Progress in molecular biology and translational science* 118, 93-113.
- Widagdo, J., Chai, Y.J., Ridder, M.C., Chau, Y.Q., Johnson, R.C., Sah, P., Haganir, R.L., y Anggono, V. (2015). Activity-Dependent Ubiquitination of GluA1 and GluA2 Regulates AMPA Receptor Intracellular Sorting and Degradation. *Cell reports* 10, 783-795.

- Woods, A., Johnstone, S.R., Dickerson, K., Leiper, F.C., Fryer, L.G., Neumann, D., Schlattner, U., Wallimann, T., Carlson, M., y Carling, D. (2003). LKB1 is the upstream kinase in the AMP-activated protein kinase cascade. *Current biology : CB* 13, 2004-2008.
- Woods, A., Dickerson, K., Heath, R., Hong, S.P., Momcilovic, M., Johnstone, S.R., Carlson, M., y Carling, D. (2005). Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase kinase- β acts upstream of AMP-activated protein kinase in mammalian cells. *Cell metabolism* 2, 21-33.
- Yamada, H., Imajoh-Ohmi, S., y Haga, T. (2012). The high-affinity choline transporter CHT1 is regulated by the ubiquitin ligase Nedd4-2. *Biomedical Research* 33, 1-8.
- Yang, Y., Kitagaki, J., Dai, R.M., Tsai, Y.C., Lorick, K.L., Ludwig, R.L., Pierre, S.A., Jensen, J.P., Davydov, I.V., Oberoi, P., *et al.* (2007). Inhibitors of ubiquitin-activating enzyme (E1), a new class of potential cancer therapeutics. *Cancer research* 67, 9472-9481.
- Yeh, T.H., Hwang, H.M., Chen, J.J., Wu, T., Li, A.H., y Wang, H.L. (2005). Glutamate transporter function of rat hippocampal astrocytes is impaired following the global ischemia. *Neurobiology of disease* 18, 476-483.
- Yernool, D., Boudker, O., Jin, Y., y Gouaux, E. (2004). Structure of a glutamate transporter homologue from *Pyrococcus horikoshii*. *Nature* 431, 811-818.
- Zelenaia, O., Schlag, B.D., Gochenauer, G.E., Ganel, R., Song, W., Beesley, J.S., Grinspan, J.B., Rothstein, J.D., y Robinson, M.B. (2000). Epidermal growth factor receptor agonists increase expression of glutamate transporter GLT-1 in astrocytes through pathways dependent on phosphatidylinositol 3-kinase and transcription factor NF- κ B. *Molecular pharmacology* 57, 667-678.
- Zhang, X., Shi, M., Bjoras, M., Wang, W., Zhang, G., Han, J., Liu, Z., Zhang, Y., Wang, B., Chen, J., *et al.* (2013). Ginsenoside Rd promotes glutamate clearance by up-regulating glial glutamate transporter GLT-1 via PI3K/AKT and ERK1/2 pathways. *Frontiers in pharmacology* 4, 152.
- Zhou, Y., y Danbolt, N.C. (2014). Glutamate as a neurotransmitter in the healthy brain. *Journal of neural transmission* 121, 799-817.