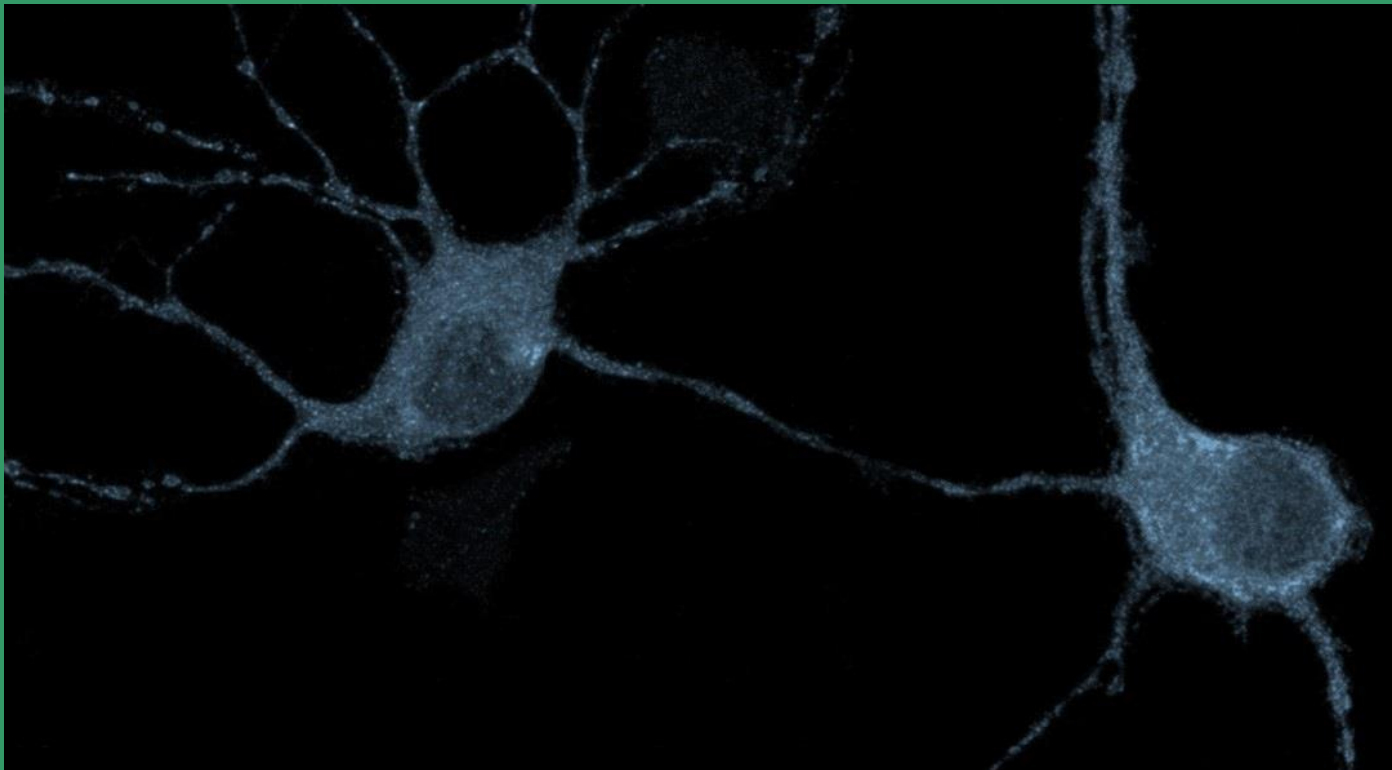


Fisiopatología del transportador neuronal de glicina GlyT2: regulación y estudio de mutantes asociados a hiperplexia

Tesis Doctoral
Andrés de la Rocha Muñoz
Madrid, 2020



UAM

Universidad Autónoma
de Madrid



Universidad Autónoma de Madrid



Facultad de Ciencias

Departamento de Biología Molecular

Fisiopatología del transportador neuronal de glicina GlyT2: regulación y estudio de mutantes asociados a hiperplexia

Memoria presentada por el graduado en Bioquímica Andrés de la Rocha Muñoz para optar al título de Doctor en Biociencias Moleculares por la Universidad Autónoma de Madrid

Directoras de la Tesis Doctoral: Beatriz López Corcuera y Carmen Aragón Rueda

Tutora de la Tesis Doctoral: Beatriz López Corcuera

Este trabajo ha sido realizado en el Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa” (CSIC-UAM)



A mis padres, Felipe y M^a Cruz

By nature, I'm curious

Science is serious

Stand High Patrol, My Research

Agradecimientos

Tras cuatro años de trabajo y una pandemia global, ha llegado la hora de depositar la Tesis. Echando la vista atrás, y aunque no suela reparar mucho en ello, durante todo este tiempo mi vida ha cambiado mucho, pasando de estudiante a trabajador asalariado, de vivir con mis padres a estar independizado, de estar empadronado en Torrejón de Ardoz a estar empadronado en Madrid y, por supuesto, de ser un jovencito confuso emocionado por embarcarse en el mundo de la ciencia a ser un jovencito... bueno, jovencito cada vez menos, confuso aún, pero con algo de experiencia en el mundo de la ciencia. Una experiencia que ha sido muy gratificante, aunque haya conocido la frustración algunos días y, en general, positiva. Por ello, quiero agradecer en primer lugar a la gente con la que he trabajado estos cuatro años y que, sin ellos, estoy seguro de que esta etapa no hubiese sido tan buena.

A Beatriz López Corcuera, por haberme dado la oportunidad de unirme a su laboratorio, abrirme la puerta para poder iniciarme en la carrera investigadora a través del estudio de GlyT2 e introducirme en este campo tan bonito que es el de la neurotransmisión glicinérgica. A Carmen Aragón Rueda, por confiar en mí para realizar esos pocos experimentos que restaban para responder a los revisores del artículo de LNX1 y que luego se convirtieron en muchos más. Gracias a las dos, Beatriz y Carmen, por ser mis mentoras científicas durante estos cuatro años. Si he llegado a este punto en el que estoy ahora es en buena parte gracias a vuestra sabia dirección.

A Enrique Núñez Balbuena, el maestro, el hombre que todo lo sabe sobre las técnicas experimentales, el autor de los western blots más limpios y bonitos, un ejemplo de meticulosidad y precisión a la hora de trabajar en un laboratorio ¡Qué sería del laboratorio si tú no estuvieses! Enri, una buena proporción de lo que se muestra en esta Tesis ha sido realizado por ti y no puedo sino agradecer tu ayuda, que ha sido imprescindible para poder sacar adelante todo este trabajo. De este periodo lo que me llevo son tus enseñanzas y el tiempo que hemos pasado juntos mientras trabajábamos codo con codo.

A todas mis compañeras, tanto del laboratorio 304 como de los laboratorios 306 y 307, tanto las que están actualmente como las que han pasado. Todas sabemos que el trabajo es trabajo, que, aunque ocupe una buena parte de nuestro tiempo diario, lo verdaderamente importante es lo que pasa más allá. Nosotras tenemos la suerte o la desgracia de que nuestro trabajo nos gusta, en algunos casos nos apasiona, y eso puede hacer que algunas veces sacrifiquemos otros aspectos de nuestra vida por él. Lo que verdaderamente es una suerte es haber encontrado a un grupo de personas como vosotras, con las que poder hablar de cualquier tema sin ningún reparo y de las que aprender alguna cosa nueva en cada conversación. A mis compañeras del 304, Cris y Raquel, hacéis fácil el trabajo en el laboratorio, siempre dispuestas a echar una mano y teniendo paciencia, no solo con el desorden de las demás, sino con los silbidos

de alguno ¡Cómo mejoraba la mañana con un poquito de música! Creo que sois unas científicas geniales, con una capacidad de organización de la que yo carezco y que espero que os traiga mucho éxito y satisfacciones en el futuro. También a Elena, porque fuiste una estudiante de TFG estupenda. Espero que te vaya muy bien. A Lola, la superviviente del laboratorio 306, la chica de los mil transportadores, siempre loca con jornadas interminables. Me alegro mucho de haber compartido los desayunos en la cafetería, las mañanas de disección y de irte a molestar tantas veces a tu sitio; nos hemos reído mucho y esto no hubiese sido igual sin esos ratos. A las chicas del laboratorio 307, Elena y Raquel ¿Os siguen sin funcionar los lentivirus? Yo creo que las HEK 293T no son, porque no tienen muchos pasas y el test de micoplasma salió negativo. Igual hay que cambiar el método de transfección. En todo caso, volved a descongelar células. Por último, a los que ya no están, a Nacho y a David, antiguos compañeros y cada uno fuera de la Península Ibérica ¡No sabéis la de conversaciones cachondas durante las comidas que os habéis perdido desde que no estáis! No sé qué será de mí una vez que haya defendido la Tesis, pero sé que me voy a acordar mucho de vosotras y espero que podamos seguirnos viendo de vez en cuando, aunque solo sea en la cena de Navidad para hacernos algún regalo horrible del Amigo Invisible.

Finalmente, del grupo de personas que han estado presentes durante el desarrollo de esta Tesis o que han hecho posible su realización, quería dar las gracias a María Delgado Barea y a Sergio Gómez López del laboratorio de Fernando Martín Belmonte. Gracias por la ayuda con los peces cebra. Especialmente a Sergio, por su disposición y por haber realizado las fantásticas inmunohistofluorescencias que se recogen en esta memoria.

Además de las personas con las que he compartido de forma más directa el trabajo de estos cuatro años, hay otras personas que forman parte de mi vida desde antes, que de forma indirecta también han vivido conmigo esta etapa y a las que quería darles las gracias.

A mis amigos de Torrejón: Mance, Nouses, Barci, Rojas, Álvaro, Manu y Jolo. Por las cervecitas en las terrazas, por las olvidadas noches de verano en el puente, por el infecto 666, por el “Resí” y, en general, por todo lo vivido juntos y los buenos momentos. Aunque cada vez reunamos menos a la banda, las veces que quedamos siento que no ha pasado el tiempo, que seguimos teniendo la misma confianza que cuando éramos más jóvenes y eso es muy importante para mí. A los bioquímicos, la Secta, por haber compartido conmigo algunos de los momentos más importantes de mi vida, tanto a nivel académico como a nivel personal, y por haber seguido conmigo durante el tiempo que ha durado la realización del doctorado.

A mi familia, porque si hay algo que realmente me hace feliz ahora que estamos un poco más alejados es reunirme con vosotros en cada cumpleaños, cada Navidad y, en general, en cualquier evento que se organice. Me considero muy afortunado por haber nacido en esta familia, de la cual, al ser tan amplia y ser yo el hijo menor, he recibido tantísimo cariño. A mis

hermanos, Sergio, Alberto y Javi, por haberme casi criado junto a papá y a mamá, lo cual creo se refleja en mis inquietudes, aspiraciones, aficiones y personalidad. Especialmente, quería dar las gracias a Alberto, por haber leído la memoria de una forma tan minuciosa, por detectar todas esas erratas y ayudarme a colocar las tildes, las comas y los puntos en el lugar correcto. A mis padres, M^a Cruz y Felipe, por su empeño y dedicación durante todos estos años; por educarme, motivarme y ofrecerme un futuro. No sé realmente por qué decidí meterme en el mundo de la ciencia, pero me he metido y supongo que algo de responsabilidad tendréis en ello. Por todo esto, esta Tesis va dedicada a vosotros.

Por último, le quería dar las gracias a Alba, mi amor. En lo que respecta estrictamente a la memoria, por leerla, releerla y escucharla leída por mí; en lo que respecta al tiempo que ha durado el doctorado, por apoyarme, aconsejarme y alegrarme en los momentos menos gratos. No obstante, todo esto es lo de menos. Por lo que te tengo que dar las gracias realmente, Alba, es por hacer de mí una persona más empática y sensible, por aguantarme y cuidarme; en definitiva, por quererme tanto como me quieres. Estoy muy feliz de que nos mudásemos hace tres años y de haber iniciado una vida en común contigo. Como he escrito un poco más arriba, no sé qué será de mí a nivel laboral en un futuro, pero no me imagino un futuro sin ti. De todos los proyectos imaginables, el que más ilusión me hace es nuestra familia.

Resumen/Summary

La glicina es el principal neurotransmisor inhibitorio en áreas caudales del sistema nervioso central. En las sinapsis glicinérgicas inhibitorias, la neurotransmisión finaliza gracias a la recaptación del transmisor por parte de los transportadores de glicina GlyT1 y GlyT2 en un proceso acoplado al gradiente electroquímico de Na⁺ y dependiente de Cl⁻. GlyT2 se encuentra exclusivamente en las neuronas presinápticas y suministra glicina al interior celular, lo que facilita el relleno de vesículas sinápticas. Esto confiere a GlyT2 un papel fundamental en el mantenimiento de la neurotransmisión glicinérgica, por lo que su regulación es de vital importancia para la biología de este tipo de sinapsis. Asimismo, los defectos que afectan a la función del transportador pueden alterar la fisiología sináptica y tener consecuencias patológicas. En este sentido, algunas mutaciones en el gen de GlyT2 constituyen la segunda causa más frecuente de hiperplexia humana, una enfermedad rara caracterizada por sobresaltos energéticos, exagerados y sostenidos en respuesta a estímulos triviales. En esta Tesis Doctoral se han explorado, por un lado, dos nuevos mecanismos fisiológicos de regulación de GlyT2 y, por otro lado, se ha realizado la caracterización molecular de dos mutantes asociados con hiperplexia humana: las variantes A277T e Y707C.

Con respecto a la regulación, se ha demostrado, en primer lugar, que la ruta de señalización de Hedgehog modula a GlyT2 tanto en neuronas primarias de tallo cerebral y médula espinal de rata como en embriones de pez cebra. Los resultados indican que la activación de la vía de Hedgehog reduce la cantidad de GlyT2, disminuyendo los niveles de su mRNA y aumentando su ubiquitinación, siendo esta última el proceso predominante en esta regulación. En segundo lugar, se ha demostrado que las E3 ubiquitin ligasas LNX1 y LNX2 interactúan, ubiquitinan y promueven la degradación de GlyT2 en el sistema heterólogo COS-7. Además, el silenciamiento de LNX2 en neuronas de tallo cerebral y médula espinal aumenta los niveles del transportador y evita su degradación promovida por la activación de proteína quinasa C.

En lo que se refiere a la caracterización de los dos mutantes asociados a hiperplexia, se ha demostrado en varios sistemas heterólogos que los mutantes A277T e Y707C presentan un defecto en su actividad, consecuencia de su menor expresión en la membrana plasmática y una maduración alterada a lo largo de la vía secretora con retención en el retículo endoplásmico. Por último, en un cribado de compuestos con potencial de rescatar el fenotipo de estos mutantes, se ha demostrado que el derivado de ácido araquidónico N-araquidonil glicina es capaz de remediar los defectos funcionales de estos mutantes en neuronas de corteza cerebral de rata.

Glycine is the main inhibitory neurotransmitter in caudal areas of the central nervous system. In glycinergic inhibitory synapses, neurotransmission is terminated by a Na⁺ and Cl⁻ dependent recapture of the transmitter by glycine transporters GlyT1 and GlyT2. GlyT2 is exclusively located in presynaptic neurons and provides glycine to the cell interior for synaptic vesicles refilling, having a major role in the maintenance of the glycinergic neurotransmission. For this reason, GlyT2 regulation plays a central role in the biology of this type of synapses and transporter defects may alter synaptic physiology having pathological consequences. For example, mutations in the gene encoding GlyT2 are the second most common cause of human hyperekplexia, a rare disease characterized by energetic, exaggerated and sustained startle in response to trivial stimuli. In this Doctoral Thesis, two new physiological regulatory mechanisms of GlyT2 have been explored. In addition, the molecular characterization of two mutants associated with human hyperekplexia, variants A277T and Y707C, has been carried out.

Regarding the studied regulatory mechanisms, it has been first demonstrated that Hedgehog signaling pathway modulates GlyT2 in both rat brainstem and spinal cord primary neurons and zebrafish embryos. The results indicate that Hedgehog signaling pathway activation decreases GlyT2 expression by diminishing its mRNA levels and increasing its ubiquitination. This latter, being the main process underlying GlyT2 regulation. As a second modulatory mechanism, it has been demonstrated that the E3 ubiquitin ligases LNX1 and LNX2 interact, ubiquitinate and promote GlyT2 degradation in COS-7 heterologous cell system. Moreover, LNX2 knockdown in brainstem and spinal cord neurons increases GlyT2 levels and prevents its degradation promoted by the activation of protein kinase C.

The characterization of hyperekplexia-associated mutants in different heterologous systems revealed that A277T and Y707C mutants have a reduced transport activity caused by a decreased plasma membrane delivery and an altered maturation along the secretory pathway with retention in the endoplasmic reticulum. Finally, in a screening test performed to seek for a compound potentially able to restore the phenotype of the mutants, the arachidonic acid derivative N-arachidonoyl glycine has been demonstrated to rescue the functional defects of the two variants in rat brain cortical neurons.

Índice

Abreviaturas	23
Introducción	29
1. La glicina como neurotransmisor inhibitor	31
1.1. Receptores de glicina	32
1.2. Transportadores de glicina: genes, distribución y función	33
2. Hiperplexia	34
3. Expresión de GlyT2 durante el desarrollo.....	35
3.1. Vía de señalización de Hedgehog	37
4. Estructura y mecanismo funcional de los GlyTs	39
5. Biogénesis de los GlyTs	40
5.1. Compuestos capaces de remediar defectos en el plegamiento de proteínas de membrana	42
5.2. N-araquidonil glicina	45
6. Organización en balsas lipídicas y tráfico intracelular de GlyT2 ...	47
6.1. Ubiquitinación	48
6.2. Proteínas ligando de Numb X 1 y 2	48
Objetivos	51
Materiales y métodos	55
1. Animales	57
2. Cultivos celulares	57
2.1. Líneas celulares	57
2.2. Obtención de cultivos primarios neuronales	57
3. Expresión transitoria de proteínas	58

4. Generación de partículas lentivirales e infección de cultivos primarios de médula espinal y tallo cerebral	59
5. Tratamientos farmacológicos	60
5.1. Estudio de la ruta de Hh	60
5.2. Activación de PKC	61
5.3. Estudio de compuestos con potencial de remediar problemas en el plegamiento de proteínas	61
6. Cuantificación de los niveles de mRNA	61
6.1. Aislamiento de RNA total	61
6.2. Retrotranscripción del RNA a cDNA	62
6.3. Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa	62
7. Transporte de [³ H]-Gly en cultivos celulares	63
8. Cuantificación de los niveles de proteína mediante western blot	64
8.1. Extracción de proteínas	65
8.2. Electroforesis, transferencia, inmunodetección y cuantificación	65
9. Ensayo de biotilación de proteínas de superficie	66
10. Ensayos de coimmunoprecipitación	67
11. Ensayos de ubiquitinación	68
12. Inmunofluorescencia	69
12.1. Inmuncitofluorescencia	69
12.2. Inmunohistofluorescencia	70
12.3. Cuantificación de inmunofluorescencia	70
13. Representación de datos y análisis estadístico	70

Bloque I de Resultados	73
1. Estudio de una posible modulación funcional de GlyT2 a través de la ruta de señalización de Hh	75
1.1. El tratamiento con purmorfamina reduce la expresión y la función de GlyT2 de un modo dependiente del tiempo y de manera específica	75
1.2. La modulación de GlyT2 por purmorfamina depende de su concentración y es revertida por ciclopamina	77
1.3. El tratamiento con purmorfamina promueve la degradación de GlyT2 aumentando su ubiquitinación	79
1.4. El tratamiento con ciclopamina aumenta los niveles de GlyT2 en embriones de pez cebra	81
2. Análisis del papel de las E3 ubiquitín ligasas LNX1 y LNX2 en la regulación de GlyT2	83
2.1. Las isoformas p80 y p70 de LNX1 interaccionan con GlyT2	83
2.2. La actividad ubiquitín ligasa de LNX1 regula la expresión y función de GlyT2	84
2.3. LNX2 también interacciona con GlyT2 y controla su ubiquitinación y expresión	86
2.4. El silenciamiento de LNX2 en neuronas de tallo cerebral y médula espinal aumenta la expresión de GlyT2 endógeno	88
2.5. LNX2 está implicada en la regulación de la actividad de GlyT2 mediada por PKC	90
2.6. Ni LNX2 ni PKC parecen estar implicados en la modulación de GlyT2 promovida por la vía de señalización de Hh	92
Bloque II de Resultados	95
3. Caracterización de mutantes asociados a hiperplexia y búsqueda de compuestos capaces de rescatar su fenotipo	97

3.1. Los mutantes A277T e Y707C tienen una actividad de transporte disminuida que se corresponde con la observada para sus homólogos humanos A275T e Y705C	97
3.2. Los mutantes A277T e Y707C presentan una maduración alterada y una expresión en superficie disminuida	100
3.3. Los mutantes A277T e Y707C están retenidos en el RE	102
3.4. El mutante A277T tiene una retención en RE más severa que Y707C	103
3.5. La sobreexpresión de CNX rescata la función y la llegada a membrana de los mutantes A277T e Y707C	107
3.6. NAG aumenta la presencia en membrana de GlyT2 silvestre en células COS-7 de modo similar a PBA	109
3.7. NAG tiene efecto inhibitor sobre la actividad de GlyT2 en células COS-7	111
3.8. NAG disminuye la interacción de GlyT2 silvestre con CNX en células COS-7	113
3.9. NAG aumenta la actividad y presencia en membrana de A277T e Y707C en neuronas primarias de corteza	115
3.10. NAG promueve la salida de RE de A277T e Y707C en neuronas primarias de corteza	118
Discusión	121
1. Estudio de una posible modulación funcional de GlyT2 a través de la ruta de señalización de Hh	123
2. Análisis del papel de las E3 ubiquitín ligasas LNX1 y LNX2 en la regulación de GlyT2	125
3. Caracterización de mutantes asociados a hiperplexia y búsqueda de compuestos capaces de rescatar su fenotipo	129
Conclusiones	135
Bibliografía	139

Abreviaturas

Números

17-DMAG (17-dimetilaminoetilamino-17-demetoxigeldanamicina)

5HT-3 (receptores de serotonina tipo 3)

A

ABC (*ATP-binding cassette*)

ALX (ALX 1393)

AraC (citosina arabinósido)

Asn (asparagina)

ATP (adenosín trifosfato)

B

B (fracción biotinilada)

BiP (proteína de unión a inmunoglobulina)

Bis (bisindolilmaleimida IX)

BSA (albúmina de suero bovino)

Bup (bupropión)

C

CAR (receptor de adenovirus y coxsackievirus)

CAST1 (proteína asociada a la citomatrix de la zona activa 1)

CB (receptor cannabinoide)

CD8 (*cluster of differentiation 8*)

cDNA (ácido desoxirribonucleico complementario)

CFTR (regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística)

CNX (calnexina)

COPII (proteína coatómero II)

CPM (cuentas por minuto)

CRMP5 (proteína mediadora de la respuesta de colapsina 5)

CRT (calreticulina)

CRT-1 (transportador de creatina 1)

C-t (C-terminal)

CYC (ciclopamina)

Cys (cisteína)

D

DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol)

DAT (transportador de dopamina)

Dbx (*developing brain homeobox protein*)

Dhh (Desert hedgehog)

DIV (día *in vitro*)

DMEM (medio de Eagle modificado por Dulbecco)

DMSO (dimetilsulfóxido)

DNA (ácido desoxirribonucleico)

dpf (día postfertilización)

E

E (día embrionario)

EAAC1 (transportador de aminoácidos excitadores 1)

EC₅₀ (afinidad)

E-cadh (E-cadherina)

ECD (dominio extracelular)

ECL (quimioluminiscencia aumentada)

EDTA (ácido etilendiaminotetraacético)

EL (bucle extracelular)

ERAD (degradación asociada a retículo endoplásmico)

ERp57 (proteína residente en retículo endoplásmico 57)

F

FAAH (ácido graso amida hidrolasa)

FBS (suero fetal bovino)

FDA (administración de alimentos y medicamentos)

Fig. (Figura)

G

G (glucosidasa)

GABA (ácido γ -aminobutírico)

GABA_AR (receptores A de ácido γ -aminobutírico)

Gag (grupo de antígenos del virus de la inmunodeficiencia humana 1)

GAPDH (gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa)

GAT (transportador de ácido γ -aminobutírico)

Glc (glucosa)

Gli (factor de transcripción asociado a glioma)

GLT1 (transportador de glutamato 1)

Glu (glutamato)

Gly (glicina)

GlyR (receptor de glicina)

GlyT (transportador de glicina)

GPCR (receptor acoplado a proteína G)

GPR18 (receptor acoplado a proteína G 18)

GPR92 (receptor acoplado a proteína G 92)

H

HBSS (solución salina balanceada de Hank)

HDAC (desacetilasas de histonas)

HEK (riñón embrionario humano)

HER2 (receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano)

Hh (Hedgehog)

HIV-1 (virus de la inmunodeficiencia humana 1)

hpf (hora postfertilización)

HRP (peroxidasa de rábano)

HSC70 (proteína de 71 kDa asociada a choque térmico)

HSP (proteína de choque térmico)

I

Ibo (ibogaína)

IC₅₀ (concentración inhibidora media)

Ihh (Indian hedgehog)

IL (bucle intracelular)

Irx3 (*iroquois homeobox protein 3*)

J

JAM4 (molécula de adhesión y de unión 4)

L

Lbx1 (*ladybird homeobox 1*)

LeuT_{Aa} (transportador de leucina de *Aquifex aeolicus*)

LNx (proteína ligando de Numb X)

Lys (lisina)

M

Man (manosa)

MDCK (riñón canino Madin-Darby)

MEM (medio mínimo esencial)

miRNA (micro ácido ribonucleico)

mRNA (ácido ribonucleico mensajero)

N

n (número de experimentos)

NAAA (N-acil aminoácido)

NAc (N-acetilglucosamina)

nAChR (receptores nicotínicos de acetilcolina)

NAG (N-araquidonil glicina)

NEM (N-etilmaleimida)

NET (transportador de noradrenalina)

NFPS (N-[3-(4'-fluorofenil)-3-(4'fenilfenoxi) propil] sarcosina)

NHS (N-hidroxisulfosuccinimida)

NKA (bomba sodio-potasio)

NMDA (N-metil-D-aspartato)

NMDAR (receptor ionotrópico de glutamato tipo N-metil-D-aspartato)

NSS (simportador de neurotransmisores y sodio)

N-t (N-terminal)

O

O.C.T. (temperatura de corte óptima)

Olig2 (factor de transcripción 2 de oligodendrocitos)

OMIM (*Online Mendelian Inheritance in Man*)

OST (oligosacaril transferasa)

P

P (día postnatal)

p (región de progenitores)

Pax (*paired box*)

PBA (ácido 4-fenilbutírico)

PBS (tampón fosfato salino)

PDI (proteína disulfuro-isomerasa)

PDZ (PSD-95/Dlg/ZO-1)

PFA (paraformaldehído)

PGA (proteína G agarosa)

PKC (proteína kinasa C)

PMA (forbol-12-miristato-13-acetato)

PMCA (bomba de Ca^{2+} de membrana plasmática)

PMM (purmorfamina)

PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonilo)

Pol (DNA polimerasa del virus de la inmunodeficiencia humana 1)

Ptch (*patched*)

Ptf1a (factor de transcripción asociado a páncreas 1a)

Q

qPCR (reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa)

R

RE (retículo endoplásmico)

Rev (regulador del virión del virus de la inmunodeficiencia humana 1)

RING (*really interesting new gene*)

RIPA (ensayo de radioinmunoprecipitación)

RNA (ácido ribonucleico)

S

SDS (dodecilsulfato sódico)

SDS-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico)

Sec61 (secretasa 61)

Ser (serina)

SERCA (bomba de Ca^{2+} de retículo endoplásmico)

SERT (transportador de serotonina)

Shh (Sonic hedgehog)

shRNA (ácido ribonucleico de horquilla corta)

SLC6 (transportador de soluto 6)

Smo (*smoothened*)

SNARE (receptores de proteínas de fijación soluble del factor sensible a N-etilmaleimida)

SNC (sistema nervioso central)

STX1 (sintaxina 1)

SV-40 (virus de simio 40)

T

T (fracción total)

t_{1/2} (tiempo de vida media)

Tat (transactivador de la transcripción del virus de la inmunodeficiencia humana 1)

TfR (receptor de transferrina)

THC (Δ^9 -tetrahidrocannabinol)

Thr (treonina)

TM (dominio transmembrana)

Tub (tubulina)

Tyr (tirosina)

U

Ub (ubiquitina)

UGGT (UDP-glucosa: glicoproteína glucosiltransferasa)

uORF (marco de lectura abierto en la región no traducida 5')

UPR (respuesta a proteínas desplegadas)

V

VAMP (proteína de membrana asociada a vesículas)

Veh (vehículo)

VIAAT (transportador vesicular de aminoácidos inhibidores)

VSV-G (glicoproteína del virus de la estomatitis vesicular)

W

WB (western blot)

X

X_{aa} (cualquier aminoácido)

Introducción

1. La glicina como neurotransmisor inhibitor

La glicina (Gly), el aminoácido proteínogénico más pequeño, es el principal neurotransmisor inhibitor en áreas caudales del sistema nervioso central (SNC) como el tallo cerebral y la médula espinal [1], lo que convierte a la neurotransmisión glicinérgica en un proceso clave para la regulación de múltiples procesos en estas regiones.

En la médula espinal, la transmisión glicinérgica inhibitora regula funciones motoras como la coordinación del movimiento voluntario a través de las interneuronas la o el mantenimiento del tono muscular gracias a las interneuronas de Renshaw [2]. También regula procesos somatosensoriales, estando presente en circuitos del asta dorsal encargados del control del dolor [3, 4]. En el tallo cerebral, la Gly regula la generación del ritmo respiratorio, que depende de circuitos inhibitoros que se encuentran en el complejo pre-Bötzing del bulbo raquídeo [5]. Además, está implicada en el procesamiento de la información auditiva en núcleos cocleares, en el complejo de la oliva superior y en el colículo inferior [6, 7]. En regiones menos caudales, la Gly también actúa como neurotransmisor inhibitor, siendo importante en el control de la liberación de dopamina en el área tegmental ventral y núcleo accumbens del sistema de recompensa [5] y en el procesamiento de estímulos visuales en la retina [8, 9]. Además de su función como neurotransmisor inhibitor, la Gly actúa como neuromodulador en vías glutamatérgicas excitadoras dependientes del receptor ionotrópico de glutamato (Glu) tipo N-metil-D-aspartato (NMDAR), siendo necesaria su unión al receptor tanto para la activación del canal iónico como para el reciclado del mismo en la membrana plasmática [10, 11].

En las sinapsis glicinérgicas inhibitoras, la neurotransmisión glicinérgica (**Fig. 1**) se inicia tras la llegada del potencial de acción al terminal presináptico, lo que genera la despolarización de su membrana y la entrada de Ca^{2+} a través de canales dependientes de voltaje, provocando, en consecuencia, la liberación de la Gly contenida en vesículas sinápticas. Una vez liberada en el espacio sináptico, la Gly activa receptores postsinápticos específicos (GlyR), promoviendo en ellos la apertura de un canal que permite la entrada de Cl^- en la neurona postsináptica, lo que produce la

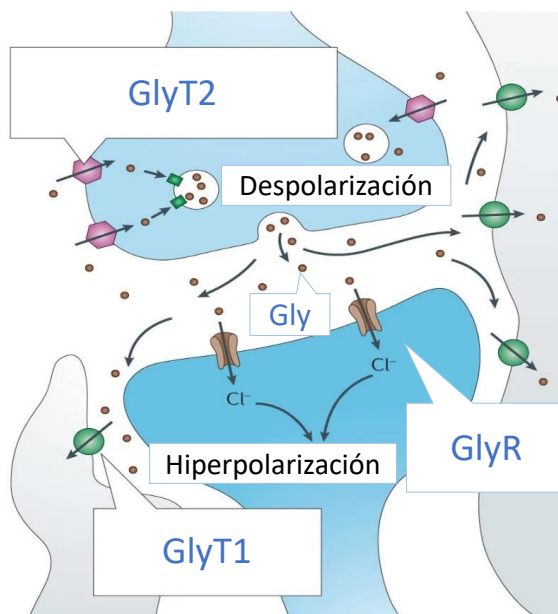


Figura 1. La sinapsis glicinérgica Adaptado de [13].

hiperpolarización de su membrana y su consecuente inhibición [12, 13]. La acción sináptica de la Gly termina con la recaptación del neurotransmisor por parte de los transportadores específicos de alta afinidad de células gliales, GlyT1, y de la neurona presináptica, GlyT2 [14, 15]. Este proceso es un transporte electrogénico acoplado al gradiente electroquímico de Na^+ y dependiente de Cl^- .

1.1. Receptores de glicina

Los receptores de Gly (GlyRs) son canales iónicos pentaméricos permeables a aniones que, junto con los receptores A de ácido γ -aminobutírico (GABA_AR), los receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR) y los receptores tipo 3 de serotonina (5HT-3), forman la superfamilia de los canales iónicos *Cys-loop* [16]. En humanos, los pentámeros de GlyR están formados por 4 subunidades posibles: las subunidades $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ y β . Aunque se pueden formar receptores homopentaméricos funcionales únicamente con subunidades α , lo más habitual es encontrar heteropentámeros de subunidades α y β con estequiometría 2:3 [17]. La subunidad $\alpha 1$ está ampliamente distribuida por el SNC de adulto, siendo muy frecuentes los pentámeros formados por subunidades $\alpha 1$ y β . En cuanto al resto de subunidades α , la subunidad $\alpha 2$ se expresa sobre todo durante el desarrollo y la subunidad $\alpha 3$, aunque, como la subunidad $\alpha 1$, se encuentra en adulto, presenta una expresión más restringida [5, 16]. La subunidad β , por su parte, cuando se encuentra formando parte de los heteropentámeros, tiene función estructural y de regulación del receptor, sirviendo para el posicionamiento y anclaje de los GlyR al citoesqueleto de la postsinapsis gracias a su interacción con la proteína de andamiaje gefirina [18, 19] o influyendo en la sensibilidad del receptor a Gly y otras drogas [2, 20].

A nivel estructural, las 4 subunidades presentan homología y tienen la topología propia de la familia de los *Cys-loop* (**Fig. 2**): 4 dominios transmembrana (TM), un dominio extracelular (ECD) N-terminal (N-t), un bucle intracelular (IL) entre los TM 3 y 4 y un ECD C-terminal (C-t). En el pentámero, el poro para el paso de Cl^- se encuentra en el eje central formado por los TM 2,

mientras que los sitios de unión a Gly solo están presentes en las subunidades α y se localizan entre los ECD de subunidades vecinas [16].

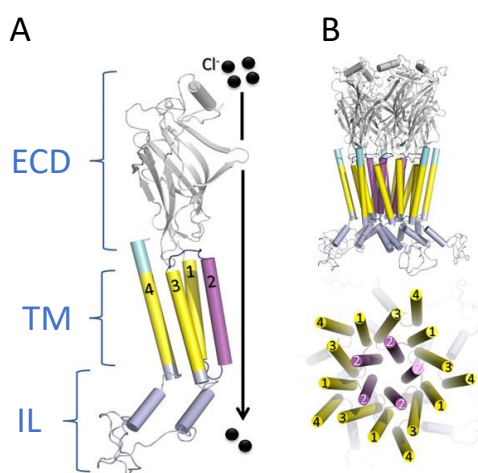


Figura 2. Estructura esquemática de los GlyR. A) Representación de un monómero de la subunidad $\alpha 1$ del GlyR con sus distintas regiones señaladas: dominios extracelulares (ECD), dominios transmembrana (TM) y bucles intracelulares (IL) **B)** Organización pentamérica de las subunidades al formar el GlyR. Adaptado de [16].

1.2. Transportadores de glicina: genes, distribución y función

Los transportadores de Gly, GlyT1 y GlyT2, son proteínas de la familia génica de los transportadores de soluto 6 (SLC6), la cual está incluida dentro de la familia de los simportadores de neurotransmisores y sodio (NSS). A la familia de los SLC6 también pertenecen los transportadores de GABA (GAT), serotonina (SERT), dopamina (DAT) y noradrenalina (NET) [21]. Ambos GlyTs son proteínas homólogas con alrededor de un 50% de identidad de secuencia que están codificados por dos genes distintos, los cuales, además, presentan variantes derivadas del procesamiento alternativo de su mRNA o por el uso de distintos promotores [15]. GlyT1 está codificado por el gen humano *SLC6A9* del cromosoma 1 y de él se han descrito al menos 5 variantes en retina que difieren en su N-t (GlyT1a-c) [22, 23] o en su C-t (GlyT1d-e) [24]. Por su parte, GlyT2 está codificado por el gen *SLC6A5* del cromosoma 11 y presenta 3 isoformas con distinto N-t (GlyT2a-c) [25].

GlyT2 se localiza únicamente en sinapsis glicinérgicas y, por tanto, se encuentra casi exclusivamente en áreas caudales del SNC. En concreto, el mRNA de GlyT2 es abundante en la sustancia gris de la médula espinal, especialmente en las regiones más dorsales, así como en núcleos del puente troncoencefálico y del bulbo raquídeo [26, 27]. GlyT1, sin embargo, se encuentra distribuido por casi todo el SNC [26, 27], regulando los niveles de Gly en sinapsis glutamatérgicas dependientes de NMDAR [28] e incluso en regiones periféricas como hígado, páncreas o intestino [27].

Aunque ambos transportadores son responsables de la terminación de la transmisión glicinérgica inhibitoria, estudios de silenciamiento génico demuestran que GlyT1 y GlyT2 tienen papeles complementarios en este proceso [29-31]. Mientras GlyT1, por su localización mayoritaria en astrocitos en torno a las sinapsis, tiene un papel relevante en la regulación de los niveles de Gly extracelulares, GlyT2, presente exclusivamente en neuronas presinápticas, tiene un papel crucial para la neurotransmisión, suministrando Gly al interior del terminal para el llenado de vesículas sinápticas [32]. Estos papeles fisiológicos diferentes se deben no solo a su distinta localización, sino también a propiedades termodinámicas diferenciales. Mientras GlyT1 cataliza el cotransporte de Na⁺, Cl⁻ y Gly con una estequiometría 2:1:1, GlyT2 transporta un ion de Na⁺ más y muestra una estequiometría 3:1:1 [33]. En condiciones fisiológicas, el Na⁺ adicional acoplado a la recaptura de Gly mediada por GlyT2 hace que la fuerza motriz disponible para dicho transporte sea dos órdenes de magnitud superior que para GlyT1, lo que permite que se puedan acumular en el botón sináptico unas concentraciones de Gly lo suficientemente altas como para que el transportador vesicular de aminoácidos inhibitorios (VIAAT), que es de baja afinidad, pueda rellenar las vesículas sinápticas. Sin embargo, el mayor acoplamiento a Na⁺

impide la reversión del transporte para GlyT2, lo que sí que es posible para GlyT1, que tiene mayor facilidad para realizar eflujo de Gly. Así, GlyT1 puede regular las concentraciones extracelulares de Gly en función de las necesidades fisiológicas, mientras que GlyT2 contribuye a la recaptación pero muy raramente al eflujo [34].

2. Hiperplexia

La hiperplexia o enfermedad del sobresalto (OMIM 149400) es una enfermedad neurogenética rara caracterizada por una respuesta exagerada (sobresalto) ante estímulos triviales táctiles y auditivos y que cursa con hipertonia muscular y apnea. Los sobresaltos pueden ser prolongados, manteniendo al individuo en un estado de rigidez generalizada observable sobre todo en tronco y extremidades, lo que impide la realización de movimientos voluntarios [35, 36]. Los síntomas afectan principalmente a neonatos, motivo por el cual también se la conoce como síndrome del bebé entumecido, asociándose con dificultad para tragar y causando en el peor de los casos la muerte por fallos cardiorrespiratorios y espasmos laríngeos [37]. Aunque el cuadro clínico mejora durante el primer año de vida, los sobresaltos pueden seguir ocurriendo durante la vida adulta, y la habituación al sobresalto, o la atenuación de la respuesta ante una estimulación repetida, es casi nula [38]. Además, los pacientes sufren alteraciones motoras incapacitantes durante toda la vida [39].

La enfermedad es causada por alteraciones en la neurotransmisión glicinérgica, puesto que el tono muscular, la excitabilidad de las motoneuronas y la coordinación de músculos agonistas y antagonistas dependen de circuitos inhibidores glicinérgicos del tallo cerebral y la médula espinal [2]. La forma mayoritaria de hiperplexia se debe a mutaciones en el GlyR que afectan de forma negativa a su función, siendo normalmente recesivas aquellas que afectan a la expresión en la superficie celular de las subunidades $\alpha 1$ o β , y dominantes las que afectan a residuos clave para el flujo de Cl^- [40]. También se han relacionado con hiperplexia, aunque en menor medida, mutaciones en gefirina y colibistina, dos proteínas encargadas de la organización y localización de los GlyR en la postsinapsis [41]. Algunas mutaciones en GlyT2 causan la forma presináptica de hiperplexia y constituyen la segunda causa de la enfermedad [42, 43].

De las más de 30 mutaciones de GlyT2 conocidas, la gran mayoría son recesivas [42-45]. Muchas de ellas son mutaciones sin sentido o con desplazamiento del marco de lectura, que producen un transportador truncado que queda retenido en el retículo endoplásmico (RE) (mutantes Y297X, Y377X, R439X o S489F + fs39). Algunas son mutaciones con cambio de sentido que afectan a residuos clave para el transporte, como las que afectan al sitio de unión de Na^+ (mutantes N509S y A275T), al sitio de unión de Cl^- (S513I) o al sitio de Gly (W482R). Otras se ha propuesto que puedan afectar a los cambios conformacionales necesarios para el ciclo de

traslocación del sustrato (L243T o Y491C) e, incluso, ciertas mutaciones pueden afectar al tráfico del transportador a lo largo de la vía secretora (P429L). A día de hoy, solo hay dos mutaciones de carácter dominante descritas en la bibliografía: las sustituciones S510R [42] e Y705C [46]. Las bases moleculares del efecto derivado de la sustitución S510R fueron caracterizadas utilizando el transportador homólogo de rata. Este mutante, denominado en rata S512R, ejerce un efecto dominante negativo sobre el transportador silvestre, reteniéndolo en RE y evitando su llegada a membrana [47]. Por otro lado, la caracterización del mutante Y705C demuestra que la cisteína (Cys) introducida interacciona con el puente disulfuro Cys 311-Cys 320 del bucle extracelular 2 (EL 2), viéndose afectada la maduración de la proteína a lo largo de la vía secretora y la expresión en membrana. Además, el mutante Y705C presenta una alteración en la dependencia a H^+ y Zn^{2+} [46].

Actualmente no existe una terapia específica para el tratamiento de la hiperplexia y se recurre a la activación de los GABA_AR mediante el uso de benzodiazepinas, normalmente clonazepam, para potenciar el efecto inhibitor de estos receptores y así suplir la deficiencia en la transmisión glicinérgica [48, 49]. Sin embargo, su uso en algunos casos se relaciona con efectos secundarios como sedación [50], lo que, unido a su falta de especificidad, la convierten en una terapia que seguramente será sustituida en el futuro.

3. Expresión de GlyT2 durante el desarrollo

Los trabajos realizados en rata demuestran que la aparición de la proteína de GlyT2 durante el desarrollo se produce en las últimas fases de la etapa fetal, llegando a máximos de expresión alrededor de las dos semanas postnatales, momento a partir del cual los niveles disminuyen ligeramente hasta alcanzar los niveles adultos a las cuatro semanas. Así, en la médula espinal y el tallo cerebral, la proteína es detectable mediante inmunodetección a partir del día embrionario (E) 17 y el pico de expresión se alcanza a día postnatal (P) 14 [26]. De forma similar, algunos experimentos de inmunohistoquímica en el sistema auditivo demuestran que el transportador aparece entre E18 y E20, alcanzándose máximos a P10 y observándose un patrón maduro de expresión a P21 [6].

En experimentos realizados en ratón, el mRNA de GlyT2 se detecta en neuronas del asta dorsal de la médula espinal a E12,5 [51]. Un trabajo posterior aporta información sobre la evolución del patrón de expresión de la proteína de GlyT2 durante el desarrollo de la médula espinal en esta misma especie (**Fig. 3A**). En él se observa la aparición del transportador a E14 en la zona marginal, a E16 en el asta ventral, poco antes del nacimiento en láminas profundas del asta dorsal, y después de P14 en las láminas I y II, aumentando su expresión hasta P21 [52].

En pez cebra (**Fig. 3B**), el mRNA de GlyT2 surge en regiones mediodorsales de la médula espinal, siendo detectable en partes rostrales a las 20 horas postfertilización (hpf) y en zonas caudales a las 24 hpf. En esta época temprana, aunque los embriones están en el corion, muestran contracciones espontáneas del cuerpo. A partir de aquí, las cantidades del mRNA van aumentando mientras se mantiene el patrón mediodorsal, como se observa entre 4 y 5 días postfertilización (dpf), momento en el cual ya están desarrollados los circuitos básicos para el nado [53]. Con respecto a áreas más rostrales del SNC, se ha demostrado que la aparición de GlyT2 en el romboencéfalo también se produce a las 20 hpf [54].

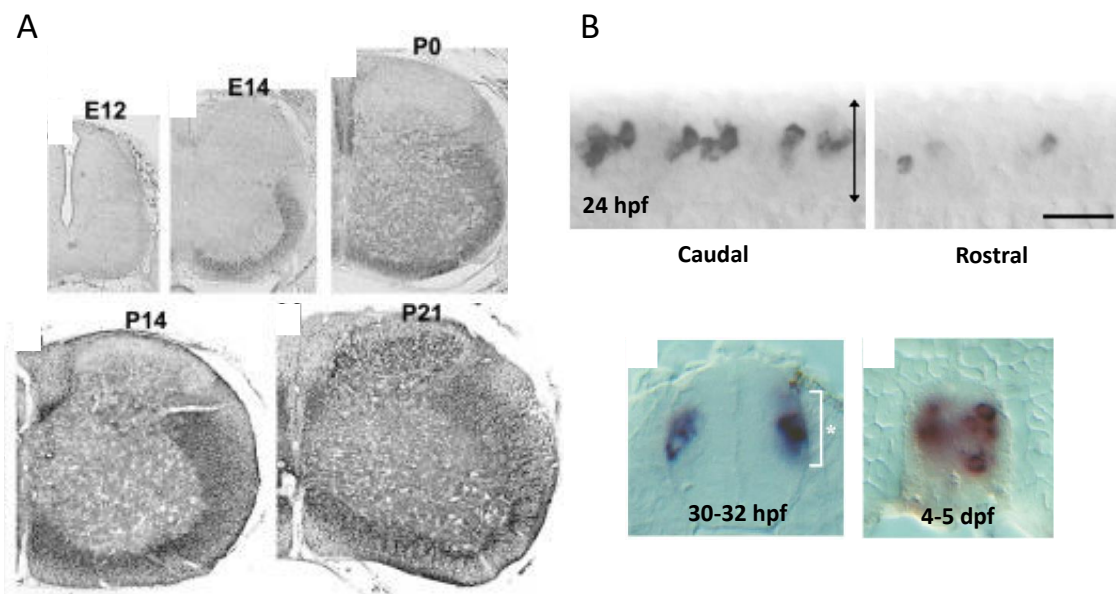


Figura 3. Expresión de GlyT2 durante el desarrollo de la médula espinal. A) Patrón de expresión de la proteína de GlyT2 en médula espinal de ratón entre E12 y P21 (secciones transversales). Adaptado de [52]. **B)** Patrón de expresión del mRNA de GlyT2 en médula espinal de pez cebra a 24 hpf (secciones longitudinales de médula espinal), 30-32 hpf y 4-5 dpf (secciones transversales). Adaptado de [53].

A día de hoy, se ha demostrado la implicación de cuatro factores de transcripción en la expresión de GlyT2: Pax2, Pax8, Ptf1a y Lbx1 [51, 55]. Concretamente, en pez cebra, se ha observado una aparente función redundante de Pax2 y Pax8 en la expresión de GlyT2 en áreas dorsales de la médula espinal [55] y, en ratón, se ha demostrado que los factores Ptf1a, Lbx1 y también Pax2 son necesarios para la expresión del transportador en el asta dorsal de la médula espinal, pero, curiosamente, no para su expresión en el asta ventral [51].

A pesar de estar relativamente bien definido el patrón de expresión de GlyT2 durante el desarrollo y de conocerse la implicación de los factores de transcripción anteriores, la aparición del transportador aún no se ha relacionado con ninguna de las rutas de señalización implicadas en organogénesis y desarrollo, de forma que vías como puede ser la de Hedgehog están aún por explorar.

3.1. Vía de señalización de Hedgehog

La ruta de señalización de Hedgehog (Hh) es una de las vías más importantes en el desarrollo y modelado de casi todos los órganos, así como en procesos de regeneración y homeostasis [56]. Que una sola ruta de señalización pueda desempeñar toda esta variedad de funciones se debe al hecho de que los ligandos que activan la ruta, las proteínas Hh, son morfógenos, es decir, unos factores difusibles que producen una respuesta celular u otra en función de su concentración y tiempo de exposición [57]. En vertebrados, existen tres proteínas de señalización secretadas que activan la vía de Hh: Sonic hedgehog (Shh), Indian hedgehog (Ihh) y Desert hedgehog (Dhh). Las tres se procesan de una manera similar y tienen la misma capacidad de activar la expresión de los genes diana de la ruta. Sin embargo, el patrón de expresión de cada una de ellas en el organismo es distinto, lo que define su función [58]. Shh tiene un papel relevante en el desarrollo del SNC y modelado de extremidades, Ihh regula el desarrollo de huesos y cartílagos, y Dhh está implicada en el desarrollo de las células germinales en testículos y ovarios, así como en la formación de las vainas de mielina en nervios periféricos [56, 57, 59].

A nivel de mecanismo (**Fig. 4**), la vía canónica se activa cuando los ligandos Hh se unen a *patched* (Ptch), un receptor de superficie con 12 TM que en condiciones de reposo está inhibiendo a un receptor acoplado a proteínas G (GPCR) llamado *smoothened* (Smo). La unión de Hh produce la internalización y degradación de Ptch, lo que desreprime a Smo e inicia una serie de eventos que inducen la activación de los factores de transcripción asociados a glioma (Gli), encargados de regular la expresión de los genes diana de la vía Hh [60]. Existen tres genes que codifican factores de transcripción Gli: Gli1, Gli2 y Gli3. Gli2 y Gli3 tienen un

carácter bifuncional, ya que presentan en su estructura un dominio C-t de activación de la transcripción y un dominio N-t de represión. Sin embargo, parece que Gli2 es el responsable mayoritario de la inducción de genes tras la activación de la vía de Hh y que Gli3 tiene sobre todo una función represora, dado que, cuando la ruta está inactiva, Gli3 suele sufrir una

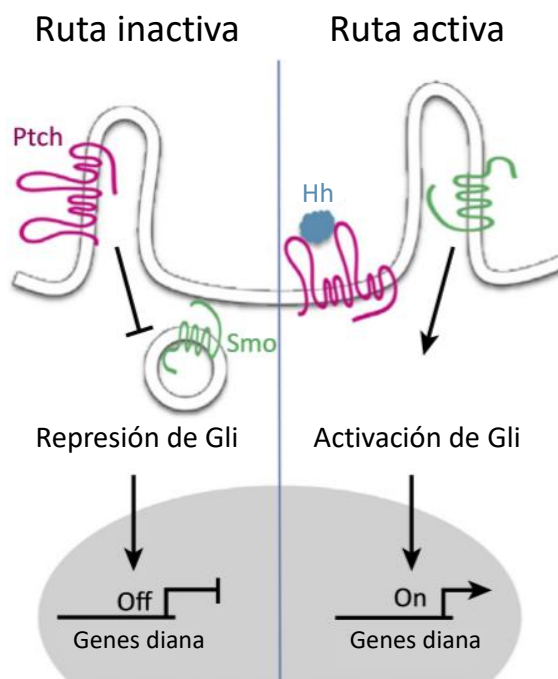


Figura 4. Vía de señalización canónica de Hh.
Adaptado de [60].

proteólisis parcial que libera su dominio N-t para la inhibición de la transcripción. Gli1, por su parte, solo presenta el dominio C-t de activación y parece tener una relevancia menor en la amplificación de la expresión de los genes diana de la ruta [59]. Curiosamente, entre los genes regulados están el propio Gli1 y Ptch, lo que lleva a pensar en la autorregulación de la vía [58].

Poniendo el foco sobre Shh, el ligando Hh con un papel relevante en el SNC [56, 59], hay que señalar su importancia en el desarrollo del tubo neural, donde su acción es responsable de la adquisición de un fenotipo ventral [61] (**Fig. 5**). Durante este proceso, la notocorda, una estructura embrionaria situada bajo el tubo neural y en paralelo a él, libera Shh, el cual se extiende dorsalmente formando un gradiente de concentración de más a menos a lo largo del eje ventrodorsal. Dicho gradiente se traduce en un gradiente intracelular de actividad de los factores Gli, que define la identidad de las células que se encuentran en el eje ventrodorsal [58]. Dentro de la médula espinal, los factores de transcripción regulados por los factores Gli y que dan lugar a las distintas identidades celulares se pueden dividir en dos clases: las proteínas de clase I (Dbx1, Dbx2, Pax6 y Irx3), que se expresan en regiones dorsales y se inhiben por la señalización de Shh; y las proteínas de clase II (Nkx6.1, Nkx6.2, Olig2 y Nkx2.2), que se expresan ventralmente y se activan por Shh. En última instancia, de la combinación de estos dos grupos de factores de transcripción surgen las regiones de progenitores (p) de la zona ventral: p3, p de motoneuronas, p2, p1 y p0 [61]. Además, la señalización de Shh también está implicada en la regulación de distintas poblaciones de células progenitoras neurales durante el desarrollo y la etapa adulta, influyendo en su proliferación, diferenciación y migración [60]. Por ejemplo, Shh es importante en el establecimiento y mantenimiento de los nichos neurogénicos del cerebro de adultos: la zona subventricular y la zona subgranular del giro dentado del hipocampo [62].

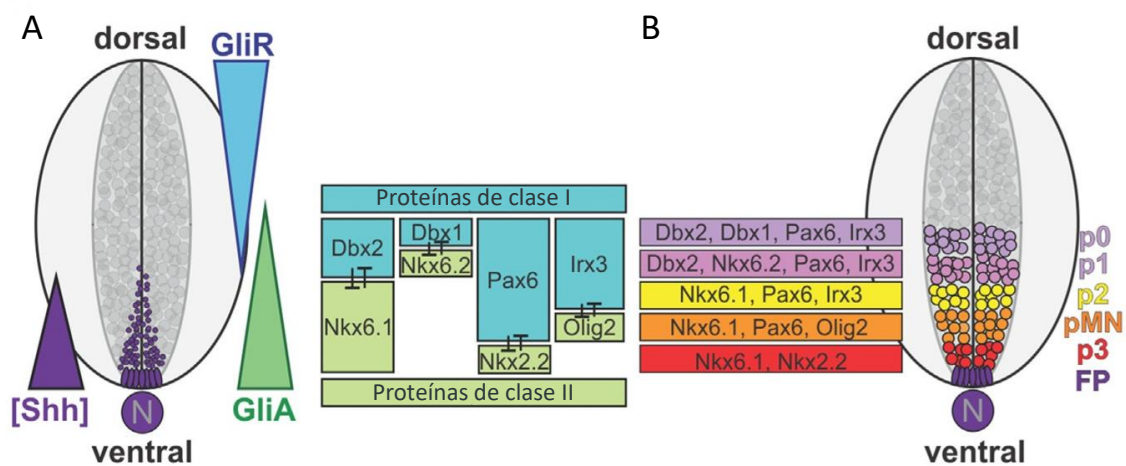


Figura 5. Papel de Shh en el desarrollo del tubo neural. A) El gradiente de Shh a lo largo del eje ventrodorsal del tubo neural establece un gradiente intracelular de Gli activadores (GliA) y Gli represores (GliR), lo que se traduce en la expresión de distintas combinaciones de proteínas de clase I y clase II por parte de las células que se encuentran en dicho eje. **B)** La combinación de proteínas de clase I y clase II da lugar a la identidad de las distintas regiones de progenitores a lo largo del eje ventrodorsal. Adaptado de [58].

4. Estructura y mecanismo funcional de los GlyTs

Como el resto de miembros de la familia SLC6, GlyT1 y GlyT2 presentan 12 TM con N-t y C-t intracelulares, así como residuos de asparagina (Asn) en el EL 2 que son glicosilados *in vivo*. La estructura tridimensional fue modelada inicialmente a partir de la obtenida para una proteína homóloga bacteriana, el transportador de leucina de *Aquifex aeolicus* (LeuT_{Aa}) [63].

Las 10 primeras α -hélices TM representan el núcleo de la proteína, donde los TM 1-5 y los TM 6-10 constituyen dos elementos estructurales repetidos pero con topología invertida, que generan un eje de simetría casi paralelo al plano de la membrana plasmática (**Fig. 6B**). A su vez, estas repeticiones se entrelazan formando dos dominios funcionales de 4 hélices TM cada uno: un dominio *core* móvil, formado por los TM 1, 2, 6 y 7; y un dominio *scaffold*

más fijo, compuesto por los TM 3, 4, 8 y 9. Los TM 5 y 10 son hélices de unión de las regiones *core* y *scaffold*. Los TM 11 y 12, sin embargo, se encuentran en la periferia del núcleo estructural y tienen un papel menos importante en el transporte, habiéndose implicado en oligomerización. La rotación del dominio *core* sobre el dominio *scaffold* es responsable del mecanismo funcional de transporte de los SLC6 según el modelo del acceso alternante (**Fig. 7**). En dicho modelo, se propone que el sitio de unión a los sustratos, localizado en la parte central de la membrana, se expone alternadamente a un lado u otro, captando y liberando los sustratos del exterior al interior celular [64]. El ciclo de translocación (**Fig. 7**) lleva a la proteína transportadora al menos a tres estados conformacionales: abierto hacia fuera, abierto hacia dentro y ocluido. Los tres han sido cristalizados en LeuT_{Aa} en presencia de sustratos o inhibidores [65]. Más tarde, DAT de *Drosophila melanogaster* [66] y SERT humano [67] se han cristalizado en conformación hacia fuera.

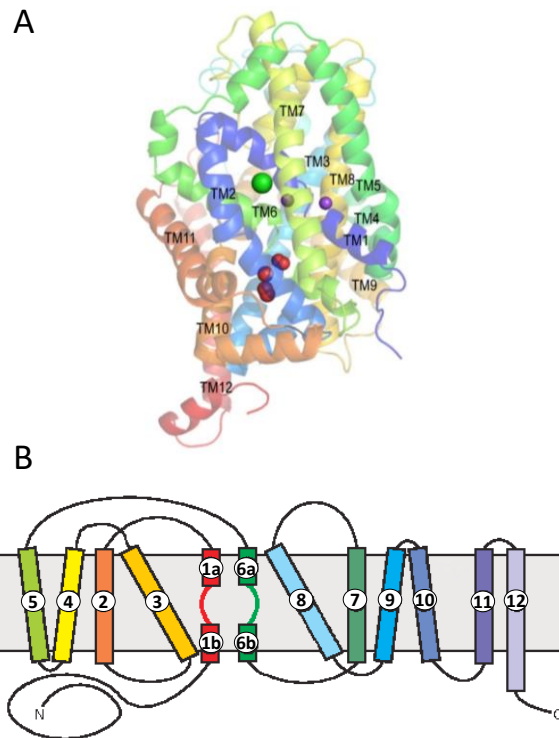


Figura 6. Estructura de GlyT2. A) Estructura modelada a partir del cristal de DAT de *Drosophila melanogaster*. Vista lateral en la que se aprecian los 12 TM del transportador. Los sitios de Na1 y Na2 están representados con esferas moradas y el sitio de Cl con una esfera verde. Adaptado de [70]. **B)** Representación esquemática de la topología de membrana propuesta para GlyT2. Adaptado de [42].

En la interfase entre los dos elementos estructurales repetidos se encuentran los TM 1 y 6, los cuales están dispuestos de modo antiparalelo y presentan una región central que tiene interrumpida la estructura α -hélice. Dichas regiones conforman, con la participación de los TM 3 y 8, el bolsillo de unión al sustrato [68]. Los dos sitios de unión a Na^+ presentes en todos los miembros de la familia SLC6 se encuentran muy próximos al sitio de unión del sustrato. Tanto es así que el sitio de Na1 se encuentra en la misma zona desplegada entre los TM 1 y 6 en la que se aloja el sustrato, siendo coordinado el Na^+ por el grupo carboxilo de la Gly; y el sitio de Na2 se localiza en una región vecina conformada por los TM 1 y 8 [69]. Por su parte, el sitio de Na3, presente únicamente en GlyT2 y recientemente descrito usando un modelo de GlyT2 basado en el cristal de DAT de *Drosophila melanogaster*, está coordinado por los residuos Glu 250 y Glu 650 de los TM 2 y 10, respectivamente [70, 71].

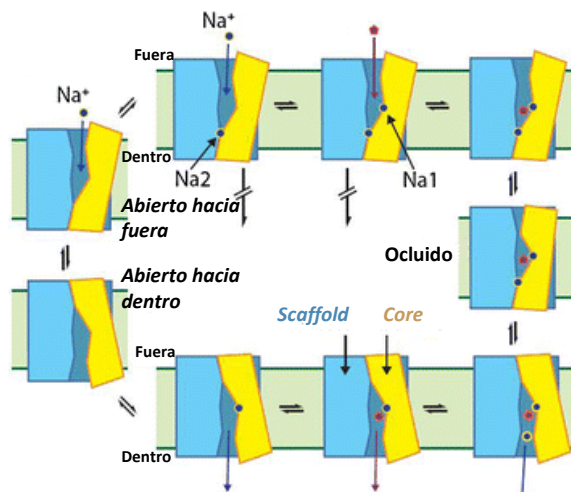


Figura 7. Modelo del acceso alternativo. La rotación del dominio core sobre el dominio scaffold es responsable del cotransporte de solutos por parte de los SLC6. Dicho movimiento promueve la alternancia de los transportadores entre dos conformaciones: una conformación abierta hacia fuera, en la que el transportador no tiene unidos los sustratos y tiene los sitios de unión accesibles desde el exterior; y una conformación abierta hacia dentro, con los sustratos en el transportador y los sitios de unión accesibles desde dentro para la liberación de dichos sustratos al interior. Adaptado de [64].

5. Biogénesis de los GlyTs

Los GlyTs se sintetizan en ribosomas asociados al RE. Como cualquier proteína transmembrana, son translocados cotraduccionalmente a través del complejo secretasa 61 (Sec61) desde el citoplasma al RE y se insertan en su membrana [72]. En el caso de los SLC6, la cadena polipeptídica naciente se dispone en la membrana del RE de tal forma que los extremos N-t y C-t quedan en el citoplasma y los EL en el lumen del RE [73, 74]. Es aquí, en el lumen del RE, donde se da el contexto necesario para el plegamiento, formación de puentes disulfuro y glicosilación de las proteínas recién sintetizadas; al existir unas condiciones óptimas para la oxidación, disponibilidad suficiente de ATP, pH neutro, altas concentraciones de Ca^{2+} y, en general, un ambiente iónico favorable [75]. Además, durante todo el proceso, existen distintas enzimas que asisten a las proteínas nacientes favoreciendo la adquisición de su conformación nativa.

Como mecanismo general, se asume que según se transloca una cadena polipeptídica, la primera chaperona del lumen del RE en actuar es la proteína de unión a inmunoglobulina

(BiP), que interacciona con regiones hidrofóbicas evitando su agregación y facilitando su plegamiento [76]. Una vez que la región con la secuencia consenso para N-glicosilación (Asn-X_{aa}-Ser/Thr) ha entrado en el lumen del RE, la oligosacaril transferasa (OST) traspassa desde el dolicol a la proteína naciente una primera cadena de 14 azúcares formada por 3 residuos de glucosa, 9 de manosa y 2 de N-acetilglucosamina (Glc₃Man₉GlcNAc₂). La posterior hidrólisis de dos residuos de glucosa por las glucosidasas I y II (GI y II) da lugar a unos intermedios monoglucosilados (Glc₁Man₉GlcNAc₂) que son sustratos de las chaperonas con actividad lectina: la proteína de membrana tipo I calnexina (CNX) y su ortólogo soluble calreticulina (CRT) [77]. La asistencia de CNX a GlyT2 está bien caracterizada, habiéndose demostrado que esta está mediada por interacciones tanto a través de azúcares como a través de la cadena polipeptídica [78] (**Fig. 8**). Una vez que CNX o CRT liberan la proteína, GII elimina la última glucosa para dar lugar a un intermediario que ya no puede ser sustrato de estas chaperonas. Sin embargo, si la enzima UDP-glucosa: glicoproteína glucosiltransferasa (UGGT) reconoce alguna región hidrofóbica accesible en la proteína parcialmente plegada, cataliza la adición de una nueva molécula de glucosa a la cadena de azúcares, facilitando que CNX y/o CRT vuelvan a asistirle en su plegamiento [76, 77]. Como se propone para otros miembros de la familia SLC6, la liberación de los GlyTs por parte de CNX podría permitir la oligomerización del transportador, lo que ayudaría a su salida del RE en forma multimérica (**Fig. 8**) [79]. La formación de enlaces disulfuro en el RE está asistida por enzimas de la familia proteína disulfuro-isomerasa (PDI). Aunque no se ha estudiado la acción de ninguna de ellas sobre los GlyTs, en el plegamiento de glicoproteínas la oxidoreductasa ERp57 tiene un papel fundamental, puesto que interacciona con los dominios P de CNX y CRT durante sus ciclos de asistencia para actuar sobre los intermediarios monoglucosilados [80]. Además de la implicación de chaperonas lumbales, estudios realizados en SERT proponen la monitorización simultánea del plegamiento de los SLC6 por parte de chaperonas citosólicas de la familia de las proteínas de choque térmico (HSP), que interaccionan con el C-t de los transportadores [74] (**Fig. 8**). Parece que para evitar que los lípidos de la membrana invadan el núcleo hidrofóbico de la proteína, las hélices transmembrana tienen que estar estabilizadas, y esto se consigue a través de la interacción del C-t con el IL 1, de forma que el posicionamiento correcto del C-t es fundamental para el plegamiento de los SLC6 [81].

Tras todos estos procesos, las proteínas plegadas son transportadas desde el RE al aparato de Golgi en vesículas revestidas por la proteína coatómero II (COPII). La inclusión de las proteínas plegadas en las vesículas depende de la proteína Sec24, una proteína del complejo COPII que, debido a sus múltiples homólogos, es capaz de seleccionar diversos sustratos [82] (**Fig. 8**). En el caso de los GlyTs, el homólogo que los selecciona es Sec24D, estando descrito un

motivo de interacción en el C-t de GlyT1 [83] y demostrada su unión a GlyT2 [47]. Curiosamente, en otros miembros de SLC6, la región para la unión de Sec24 está bloqueada por las HSP, de forma que solo una vez que estas chaperonas han liberado al transportador es posible la interacción con Sec24 y la salida del RE [73].

En el caso de que todos los mecanismos para promover el plegamiento fallasen, la proteína sería sometida a la llamada degradación asociada a RE (ERAD), lo que conlleva su retrotraslocación al citosol, ubiquitinación y degradación por el proteasoma [74] (**Fig. 8**).

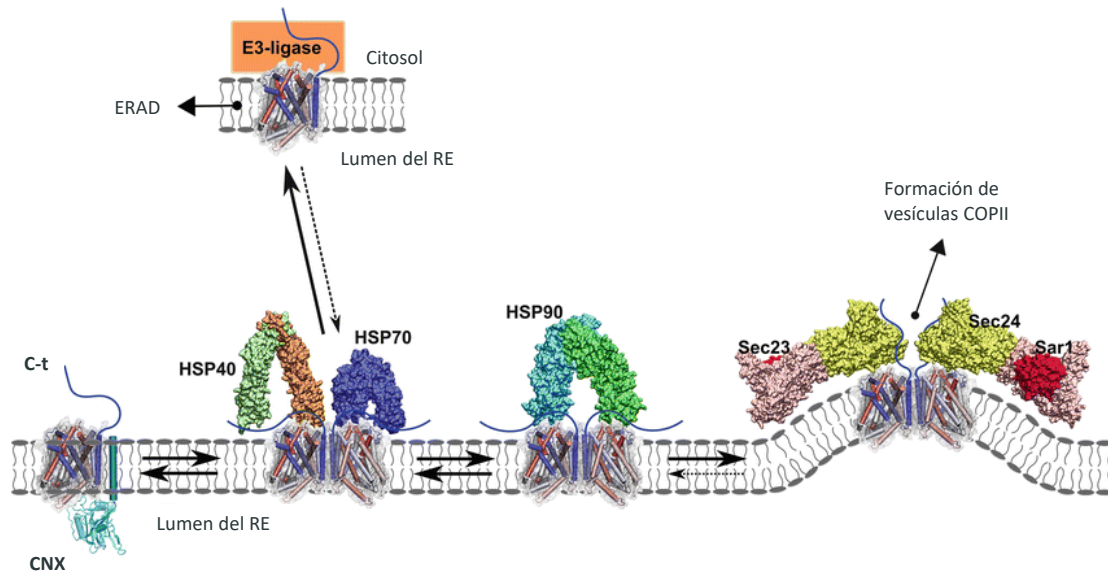
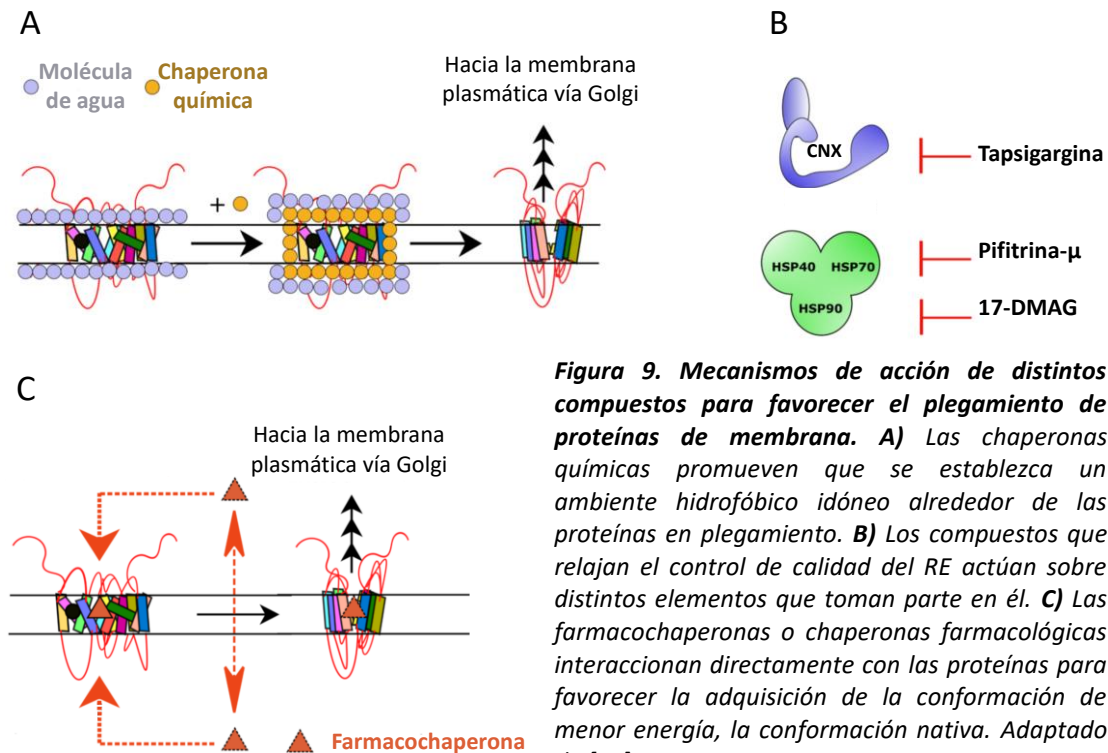


Figura 8. Control de calidad del RE sobre los transportadores SLC6. Tras la inserción en el RE a través del complejo traslocón Sec61 y la subsecuente glicosilación del EL 2, el plegamiento de los SLC6 es ayudado por CNX. Dicha interacción mantiene a los transportadores en conformación monomérica, pudiendo oligomerizar solamente tras la liberación de CNX. En el citosol, el plegamiento es asistido por la interacción secuencial de las chaperonas HSP40, HSP70 y HSP90 con el C-t de los SLC6. Cuando el proceso de plegamiento ha concluido, HSP90 se libera y Sec24 puede unirse a los transportadores para su reclutamiento en vesículas COPII y salida del RE. Si el proceso de plegamiento fallase, los transportadores serían enviados a ERAD. Adaptado de [74].

5.1. Compuestos capaces de remediar defectos en el plegamiento de proteínas de membrana

Como se ha comentado previamente, el uso de benzodiazepinas para tratar a los enfermos de hiperplexia no es una terapia específica [48, 49]. Este hecho, unido a los efectos secundarios asociados a estos fármacos [50], hacen que sea necesario buscar nuevas terapias que rescaten el fenotipo causado por las distintas mutaciones asociadas a hiperplexia, tanto de GlyR como de GlyT2. En este sentido, un abordaje que ha dado resultado para otras proteínas es utilizar compuestos pequeños que actúen durante el proceso de plegamiento en el RE, corrigiendo el fenotipo funcional de variantes defectuosas [84-87]. Distintos autores han explorado esta posibilidad con anterioridad, de forma que, a día de hoy, se pueden enumerar al menos tres tipos de compuestos capaces de rescatar defectos en el plegamiento de proteínas

de membrana: chaperonas químicas, compuestos capaces de hacer más laxo el control de calidad del RE y farmacochaperonas [79] (**Fig. 9**).



Las chaperonas químicas (**Fig. 9A**) son compuestos que favorecen de forma inespecífica el plegamiento. Atendiendo a sus propiedades químicas, pueden clasificarse en dos grupos: osmolitos y compuestos hidrofóbicos. Entre los osmolitos se encuentran compuestos como el dimetilsulfóxido (DMSO), el glicerol o la betaína, que actúan secuestrando moléculas de agua alrededor de las proteínas nacientes, lo que establece un ambiente hidrofóbico propicio para el plegamiento. Dentro de los compuestos hidrofóbicos o chaperonas hidrofóbicas se encuentran los ácidos biliares y el ácido 4-fenilbutírico (PBA). En este caso, el mecanismo de acción propuesto consiste en una interacción directa de estos compuestos con parches hidrofóbicos expuestos de las cadenas polipeptídicas nacientes, evitando su agregación y reduciendo el estrés de RE. Sin embargo, a pesar de haberse propuesto este mecanismo, la forma de actuación de estos compuestos parece ser más compleja y afecta a distintos niveles de regulación [88].

El PBA es un ácido graso de cadena corta aprobado por la FDA para el tratamiento de trastornos del ciclo de la urea [89]. Como chaperona hidrofóbica se utiliza en la terapia de fibrosis quística, al estabilizar al mutante $\Delta F508$ del regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística (CFTR) [84, 90-92] e, *in vitro*, se ha demostrado su efecto sobre transportadores de la familia ABC [93], variantes mal plegadas de SERT [94] o mutantes del transportador de creatina 1 (CRT-1) asociadas al síndrome de deficiencia en el transportador

de creatina [95]. Recientemente también se ha demostrado su capacidad para rescatar el efecto dominante negativo causado por el mutante S512R de GlyT2 [47]. En cuanto a sus posibles formas de actuación como chaperona química, además de una interacción directa con las proteínas en plegamiento, se ha propuesto, entre otras, la modulación de la expresión de la proteína de 71 kDa asociada a choque térmico (HSC70) [96] o la inhibición de desacetilasas de histonas (HDAC) implicadas en la regulación de genes relacionados con la respuesta a proteínas desplegadas (UPR) [95].

Los compuestos que relajan el control de calidad del RE (**Fig. 9B**) permiten el escape de proteínas mal plegadas hacia la superficie celular, aumentando su número en la membrana celular y restaurando en mayor o menor medida el fenotipo funcional. Por ejemplo, la llegada a membrana del mutante $\Delta F508$ de CFTR aumenta cuando se bloquea la ERAD o cuando se inhibe la actividad de CNX al reducir los niveles de Ca^{2+} en RE [97]. En el campo de los SLC6, la inhibición de HSP70 y HSP90 ha dado buenos resultados para rescatar mutantes mal plegados de SERT [98], variantes de DAT relacionadas con parkinsonismo y distonía infantil [85], o mutantes de CRT-1 [95].

Por último, como farmacochaperonas o chaperonas farmacológicas (**Fig. 9C**) se define a aquellos compuestos que interaccionan específicamente con intermediarios de plegamiento facilitando la adquisición de la conformación nativa, es decir, favoreciendo que se alcance la conformación final de mínima energía al reducir la diferencia de energía entre los estados de transición. La mayor ventaja de estos compuestos es que son altamente específicos al ser ligandos de las proteínas a las que se unen [74]. Actualmente existen dos farmacochaperonas aprobadas para su uso en pacientes: migalastat, un inhibidor de la α galactosidasa A efectivo en el tratamiento de la enfermedad de Fabry [86]; y lumacaftor, que corrige el fenotipo de fibrosis quística causado por la mutación $\Delta F508$ del CFTR [87, 99].

Con respecto a los SLC6, algunos inhibidores atípicos de transportadores de monoaminas han dado buenos resultados. La ibogaína, un alcaloide indólico proveniente del arbusto africano *Tabernanthe iboga*, así como su metabolito desmetilado noribogaína, son capaces de rescatar variantes de SERT con mutaciones en el C-t [100] y mutantes de DAT relacionadas con parkinsonismo y distonía infantil [85, 101]. De la misma forma, bupropión, un derivado de catinona utilizado como antidepresivo, también se ha demostrado eficaz en el rescate de mutantes mal plegados de DAT [101]. El hecho de que ibogaína, noribogaína y bupropión se unan al sitio ortostérico de estos transportadores y los inhiban forzando una conformación abierta hacia dentro, hace pensar que es precisamente la adquisición de esta conformación la que facilita el plegamiento, de forma que se ha propuesto que la conformación abierta hacia dentro es uno de los estados de transición por los que han de pasar los SLC6 para

adquirir el estado nativo [79]. En cuanto a GlyT2, la farmacología no es tan abundante como en el caso de los transportadores de monoaminas, lo cual dificulta el hallazgo de un compuesto específico capaz de rescatar variantes mal plegadas. Sin embargo, sí que existen dos inhibidores sintéticos específicos, ALX 1393 y ORG 25543 [102-104], así como una serie de inhibidores lipídicos como N-araquidonil glicina [105-107], cuyo potencial para rescatar variantes mal plegadas de GlyT2 podría estudiarse.

5.2. N-araquidonil glicina

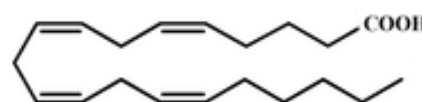
N-araquidonil glicina (NAG) es un compuesto endógeno derivado del ácido araquidónico que está ampliamente distribuido por el organismo aunque no de forma uniforme, existiendo niveles altos de NAG en médula espinal e intestino delgado, niveles más bajos en cerebro, riñón y piel, y niveles muy bajos en el corazón [108].

Entre sus funciones se ha descrito mayoritariamente un papel antiinflamatorio o analgésico y, aunque es controvertido, frecuentemente se ha propuesto que parte de sus acciones biológicas estén mediadas por su

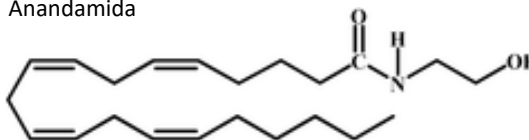
unión a GPR18, un GPCR del que son agonistas totales los cannabinoides anandamida y Δ^9 -tetrahidrocannabinol (THC) [109]. Así, se ha propuesto que GPR18 media en el efecto antiinflamatorio de NAG observado en un modelo murino de peritonitis, donde el compuesto reduce el reclutamiento de leucocitos inflamatorios [110]; que está implicado en la proliferación y reclutamiento de microglía en el SNC que resulta de la aplicación de NAG [111-113]; o que la reducción de la presión intraocular promovida por NAG es bloqueada por la inhibición de GPR18 [114]. En cuanto a otros posibles receptores que medien la función de NAG, se ha propuesto que en ganglios espinales la interacción del compuesto con GPR92 pueda tener algún papel en el procesamiento de estímulos sensoriales [115]. Curiosamente, a pesar de la similitud entre NAG y anandamida, NAG no tiene afinidad por el receptor cannabinoide 1 (CB₁) [108].

La función más estudiada de NAG es su acción antinociceptiva, que ha sido probada en distintos modelos comportamentales de dolor. Se ha demostrado que la administración sistémica o local de NAG reduce la respuesta de ratones ante estímulos térmicos dañinos [116, 117], que su administración local en las patas de ratas inhibe el comportamiento nociceptivo

Ácido araquidónico



Anandamida



NAG

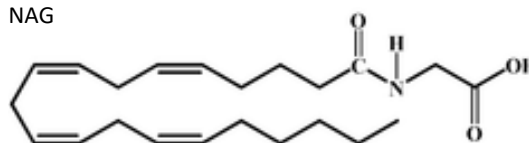


Figura 10. Ácido araquidónico, anandamida y NAG. Adaptado de [109].

inducido por formalina [118] y que su administración intratecal en ratas revierte la alodinia mecánica y la hiperalgesia térmica producida por inflamación en las patas, así como evita parcialmente la alodinia mecánica derivada de la ligación del nervio ciático [119, 120]. En cuanto a los mecanismos que subyacen a los efectos analgésicos de NAG, parece que la inhibición de los canales de Ca^{2+} tipo T $\text{Ca}_v3.2$ es la responsable de la antinocicepción térmica cuando NAG se administra localmente [117]. No obstante, cuando NAG se administra por otras vías, los mecanismos responsables están aún por esclarecer. Por ejemplo, se ha propuesto que NAG inhibe a la ácido graso amida hidrolasa (FAAH), aumentando los niveles sistémicos de anandamida, y que el efecto analgésico se debería a la estimulación por parte de esta última de los receptores de cannabinoides. Sin embargo, parece que CB_1 y CB_2 no median en la analgesia producida por la administración intratecal de NAG, puesto que la inhibición de los receptores no bloquea el efecto antinociceptivo observado [119, 120]. Por otro lado, también se ha propuesto que el efecto analgésico de NAG se deba a una inhibición parcial de GlyT2 y al consecuente potenciamiento de la transmisión glicinérgica inhibitoria en el asta dorsal de la médula espinal [105, 107].

NAG se describió como un inhibidor parcial no competitivo de GlyT2 con una IC_{50} de 5 μM y una inhibición máxima de en torno al 90% cuando se medían las corrientes asociadas a su actividad en oocitos de *Xenopus laevis* [105]. En un trabajo posterior, se demostró la capacidad de NAG para potenciar la transmisión glicinérgica inhibitoria en preparaciones de asta dorsal de la médula espinal al inhibir específicamente a GlyT2 [107]. Dicha inhibición, al ser parcial, reduciría la tasa de aclaramiento de Gly de la sinapsis, manteniendo durante más tiempo la activación de los GlyR, pero no la bloquearía totalmente, permitiendo así la acumulación del neurotransmisor en los botones presinápticos para el relleno de vesículas sinápticas. En cómputo global, la transmisión glicinérgica seguiría produciéndose de modo prolongado en el tiempo, lo que se traduciría en un efecto analgésico. Sin embargo, la relativa baja afinidad de NAG por GlyT2, su rápido metabolismo mediado por ciclooxigenasas y su interacción con otras dianas dificultarían su administración terapéutica [121]. Por ello, se empezaron a desarrollar una serie de nuevos compuestos lipídicos con potencial de inhibir a GlyT2. El hecho de que compuestos estructuralmente relacionados con NAG como la anandamida no produjesen inhibición de GlyT2 y que otros N-acil aminoácidos (NAAAs) como N-araquidonil L-alanina, N-araquidonil GABA u oleil L-carnitina sí que lo hiciesen, pero con distinto grado de afinidad [105, 122], llevó a la publicación de una serie de trabajos en los que se estudiaba el potencial de nuevos NAAAs con modificaciones tanto en la cadena hidrocarbonada [121] como en la cabeza polar [123]. De en torno a 50 lípidos generados, el que mejor resultados dio fue la oleil-D-lisina, un compuesto con alta afinidad por GlyT2, resistencia a la degradación, rápida absorción tras su

administración intraperitoneal y facilidad para cruzar la barrera hematoencefálica [123]. En cuanto a la región de unión de NAG y otros NAAAs en GlyT2, recientemente se ha identificado un bolsillo situado en la parte extracelular del transportador, en una hendidura entre los TM 5, 7 y 8, y el EL 4, que actuaría como un sitio alostérico de modulación de la actividad de transporte [124].

6. Organización en balsas lipídicas y tráfico intracelular de GlyT2

En tallo cerebral y médula espinal, alrededor del 13% del total de GlyT2 y la mayoría de su fracción de membrana se encuentran en balsas lipídicas [125], unos dominios pequeños, dinámicos y heterogéneos, enriquecidos en esteroides y esfingolípidos, que compartimentan regiones de la membrana. En este sentido, mediante difusión lateral se organizan complejos proteicos relacionados con transducción de señales y tráfico intracelular [126]. En SNC, se han propuesto como reguladores espaciales de la exocitosis y se las ha relacionado con la formación de sinapsis. En el contexto de la sinapsis glicinérgica, la presencia de GlyT2 en balsas lipídicas promueve su actividad debido a la abundancia de colesterol, compartimenta al transportador junto con sus interactores y podría asociarlo espacialmente con la maquinaria molecular de llenado de vesículas sinápticas y de exocitosis, facilitando la entrada de Gly en los terminales presinápticos y su acoplamiento a estos procesos [125, 127, 128].

El tráfico de GlyT2 desde el interior celular a la membrana plasmática y viceversa sirve para mantener un número óptimo de transportadores en membrana según las necesidades de la célula y, por tanto, es un punto clave en la regulación de su actividad. En cultivos primarios de neuronas de tallo cerebral y médula espinal, se estima que en torno al 60% del total de GlyT2 se encuentra en membrana plasmática y que el 30% es intracelular. De esta fracción intracelular, GlyT2 se distribuye en distintos compartimentos, pero principalmente se encuentra en endosomas de reciclaje Rab11⁺, que constituyen una reserva de transportador disponible para adaptarse a las necesidades de transporte de Gly [129].

Está demostrado que la exocitosis de GlyT2 desde vesículas internas a la membrana plasmática es promovida por la entrada de Ca²⁺ al interior celular y que depende al menos de dos proteínas de la familia SNARE: sintaxina 1 (STX1) y la proteína de membrana asociada a vesículas (VAMP). De esta forma, la liberación de Gly a la sinapsis se coordina con su recaptación para un control fino de la duración de la neurotransmisión glicinérgica [130].

La endocitosis de GlyT2 se produce mediante vesículas revestidas de clatrina que se escinden de la membrana gracias a dinamina 2 [131]. Como muchas proteínas de membrana,

GlyT2 se endocita constitutivamente y, además, de forma regulada en respuesta a distintas situaciones y reguladores. La endocitosis constitutiva está mediada por la ubiquitinación de un grupo de lisinas (Lys) del C-t de la proteína transportadora (Lys 751, Lys 773, Lys 787 y Lys 791) y consiste en la internación a través de endosomas de reciclaje Rab11⁺. Durante este proceso, GlyT2 permanece asociado a balsas lipídicas en estas vesículas, lo que permite un rápido recambio de los transportadores de membrana en condiciones basales [132]. Por su parte, la endocitosis regulada de GlyT2 se ha estudiado ampliamente a través de la activación de proteína quinasa C (PKC) y se produce en dos pasos: uno de difusión lateral desde balsas lipídicas a dominios no enriquecidos en colesterol y otro de internación mediada por ubiquitinación de la Lys 791. Al contrario que durante el tráfico constitutivo, GlyT2 se interna mayoritariamente en endosomas tardíos Rab6⁺ y es dirigido a la vía de degradación [131].

6.1. Ubiquitinación

Como se ha comentado en el apartado anterior, la ubiquitinación de GlyT2 es un proceso muy estudiado y con mucha relevancia a nivel de su regulación. La ubiquitina, el elemento principal del proceso, es una proteína de 76 aminoácidos que se une mediante enlace covalente a otras proteínas para su marcaje y posterior dirección a otros destinos [133]. La modificación de proteínas por unión de ubiquitina es una cascada enzimática que se produce en tres pasos. Primero, se produce una activación de la ubiquitina dependiente de ATP que implica la formación de un enlace tioéster entre el C-t de ubiquitina y una Cys de la enzima E1. Después, la ubiquitina activada es transferida a una Cys de la enzima E2 para su posterior acoplamiento a una E3 ubiquitín ligasa. Finalmente, la E3 ubiquitín ligasa cataliza la unión de la ubiquitina a través de su C-t a un residuo específico de Lys de la proteína diana [134, 135].

Las proteínas pueden tener unida una sola molécula de ubiquitina por Lys, quedando monoubiquitinadas, o pueden tener unidas una cadena de ubiquitinas, quedando poliubiquitinadas [136]. En este último caso, las moléculas de ubiquitina se van añadiendo secuencialmente, uniéndose cada nueva molécula a un residuo de Lys de la anterior. Las Lys 11, 48 y 63 de ubiquitina tienen funciones específicas. En general, las cadenas formadas a través de enlaces que implican Lys 48 y Lys 11 dirigen las proteínas modificadas a degradación proteosomal; mientras la monoubiquitinación y poliubiquitinación que implique Lys 63 promueven regulaciones no proteolíticas [137].

6.2. Proteínas ligando de Numb X 1 y 2

La especificidad del proceso de ubiquitinación viene definida por la especificidad que tenga una E3 ligasa por su proteína diana, y este quizá sea el motivo de que se hayan descubierto más de 600 de estas enzimas en contraposición con las escasas enzimas E1 y E2 encontradas

[138]. Como se ha descrito anteriormente, la ubiquitinación de GlyT2 está íntimamente relacionada con el reciclaje intracelular del transportador [131, 132]; sin embargo, aún no se ha identificado ninguna E3 ubiquitín ligasa responsable de este proceso. Un estudio proteómico identificó en 2012 la posible interacción de GlyT2 con la E3 ubiquitín ligasa LNX1 [139], abriendo la puerta al estudio de una posible regulación del transportador por parte de esta proteína u otras de su familia.

Las proteínas ligando de Numb X (LNX) o PDZ y RING (PDZRN) son una familia de E3 ubiquitín ligasas que se caracterizan por la presencia en su estructura de un dominio RING seguido de distinto número de dominios PDZ de interacción con otras proteínas. La familia está formada por cinco miembros (LNX1-5) que, aun siendo homólogos, tienen distinto grado de similitud [140]. LNX1 y LNX2, las más estudiadas, están estrechamente relacionadas y se componen de un dominio RING y cuatro dominios PDZ [141, 142] (**Fig. 11**).

LNX1 y LNX2 están ampliamente distribuidas por el organismo y han sido detectadas a nivel de mRNA durante el desarrollo y en etapa postnatal. Sin embargo, mientras el mRNA de LNX2 es único y se expresa tanto en tejidos periféricos como en SNC [142]

(**Fig. 11B**), LNX1 presenta diversas variantes de mRNA con distinta localización. Así, en tejidos periféricos se expresa la variante de mRNA que da lugar a la isoforma larga de LNX1, llamada p80 (**Fig. 11A**); y en cerebro y médula se expresan las variantes que dan lugar a dos proteínas sin el dominio RING, las isoformas p70 y p62 [141, 143] (**Fig. 11A**). En SNC, LNX1 y LNX2 son preferentemente neuronales, encontrándose una proporción pequeña de sus mRNAs en oligodendrocitos [143].

Inicialmente, se propuso el papel de LNX1 y LNX2 en desarrollo, puesto que ambas eran capaces de interactuar con la proteína Numb [141, 142], un inhibidor de la ruta de Notch que promueve la diferenciación de las células progenitoras al no repartirse de forma equitativa tras la división celular asimétrica [144]. Dado que LNX1 y LNX2 ubiquitinan y envían a degradación a Numb, se propuso que, favoreciendo la señalización de Notch, promoviesen el mantenimiento de las células progenitoras [138, 145]. En este sentido, se ha demostrado que durante el desarrollo del SNC de pez cebra, la Gly suprime la expresión de LNX1, estabilizando Numb y

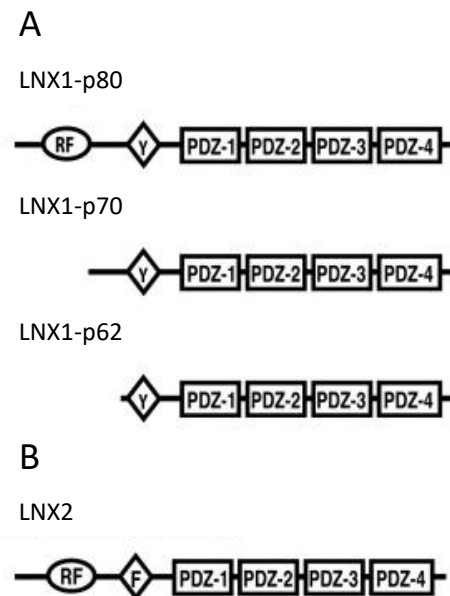


Figura 11. Las E3 ubiquitín ligasas LNX1 y LNX2. A) Esquema de la estructura de las distintas isoformas de LNX1. **B)** Esquema de la estructura de LNX2. Adaptado de [143].

disminuyendo la actividad de Notch, lo que promueve la diferenciación neuronal [146]. No obstante, las funciones de LNX1 y LNX2 van más allá de su papel en desarrollo, en parte debido a su amplia distribución y a la presencia en su estructura de cuatro dominios PDZ, dos características que hacen que tengan múltiples dianas [141, 142, 147]. Además, hay que señalar que LNX1 y LNX2 también presentan motivos C-t de unión a dominios PDZ y que, por tanto, son capaces de interactuar entre ellas [142], de forma que es probable que LNX1 y LNX2 realicen sus funciones formando grandes complejos proteicos junto a sus proteínas diana y que parte de sus acciones no se deban solo a su actividad E3 ubiquitín ligasa, sino a su capacidad de localizar en una misma parte de la célula a distintas proteínas [142, 148]. Con respecto a estas otras funciones en las que se ha involucrado a las LNX, por ejemplo, en SNC, se han relacionado con la función y formación de sinapsis químicas, dado que LNX1 interactúa con proteínas de la presinapsis como liprina- α 1 [149] o la proteína asociada a la citomatrix de la zona activa 1 (CAST 1) [150], pero también se han relacionado con la biología de sinapsis eléctricas, puesto que se ha observado la colocalización de LNX1 y LNX2 con conexina 36 en cerebro, así como se ha demostrado que la sobreexpresión de LNX2 junto a conexina 36 en sistema heterólogo promueve la ubiquitinación y degradación de esta última [148]. Por otro lado, en el contexto de la unión neuromuscular, se ha determinado la presencia de LNX1-p80 junto con el receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2) en las células perisinápticas de Schwann y se ha conseguido coinmuprecipitar HER2 junto a LNX1 a partir de lisados de cerebro [143, 151]. Fuera del SNC, se ha demostrado que LNX1 y LNX2 participan en la degradación del correceptor CD8 de linfocitos T [152] y que ambas interactúan y regulan distintas proteínas de adhesión. Así, la sobreexpresión de LNX1-p80 en células MDCK promueve la ubiquitinación y degradación dependiente de lisosoma de Claudina 1, 2 y 4 [153], LNX1-p70 facilita la endocitosis de la molécula de adhesión y de unión 4 (JAM4) en un proceso dependiente de Numb [154], y tanto LNX1 como LNX2 interactúan con el receptor de adenovirus y coxsackievirus (CAR) [155]. En definitiva, se ha descrito la implicación de LNX1 y LNX2 en procesos de lo más diverso. A pesar de ello, aún quedan muchos aspectos por conocer sobre ellas.

Objetivos

Dado que la actividad de GlyT2 aporta Gly para el relleno de vesículas sinápticas y el consecuente mantenimiento de la neurotransmisión glicinérgica inhibitoria, la comprensión de los distintos aspectos que afectan a su función puede ayudar a profundizar en la fisiología de este tipo de neurotransmisión y, asimismo, poner los cimientos para remediar los aspectos patológicos relacionados con ella.

A nivel fisiológico, la función de GlyT2 es regulada a través de distintos mecanismos, lo que permite que su actividad sea apropiada en espacio y tiempo. Sin embargo, como ya se ha indicado, a pesar de la importancia de la señalización de Hh en la adquisición de distintos fenotipos celulares a lo largo del eje ventrodorsal de la médula espinal, donde el transportador se expresa abundantemente, no existen estudios en los que se haya determinado si GlyT2 se ve afectado por la estimulación de esta cascada de señalización, ni en adultos ni durante el desarrollo. Por otro lado, muchos de los mecanismos que controlan la actividad de GlyT2 convergen en la ubiquitinación del transportador y, aunque no se ha demostrado la implicación de ninguna E3 ubiquitín ligasa específica en el proceso, en 2012 se identificó a GlyT2 como posible interactor de la proteína LNX1.

A nivel patológico, las mutaciones que afectan a la función de GlyT2 son la segunda causa de hiperplexia o enfermedad del sobresalto y no existe una terapia específica para su tratamiento, a pesar de poder producir la muerte súbita en neonatos. Por ello, la caracterización de los mutantes del transportador asociados a esta enfermedad, así como la búsqueda de compuestos con capacidad de rescatar su fenotipo, puede ser de máxima utilidad para encontrar una terapia adecuada.

Por todo ello, esta Tesis Doctoral se va a dividir en dos bloques conceptualmente distintos que comprenden tres objetivos específicos:

Bloque I

1. Estudio de una posible modulación funcional de GlyT2 a través de la ruta de señalización de Hh.
2. Análisis del papel de las E3 ubiquitín ligasas LNX1 y LNX2 en la regulación de GlyT2.

Bloque II

3. Caracterización de mutantes asociados a hiperplexia y búsqueda de compuestos capaces de rescatar su fenotipo.

Materiales y métodos

1. Animales

Durante el desarrollo de este trabajo se han utilizado ratas Wistar hembras y embriones de pez cebra de ambos sexos. Todos los individuos usados fueron criados en condiciones estándar en el Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa”, de acuerdo con los procedimientos aprobados en la Directiva 2010/63/UE de la Unión Europea y con la aprobación del Comité de Ética de Investigación de la Universidad Autónoma de Madrid (procedimiento aprobado por el CEI UAM 10-4-2010) y la Comunidad de Madrid (CM 6-3-2015).

2. Cultivos celulares

Como sistemas heterólogos de expresión de GlyT2, se utilizaron células COS-7, células MDCK II (American Type Culture Collection) y neuronas primarias de corteza cerebral de rata. Para ensayar en el sistema endógeno de expresión de GlyT2, se realizaron cultivos primarios de médula espinal y tallo cerebral. Por otro lado, como sistema de producción de partículas lentivirales, se han utilizado las células de riñón embrionario humano 293T (HEK 293T). Todos los cultivos celulares utilizados se crecieron en incubadores a 37°C y 5% de CO₂.

2.1. Líneas celulares

Las COS-7 son células inmortalizadas con morfología fibroblástica que provienen de riñón de mono verde africano y fueron cultivadas en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con un 10% de suero fetal bovino (FBS). Las MDCK II, por su parte, son células de morfología epitelial que provienen de riñón canino y fueron cultivadas en medio mínimo esencial (MEM) con FBS al 10%. Las células HEK 293T son una versión de las células HEK 293 que expresan el antígeno T largo del virus de simio 40 (SV-40) y, al igual que las COS-7, fueron cultivadas con DMEM suplementado con un 10% de FBS.

2.2. Obtención de cultivos primarios neuronales

Los cultivos primarios de neuronas se obtuvieron a partir de fetos de rata Wistar a distintos días de gestación según el caso. Los cultivos de neuronas de médula espinal y tallo cerebral se obtuvieron a E16, mientras que los cultivos de neuronas corticales se realizaron a E19. El procedimiento de obtención fue similar en ambos casos. Los tejidos se diseccionaron en solución salina balanceada de Hank (HBSS) y se trataron con tripsina durante 15 min para una posterior disgregación mecánica. Después, las células disgregadas se centrifugaron a 1200 rpm durante 5 min y se resuspendieron, plaquearon e incubaron durante 4h en medio de plaqueo (DMEM con un 10% de FBS, glucosa 10 mM, piruvato sódico 10 mM, glutamina 0,5 mM, gentamicina 0,05 mg/ml, estreptomycin al 0,01% y penicilina 100 U/ml). Pasado este tiempo, el medio se reemplazó por medio Neurobasal™ suplementado con B-27™ (Gibco) al 2%, el medio

definitivo de mantenimiento de las neuronas. A los 2 días *in vitro* (DIV) se añadió citosina arabinósido (AraC) 1 μ M al medio para eliminar la glía y asegurar un cultivo enriquecido de neuronas. Los cultivos primarios de neuronas de corteza se mantuvieron hasta DIV 7 y los de neuronas de médula espinal y tallo cerebral hasta DIV 12. En este último caso, la mitad del volumen del medio se sustituyó por medio fresco a DIV 7.

3. Expresión transitoria de proteínas

Tanto para explorar la relación funcional entre las proteínas LNX y GlyT2 como para caracterizar el fenotipo de los mutantes asociados a hiperplexia, se ha recurrido a la expresión transitoria mediante transfección de distintas proteínas contenidas en plásmidos (**Tabla 1**). Para ello, se utilizaron los reactivos comerciales TurboFect™ y Lipofectamine™ 2000 (Thermo Fisher Scientific). Estos reactivos contienen, respectivamente, polímeros y lípidos catiónicos, los cuales forman complejos estables con el DNA y facilitan su endocitosis por parte de las células.

Tabla 1. Lista de plásmidos utilizados para expresión transitoria

Inserto	Vector	Origen
GlyT2 y mutantes	pcDNA3	Generación propia
LNX1-p70-Myc	pCLneoMyc	Addgene (#37009)
LNX1-p80-FLAG	pFLAG-CMV-2	Cedido por Jane Mcglade (Universidad de Toronto)
LNX2-p80-Myc	pCLneoMyc	Addgene (#37010)
Ubiquitina-HA	pRK5	Addgene (#17608)
Sec24D-Myc	pcDNA3	Cedido por Francisco Zafra (Universidad Autónoma de Madrid y Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa”)
CNX	pCMV-SPORT6	Source Bioscience Lifesciences (Image number 2582119)

Se utilizó TurboFect™ para la transfección de células COS-7 y Lipofectamine™ 2000 para transfectar células MDCK II y neuronas corticales. Independientemente del reactivo utilizado, la transfección se realizó en los medios de mantenimiento correspondientes para cada tipo celular en ausencia de suplementos, utilizando 2 μ l de reactivo por cada μ g de DNA. La cantidad de DNA usada dependió del tamaño de placa en la que estuviesen sembradas las células (**Tabla 2**). Pasadas 4h de incubación, los medios de transfección se sustituyeron por los medios completos de cultivo. En todos los casos, los cultivos se incubaron a 37°C y 5% de CO₂ entre 24h y 48h hasta ser procesados.

Tabla 2. Cantidades de reactivo de transfección y DNA utilizadas

Tamaño de placa	Reactivo de transfección (μl)	DNA (μg)
p100	20	10
p60	10	5
p6	5	2,5
p12	2,5	1,25
p24	2	1

4. Generación de partículas lentivirales e infección de cultivos primarios de médula espinal y tallo cerebral

Para el silenciamiento de LNX2 en neuronas de médula espinal y tallo cerebral, se emplearon partículas lentivirales con shRNAs. La producción de los lentivirus se realizó en células HEK 293T mediante la transfección con TurboFect™ de los vectores con el shRNA control o el shRNA de LNX2 (**Tabla 3**) y los dos plásmidos necesarios para el ensamblaje y función de los lentivirus: el plásmido de empaquetamiento psPAX2 y el plásmido de envuelta pMD2.G (**Tabla 4**). Para ello, las células HEK293T, sembradas en una placa P100 y a una confluencia del 80-90%, fueron incubadas en 750 μl de medio Opti-MEM™ (Gibco) con 36 μl de TurboFect™, 8 μg del shRNA en cuestión, 4 μg de vector psPAX2 y 2 μg de pMD2.G. Tras las 4h de incubación, el medio se reemplazó por DMEM suplementado con FBS al 10% y se mantuvo durante toda la noche. Al día siguiente, el medio se sustituyó por 5 ml de Neurobasal™ con B-27™ al 2%. Tras 24h, este medio con las partículas lentivirales ya ensambladas se recogió, filtró y congeló a -80°C para su uso posterior.

Tabla 3. Secuencia de los shRNAs utilizados

Inserto	Secuencia	Vector	Origen
shRNA Control	5'CCTAAGGTTAAGTCGCCCTCGCTCGA GCGAGGGCGACTTAACCTTAGG 3'	pLKO.1	Addgene (#1864)
shRNA LNX2	5'CCACTGATCAACATCGTCATT 3'	pLKO.1	Cedido por Jaime de Juan Sanz (Universidad Sorbona e Instituto del Cerebro de París)

Tabla 4. Plásmidos necesarios para el ensamblaje y función de lentivirus

Inserto	Vector	Origen
Gag, Pol, Rev y Tat del virus de la inmunodeficiencia humana 1 (HIV-1)	psPAX2	Cedido por Jaime de Juan Sanz (Universidad Sorbona e Instituto del Cerebro de París)
Glicoproteína del virus de la estomatitis vesicular (VSV-G)	pMD2.G	Cedido por Jaime de Juan Sanz (Universidad Sorbona e Instituto del Cerebro de París)

Los cultivos se infectaron con las partículas lentivirales a DIV 1. Las preparaciones se añadieron en relación 5% v/v directamente al medio de cultivo. A las 24h, a las neuronas se les cambió la mitad del volumen del medio de cultivo por medio fresco. Las neuronas fueron mantenidas en cultivo hasta DIV 12.

5. Tratamientos farmacológicos

5.1. Estudio de la ruta de Hh

Para explorar *in vitro* la posibilidad de una regulación de GlyT2 a través de la señalización de Hh, se utilizaron neuronas primarias de médula espinal y tallo cerebral a DIV 12, realizándose distintos tratamientos con un agonista y un antagonista del receptor Smo (**Tabla 5**). Además, para desentrañar el posible mecanismo subyacente, se realizaron tratamientos conjuntos del agonista de Smo con inhibidores de la enzima E1 y de PKC (**Tabla 5**). En todos los casos, los tratamientos se realizaron a 37°C y 5% de CO₂ en medio Neurobasal™ suplementado con B-27™ al 2%. Para corroborar *in vivo* la modulación promovida por la ruta de Hh, se utilizaron embriones de pez cebra de 24 hpf decorionados manualmente, a los cuales se trató con el antagonista de Smo durante 24h a 28°C. El compuesto fue añadido directamente al medio de mantenimiento de los embriones, el medio salino E3 (NaCl 5 mM; KCl 0,17 mM; CaCl₂ 0,33 mM; MgSO₄ 0,33mM y azul de metileno al 0,1%).

Tabla 5. Compuestos para estudiar la modulación de GlyT2 por parte de la vía de Hh

Compuesto	Concentración utilizada	Vehículo	Casa comercial
Purmorfamina (Agonista de Smo)	1, 5 y 10 µM	DMSO	Sigma-Aldrich
Ciclopamina (Antagonista de Smo)	0,2; 1; 2 y 100 µM	DMSO	Sigma-Aldrich
PYR 41 (Inhibidor de la E1)	5 µM	DMSO	Calbiochem
Bisindolilmaleimida IX (Inhibidor de PKC)	20, 100 y 500 µM	DMSO	Calbiochem

5.2. Activación de PKC

Para estudiar si LNX2 mediaba en el efecto de la activación de PKC sobre la endocitosis de GlyT2, las neuronas primarias de médula espinal y tallo cerebral con LNX2 silenciado y control se trataron con forbol-12-miristato-13-acetato (PMA) (Sigma-Aldrich) 1 μ M en etanol durante 2h.

5.3. Estudio de compuestos con potencial de remediar problemas en el plegamiento de proteínas

Con el objetivo de encontrar un compuesto con potencial de remediar defectos en el plegamiento de GlyT2 y sus variantes asociadas a hiperplexia, se realizaron diversas pruebas en células COS-7 y neuronas primarias de corteza cerebral a DIV 7. Todos los compuestos susceptibles (**Tabla 6**) se añadieron inmediatamente tras las 4h de transfección disueltos en el medio de mantenimiento de cada tipo de cultivo y se mantuvieron a 37°C y 5% de CO₂ entre 40 y 48h.

Tabla 6. Compuestos con potencial de remediar problemas de plegamiento

Compuesto	Concentración utilizada	Vehículo	Casa comercial
Bupropión hidrocloreuro	1 μ M	Metanol	Sigma-Aldrich
Ibogaína hidrocloreuro	1 μ M	Metanol	LGC Standards
ALX 1393	10 nM	DMSO	Santa Cruz Biotechnology
NAG	1, 5, 10 y 100 μ M	Etanol	Cayman chemicals
PBA	1 mM	Agua	Sigma-Aldrich

6. Cuantificación de los niveles de mRNA

En varios apartados de este trabajo se ha recurrido a la cuantificación de los niveles de expresión relativos de distintos mRNAs mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR). Para poder cuantificar estos niveles, previamente es necesario extraer el RNA total de las muestras de interés y su posterior retrotranscripción a cDNA.

6.1. Aislamiento de RNA total

El RNA total se aisló mediante el método de extracción ácida con tiocianato de guanidinio:fenol:cloroformo, usando el reactivo comercial TRI Reagent[®] (Sigma-Aldrich). Inicialmente, las muestras fueron lisadas con Tri Reagent[®] durante 5 min en un tubo de 1,5 ml. En función del material de partida y de su cantidad, el volumen de reactivo utilizado se varió según el caso. Tras la incubación con Tri Reagent[®], se añadió a cada muestra 0,2 ml de

cloroformo por cada ml de reactivo utilizado para la lisis, se agitó vigorosamente y se incubó durante 3 min para posteriormente centrifugar a 12000 x g durante 15 min a 4°C. Esta centrifugación permite la separación de las muestras en tres fases: una fase de fenol-cloroformo de color rosado en la parte inferior del tubo, una interfase y una fase acuosa incolora en la parte superior. La fase acuosa, que contiene el RNA total de las muestras, se transfirió a un nuevo tubo, al que a continuación se añadió 0,5 ml de isopropanol por cada ml de Tri Reagent[®] utilizado en un inicio y se agitó vigorosamente. Para facilitar la precipitación del RNA, las muestras se mantuvieron a -20°C durante 2h y se centrifugaron a 12000 x g durante 15 min a 4°C. Después se eliminó el sobrenadante, manteniendo el RNA precipitado en el fondo del tubo para su posterior lavado con 1 ml de etanol al 75% por cada ml de Tri Reagent[®] usado. El etanol elimina sales precipitadas junto con el RNA, mejorando la pureza del material aislado. Las muestras se agitaron brevemente, se centrifugaron a 7500 x g durante 5 min a 4°C y se eliminó de nuevo el sobrenadante. El RNA precipitado se secó al aire para eliminar cualquier resto de etanol y se resuspendió en 20-30 µl de agua previamente esterilizada en autoclave. La cuantificación del RNA aislado se realizó en un espectrofotómetro NanoDrop™ One (Thermo Fisher Scientific).

6.2. Retrotranscripción del RNA a cDNA

La retrotranscripción a cDNA se llevó a cabo con el iScript™ cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad). Para ello, se prepararon muestras con un volumen final de 20 µl que contenían 1 µg de RNA total, 4 µl de iScript Reaction Mix (5x) y 1 µl de iScript Reverse Transcriptase. El protocolo seguido para la reacción de retrotranscripción fue el indicado por la casa comercial (**Tabla 7**).

Tabla 7. Programa para la retrotranscripción del RNA

Paso	Temperatura (°C)	Duración (min)
Cebado	25	5
Transcripción reversa	46	20
Inactivación de la enzima	95	1

6.3. Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa

Para la qPCR se prepararon muestras con 12,5 pg de cDNA en un volumen final de 10 µl, conteniendo 5 µl de Fast SYBR™ Green Master Mix (2x) (Thermo Fisher Scientific) y 2,5 µM de sonda específica según el caso (**Tabla 8**).

Tabla 8. Sondas para detección de genes por qPCR

mRNA diana	Sonda directa	Sonda inversa
GlyT2 (rata)	5'CAGCCAGGCCAATAAGACAT 3'	5'CCACCTGATCTCACCAGGAT 3'
GlyT2 (pez cebra)	5'TTGACACAGCCAAACTCAGTC 3'	5'ACGGCTGTCTCAACATTTCC 3'
GAPDH (rata)	5'TCCCATTCTTCCACCTTTGA 3'	5'ATGTAGGCCATGAGGTCCAC 3'
GAPDH (pez cebra)	5'CTGGTCATTGATGGTCATGC 3'	5'CACCACCCTTAATGTGAGCA 3'
LNX1-p80 (rata)	5'TGGAGGCGGGCTGGTGA 3'	5'TTCCTCAGGGGCAGGTCAAGA 3'
LNX2 (rata)	5'CCGTGTGCCAAGATGTAATG 3'	5'GGATCCAGTTTCACCCTCAA 3'

La reacción se realizó en el ABI Prism™ 7900HT Sequence Detection System (Thermo Fisher Scientific) siguiendo el protocolo recomendado por la casa comercial del kit (**Tabla 9**). La expresión relativa de los mRNAs se cuantificó mediante el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$, utilizando para normalizar el gen de la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH).

Tabla 9. Programa de qPCR

Paso	Temperatura (°C)	Duración (s)	Nº de ciclos
Activación de la polimerasa	95	20	1
Desnaturalización	95	1	40
Anillamiento y extensión	60	20	

7. Transporte de [³H]-Gly en cultivos celulares

Antes de llevar a cabo el ensayo, se retiró el medio de mantenimiento de los pocillos en los que se encontraban las células y se realizó un lavado con tampón fosfato salino (PBS) que contenía glucosa al 0,2%. Para el ensayo, las células se incubaron a 37°C durante 7 o 10 min con la misma solución, pero que contenía además 2 µCi/ml de [³H]-Gly y 10 pmol/µl de Gly fría. Tras el tiempo de ensayo, las células se volvieron a lavar y se dejaron secar a temperatura ambiente para posteriormente lisarlas con NaOH 0,2 N. Para calcular la acumulación de Gly, se realizaron tres medidas distintas (**Ecuación 1**). Por un lado, se utilizó un volumen del medio de incubación (estándar) para medir radiactividad asociada a ³H en un contador 1450 MicroBeta® TriLux (PerkinElmer), previa adición de líquido de centelleo Opti-Fluor® (PerkinElmer). Teniendo en cuenta la concentración de Gly fría y el volumen llevado al contador, se obtuvieron las cuentas por minuto (CPM)/pmol de Gly fría. Por otro lado, a partir del lisado de células con NaOH se

obtuvieron dos alícuotas. La primera de ellas se utilizó para cuantificar radiactividad asociada a ^3H en CPM y la segunda para cuantificar proteína mediante el ensayo de Bradford (Bio-Rad), obteniéndose una concentración de proteína en $\text{mg}/\mu\text{l}$. Dividiendo las CPM de la muestra entre las CPM/pmol de Gly fría cuantificadas en el estándar y teniendo en cuenta el volumen utilizado para el contaje, se pudo deducir la concentración de Gly en $\text{pmol}/\mu\text{l}$ asimilada por el cultivo. Dividiendo la concentración de Gly asimilada entre la concentración de proteína previamente determinada, se corrigieron diferencias entre los distintos pocillos utilizados para el ensayo. Finalmente, dividiendo el valor obtenido entre el tiempo de ensayo, se obtuvo la capacidad de acumulación de Gly de las células, expresada en $\text{pmol de Gly /mg de proteína/min}$.

Ecuación 1. Fórmula para el cálculo de la capacidad de acumulación de Gly

$$= \frac{\text{CPM muestra} \cdot \text{Gly} \cdot \text{Vol proteína}}{\text{Vol contaje muestra} \cdot \text{CPM estándar} \cdot \text{proteína} \cdot t \text{ ensayo}}$$

Siendo **CPM muestra**: cuentas por minuto determinadas en una alícuota de la muestra; **Gly**: pmol de glicina presentes en una alícuota de la solución radiactiva; **Vol proteína**: volumen de muestra utilizado para la medida de proteína; **Vol contaje muestra**: volumen de muestra utilizado para el contaje; **CPM estándar**: cuentas por minuto determinadas en un volumen de la solución radiactiva empleada; **proteína**: cantidad de proteína cuantificado en una alícuota de la muestra; **t ensayo**: tiempo de incubación con la solución radiactiva.

Para determinar la actividad específica de GlyT2, fue necesario determinar la acumulación basal de Gly en las células (acumulación dependiente de otros transportadores). En COS-7 y cultivos de neuronas corticales, el basal se obtuvo a partir del ensayo en células no transfectadas con GlyT2. En cultivos primarios de médula y tallo cerebral, se obtuvo a partir de células en las que se ensayó la acumulación de Gly en presencia del inhibidor de GlyT2 ORG 25543 (25 μM) (Tocris). Además, siempre que se realizaron experimentos en cultivos neuronales, la solución de ensayo incluía en todos los casos el antagonista de GlyT1 NFPS (10 μM) (Sigma-Aldrich), ya que la actividad del GlyT1 endógeno podía enmascarar el transporte de GlyT2. Para finalmente determinar el transporte de [^3H]-Gly de GlyT2 fue necesario substrair la acumulación de Gly basal que tuviesen las células a la acumulación de Gly de las células problema.

8. Cuantificación de los niveles de proteína mediante western blot

La detección y cuantificación de proteínas se llevó a cabo mediante la técnica de western blot (WB), que consiste en la separación de las proteínas de un extracto en función de su tamaño

mediante electroforesis, su transferencia a una membrana y su posterior inmunodetección y visualización mediante el uso de anticuerpos específicos.

8.1. Extracción de proteínas

Para preparar extractos proteicos, las células se lavaron con PBS y se recolectaron en tampón de levantamiento (Tris-HCl 50 mM a pH 7.5; NaCl 150 mM; ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 1 mM; fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 1 mM y cóctel de inhibidores de proteasas (Sigma-Aldrich) a 1:200). Mediante el ensayo de Bradford se cuantificó la cantidad de proteína para poder preparar muestras con concentración y volumen idénticos. Las muestras se lisaron durante 30 min a 4°C con tampón de ensayo de radioinmunoprecipitación (RIPA) (Triton™ X-100 al 1%; dodecilsulfato sódico (SDS) al 0,1%; deoxicolato sódico al 0,5%; Tris-HCl 50 mM a pH 7,5; NaCl 150 mM, EDTA 1 mM; PMSF 1 mM y cóctel de inhibidores de proteasas a 1:200) y se centrifugaron a máxima velocidad durante 15 min para la eliminación de membranas. Finalmente, los extractos proteicos se desnaturalizaron en tampón de carga (SDS al 2,3%; glicerol al 10%; azul de bromofenol al 0,01%; Tris-HCl 0,0625 M a pH 6,8 y ditiotretitol 100 mM) a 37°C durante 30 min.

8.2. Electroforesis, transferencia, inmunodetección y cuantificación

Las muestras se sometieron a electroforesis en gel de poliacrilamida al 6 o 7,5% con SDS (SDS-PAGE) (100-120 V/gel) y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa mediante un sistema de transferencia semiseca (90 min, 65 V/gel). Para evitar interacciones inespecíficas de los anticuerpos, las membranas se incubaron durante 30 min con solución de bloqueo (leche en polvo desnatada al 5% y Tween®-20 al 0,1% en PBS). Seguidamente, se incubaron a 4°C durante toda la noche con los anticuerpos primarios preparados en solución de bloqueo (**Tabla 10**). Tras la incubación con los anticuerpos primarios, las membranas se lavaron con leche en polvo desnatada al 2% y Tween®-20 al 0,1% en PBS, se incubaron durante 90 minutos con los correspondientes anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa de rábano (HRP) y se volvieron a lavar. El revelado se realizó por quimioluminiscencia usando el reactivo Clarity™ Western ECL Substrate (Bio-Rad). La luz emitida por los anticuerpos secundarios conjugados con HRP fue captada por películas fotográficas.

Tabla 10. Anticuerpos utilizados en WB

Anticuerpo	Especie	Dilución	Casa comercial
Anti-GlyT2	Conejo	1:1000	Generación propia [156]
Anti-GlyT2	Rata	1:500-1:1000	Generación propia [129]
Anti-tubulina	Ratón	1:2000	Sigma-Aldrich (Clon B-5-1-2)
Anti-subunidad $\alpha 3$ de la bomba sodio-postasio ($\alpha 3$ NKA)	Cabra	1:500-1:1000	Santa Cruz Biotechnology (sc-16052)
Anti-proteína mediadora de la respuesta de colapsina 5 (CRMP5)	Conejo	1:2000	Abcam (ab36203)
Anti-GlyT1	Conejo	1:200	Generación propia [28]
Anti-STX1A	Ratón	1:1000	Santa Cruz Biotechnology (sc-20036)
Anti-GAPDH	Ratón	1:1000	Abcam (ab8245)
Anti-FLAG	Ratón	1:1000	Sigma-Aldrich (Clon M2)
Anti-Myc	Ratón	1:1000	Cell Signaling (#2276)
Anti-HA	Ratón	1:1000	Sigma-Aldrich (Clon 12CA5)
Anti-ubiquitina	Ratón	1:200-1:500	Santa Cruz Biotechnology (sc-8017)
Anti-receptor de transferrina (TfR)	Ratón	1:500	Invitrogen (#13-6800)
Anti-CNX	Ratón	1:500-1:1000	BD Transduction Laboratories (Clon 37)

Para la cuantificación de las bandas de proteínas, las películas fotográficas fueron escaneadas con el sistema GS-900™ calibrated densitometer (Bio-Rad) y analizadas con Image Lab™ Software (Bio-Rad).

9. Ensayo de biotilación de proteínas de superficie

Dado que una buena parte de GlyT2 se encuentra en la membrana plasmática y esta proporción puede verse afectada en distintas condiciones, su análisis resultó muy útil en el estudio del fenotipo de los mutantes asociados a hiperplexia. Para el aislamiento y posterior análisis de la fracción de membrana de GlyT2 se realizaron ensayos basados en la interacción biotina-avidina. En ellos, las proteínas de superficie se marcan con N-hidroxisulfosuccinimida (NHS) éster de biotina, un compuesto impermeable con afinidad por Lys que, tras la lisis celular, puede ser precipitado utilizando estreptavidina-agarosa, de forma que la fracción de proteínas

de superficie pueda ser aislada de la fracción total. Para detectar GlyT2 de la fracción de membrana se recurrió a su análisis por WB.

Las células se mantuvieron durante al menos 15 min a 4°C para reducir al máximo el tráfico de membrana. Posteriormente se lavaron con PBS y se incubaron durante 30 min con 1 mg/ml del reactivo de biotilación EZ-Link™ NHS-Biotin (Thermo Fisher Scientific) disuelto en PBS. Tras realizar 2 lavados de 20 min con L-Lys 100 mM en PBS para eliminar el exceso de reactivo, las células se recolectaron en tampón de levantamiento, se lisaron durante 30 min a 4°C con tampón RIPA y se centrifugaron a máxima velocidad durante 15 min para eliminar membranas. Del sobrenadante obtenido se reservó una alícuota de proteína total y otra parte se incubó con estreptavidina-agarosa de *Streptomyces avidinii* (Sigma-Aldrich) durante 90 min en agitación rotatoria. Tras 3 lavados de 5 min con tampón RIPA, se retiró el sobrenadante y sobre las partículas precipitadas de estreptavidina-agarosa se añadió tampón de carga y se calentó a 75°C durante 10 min para eluir la fracción de proteína de membrana.

10. Ensayos de coimmunoprecipitación

La coimmunoprecipitación es un método que permite estudiar las interacciones de una proteína con otras y en este trabajo se ha utilizado para estudiar la unión de GlyT2 a las proteínas LNX y a proteínas implicadas en el control de calidad de RE. Este método se basa en la utilización de detergentes suaves que permitan la solubilización de membranas sin eliminar interacciones proteína-proteína y en la posterior purificación de una proteína concreta junto a sus interactores mediante el uso de un anticuerpo específico y una proteína de unión a inmunoglobulinas conjugada con partículas. Los resultados se analizan por WB.

Las células se lavaron para eliminar los restos de medio de cultivo, se recolectaron en PBS y se lisaron a temperatura ambiente durante 90 min con un 0,2% del detergente no iónico Nonidet™ P40 Substitute disuelto en PBS. Tras centrifugar a máxima velocidad durante 15 min, una alícuota del sobrenadante se guardó como proteína total y el resto se sometió a un preaclaramiento durante 30 min a temperatura ambiente con partículas de proteína G agarosa (PGA) (Invitrogen) en Nonidet™ P40 Substitute al 0,2% (50% v/v) para eliminar posibles interacciones inespecíficas con la agarosa. Posteriormente, el sobrenadante se incubó durante toda la noche a 4°C con el anticuerpo de elección. En la **Tabla 11** se especifican los anticuerpos utilizados, así como la cantidad de ellos que se añadió por cada mg de proteína total de partida. Al día siguiente, cada muestra se incubó durante 90 minutos con las partículas de PGA a temperatura ambiente. Finalmente, después de 3 lavados de 5 min con Nonidet™ P40 Substitute al 0,2%, la fracción de proteínas inmunoprecipitadas se eluyó añadiendo tampón de carga y calentando a 75°C durante 15 min.

Tabla 11. Anticuerpos utilizados para inmunoprecipitación

Anticuerpo	Especie	µg anticuerpo/mg proteína total	Casa comercial
Anti-GlyT2	Conejo	4,0	Generación propia [156]
Anti-FLAG	Ratón	4,0	Sigma-Aldrich (Clon M2)
Anti-Myc	Ratón	4,0	Cell Signaling (#2276)
Anti-CNX	Conejo	2,5	StressMarq Biosciences (SPC-108)

11. Ensayos de ubiquitinación

Los ensayos para determinar el grado de ubiquitinación de GlyT2 se basan en la inmunoprecipitación del transportador tras lisar en condiciones estrictas que eliminen cualquier tipo de interacción proteína-proteína. Así se intenta evitar que la señal de ubiquitina detectada por WB no corresponda solo a GlyT2 sino también a alguna proteína de su interactoma.

En primer lugar, las células se trataron con inhibidores de la degradación proteica durante 3-4h a 37°C según el caso (**Tabla 12**). Pasado este tiempo, las células se lavaron y recolectaron en tampón de levantamiento con N-etilmaleimida (NEM) (NEM 50 mM, Tris-HCl 50 mM a pH 7,5; NaCl 150 mM; EDTA 1 mM; PMSF 1 mM y cóctel de inhibidores de proteasas a 1:200). La NEM es un compuesto que reacciona con grupos sulfhidrilo, de forma que bloquea permanentemente Cys reducidas y en este tipo de ensayos se utiliza para inhibir deubiquitininas. Tras recolectar las células, se cuantificó la proteína y cantidades iguales de proteína de cada muestra se centrifugaron y resuspendieron en 90 µl de tampón de levantamiento con NEM. Para eliminar cualquier tipo de interacción proteína-proteína, se añadieron 10 µl de SDS al 10% y se incubó durante 10 min a 95°C. Entonces, se añadieron secuencialmente 34 µl de tampón de levantamiento con NEM y Triton™ X-100 al 4% y 1 ml de tampón de levantamiento con NEM y Triton™ X-100 al 1%. Tras 30 min a 4°C en agitación rotatoria, se realizó el preaclaramiento con PGA y las muestras se incubaron con anti-GlyT2 toda la noche en las mismas condiciones que para la coimmunoprecipitación anteriormente descrita (**Tabla 11**). Al día siguiente, cada muestra se incubó durante 90 minutos con las partículas de PGA. Finalmente, después de 3 lavados de 5 min con tampón de levantamiento con NEM y Triton™ X-100 al 1%, la fracción de proteínas inmunoprecipitadas se eluyó añadiendo tampón de carga y calentando a 75°C durante 15 min.

Tabla 12. Compuestos para inhibir la degradación de proteínas

Compuesto	Concentración utilizada	Vehículo	Casa comercial
Leupeptina (inhibidor del lisosoma)	100 μ M	DMSO	Sigma-Aldrich
MG-132 (inhibidor del proteasoma)	10 μ M	DMSO	Hölzel Biotech

12. Inmunofluorescencia

12.1. Inmuncitofluorescencia

Estos ensayos se realizaron en células COS-7, MDCK II o neuronas primarias de corteza cerebral con el objetivo de cuantificar la colocalización de GlyT2 y los mutantes de hiperplexia con marcadores celulares. Las células sembradas en cubreobjetos se lavaron 3 veces con PBS atemperado y se fijaron durante 15 min con metanol a -20°C . Tras esto, las células se volvieron a lavar con PBS y se permeabilizaron durante 10 min con Triton™ X-100 al 0,1% en PBS. Se realizaron de nuevo 3 lavados y, a continuación, las células se incubaron durante 1h con solución de bloqueo (FBS al 2%, albúmina de suero bovino (BSA) al 2% y gelatina bovina al 0,2% en PBS). Pasado este tiempo, las células se lavaron 3 veces y se incubaron durante 90 min a temperatura ambiente con los anticuerpos primarios diluidos en PBS con un 10% de solución de bloqueo (**Tabla 13**). Tras volver a lavar, se realizó la incubación con los anticuerpos secundarios durante 60 min a temperatura ambiente. Una vez realizados los marcajes, las células se lavaron por última vez, se montaron sobre portaobjetos utilizando Mowiol® y se dejaron secar en oscuridad y a temperatura ambiente durante toda la noche. Las muestras se mantuvieron a 4°C hasta su visualización en un microscopio confocal invertido LSM 510 (Zeiss).

Tabla 13. Anticuerpos utilizados en inmuncitofluorescencia

Anticuerpo	Especie	Dilución	Casa comercial
Anti-GlyT2	Conejo	1:200	Generación propia [156]
Anti-GlyT2	Rata	1:200	Generación propia [129]
E-Cadherina	Rata	1:200	Cedido por Amparo Cano (Universidad Autónoma de Madrid e Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols") (clon ECCD-2)
Anti-CNX	Conejo	1:200	StressMarq Biosciences (SPC-108)

12.2. Inmunohistofluorescencia

El efecto sobre la expresión de GlyT2 al antagonizar al receptor Smo en embriones de pez cebra se determinó por inmunohistofluorescencia. Tras el tratamiento farmacológico, los embriones de 48 hpf decorionados manualmente se fijaron durante la noche a 4°C en paraformaldehído (PFA) al 4%, se sumergieron en sacarosa al 30% durante 2-4h y se embebieron en medio de inclusión de criostato Tissue Tek® O.C.T.™ (Sakura). Después de congelar, se cortaron secciones transversales de la médula espinal de 10 µm en un criostato a -20°C. Luego, las secciones se lavaron 3 veces con PBS que contenía Tween®-20 al 1%, se bloquearon durante 2h a 4°C con BSA al 3% y se incubaron durante la noche a 4°C con anticuerpo de conejo anti-GlyT2 (1: 200) en solución de bloqueo. Al día siguiente, las secciones se lavaron 6 veces con PBS que contenía Tween®-20 al 1%, se volvieron a bloquear y se incubaron durante la noche a 4°C con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (1:2000) (Merck) y anti-conejo Alexa Fluor™ 488 (1:500) (Thermo Fisher Scientific) en solución de bloqueo. Finalmente, las secciones se lavaron 4 veces con PBS que contenía Tween®-20 al 1%, se montaron usando ProLong™ Gold Antifade Mountant (Thermo Fisher Scientific) y se almacenaron a 4°C antes de la obtención de imágenes por microscopía confocal en un microscopio A1R + (Nikon).

12.3. Cuantificación de inmunofluorescencia

La cuantificación de las inmunofluorescencias se realizó con el programa Fiji (National Institutes of Health). El plugin JACoP sirvió para obtener los coeficientes de solapamiento de Manders M1 y M2 [157].

13. Representación de datos y análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos y su representación gráfica se llevó a cabo con el programa GraphPad Prism® (GraphPad Software). Los datos se representan como diagramas de cajas y bigotes en los que se muestra la media (+), la mediana (línea), los percentiles 25 y 75 (caja) y los valores mínimo y máximo (bigotes).

Resultados

Bloque I

1. Estudio de una posible modulación funcional de GlyT2 a través de la ruta de señalización de Hh

1.1. El tratamiento con purmorfamina reduce la expresión y la función de GlyT2 de un modo dependiente del tiempo y de manera específica

Para estudiar si la ruta de señalización de Hh podía modular a GlyT2, se probó el efecto de purmorfamina en cultivos primarios de tallo cerebral y médula espinal de rata, un sistema donde el transportador se expresa en grandes cantidades. La purmorfamina es un derivado de purinas que actúa como agonista del receptor Smo, es decir, es un ligando de este receptor con capacidad para activarlo [158-160], lo que es necesario para desencadenar la ruta de señalización de Hh y la consecuente activación de los factores de transcripción Gli [59].

Como se muestra en la **Figura 12A**, el tratamiento con purmorfamina 10 μM durante 2, 8, 16 y 24h produjo una reducción dependiente del tiempo de la actividad de GlyT2 medida mediante ensayos de transporte de [^3H]-Gly, llegándose tras 16 y 24h de tratamiento a actividades remanentes del $50,8 \pm 4,2\%$ ($n = 11$, **** $p < 0,0001$) y del $49,2 \pm 4,4\%$ ($n = 6$, **** $p < 0,0001$) con respecto al tratamiento con el vehículo. De forma paralela, la expresión total de la proteína también decayó de un modo dependiente del tiempo (**Fig. 12B y 12C**), reduciéndose un 60% tras 16h ($41,0 \pm 7,1$ respecto al tratamiento con el vehículo, $n = 9$, **** $p < 0,0001$) y un 65% a las 24h ($33,0 \pm 10,43$ respecto al tratamiento con el vehículo, $n = 5$, *** $p = 0,0003$). Además, el análisis por qPCR de los niveles de mRNA de GlyT2 tras tratamientos de 2, 5, 8 y 16h también mostró una tendencia a la baja, alcanzándose una reducción estadísticamente significativa tras 16h (**Fig. 12D**). Concretamente, los niveles de mRNA se redujeron un 30% ($71,5 \pm 6,2\%$ respecto al tratamiento con el vehículo, $n = 3$, * $p = 0,0414$), lo que sugiere que purmorfamina regula GlyT2 a nivel transcripcional o postranscripcional. Sin embargo, dado que la caída de los niveles de mRNA tras 16h de tratamiento es mucho menor que la disminución de la expresión proteica y de la actividad, es posible que este no sea el mecanismo de regulación principal a través del cual la ruta de Hh modula la función de GlyT2.

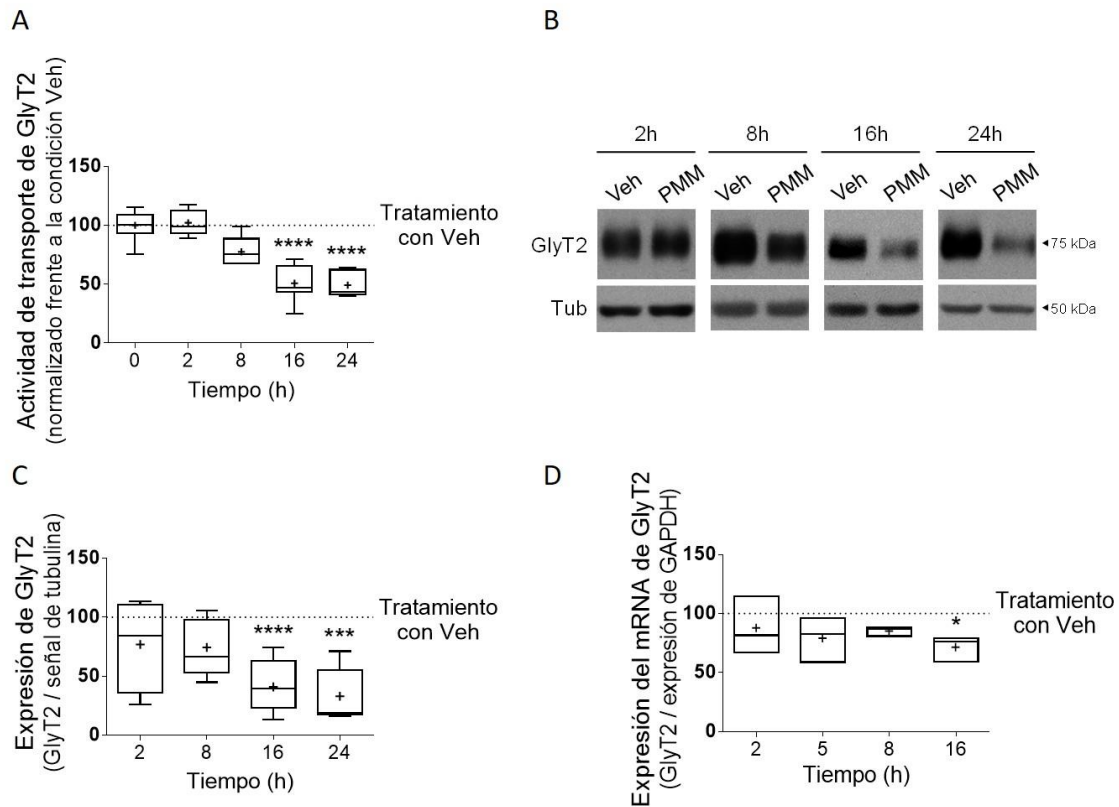


Figura 12. El tratamiento con purmorphamina reduce la función y expresión proteica de GlyT2 de una manera dependiente del tiempo. **A)** Los cultivos primarios de neuronas de médula espinal y tallo cerebral fueron tratados con purmorphamina (PMM) 10 μ M durante los tiempos indicados y posteriormente sometidos a ensayos de transporte de [3 H]-Gly. El transporte de Gly viene expresado como porcentaje del obtenido para el tratamiento con vehículo (Veh). *****p* (PMM 16h) < 0,0001; *****p* (PMM 24h) < 0,0001; usando la prueba de comparación múltiple de Dunn. *n* (Veh y PMM 2h) = 5, *n* = (Veh y PMM 8h) = 5, *n* (Veh y PMM 16h) = 11, *n* (Veh y PMM 24h) = 6. **B)** Los cultivos primarios de neuronas de médula espinal y tallo cerebral fueron tratados como en (A) y posteriormente lisados para determinar los niveles de GlyT2 mediante WB. **C)** Cuantificación de la expresión proteica de GlyT2. Tubulina (Tub) fue utilizada como control de carga. El nivel de GlyT2 viene expresado como porcentaje del obtenido para el tratamiento con Veh. *****p* (PMM 16h) < 0,0001; ****p* (PMM 24h) = 0,0003; usando la prueba de comparación múltiple de Dunn. *n* (Veh y PMM 2h) = 4, *n* = (Veh y PMM 8h) = 7, *n* (Veh y PMM 16h) = 9, *n* (Veh y PMM 24h) = 5. **D)** Los cultivos primarios de neuronas de médula espinal y tallo cerebral fueron tratados como en (A) y utilizados para determinar la expresión relativa del mRNA de GlyT2. GAPDH fue utilizado como gen de referencia. El nivel de GlyT2 viene expresado como porcentaje del obtenido para el tratamiento con Veh. **p* = 0,0414; usando la prueba de comparación múltiple de Dunn. *n* = 3.

Para investigar si la reducción de GlyT2 promovida por purmorphamina era específica, se analizaron los niveles de distintas proteínas neuronales relacionadas con GlyT2 tras 8 y 24h de tratamiento con el agonista (**Fig. 13**). La α 3NKA, CRMP5 y STX1A interaccionan con GlyT2, tal y como se ha descrito previamente [127, 130, 161]. Por otro lado, GlyT1 es miembro de la familia SLC6 y comparte una identidad de secuencia de aminoácidos del 50% con GlyT2. Como se puede observar en la **Figura 13**, la expresión de ninguna de estas proteínas se vio afectada ni siquiera tras 24h de tratamiento con purmorphamina, condición que sin embargo causó una caída drástica

de la expresión de GlyT2, lo que sugiere que la regulación de GlyT2 por parte del agonista de la vía Hh es selectiva.

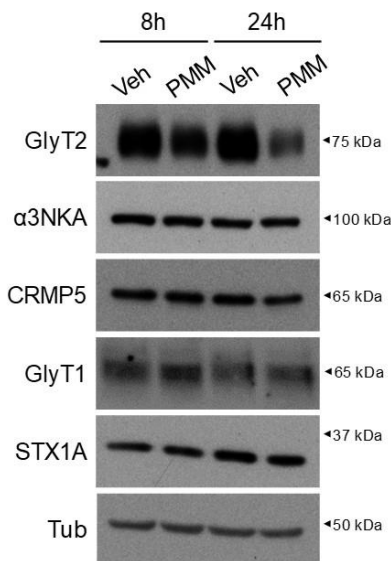


Figura 13. El tratamiento con purmorphamina modula los niveles de GlyT2 de manera específica. Los cultivos primarios de neuronas de médula espinal y tallo cerebral fueron tratados con purmorphamina (PMM) durante 8 y 24h, y posteriormente lisados para determinar los niveles de GlyT2, α 3NKA, CRMP5, GlyT1, STX1A y tubulina (Tub) mediante WB.

1.2. La modulación de GlyT2 por purmorphamina depende de su concentración y es revertida por ciclopamina

A continuación, se realizaron tratamientos de 16h con distintas concentraciones de purmorphamina con el objetivo de establecer la concentración óptima para la inhibición de GlyT2 en las neuronas de tallo cerebral y médula espinal (**Fig. 14**). Los resultados muestran que purmorphamina inhibió la actividad de GlyT2 de un modo dependiente de concentración (**Fig. 14A**), obteniéndose la mayor reducción a 10 μ M (actividad remanente del $53,9 \pm 1,9\%$ respecto al tratamiento con el vehículo, $n = 10$, **** $p < 0,0001$). De una forma similar, la expresión total de GlyT2 también se redujo con el aumento de la concentración de purmorphamina (**Fig. 14B y C**), haciéndose estadísticamente significativa al tratar con purmorphamina 5 μ M y 10 μ M (**Fig. 14C**, $n = 4$, * p (Veh vs PMM 5 μ M) = 0,0098; ** p (Veh vs PMM 10 μ M) = 0,0098). Además, también se realizaron estudios de dosis-respuesta con ciclopamina, un alcaloide esteroideo vegetal que inhibe de forma específica a Smo y que compite con purmorphamina por su unión al mismo dominio TM del receptor [162, 163]. El tratamiento en solitario con ciclopamina no produjo diferencias significativas en los niveles de GlyT2 a ninguna de las concentraciones ensayadas (**Figura 14B y C**, $n = 4$), lo que sugiere que, en los cultivos de neuronas utilizados, la ruta de Hh no está activa o no regula al transportador de manera basal. Sin embargo, la ciclopamina a concentraciones de 1 y 2 μ M previno la reducción de GlyT2 promovida por purmorphamina a 5 y 10 μ M, respectivamente (**Fig. 14C**, $n = 4$, ^{ns} p (Veh vs PMM 5 μ M + CYC 1 μ M) > 0,9999; ^{ns} p (Veh

vs PMM 10 μM + CYC 2 μM) > 0.9999); lo que indicaría que esta modulación se produce como consecuencia de una activación específica de Smo.

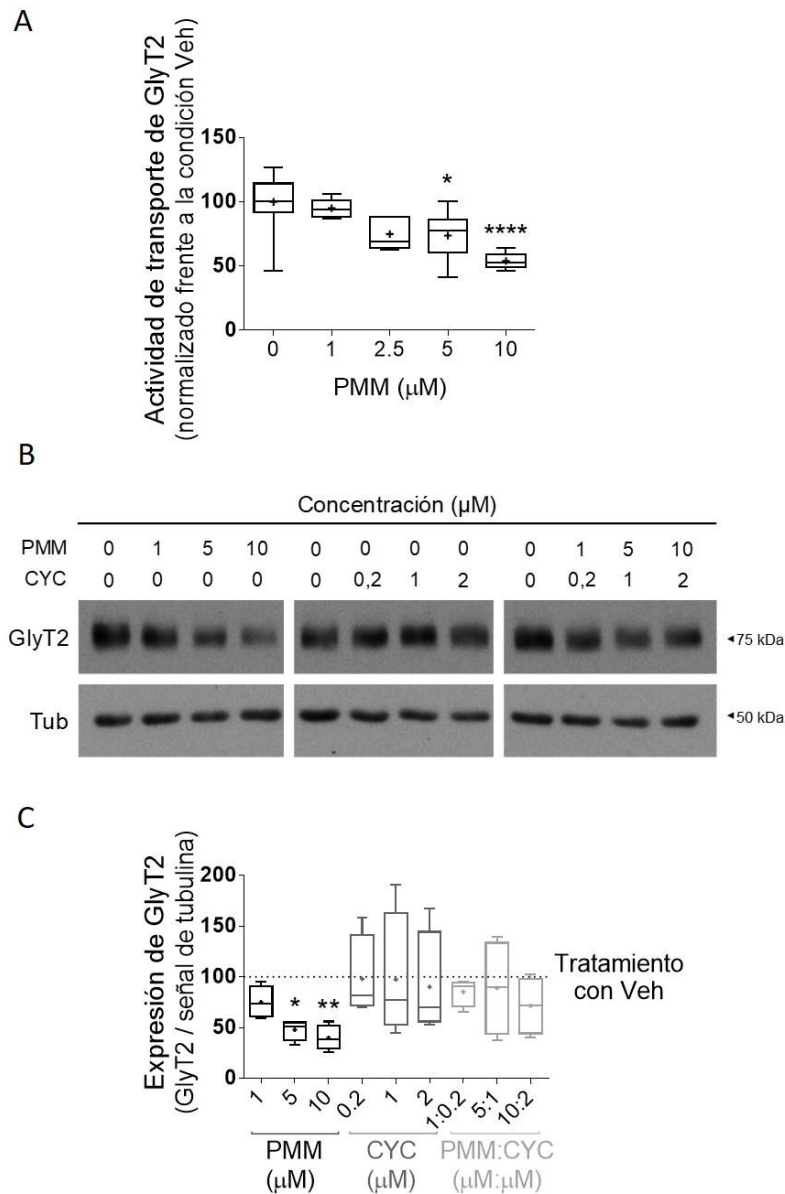


Figura 14. La reducción de la actividad y expresión de GlyT2 promovida por purmorfamina se produce de manera dependiente de concentración y es revertida por ciclopamina. A) Los cultivos primarios de neuronas de médula espinal y tallo cerebral fueron tratados durante 16h con purmorfamina (PMM) a las concentraciones indicadas y posteriormente sometidos a ensayos de transporte de $[^3\text{H}]$ -Gly. El transporte de Gly viene expresado como porcentaje del obtenido para el tratamiento con vehículo (Veh). * p (PMM 5 μM) = 0,0242; **** p (PMM 10 μM) < 0,0001; usando la prueba de comparación múltiple de Dunn. n (Veh) = 13, n (PMM 1 μM) = 7, n (PMM 2,5 μM) = 7, n (PMM 5 μM) = 10, n (PMM 10 μM) = 10. **B)** Los cultivos primarios de neuronas de médula espinal y tallo cerebral fueron tratados durante 16h con PMM y/o ciclopamina (CYC) a las concentraciones indicadas y posteriormente lisados para determinar los niveles de GlyT2 mediante WB. **C)** Cuantificación de la expresión proteica de GlyT2. Tubulina (Tub) fue utilizada como control de carga. El nivel de GlyT2 viene expresado como porcentaje del obtenido para el tratamiento con Veh en cada caso. * p (Veh vs PMM 5 μM) = 0,0248; ** p (Veh vs PMM 10 μM) = 0,0098; ^{ns}p (Veh vs PMM 1 μM + CYC 0,2 μM) > 0.9999, ^{ns}p (Veh vs PMM 5 μM + CYC 1 μM) > 0.9999; ^{ns}p (Veh vs PMM 10 μM + CYC 2 μM) > 0.9999; usando la prueba de comparación múltiple de Dunn. n = 4.

1.3. El tratamiento con purmorfamina promueve la degradación de GlyT2 aumentando su ubiquitinación

Dado que tras 16h de tratamiento con purmorfamina se observa una caída de GlyT2 del 60% a nivel de proteína, pero solo del 30% a nivel de mRNA, y puesto que está descrito que la ubiquitinación de GlyT2 es esencial en su regulación [131, 132], se decidió investigar si el descenso en los niveles proteicos de GlyT2 inducido por purmorfamina se debía a la ubiquitinación y consecuente degradación del transportador.

Para ello, los cultivos de neuronas de tallo cerebral y médula espinal se trataron durante 16h con purmorfamina 10 μ M o su vehículo, se solubilizaron en condiciones estrictas para eliminar cualquier tipo de interacción proteína-proteína y se inmunoprecipitó GlyT2. Los niveles de ubiquitinación del transportador se determinaron mediante WB, utilizando un anticuerpo frente a ubiquitina cuya señal se normalizó frente a la señal de GlyT2 inmunoprecipitado (**Fig. 15A**). Con respecto al tratamiento con el vehículo, el tratamiento con purmorfamina aumentó los niveles de ubiquitinación de GlyT2 a un $246,6 \pm 29,3\%$ (**Fig. 15B**, $n = 3$, $**p = 0,0074$), confirmando que el agonista de la ruta de Hh induce la ubiquitinación del transportador. Como era esperable, en estos experimentos también se observó una reducción de los niveles del transportador (**Fig. 15A**) similar a la mostrada en las **Figuras 12B, 12C, 14B y 14C**. En estos ensayos de ubiquitinación, no se detectó una única banda que correspondiese con una forma monoubiquitinada de GlyT2, sino que se encontró un marcaje de ubiquitina extendido a lo largo del carril característico de las formas poliubiquitinadas [164, 165]. Mientras la monoubiquitinación normalmente regula la localización y actividad de distintas proteínas celulares [136], la poliubiquitinación es un tipo de modificación que suele destinar a las proteínas a degradación [133]. Para corroborar que la ubiquitinación de GlyT2 era realmente el mecanismo que subyacía a la reducción promovida por purmorfamina, se utilizó PYR 41, un inhibidor específico y permeable de la enzima activadora de ubiquitina E1 [166]. Dado que la E1 es la enzima que cataliza el primer paso del proceso de ubiquitinación [134], su inhibición bloquea el proceso completo y las proteínas no pueden ser modificadas por ubiquitina. Como se muestra en las **Figuras 15C y 15D**, cuando las neuronas fueron tratadas durante 16h con purmorfamina 10 μ M en presencia de PYR 41 5 μ M, la reducción de GlyT2 observada en ausencia de PYR 41 ($n = 4$, $*p = 0,0164$) se revirtió completamente ($n = 4$, $^{ns}p > 0,9999$). Por tanto, estos resultados indican que purmorfamina promueve la degradación de GlyT2 y que la enzima E1 y, en consecuencia, el proceso de ubiquitinación están implicados en este proceso.

Con todo ello, los resultados obtenidos en neuronas de médula espinal y tallo cerebral revelan que la ruta de Hh modula de forma negativa la expresión y función de GlyT2, siendo este un proceso que depende principalmente de la degradación del transportador a través de su ubiquitinación.

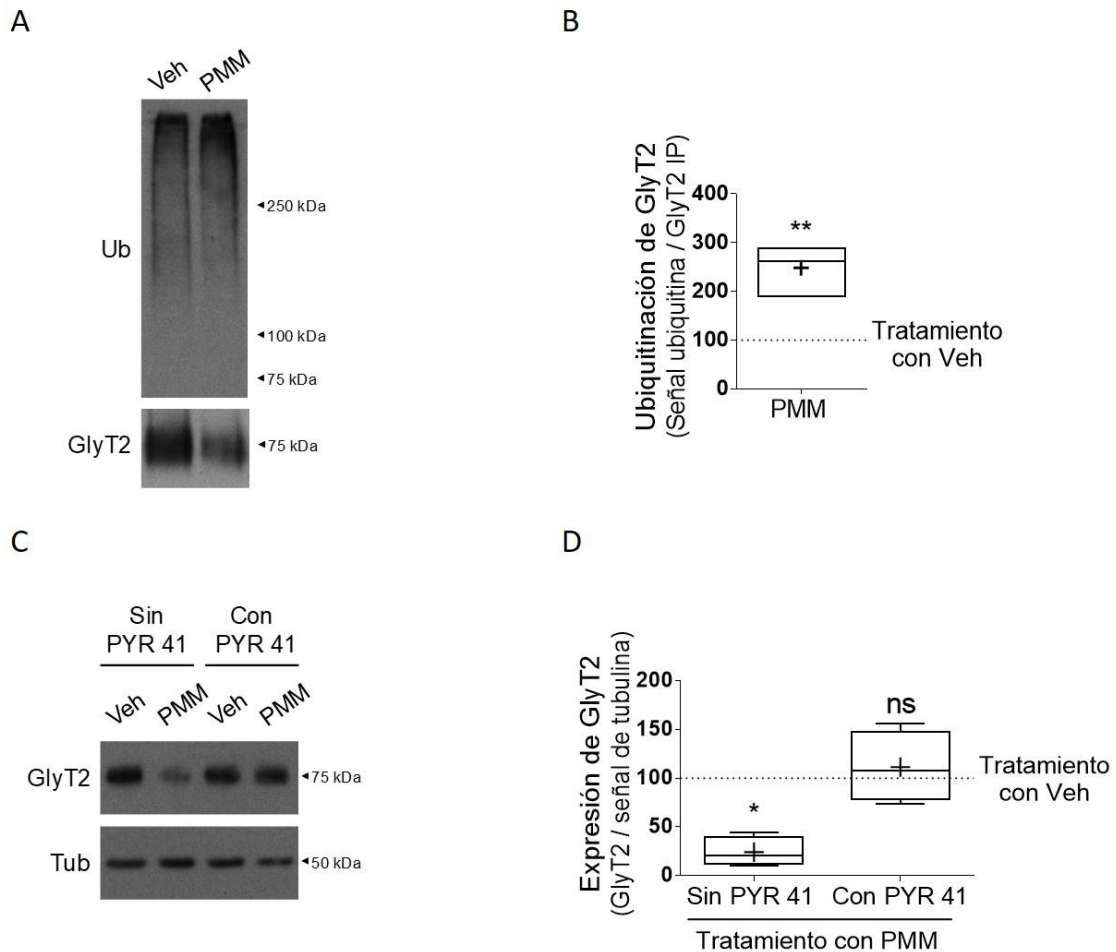


Figura 15. La ubiquitinación es el mecanismo que subyace a la degradación de GlyT2 promovida por purmorfamina. **A)** Los cultivos primarios de neuronas de médula espinal y tallo cerebral fueron tratados con purmorfamina (PMM) 10 μ M durante 16h, lisados y sometidos a inmunoprecipitación contra GlyT2. El grado de ubiquitinación del transportador fue determinado mediante WB utilizando un anticuerpo frente a ubiquitina (Ub) cuya intensidad de señal fue normalizada frente a GlyT2. **B)** Cuantificación del grado de ubiquitinación de GlyT2. El nivel de ubiquitinación de GlyT2 viene expresado como porcentaje del determinado para el tratamiento con vehículo (Veh). $**p = 0,0074$; usando la prueba t de Student despareada. $n = 3$. **C)** Los cultivos primarios de neuronas de médula espinal y tallo cerebral fueron tratados con PMM como en (A) en presencia o ausencia de PYR 41 5 μ M y posteriormente lisados para determinar los niveles de GlyT2 mediante WB. **D)** Cuantificación de la expresión proteica de GlyT2. Tubulina (Tub) fue utilizada como control de carga. El nivel de GlyT2 viene expresado como porcentaje del obtenido para el tratamiento con Veh en cada caso. $*p$ (Veh vs PMM) = 0,0164; ^{ns}p (Veh vs PMM + PYR41) > 0,9999; usando la prueba de comparación múltiple de Dunn. $n = 4$.

1.4. El tratamiento con ciclopamina aumenta los niveles de GlyT2 en embriones de pez cebra

El siguiente paso fue determinar si la modulación de GlyT2 que se observó *in vitro* al actuar sobre Smo también se producía *in vivo*. Para ello, se realizaron tratamientos en embriones de pez cebra (*Danio rerio*), un modelo muy útil para el estudio del SNC a nivel conductual, a nivel de desarrollo o para desentrañar mecanismos patológicos [167-169]. La ventana de tiempo en la que se actuó fue elegida valorando dos eventos conocidos. El primero de ellos es que la expresión del mRNA de GlyT2 en el SNC de pez cebra aparece alrededor de las 20 hpf [53, 54], y el segundo es que su barrera hematoencefálica se forma completamente alrededor de las 72 hpf [170, 171]. Dado que cualquier tratamiento debía realizarse entre esos dos tiempos para que se pudiese actuar sobre GlyT2 y asegurar que los compuestos utilizados llegasen a sus dianas neuronales, se decidió realizar tratamientos de 24h entre las 24 y las 48 hpf. En esta etapa del desarrollo, la ruta de señalización de Shh está plenamente activa en pez cebra y su inhibición causa defectos moleculares y de desarrollo en el eje dorsoventral del tubo neural [172-177]. Por tanto, con respecto al tratamiento farmacológico que se decidió usar en pez cebra, se eligió la ciclopamina, el antagonista de Smo previamente utilizado, por ser la aproximación más fiable para modular la ruta Hh en este contexto.

Tras las 24h de tratamiento con ciclopamina 100 μ M, se analizaron los niveles de GlyT2 mediante WB en los embriones de pez cebra de 48 hpf, observándose un aumento significativo con respecto a los embriones tratados con vehículo (**Fig. 16A**). Tal como se indica en la **Figura 16B**, la expresión de GlyT2 en los embriones tratados con ciclopamina fue un $271,5 \pm 88,4\%$ de la expresión observada en los embriones control ($n = 8$, 4 peces por condición en cada experimento; $**p = 0,0014$), lo que sugiere que, en esta etapa del desarrollo embrionario del pez cebra, los niveles de GlyT2 podrían ser reducidos como resultado de una activación fisiológica de la vía de Hh. A pesar del gran aumento de proteína, el análisis por qPCR de los niveles del mRNA de GlyT2 tras el tratamiento con ciclopamina mostró que, aunque había una ligera tendencia al alza, este incremento no fue estadísticamente significativo y no podía dar cuenta del aumento observado a nivel de proteína (**Fig. 16C**, $n = 4$, 10 peces por condición en cada experimento; $^{ns}p = 0,3429$). Finalmente, para corroborar los resultados, se analizaron los niveles de GlyT2 mediante inmunohistofluorescencia de secciones transversales de la médula espinal (**Fig. 16D**). La expresión de GlyT2 se determinó cuantificando la intensidad del marcaje y relacionándola con el área ocupada por la médula. Como era de esperar, en los embriones tratados con ciclopamina entre las 24 y las 48 hpf se observó un aumento estadísticamente

significativo de la expresión de GlyT2, cuantificado en un $139,6 \pm 8,4\%$ con respecto a la observada en los embriones tratados con vehículo (**Fig. 16E**, $n = 30$, **** $p < 0,0001$).

Como conclusión, los resultados obtenidos en los embriones de pez cebra corroboran *in vivo* lo observado en neuronas primarias y aportan indicios de una modulación de GlyT2 por la ruta de Hh durante el desarrollo.

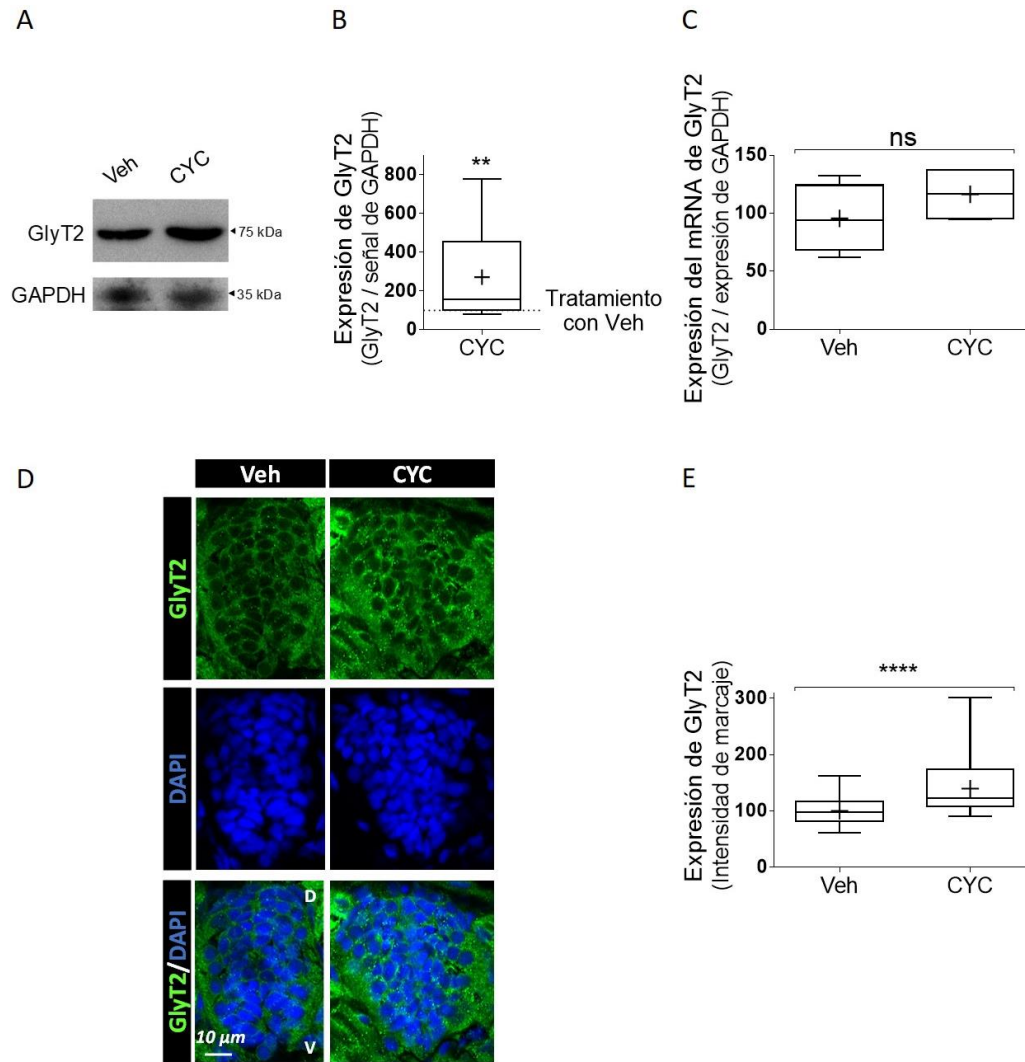


Figura 16. El tratamiento de embriones de pez cebra con ciclopamina durante 24h aumenta la expresión proteica de GlyT2. **A)** Los embriones de pez cebra a 24 hpf fueron tratados con ciclopamina (CYC) 100 μ M durante 24h. A las 48 hpf los embriones fueron lisados para determinar los niveles de GlyT2 mediante WB. **B)** Cuantificación de la expresión proteica de GlyT2. GAPDH fue utilizada como control de carga. El nivel de GlyT2 viene expresado como porcentaje del obtenido para el tratamiento con vehículo (Veh). ** $p = 0,0014$; usando la prueba de Kolmogorov-Smirnov. $n = 8$, 4 peces por condición en cada experimento. **C)** Los embriones de pez cebra a 24 hpf fueron tratados como en (A) y utilizados para determinar la expresión relativa del mRNA de GlyT2. GAPDH fue utilizado como gen de referencia. El nivel de GlyT2 viene expresado como porcentaje del obtenido para el tratamiento con Veh. $^{ns}p = 0,3429$; usando la prueba U de Mann-Whitney. $n = 4$, 10 peces por condición en cada experimento. **D)** Los embriones de pez cebra a 24 hpf fueron tratados como en (A) y cortados en secciones transversales de 10 μ m. Las secciones que incluían médula espinal fueron sometidas a inmunohistoquímica utilizando un anticuerpo frente a GlyT2. Los núcleos celulares se marcaron con DAPI. **E)** Intensidades de marcaje de GlyT2. El nivel de GlyT2 viene expresado como porcentaje del obtenido para el tratamiento con Veh. **** $p < 0,0001$; usando la prueba U de Mann-Whitney. n (Veh) = 29, n (CYC) = 30.

2. Análisis del papel de las E3 ubiquitín ligasas LNX1 y LNX2 en la regulación de GlyT2

2.1. Las isoformas p80 y p70 de LNX1 interaccionan con GlyT2

Para cumplir con el segundo de los objetivos propuestos en esta Tesis Doctoral, en primer lugar se quiso demostrar si, como se había predicho anteriormente en un análisis proteómico [139], la E3 ubiquitín ligasa LNX1 podía tener como diana a GlyT2. Para ello, se exploró la posibilidad de una relación física y funcional entre LNX1 y GlyT2.

En un primer grupo de experimentos, se determinó si LNX1 y GlyT2 interaccionaban en un sistema heterólogo. Para ello, GlyT2 se expresó en células COS-7 junto con la isoforma p80 de LNX1 (LNX1-p80) unida al epítipo FLAG y se realizaron ensayos de coinmunoprecipitación 48h después de la incubación con el reactivo de transfección. Dicha isoforma es la variante más larga y contiene el dominio RING que le otorga la actividad E3 ubiquitín ligasa [141]. Como resultado de los ensayos, LNX1-p80 unido a FLAG coinmunoprecipitó con GlyT2 (**Fig. 17A**, carril 2) y, recíprocamente, GlyT2 coinmunoprecipitó con LNX1-p80-FLAG (**Fig. 17A**, carril 3), quedando así demostrada la interacción del transportador con la isoforma larga de LNX1. Por otro lado, también se estudió si LNX1-p70, una isoforma más corta y sin actividad E3 ligasa [141] (**Fig. 17**), interaccionaba con GlyT2, dado que esta isoforma también contiene el dominio PDZ2 que se ha propuesto como responsable de la interacción con un péptido que presenta los últimos 8 aminoácidos del transportador [139]. Mediante la misma aproximación, se observó que LNX1-p70 unido a Myc coinmunoprecipitaba con GlyT2 (**Fig. 17B**, carril 2), así como GlyT2 coinmunoprecipitaba con LNX1-p70-Myc (**Fig. 17B**, carril 3).

Estos resultados indican que la interacción previamente descrita entre el dominio PDZ2 de LNX1 y el péptido con los últimos 8 aminoácidos de GlyT2 [139] también se produce entre GlyT2 y LNX1 en un ambiente celular.

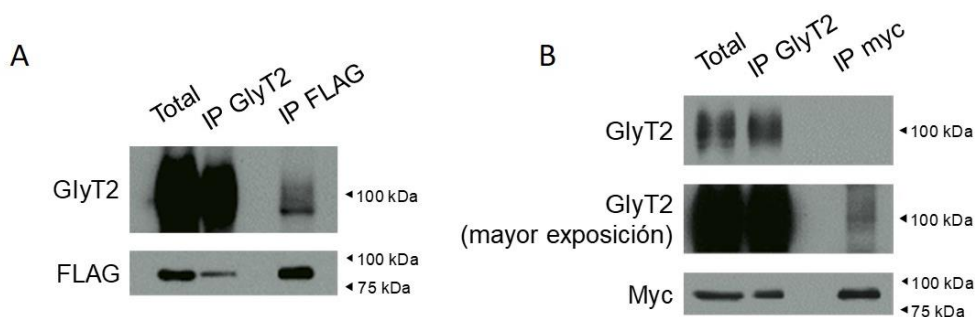


Figura 17. GlyT2 interacciona con las isoformas p80 y p70 de LNX1. A) Las células COS-7 transfectadas con GlyT2 y LNX1-p80-FLAG fueron lisadas y sometidas a inmunoprecipitación de GlyT2 y FLAG. **B)** Las células COS-7 transfectadas con GlyT2 y LNX1-p70-Myc fueron lisadas y sometidas a inmunoprecipitación de GlyT2 y Myc.

2.2. La actividad ubiquitín ligasa de LNX1 regula la expresión y función de GlyT2

A continuación, para demostrar si la interacción observada entre LNX1-p80 y GlyT2 era capaz de regular de alguna manera al transportador, ambas proteínas se coexpresaron en células COS-7 junto con ubiquitina unida al epítipo HA. 48h después de la transfección, se determinó el grado de ubiquitinación de GlyT2 previo tratamiento de 4h con leupeptina. Durante su reciclaje, GlyT2 es ubiquitinado en la membrana plasmática y enviado al lisosoma para su degradación [78]. La leupeptina es un inhibidor de cistein, serín y treonin peptidasas que se usa comúnmente como bloqueante de la degradación lisosomal [178, 179]. El tratamiento con leupeptina permite la acumulación de proteínas ubiquitinadas que, debido a que se dirigen a degradación lisosomal, en condiciones normales tendrían un tiempo de vida media ($t_{1/2}$) bajo, siendo difíciles de detectar por WB. Por ello, el tratamiento con leupeptina mejora su detección y es un buen abordaje para medir el grado de ubiquitinación de proteínas que, específicamente, se dirigen al lisosoma.

Cuando GlyT2 se coexpresó junto con LNX1-p80-FLAG, se detectó un incremento significativo de la señal de ubiquitina-HA asociada al transportador (**Fig. 18A**, lado izquierdo), cuantificada en un $204,3 \pm 33,2\%$ de la condición control (**Fig. 18B**, $n = 13$, $*p = 0,0111$). Además, en experimentos similares se observó una reducción de los niveles de GlyT2 de alrededor del 60% ($37,2 \pm 5,9\%$ de la condición control, **Fig. 19A**, lado izquierdo y **Fig. 19B**; $n = 10$; $***p = 0,0001$) y una reducción de en torno al 40% de su actividad medida por transporte de [3 H]-Gly ($58,7 \pm 2,8\%$ de la condición control, **Fig. 19C**, $n = 27$, $****p < 0,0001$). Por otro lado, se quiso determinar si este proceso requería del grupo de 4 Lys del C-t de GlyT2 cuya implicación en su ubiquitinación y expresión ha sido demostrada previamente [132]. De la misma manera que antes, LNX1-p80-FLAG se expresó junto con un mutante de GlyT2 en el que el grupo de Lys del C-t había sido sustituido por argininas (Arg) (GlyT2-4KR) y se determinó el grado de ubiquitinación del transportador tras 48h. En este caso, no se observaron diferencias significativas en el nivel de ubiquitinación de GlyT2-4KR cuando se sobreexpresó LNX1-p80-FLAG (**Fig. 18A**, lado derecho y **Fig. 18B**; $n = 4$; $^{ns}p > 0,9999$), indicando que LNX1-p80 ubiquitina el grupo de Lys del C-t de GlyT2. Además, tampoco se observaron diferencias significativas en la expresión total (**Fig. 19A**, lado derecho y **Fig. 19B**; $n = 6$; $^{ns}p = 0,3653$) ni en la actividad de GlyT2-4KR (**Fig. 19C**, $n = 16$, $^{ns}p > 0,6564$).

Dado que la sobreexpresión de LNX1-p80 promovió una reducción significativa de los niveles y actividad de GlyT2, estos resultados sugieren que la ubiquitinación de GlyT2 por parte de LNX1 regula sus niveles.

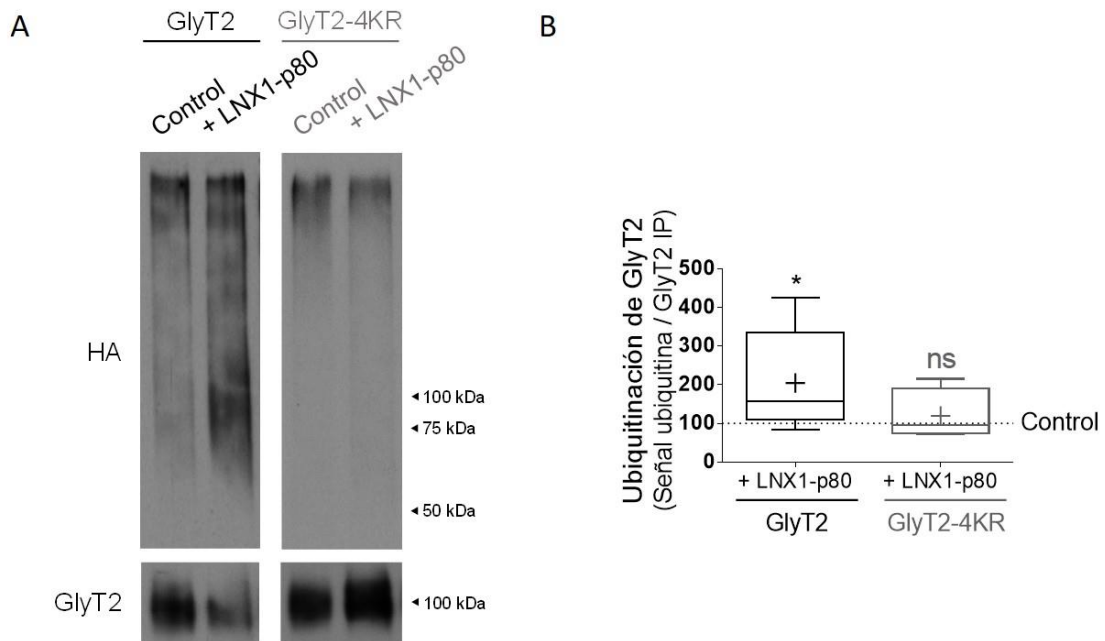


Figura 18. LNX1-p80 aumenta el nivel de ubiquitinación de GlyT2. A) Las células COS-7 transfectadas con GlyT2 o GlyT2-4KR, ubiquitina-HA y con o sin LNX1-p80-FLAG fueron lisadas y sometidas a inmunoprecipitación contra GlyT2. El grado de ubiquitinación del transportador fue determinado mediante WB utilizando un anticuerpo frente a HA cuya intensidad de señal fue normalizada frente a GlyT2. **B)** Cuantificación del grado de ubiquitinación de GlyT2. El nivel de ubiquitinación de GlyT2 viene expresado como porcentaje del obtenido para la condición control. * p (GlyT2 + p80) = 0,0111; ^{ns} p (GlyT2-4KR + p80) > 0,9999; usando la prueba de comparación múltiple de Dunn. n (GlyT2 control) = 13, n (GlyT2 + p80) = 13, n (GlyT2-4KR control) = 4, n (GlyT2-4KR + p80) = 4.

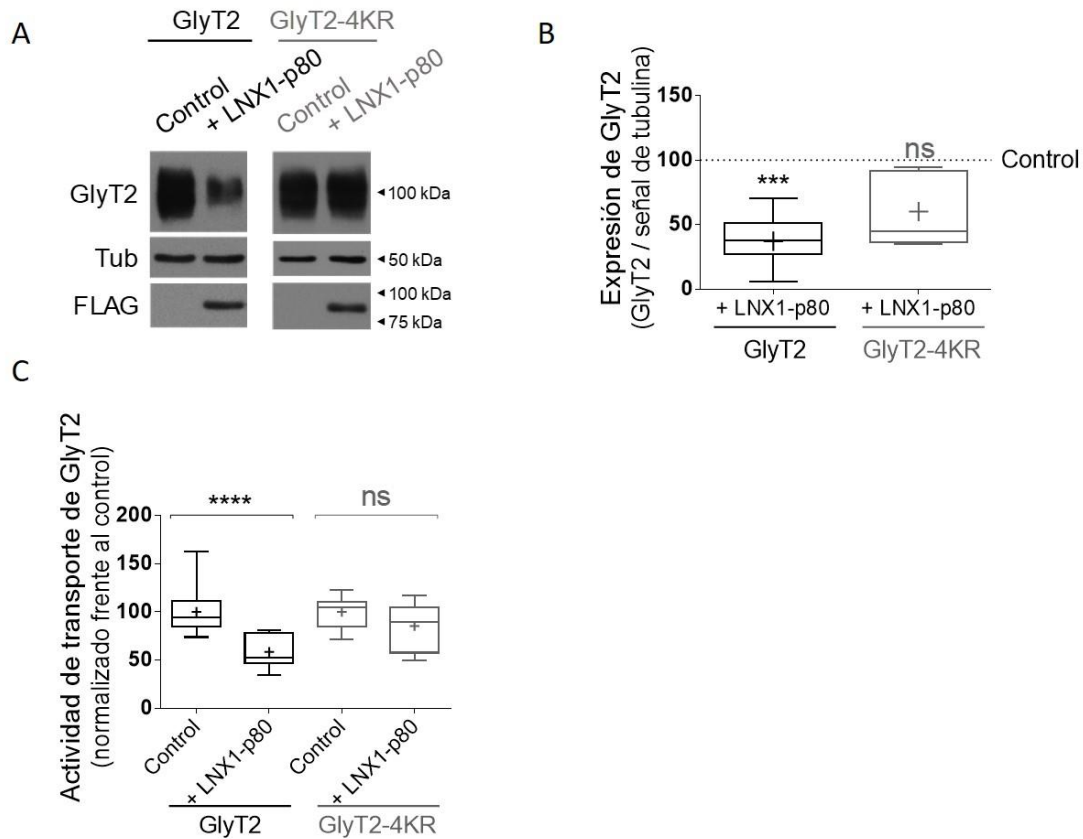


Figura 19. LNX1-p80 reduce la expresión y actividad de transporte de GlyT2. **A)** Las células COS-7 transfectadas con GlyT2 o GlyT2-4KR y con o sin LNX1-p80-FLAG fueron lisadas para determinar los niveles de GlyT2 mediante WB. **B)** Cuantificación de la expresión proteica de GlyT2. Tubulina (Tub) fue utilizada como control de carga. El nivel de GlyT2 viene expresado como porcentaje del obtenido para la condición control. *** p (GlyT2 + p80) = 0,0001; ^{ns} p (GlyT2-4KR + p80) = 0,3653; usando la prueba de comparación múltiple de Dunn. n (GlyT2 control) = 10, n (GlyT2 + p80) = 10, n (GlyT2-4KR) = 6, n (GlyT2-4KR + p80) = 6. **C)** Las células COS-7 transfectadas como en (A) fueron sometidas a ensayos de transporte de [³H]-Gly. El transporte de Gly viene expresado como porcentaje del obtenido para la condición control. **** p (GlyT2 + p80) < 0,0001; ^{ns} p (GlyT2-4KR + p80) > 0,6564; usando la prueba de comparación múltiple de Dunn. n (GlyT2 control) = 43, n (GlyT2 + p80) = 27, n (GlyT2-4KR control) = 16, n (GlyT2-4KR + p80) = 16.

2.3. LNX2 también interacciona con GlyT2 y controla su ubiquitinación y expresión

LNX2 presenta homología estructural con respecto a la isoforma larga de LNX1, LNX1-p80 [142]. Dado que muchas proteínas que interaccionan con el dominio PDZ2 de LNX1 y LNX2 son compartidas entre ambas E3 ubiquitin ligasas [142, 180], existía la posibilidad de que LNX2 regulase la actividad de GlyT2. Para estudiarlo, como se realizó en el apartado anterior, se coexpresaron LNX2 unido a Myc y GlyT2 en células COS-7. 48h después de la transfección, se confirmó la interacción de las dos proteínas mediante ensayos de coimmunoprecipitación, observándose que la inmunoprecipitación de GlyT2 coimmunoprecipitaba LNX2-Myc (**Fig. 20**, carril 2) y que la inmunoprecipitación de LNX2-Myc traía consigo a GlyT2 (**Fig. 20**, carril 3).

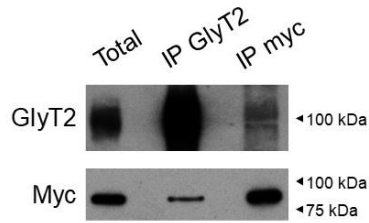


Figura 20. GlyT2 interacciona con LNX2. Las células COS-7 transfectadas con GlyT2 y LNX2-Myc fueron lisadas y sometidas a inmunoprecipitación de GlyT2 y Myc.

Posteriormente, en ensayos de ubiquitinación similares a los anteriores, se demostró que la sobreexpresión de LNX2 producía un incremento de la ubiquitinación de GlyT2 tras 24h (**Fig. 21A**). Concretamente, el marcaje de ubiquitina cuantificado fue un $172,4 \pm 19,9\%$ de la condición control (**Fig. 21B**, $n = 6$; $**p = 0,022$). De una manera similar a lo que ocurría cuando se sobreexpresaba LNX1-p80, se observó la reducción de la expresión total de GlyT2 silvestre a un $16,5 \pm 3,3\%$ tras 48h de sobreexpresión de LNX2-Myc (**Fig. 22A**, lado izquierdo y **Fig. 22B**; $n = 8$, $****p < 0,0001$). Por otro lado, la sobreexpresión de LNX2 tampoco produjo diferencias significativas en los niveles de GlyT2-4KR (**Fig. 22A**, lado derecho y **Fig. 22B**; $n = 5$; $^{ns}p = 0,1453$). Finalmente, se confirmó que LNX2 también influía sobre la actividad de transporte de GlyT2, determinándose, tras 48h de sobreexpresión de LNX2-Myc, la disminución de la actividad del transportador hasta llegar a un $65,8 \pm 3,6\%$ de la mostrada por el transportador en condiciones control (**Fig. 22C**, $n = 27$, $****p < 0,0001$).

Por tanto, estos resultados confirman que la E3 ubiquitín ligasa LNX2 interacciona con GlyT2 para modular sus niveles y su función mediante ubiquitinación.

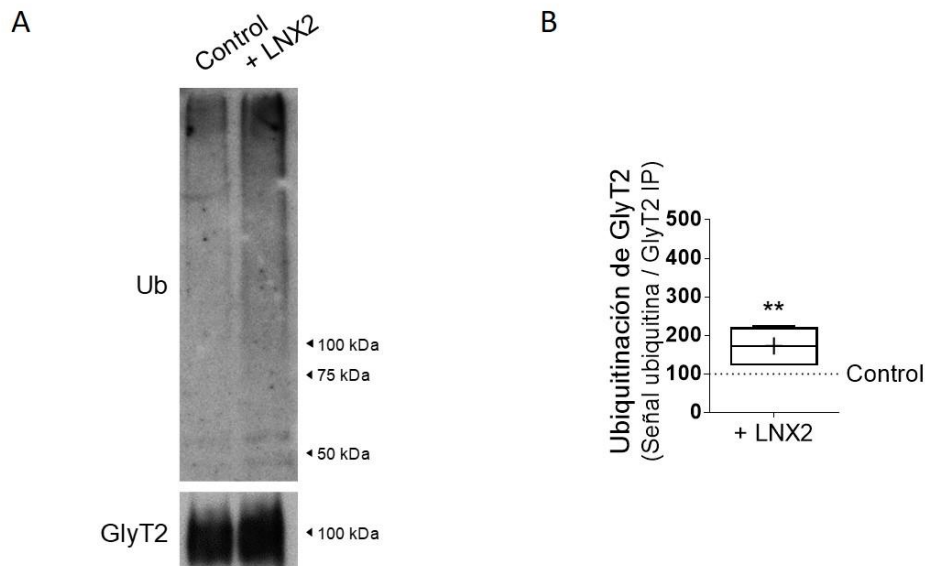


Figura 21. LNX2 aumenta el nivel de ubiquitinación de GlyT2. **A)** Las células COS-7 transfectadas con GlyT2 y con o sin LNX2-Myc fueron lisadas y sometidas a inmunoprecipitación contra GlyT2. El grado de ubiquitinación del transportador fue determinado mediante WB utilizando un anticuerpo frente a ubiquitina (Ub) cuya intensidad de señal fue normalizada frente a GlyT2. **B)** Cuantificación del grado de ubiquitinación de GlyT2. El nivel de ubiquitinación de GlyT2 viene expresado como porcentaje del obtenido para la condición control. $**p = 0,022$; usando la prueba de Kolmogorov-Smirnov. $n = 6$.

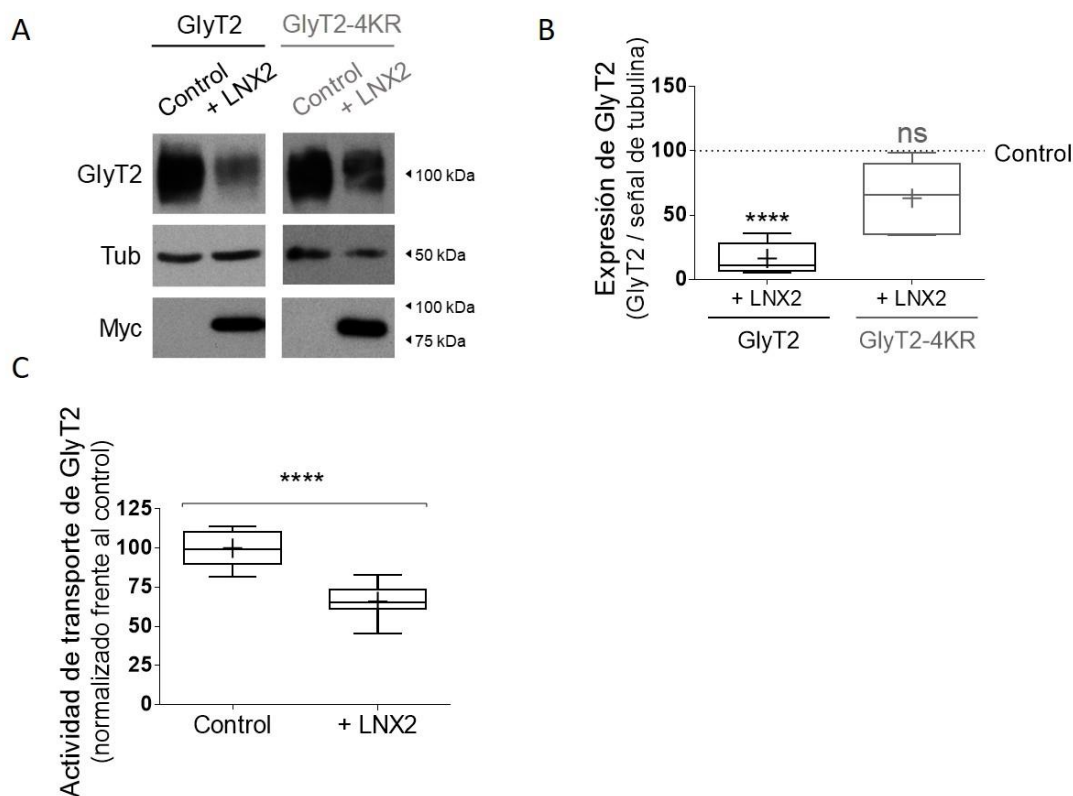


Figura 22. LNX2 reduce la expresión y actividad de transporte de GlyT2. **A)** Las células COS-7 transfectadas con GlyT2 o GlyT2-4KR y con o sin LNX2-Myc fueron lisadas para determinar los niveles de GlyT2 mediante WB. **B)** Cuantificación de la expresión proteica de GlyT2. Tubulina (Tub) fue utilizada como control de carga. El nivel de GlyT2 viene expresado como porcentaje del obtenido para la condición control. **** p (GlyT2 + LNX2) < 0,0001; ^{ns}p (GlyT2-4KR + LNX2) = 0,1453; usando la prueba de comparación múltiple de Dunn. n (GlyT2 control) = 8, n (GlyT2 + LNX2) = 8, n (GlyT2-4KR) = 4, n (GlyT2-4KR + LNX2) = 4. **C)** Las células COS-7 transfectadas como en (A) fueron sometidas a ensayos de transporte de [3 H]-Gly. El transporte de Gly viene expresado como porcentaje del obtenido para la condición control. **** p (GlyT2 + LNX2) < 0,0001; usando la prueba U de Mann-Whitney. n = 27.

2.4. El silenciamiento de LNX2 en neuronas de tallo cerebral y médula espinal aumenta la expresión de GlyT2 endógeno

Una vez demostrada la regulación de GlyT2 por parte de las proteínas LNX en el sistema heterólogo COS-7, se quiso determinar si el transportador era modulado por ellas también en neuronas de tallo cerebral y médula espinal de rata, el sistema en el que GlyT2 se expresa naturalmente. Con este objetivo, el primer paso fue medir la expresión endógena de LNX1-p80 y LNX2 en estas neuronas mediante qPCR. Para ello se utilizó como referencia un lisado de riñón de rata, un tejido en el que LNX1-p80 y LNX2 se expresan de manera abundante [141, 142].

El mRNA de LNX2 fue detectado en las neuronas de tallo cerebral y médula espinal a DIV 12 (**Fig. 23A**), siendo la cantidad determinada un 85% menor que la detectada en riñón. Sin embargo, LNX1-p80, que también se detectó en riñón, no se encontró en estas neuronas (**Fig. 23A**), lo cual concuerda con los resultados obtenidos por otros autores, que han detectado la expresión de LNX1-p80 en tejidos periféricos pero no en SNC [141, 143, 148]. Debido a la

indetectable presencia de LNX1-p80 en neuronas de tallo cerebral y médula espinal, a partir de aquí solo se estudió el papel de LNX2 en el control de la expresión de GlyT2. Para ello, las neuronas fueron infectadas a DIV 1 con partículas lentivirales que contenían un shRNA contra LNX2, observándose a DIV 12 una reducción del mRNA de la E3 ubiquitín ligasa de en torno al 80% ($21,3 \pm 4,1\%$ de la condición control, **Fig. 23B**, $n = 14$, $****p < 0,0001$). En consecuencia, bajo estas condiciones se produjo un aumento significativo de los niveles proteicos de GlyT2 (**Fig. 23C**), llegando a un $165,2 \pm 20,6\%$ de la cantidad expresada por las neuronas infectadas con el shRNA control (**Fig. 23D**, $n = 16$, $****p < 0,0001$).

Este hallazgo apoya los resultados obtenidos en experimentos iniciales realizados en sistema heterólogo, de forma que, al igual que la sobreexpresión de LNX2 produce la reducción de los niveles de GlyT2, el silenciamiento de LNX2 en neuronas produce un aumento del transportador.

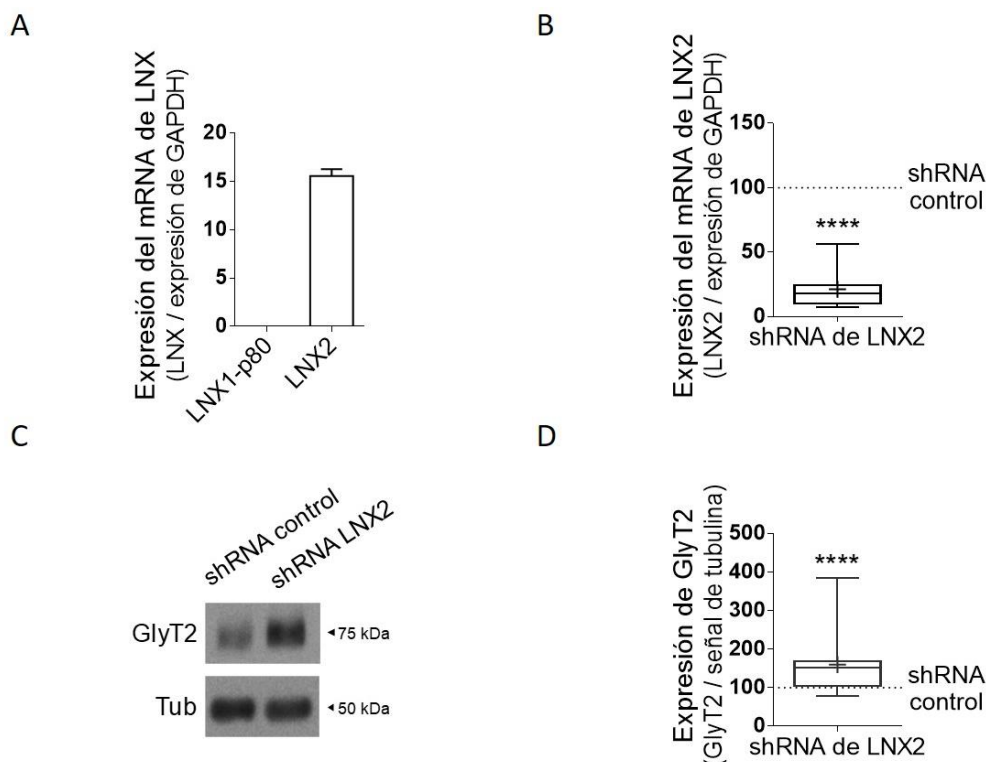


Figura 23. El silenciamiento de LNX2 en neuronas de médula espinal y tallo cerebral promueve el aumento de expresión de GlyT2. **A)** La expresión del mRNA de LNX1-p80 y LNX2 en neuronas de médula espinal y tallo cerebral fue determinada mediante qPCR. GAPDH fue utilizado como gen de referencia. Los niveles de mRNA vienen expresados como porcentaje de los determinados en riñón. $n = 3$. **B)** Los cultivos primarios de neuronas de médula espinal y tallo cerebral fueron infectados con un shRNA contra LNX2 o un shRNA control a DIV 1. Tras 12 DIV, el RNA total se extrajo de las células y se realizó la determinación de los niveles de expresión del mRNA de LNX2 mediante qPCR. GAPDH fue utilizado como gen de referencia. El nivel de LNX2 viene expresado como porcentaje del obtenido para la condición del shRNA control. $****p < 0,0001$; usando la prueba de Kolmogorov-Smirnov. $n = 14$. **C)** Los cultivos primarios de neuronas de médula espinal y tallo cerebral fueron infectados como en (B) y tras 12 DIV fueron lisadas para determinar los niveles de GlyT2 mediante WB. **D)** Cuantificación de la expresión proteica de GlyT2. Tubulina (Tub) fue utilizada como control de carga. El nivel de GlyT2 viene expresado como porcentaje del obtenido para la condición del shRNA control. $****p < 0,0001$; usando la prueba de Kolmogorov-Smirnov. $n = 16$.

2.5. LNX2 está implicada en la regulación de la actividad de GlyT2 mediada por PKC

Previamente se ha descrito que la activación de PKC en neuronas glicinérgicas inducía un aumento de la ubiquitinación y una reducción de la expresión y actividad de transporte de GlyT2, y se sugería que este podía ser un mecanismo de regulación de la neurotransmisión glicinérgica [131, 132, 181]. PKC está ampliamente descrita como reguladora de la liberación de neurotransmisores en muchos tipos de sinapsis del SNC y su activación con ésteres de forbol ha sido muy utilizada para caracterizar su función [182-184]. Dado que LNX2 parece regular el estado de ubiquitinación de GlyT2, se hipotetizó que la degradación del transportador observada tras la activación de PKC podía estar mediada por LNX2. Para responder a esta cuestión, se silenció LNX2 en neuronas glicinérgicas y los cultivos a DIV 12 se trataron con PMA, un activador de PKC.

Mientras la activación de PKC en neuronas infectadas con el shRNA control resultó en una disminución de los niveles de GlyT2 a un $67,2 \pm 10,1\%$ (**Fig. 24A**, lado izquierdo y **Fig. 24B**, $n = 7$, $**p = 0,0016$), el silenciamiento de LNX2 bloqueó el efecto del PMA (**Fig. 24A**, lado derecho y **Fig. 24B**, $n = 6$, $^{ns}p = 0,6892$), lo que sugiere la implicación de LNX2 en la regulación de GlyT2 llevada a cabo por PKC. Para confirmar el impacto de esta modulación sobre la actividad de GlyT2, se realizaron ensayos de transporte de $[^3H]$ -Gly en neuronas primarias de tallo cerebral y médula espinal en las mismas condiciones; y se observó que la disminución del transporte tras el tratamiento con PMA no se producía en neuronas en las que LNX2 se había silenciado (**Fig. 24C**, n (shRNA control y PMA) = 6, n (shRNA LNX2 y PMA) = 7, $****p$ (shRNA control y PMA) < 0,0001, ^{ns}p (shRNA LNX2 y PMA) = 0,4372).

En conjunto, estos experimentos muestran que LNX2 es esencial en la regulación de GlyT2 por parte de PKC en neuronas glicinérgicas, siendo esta E3 ubiquitín ligasa uno de los eslabones moleculares que se encuentran entre la activación de PKC y la aceleración de la ubiquitinación de GlyT2.

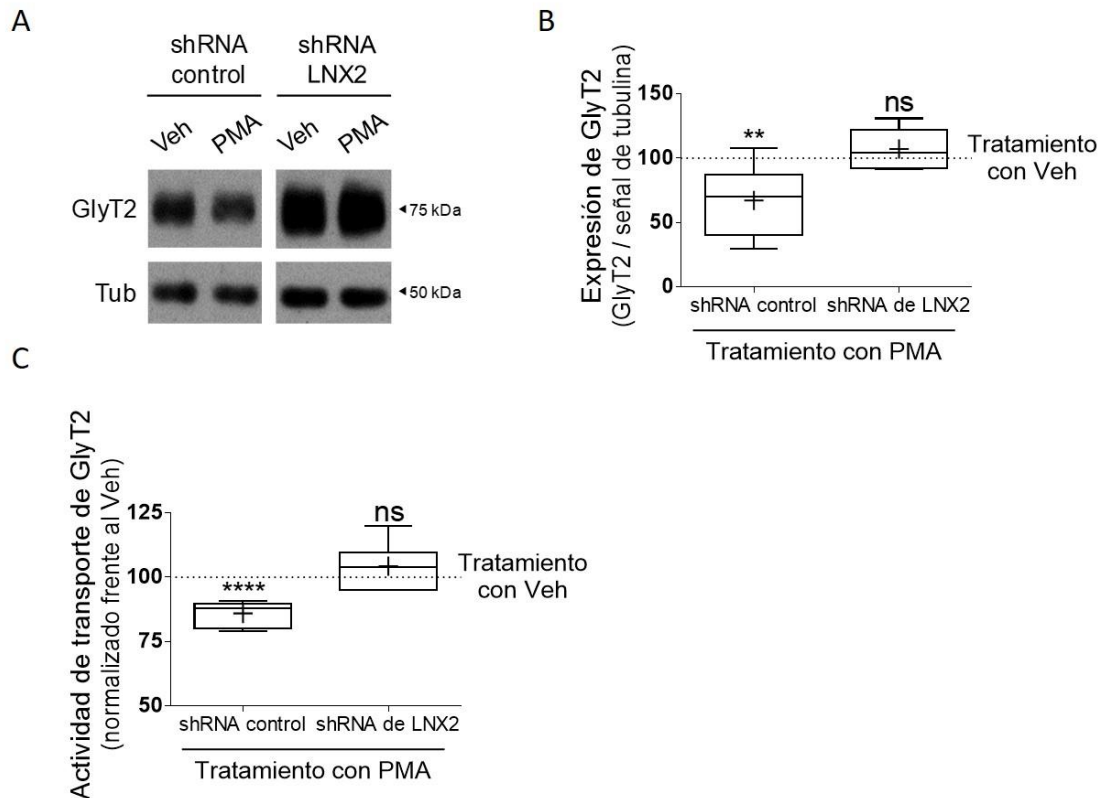


Figura 24. El silenciamiento de LNX2 en neuronas de médula espinal y tallo cerebral evita la degradación de GlyT2 provocada por PMA. A) Los cultivos primarios de neuronas de médula espinal y tallo cerebral infectados con shRNA contra LNX2 o shRNA control fueron tratados con PMA 1 μ M o vehículo (Veh) durante 2h. Tras este tiempo, las células fueron lisadas para determinar los niveles de GlyT2 mediante WB. **B)** Cuantificación de la expresión proteica de GlyT2. Tubulina (Tub) fue utilizada como control de carga. El nivel de GlyT2 viene expresado como porcentaje del obtenido para al tratamiento con Veh en cada caso. $**p$ (shRNA control + PMA) = 0,005, ^{ns}p (shRNA LNX2 + PMA) = 0,6892; usando la prueba de comparación múltiple de Sidak. n (shRNA control + Veh) = 7, n (shRNA control + PMA) = 7, n (shRNA LNX2 2 + Veh) = 6, n (shRNA LNX2 + PMA) = 6. **C)** Los cultivos primarios de neuronas de médula espinal y tallo cerebral infectados y tratados con PMA como en (A) fueron sometidas a ensayos de transporte de [3 H]-Gly. El transporte de Gly viene expresado como porcentaje del obtenido para el tratamiento con Veh en cada caso. $****p$ (shRNA control + PMA) < 0,0001, ^{ns}p (shRNA LNX2 + PMA) = 0,4372; usando la prueba de comparación múltiple de Sidak. n (shRNA control + Veh) = 6, n (shRNA control + PMA) = 6, n (shRNA LNX2 2 + Veh) = 7, n (shRNA LNX2 + PMA) = 7.

2.6. Ni LNX2 ni PKC parecen estar implicados en la modulación de GlyT2 promovida por la vía de señalización de Hh

Dado que, como se ha demostrado en el apartado anterior, la activación de la ruta de Hh produce una disminución de la actividad y expresión proteica de GlyT2 dependiente de ubiquitinación, se quiso estudiar si LNX2 era la E3 ubiquitín ligasa que mediaba en este proceso. En primer lugar, los cultivos neuronales se trataron entre 2 y 16h con purmorfamina 10 μ M y se midió la expresión del mRNA de LNX2 mediante qPCR. Aunque a lo largo de esa ventana de tiempo la expresión proteica y actividad de GlyT2 se veía disminuida (**Fig. 12**), los niveles del mRNA de LNX2 no variaron de forma significativa (**Fig. 25A**, $n = 3$, $^{ns}p = 0,3964$). Esto sugiere que la activación de la señalización de Hh con el agonista no promueve cambios en la ubiquitín ligasa a nivel transcripcional o postranscripcional. Para comprobar realmente la implicación de LNX2 en la modulación de GlyT2 ejercida por purmorfamina, se utilizaron de nuevo cultivos primarios infectados con shRNA contra LNX2 o shRNA control y se realizaron tratamientos con purmorfamina 10 μ M durante 16h. Como se muestra en las **Figuras 25B, 25C y 25D**, el silenciamiento de LNX2 no afectó a la reducción de la expresión (n (shRNA control) = 3, n (shRNA LNX2) = 7, ^{ns}p (PMM: Control shRNA vs LNX2 shRNA) = 0,9401), ni de la actividad ($n = 4$, ^{ns}p (PMM: Control shRNA vs LNX2 shRNA) = 0,6814) de GlyT2 inducida por purmorfamina. Finalmente, dado que la vía de Shh puede activar la ruta de PKC [185], también se quiso investigar si esta kinasa estaba implicada en la modulación de GlyT2 inducida por purmorfamina, aunque no fuese de manera dependiente de LNX2. Con este objetivo, los cultivos se volvieron a tratar con purmorfamina o su vehículo en las mismas condiciones descritas arriba, pero en presencia o ausencia de bisindolilmaleimida IX, un inhibidor de PKC. Los experimentos realizados indicaron que tampoco el tratamiento con bisindolilmaleimida IX a distintas concentraciones (**Fig. 26A y B**) evitaba la degradación de GlyT2 causada por purmorfamina.

Por tanto, estos resultados indican que ni la ruta de PKC ni LNX2 median en la modulación de GlyT2 promovida por purmorfamina y que debe ser otra E3 ubiquitín ligasa la que esté implicada en este proceso.

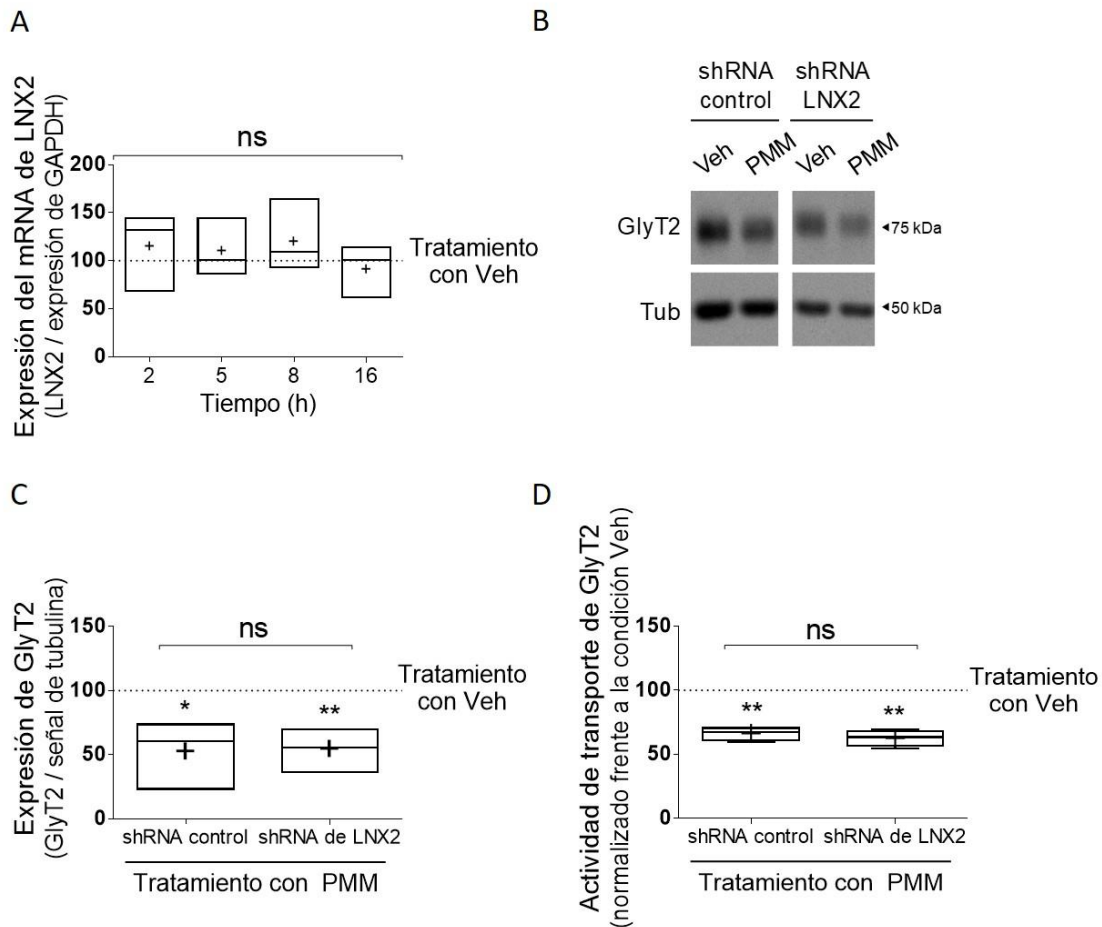


Figura 25. La E3 ubiquitín ligasa LNX2 no está implicada en la degradación de GlyT2 inducida por purmorfamina. **A)** Los cultivos primarios de neuronas de médula espinal y tallo cerebral fueron tratados con purmorfamina (PMM) 10 μ M o vehículo (Veh) durante el tiempo indicado. Tras este tiempo, los niveles de expresión del mRNA de LNX2 fueron determinados mediante qPCR. GAPDH fue utilizado como gen de referencia. El nivel de LNX2 viene expresado como porcentaje del obtenido para el tratamiento con Veh. $^{ns}p = 0,3964$; usando la prueba de Kruskal-Wallis. $n = 3$. **B)** Los cultivos primarios de neuronas de médula espinal y tallo cerebral infectados con shRNA contra LNX2 o shRNA control fueron tratados con PMM 10 μ M o Veh durante 16h. Tras este tiempo, las células fueron lisadas para determinar los niveles de GlyT2 mediante WB. **C)** Cuantificación de la expresión proteica de GlyT2. Tubulina (Tub) fue utilizada como control de carga. El nivel de GlyT2 viene expresado como porcentaje del obtenido para el tratamiento con Veh en cada caso. $^{*}p$ (Control shRNA: Veh vs PMM) = 0,0280; $^{**}p$ (LNX2 shRNA: Veh vs PMM) = 0,0023; ^{ns}p (PMM: Control shRNA vs LNX2 shRNA) = 0,9401; usando la prueba de comparación múltiple de Holm-Sidak. n (shRNA control) = 3, n (shRNA LNX2) = 7. **D)** Los cultivos primarios de neuronas de médula espinal y tallo cerebral infectados y tratados con PMM como en (B) fueron sometidos a ensayos de transporte de [3 H]-Gly. El transporte de Gly viene expresado como porcentaje del obtenido para el tratamiento con Veh en cada caso. $^{**}p$ (Control shRNA: Veh vs PMM) = 0,0037; $^{**}p$ (LNX2 shRNA: Veh vs PMM) = 0,0026; ^{ns}p (PMM: Control shRNA vs LNX2 shRNA) = 0,6814; usando la prueba de comparación múltiple de Holm-Sidak, $n = 4$.

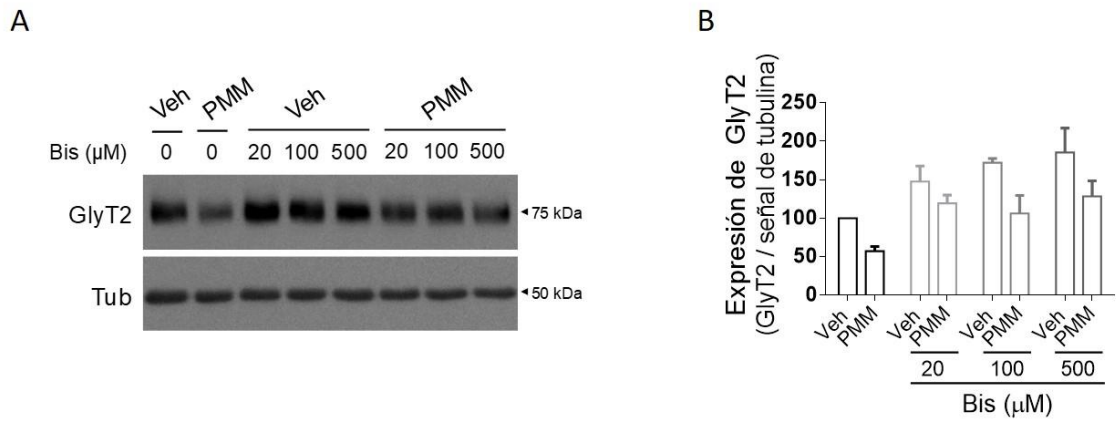


Figura 26. La inhibición de PKC no evita la degradación de GlyT2 promovida por purmorfamina. A) Los cultivos primarios de neuronas de médula espinal y tallo cerebral fueron tratados con purmorfamina (PMM) 10 μM o vehículo (Veh) durante 16h y con o sin bisindolilmaleimida IX (Bis) a las concentraciones indicadas. Tras este tiempo, las células fueron lisadas para determinar los niveles de GlyT2 mediante WB. **B)** Cuantificación de la expresión proteica de GlyT2 tras los tratamientos. Tubulina (Tub) fue utilizada como control de carga. El nivel de GlyT2 viene expresado como porcentaje del obtenido para el tratamiento con el Veh de PMM en solitario. $n = 4$.

Bloque II

3. Caracterización de mutantes asociados a hiperplexia y búsqueda de compuestos capaces de rescatar su fenotipo

3.1. Los mutantes A277T e Y707C tienen una actividad de transporte disminuida que se corresponde con la observada para sus homólogos humanos A275T e Y705C

En el segundo bloque de esta Tesis Doctoral, se ha abordado el reto de caracterizar el fenotipo molecular de varios mutantes de GlyT2 asociados a hiperplexia humana anteriormente descubiertos y parcialmente descritos, los mutantes A275T, L306V, Y705C y G767R [42-44, 46]. La variante A275T presenta una sustitución en un residuo del TM 3 y se produce por la mutación con cambio de sentido G823A. En el paciente de hiperplexia portador de la mutación, no se detectó ninguna mutación en el otro alelo del gen *SLC6A5*, pero tampoco se confirmó si el patrón de herencia de la enfermedad era autosómico dominante o recesivo. Por otro lado, cuando A275T se expresó en sistema heterólogo, se obtuvo una actividad de transporte de Gly disminuida que se atribuyó a una dependencia alterada a Na⁺ y a Gly [43]. La variante L306V presenta la sustitución en el EL 2 como consecuencia de la mutación C916G; en este caso, el paciente, además de presentar la mutación L306V, también portaba la mutación N509S en el otro alelo del gen *SLC6A5*. Puesto que en sistema heterólogo el transporte de Gly asociado a GlyT2 cuando se expresaba la variante L306V era similar a la observada para el transportador silvestre y dado que solo se observó una disminución cuando el mutante L306V se coexpresaba junto con N509S, se propuso que ambas mutaciones debían de actuar de manera sinérgica a la hora de causar el fenotipo de hiperplexia y se sugirió un patrón de herencia autosómico recesivo para ellas [42]. Con respecto al mutante Y705C, la sustitución se encuentra en el TM11 y se produce por la mutación A2114G; en este caso, se pudo confirmar que el patrón de herencia de hiperplexia dentro del grupo de pacientes con esta mutación era del tipo autosómico dominante. Como ya se ha comentado en la introducción, se demostró que la Cys introducida interfería con el puente disulfuro Cys 311-Cys 320 del EL 2, afectándose la maduración del transportador a lo largo de la vía secretora, llegada a membrana y función. Sin embargo, no se pudo demostrar la retención de esta variante en ninguno de los compartimentos del sistema endomembranas [46]. Por último, la variante G767R presenta la sustitución de un residuo del C-t como consecuencia de la mutación C2299T. Curiosamente, el paciente de hiperplexia con esta mutación también era heterocigoto para la mutación I244T de la subunidad $\alpha 1$ del GlyR, una

mutación que previamente se había caracterizado como autosómica recesiva. Cuando se expresó el mutante G767R en sistema heterólogo, no se observó ni una actividad de transporte disminuida ni una alteración a nivel de expresión medida por WB con respecto al transportador silvestre [44].

En esta Tesis Doctoral, aprovechando las herramientas experimentales disponibles en el laboratorio, se ha optado por trabajar con los homólogos de rata A277T, L308V, Y707C y G769R. En nuestro grupo hay larga experiencia trabajando con el homólogo de GlyT2 de rata [70, 78, 130] y en la mayoría de casos, cuando las mutaciones que producen hiperplexia humana se trasladan al homólogo de rata, el fenotipo molecular observado se corresponde con el que se obtiene para la variante humana [47]. Para comprobar si esto también era así para las variantes de rata A277T, L308V, Y707C y G769R, como primer paso, se quiso explorar en células COS-7 si estos mutantes se comportaban de la misma manera que sus homólogos humanos.

Los ensayos de transporte de [³H]-Gly en células COS-7 que expresaban los mutantes A277T e Y707C revelaron actividades de transporte del $50,2 \pm 2,3\%$ y del $55,3 \pm 1,4\%$ (**Fig. 27A**, n (A277T) = 79, n (Y707C) = 72, ****p < 0,0001) respecto al transportador silvestre, lo cual se adecuaba a la actividad observada para sus homólogos humanos (**Fig. 27B**). Además, al igual que está descrito para el mutante humano A275T [43], la variante de rata A277T también mostró una dependencia alterada de Na⁺: en ensayos de transporte de [³H]-Gly en los que se varió la concentración de Na⁺ entre 0 y 300 mM, se determinó la afinidad (EC₅₀) de A277T por Na⁺, observándose una reducción de la misma con respecto al silvestre (EC₅₀ (Silvestre) = $78,7 \pm 7,4$ mM; EC₅₀ (A277T) = $134,9 \pm 19,9$ mM; **Fig. 27C**; n = 6,). Por el contrario, las variantes L308V y G769R mostraron un comportamiento que no se correspondía con lo observado para los mutantes humanos. Estos mutantes no parecieron tener una actividad disminuida con respecto al silvestre (**Fig. 27A**, n (L308V) = 76, n (G769R) = 76, ^{ns}p (L308V) > 0,9999, ^{ns}p (G769R) = 0,2475), a diferencia de los resultados obtenidos para las variantes L306V y G767R, que mostraron, en relación a su silvestre, actividades del $48,8 \pm 2,4\%$ y del $71,0 \pm 3,6\%$, respectivamente (**Fig. 27B**, n (L306V) = 29, n (G767R) = 23, ****p (L306V) < 0,0001, *p (G767R) = 0,0110).

Por tanto, en base a estos primeros resultados de actividad, se decidió continuar únicamente con el estudio del fenotipo de los mutantes A277T e Y707C, por ser las dos variantes que podían aportar datos más fiables con respecto a los defectos de los homólogos humanos asociados a hiperplexia.

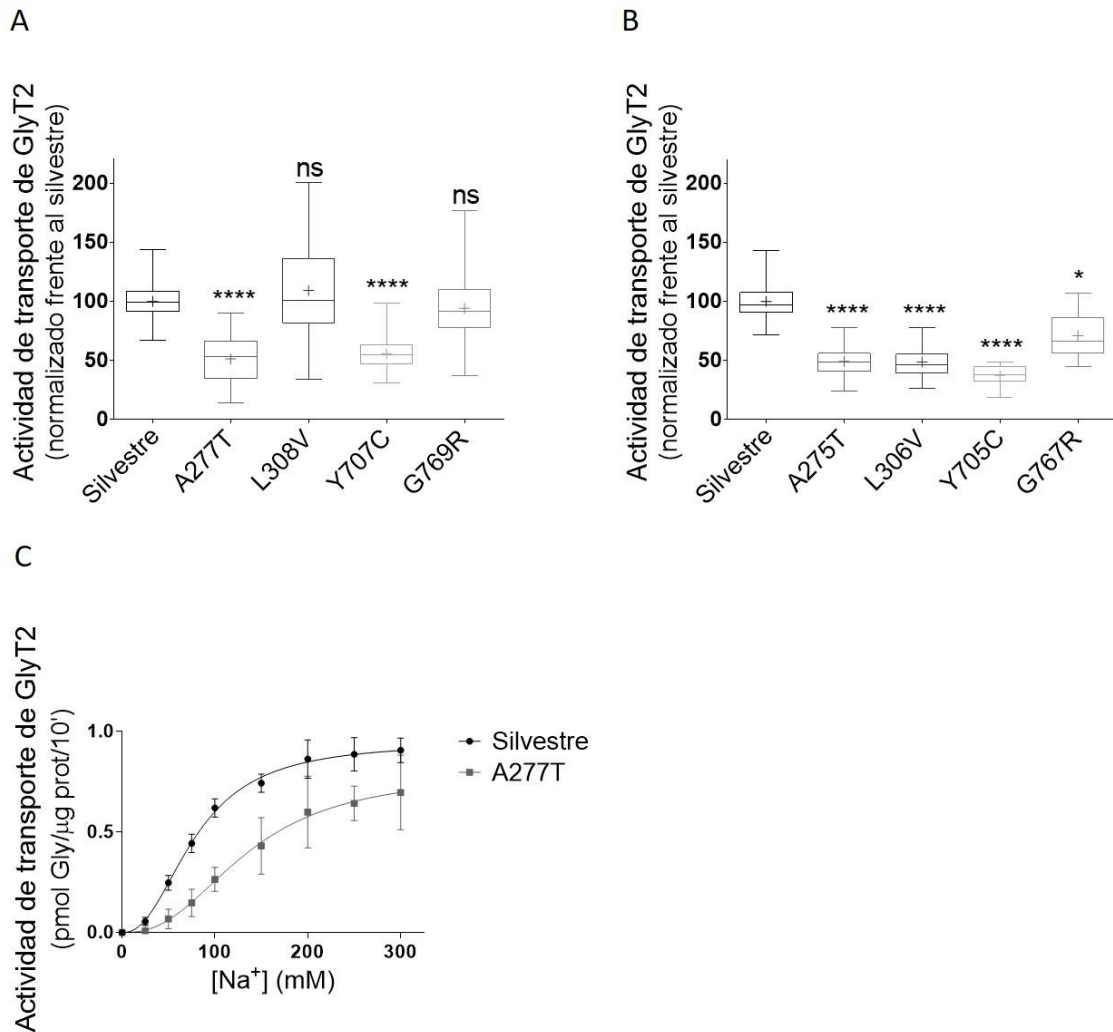


Figura 27. Los mutantes A277T e Y707C presentan una actividad disminuida similar a la determinada para sus homólogos humanos. A) Las células COS-7 que expresan la variante silvestre de GlyT2 de rata o los mutantes A277T, L308V, Y707C y G769R fueron sometidas a ensayos de transporte de [³H]-Gly. El transporte de Gly viene expresado como porcentaje del obtenido para GlyT2 silvestre. *****p* (A277T) < 0,0001; ^{ns}*p* (L308V) > 0,9999; *****p* (Y707C) < 0,0001; ^{ns}*p* (G769R) = 0,2475; usando la prueba de comparación múltiple de Dunn. *n* (Silvestre) = 88, *n* (A277T) = 79, *n* (L308V) = 76, *n* (Y707C) = 72, *n* (G769R) = 76. **B)** Las células COS-7 que expresan la variante silvestre de GlyT2 de humano o los mutantes A275T, L306V, Y705C y G767R fueron sometidas a ensayos de transporte de [³H]-Gly. El transporte de Gly viene expresado como porcentaje del obtenido para GlyT2 silvestre. *****p* (A275T) < 0,0001; *****p* (L306V) < 0,0001; *****p* (Y705C) < 0,0001; **p* (G767R) = 0,0110; usando la prueba de comparación múltiple de Dunn. *n* (Silvestre) = 33, *n* (A275T) = 26, *n* (L306V) = 29, *n* (Y705C) = 25, *n* (G767R) = 23. **C)** Las células COS-7 que expresan la variante silvestre de GlyT2 de rata o el mutante A277T fueron sometidas a ensayos de transporte de [³H]-Gly en presencia de concentraciones crecientes de NaCl extracelular (sustituido isotómicamente por cloruro de colina). El transporte de Gly viene expresado en pmol Gly/ μ g proteína/ $10'$.

3.2. Los mutantes A277T e Y707C presentan una maduración alterada y una expresión en superficie disminuida

A pesar de haberse propuesto que el defecto a nivel de actividad que sufre el mutante A275T se debe a una dependencia alterada a Na⁺ y a Gly, no se había explorado aún cómo es su comportamiento a nivel de llegada a membrana y maduración a lo largo de la vía secretora [43]. Con respecto al mutante Y705C, aunque se ha demostrado que presenta una llegada a membrana plasmática y maduración alteradas, se desconocen ciertos detalles [46]. Por ello, una vez demostrado que las variantes A277T e Y707C reproducían las alteraciones en actividad que presentaban los mutantes asociados a hiperplexia humana, se determinó el grado de maduración y el nivel de expresión en membrana de estas dos variantes de rata.

Para ello, los mutantes A277T e Y707C se expresaron en el sistema heterólogo COS-7 y se determinó su expresión en superficie mediante ensayos de biotilación. Durante los mismos, además de aislar la fracción de proteínas de membrana, también se obtuvo una alícuota que contenía el total de proteínas expresadas. Cuando se obtienen extractos proteicos totales (muestra de proteínas totales, T) de células COS-7 que expresan GlyT2 y se analizan por WB, se obtienen mayoritariamente dos bandas para el transportador (**Fig. 28A**, carriles 1, 3 y 5): una banda de alrededor de 75 kDa que se corresponde con la fracción inmadura del transportador con glicosilación incompleta residente en RE; y una banda de 100 kDa que se corresponde con la fracción madura con glicosilación completa [78]. Dado que ambas fracciones representan dos estados distintos de glicosilación de GlyT2 durante la vía secretora, la relación entre ellas es informativa sobre posibles alteraciones en la maduración del transportador. Los mutantes A277T e Y707C mostraron una disminución de la relación entre la fracción madura (100 kDa) y la fracción inmadura (75 kDa) de en torno al 55% con respecto al silvestre (**Fig. 28B**, n (A277T) = 14, n (Y707C) = 16, **p (A277T) = 0,0028, **p (Y707C) = 0,0027), indicando un posible bloqueo en RE durante su maduración. Por otro lado, en las fracciones biotiladas (B) solo se detecta la banda de 100 kDa, que es la forma funcional de GlyT2 que se encuentra en membrana (**Fig. 28A**, carriles 2, 4 y 6). En el caso de los mutantes A277T e Y707C, su fracción biotilada estaba claramente disminuida en comparación con el transportador silvestre, siendo, respectivamente, del 34,6 ± 4,7% y del 33,6 ± 5,0% (**Fig. 28C**, n (A277T) = 15, n (Y707C) = 14, ****p < 0,0001).

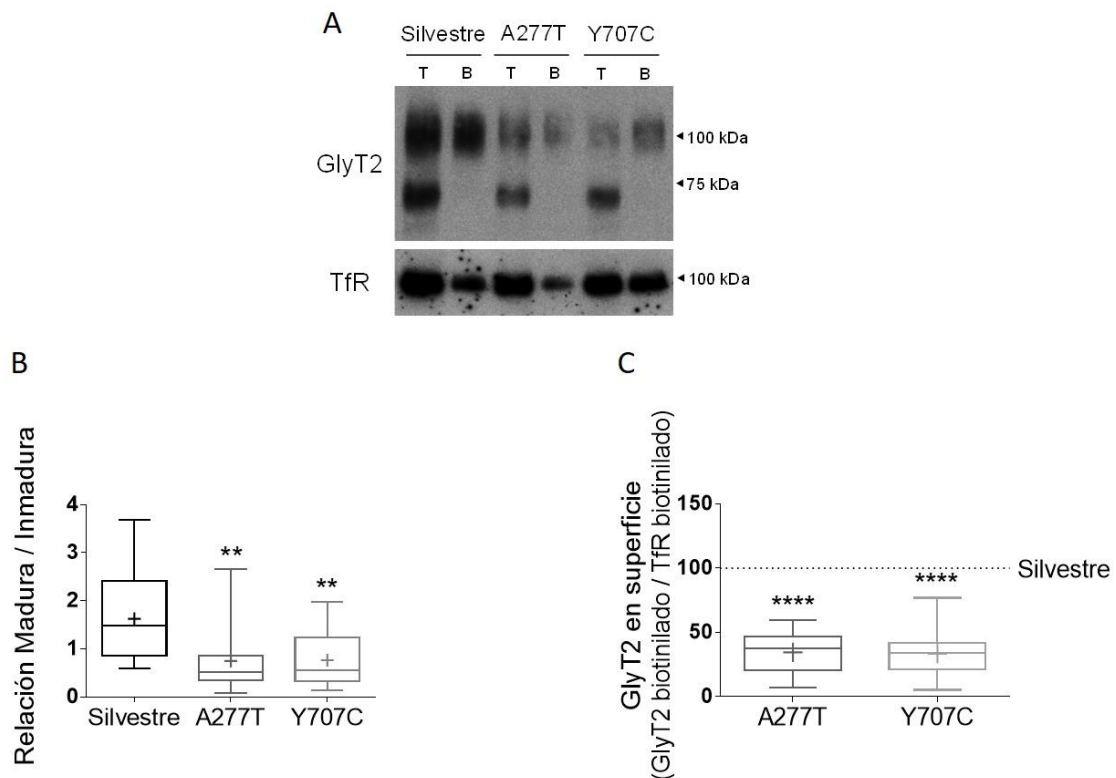


Figura 28. Los mutantes A277T e Y707C tienen una maduración alterada y una menor presencia en membrana. A) Las células COS-7 que expresan GlyT2 silvestre, A277T o Y707C fueron sometidas a ensayos de biotinilación de superficie. Las fracciones total (T) y biotinilada (B) del lisado fueron analizadas por WB. **B)** Relación de intensidades entre la banda madura (100 kDa) y la banda inmadura (75 kDa) de la fracción T de GlyT2. $^{**}p$ (A277T) = 0,0028, $^{**}p$ (Y707C) = 0,0027; usando la prueba de comparación múltiple de Dunn. n (Silvestre) = 19, n (A277T) = 14, n (Y707C) = 16. **C)** Cuantificación de la fracción B de GlyT2 silvestre y mutantes. TfR fue utilizado como control de carga. El nivel de GlyT2 en superficie viene expresado como porcentaje del obtenido para GlyT2 silvestre. $^{****}p$ < 0,0001; usando la prueba de comparación múltiple de Dunn. n (Silvestre) = 15, n (A277T) = 15, n (Y707C) = 14.

Como evidencia adicional se evaluó la expresión en membrana de los mutantes respecto al silvestre mediante inmunocitofluorescencia y el posterior estudio del grado de colocalización de las variantes con el marcador de membrana plasmática E-cadherina. Para estos ensayos, se utilizó la línea celular MDCK II, cuyas células expresan visiblemente el marcador E-cadherina cuando alcanzan cierto nivel de confluencia, en contra de lo que sucede en células COS-7, en las que resulta difícil encontrar un marcador de superficie adecuado. El grado de colocalización de GlyT2 y E-cadherina se cuantificó mediante el coeficiente de solapamiento de Manders [157]. Como se observa en la **Figura 29**, el grado de solapamiento de los mutantes A277T e Y707C con E-cadherina fue un 30% menor que el observado para el transportador silvestre. Concretamente, A277T colocalizó con E-cadherina un $69,8 \pm 4,0\%$ con respecto al silvestre e Y707C un $68,1 \pm 3,9\%$ (n (A277T) = 35, n (Y707C) = 32, $^{****}p$ < 0,0001). Dado que este coeficiente permite inferir la proporción de GlyT2 que está en membrana, los resultados obtenidos, junto con los anteriores, indican que los mutantes A277T e Y707C tienen un problema de retención intracelular que les impide llegar a la membrana plasmática, lo que constituye la primera

evidencia de que la mutación asociada a hiperplexia humana A275T presenta una alteración en su tráfico a lo largo de la vía secretora y concuerda con los resultados obtenidos previamente para el mutante Y705C [46].

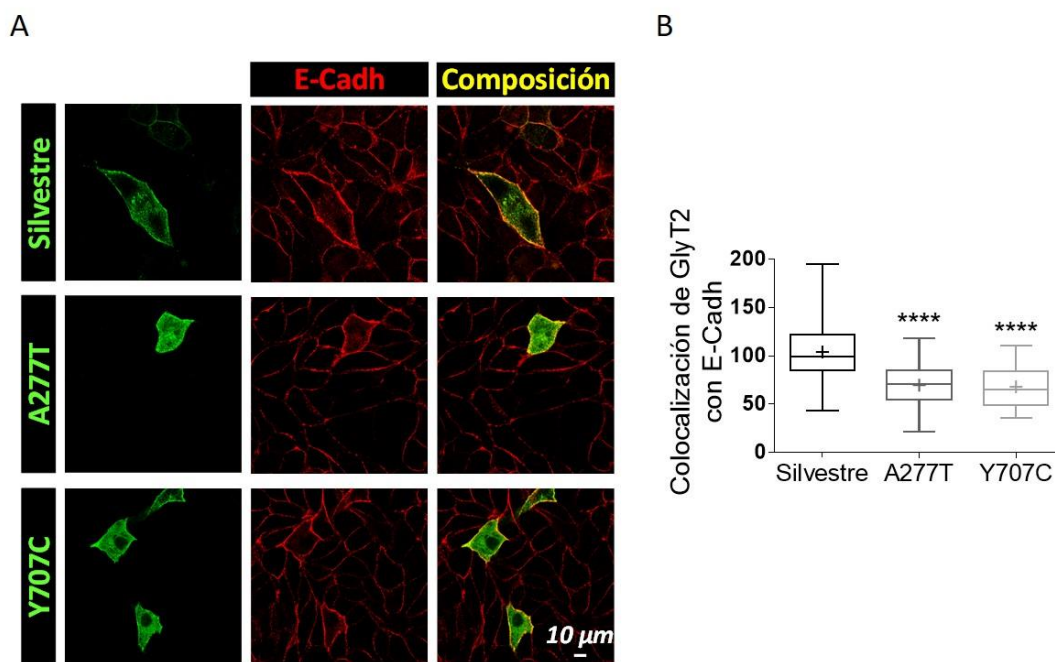


Figura 29. Los mutantes A277T e Y707C muestran una menor colocalización con E-cadherina. A) Las células MDCK II que expresan GlyT2 silvestre, A277T o Y707C fueron sometidas a una doble inmunocitofluorescencia utilizando anticuerpos frente a GlyT2 y E-cadherina (E-cadh). **B)** Grado de colocalización de GlyT2 silvestre y mutantes con E-cadh determinado mediante el coeficiente de solapamiento de Manders. El coeficiente de solapamiento de Manders determina la proporción de solapamiento de un canal sobre otro; en este caso, la proporción del canal verde (GlyT2) que solapaba sobre el canal rojo (E-cadh). El grado de colocalización viene expresado como porcentaje del obtenido para GlyT2 silvestre. **** $p < 0,0001$; usando la prueba de comparación múltiple de Dunn. n (Silvestre) = 47, n (A277T) = 35, n (Y707C) = 32.

3.3. Los mutantes A277T e Y707C están retenidos en el RE

Puesto que los mutantes A277T e Y707C mostraron una acumulación de la fracción inmadura mayor que la determinada para GlyT2 silvestre (**Fig. 28A**, carril 1, 3 y 5; **Figura 28B**), se quiso determinar si sufrían algún tipo de retención en RE. Sobre el mutante humano A275T, dado que no se había realizado ningún tipo de estudio sobre su tráfico a lo largo de la vía secretora, no existían datos sobre una posible retención en RE. Del mutante Y705C, aunque sí que se demostró un defecto en su maduración, no se consiguió demostrar su retención en RE [46].

Para estudiar la posible retención de los mutantes de rata A277T e Y707C, ambas variantes se expresaron de forma transitoria en células COS-7 y se determinó su grado de colocalización con CNX mediante el coeficiente de solapamiento de Manders (**Fig. 30**). CNX, al ser una chaperona de RE, se utiliza ampliamente como marcador de este orgánulo y permite determinar la presencia o no de una proteína en él [186-188]. Los resultados mostraron que los

mutantes A277T e Y707C solapan con CNX un 30% más que el transportador silvestre (**Fig. 30B**, n (A277T) = 8, n (Y707C) = 16, $*p$ (A277T) = 0,0381, $*p$ (Y707C) = 0,0384), lo que indica una mayor presencia en el RE de estos mutantes y sugiere que las variantes asociadas a hiperplexia humana podrían tener algún tipo de retención en RE.

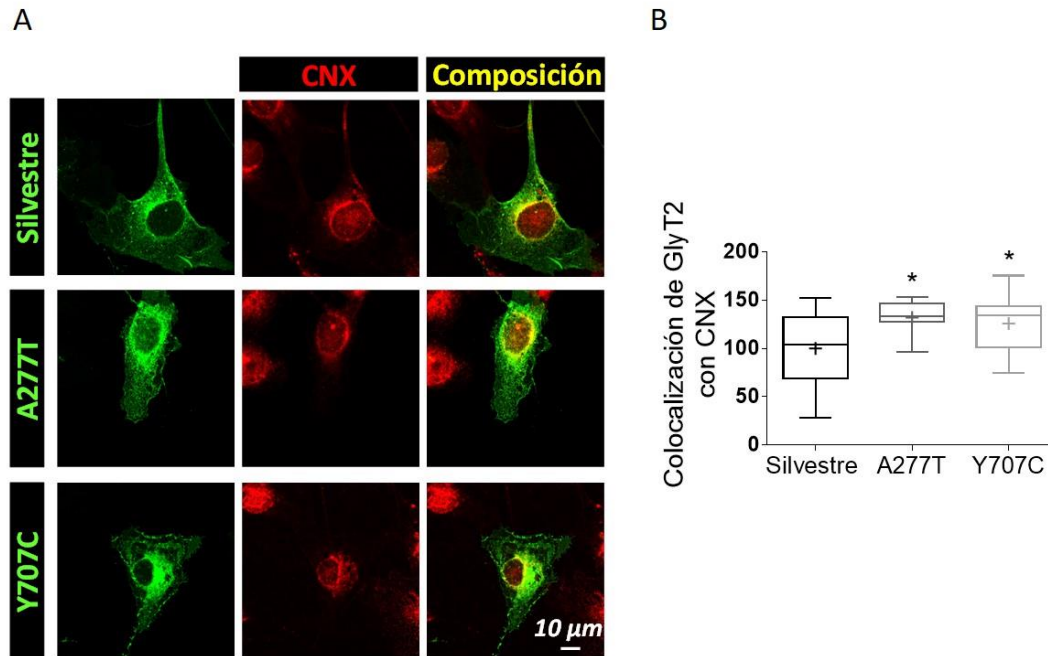


Figura 30. Los mutantes A277T e Y707C tienen un mayor grado de colocalización con CNX. A) Las células COS-7 que expresan GlyT2 silvestre, A277T o Y707C fueron sometidas a una doble inmunocitofluorescencia utilizando anticuerpos frente a GlyT2 y CNX. **B)** Grado de colocalización de GlyT2 silvestre y mutantes con CNX determinado mediante el coeficiente de solapamiento de Manders. El coeficiente de solapamiento de Manders determina la proporción de solapamiento de un canal sobre otro; en este caso, la proporción del canal verde (GlyT2) que solapaba sobre el canal rojo (CNX). El grado de colocalización viene expresado como porcentaje del obtenido para GlyT2 silvestre. $*p$ (A277T) = 0,0381, $*p$ (Y707C) = 0,0384; usando la prueba de comparación múltiple de Holm-Sidak. n (Silvestre) = 19, n (A277T) = 8, n (Y707C) = 16.

3.4. El mutante A277T tiene una retención en RE más severa que Y707C

Puesto que los mutantes parecían tener algún tipo de retención en RE, se analizaron algunos procesos que tienen lugar en el RE durante las primeras etapas de la vía secretora.

En primer lugar, se estudió la interacción de A277T e Y707C con CNX, cuyo papel en el control de calidad de GlyT2 ha sido descrito anteriormente por nuestro grupo [78]. Para ello, las células COS-7 que expresaban los transportadores se lisaron en condiciones permisivas para las interacciones entre proteínas y se realizaron ensayos de coimmunoprecipitación utilizando un anticuerpo frente a CNX. Aunque previamente se ha descrito que CNX interacciona con la fracción inmadura de GlyT2 (75 kDa), que es la que se encuentra en RE [78], bajo las condiciones utilizadas en este trabajo la inmunoprecipitación con el anticuerpo anti-CNX y el revelado del

WB con anti-GlyT2 produjo unas bandas inespecíficas a la altura de la fracción inmadura que enmascaraban su aparición e impidieron su cuantificación (**Fig. 31A**). No obstante, las proteínas transmembrana como GlyT2, al ser altamente hidrofóbicas, tienden a formar agregados que son resistentes al SDS [189] y que aparecen tras el revelado de los WB. Concretamente, en los WB de GlyT2 aparecen unos agregados de la proteína inmadura con un peso molecular alrededor de los 250 kDa (**Fig. 31A**), los cuales fueron cuantificados como aproximación para determinar la proporción de proteína inmadura coimmunoprecipitada con CNX. La cuantificación reveló que tanto A277T como Y707C coimmunoprecipitaban con CNX en mayor proporción que el transportador silvestre (**Fig. 31A y 31B**). En concreto, mientras A277T coimmunoprecipitó con CNX casi 3 veces más que GlyT2 silvestre ($289,1 \pm 120,2\%$; **Fig. 31B**, $n = 4$, $**p = 0,0091$), Y707C lo hizo alrededor de 2 veces más ($188,5 \pm 20,1\%$; **Fig. 31B**, $n = 6$, $**p = 0,0084$). Esta mayor interacción con CNX indicaría que dichas mutaciones promueven defectos en el plegamiento de estas variantes y apoya la hipótesis de su retención en RE.

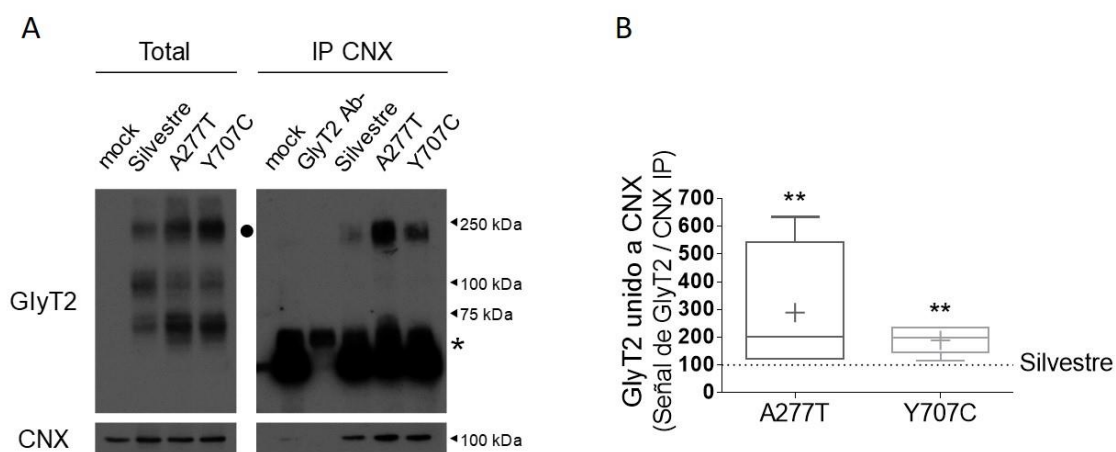


Figura 31. Los mutantes A277T e Y707C interactúan en mayor medida con CNX. A) Las células COS-7 que expresan GlyT2 silvestre, A277T o Y707C fueron lisadas y sometidas a inmunoprecipitación contra CNX en condiciones que permitiesen mantener su interacción con GlyT2. Los agregados de GlyT2 inmaduro se marcan con un punto (●) y las bandas inespecíficas de 50 kDa con un asterisco (*). **B)** Cuantificación de la cantidad de GlyT2 unido a CNX. La cantidad de GlyT2 unido a CNX viene expresada como porcentaje de la cantidad determinada para GlyT2 silvestre. $**p$ (A277T) = 0,0091, $**p$ (Y707C) = 0,0084; usando la prueba de comparación múltiple de Dunn. n (Silvestre) = 6, n (A277T) = 4, n (Y707C) = 6.

Sabiendo que una mayor interacción con CNX puede significar una acumulación de variantes de GlyT2 mal plegadas que son dirigidas a la ERAD y que las proteínas eliminadas por la ERAD son previamente ubiquitinadas [76, 77], en segundo lugar se analizó el nivel de ubiquitinación de los mutantes expresados en COS-7 tras un tratamiento de 4h con MG-132. Este compuesto es un inhibidor del proteasoma [190], el destino final de las proteínas que son dirigidas a la ERAD, y su utilización permite la acumulación de las proteínas ubiquitinadas que van a ser degradadas por el proteasoma. Dado que el $t_{1/2}$ de estas proteínas es corto, su

acumulación permite visualizarlas en un WB y las diferencias en sus niveles de ubiquitinación sirven para inferir distinto grado de degradación por el proteasoma. Previamente, en nuestro laboratorio se demostró que el tratamiento con MG-132 produce una acumulación selectiva de la proteína inmadura de GlyT2 [78] y, dado que esta es la fracción del transportador sometida al control de calidad de RE, medir los niveles de ubiquitinación de las variantes en este contexto puede dar idea de distinto grado de envío a ERAD. Los WB mostraron que los niveles de ubiquitina asociada a A277T, pero no a Y707C, estaban significativamente incrementados respecto a GlyT2 silvestre, en torno a un 60% más de inmunorreactividad frente a ubiquitina ($161,4 \pm 26,7\%$; **Fig. 32A y Fig. 32B**, $n = 4$, $*p = 0,0401$), lo que sugiere, por tanto, que el mutante A277T se dirige en mayor medida a ERAD que el transportador silvestre.

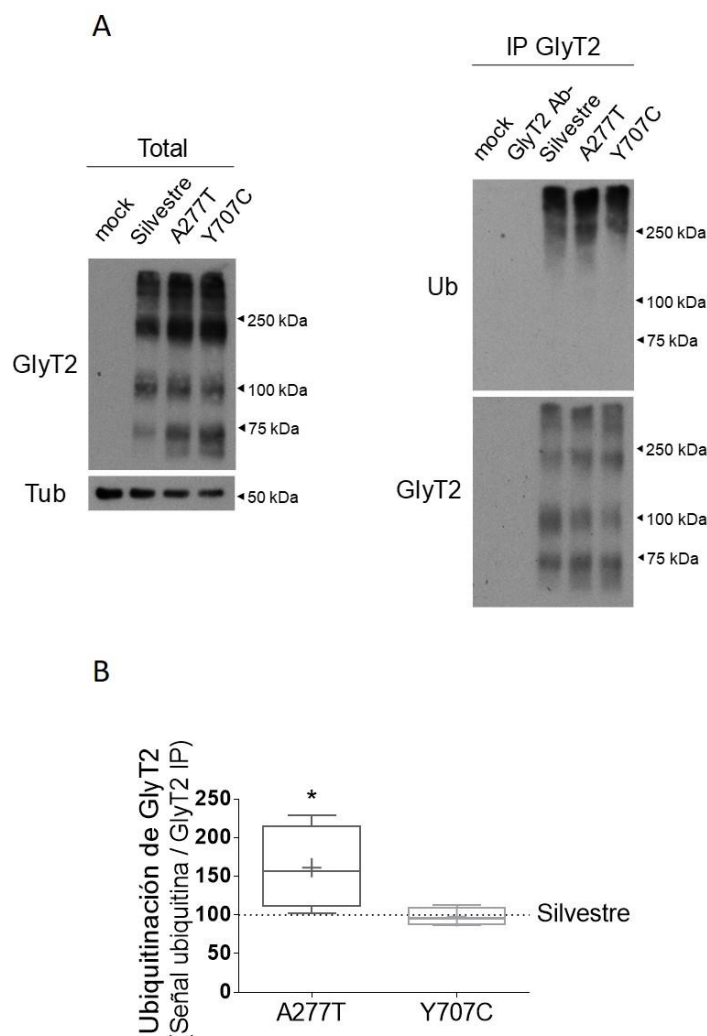


Figura 32. El mutante A277T, pero no Y707C está más ubiquitinado que GlyT2 silvestre. A) Las células COS-7 que expresan GlyT2 silvestre, A277T o Y707C fueron lisadas y sometidas a inmunoprecipitación contra GlyT2. El grado de ubiquitinación del transportador fue determinado mediante WB utilizando un anticuerpo frente a ubiquitina (Ub) cuya intensidad de señal fue normalizada frente a GlyT2 **B)** Cuantificación del grado de ubiquitinación de GlyT2. El nivel de ubiquitinación de GlyT2 viene expresado como porcentaje del obtenido para GlyT2 silvestre. $*p$ (A277T) = 0,0401; usando la prueba de comparación múltiple de Dunn. $n = 4$.

Finalmente, se estudió la interacción de los mutantes A277T e Y707C con la proteína Sec24D, un adaptador del complejo COPII que selecciona los transportadores correctamente plegados para su tráfico al Golgi [47]. Las alteraciones en esta interacción se podrían relacionar con problemas para la exportación de los mutantes del RE. Metodológicamente, las células COS-7 se cotransfectaron con el mutante de GlyT2 ensayado y con Sec24D-Myc. Posteriormente, se realizaron ensayos de coimmunoprecipitación utilizando un anticuerpo frente a GlyT2. La cantidad de Sec24D coimmunoprecipitado junto con A277T fue el $55,1 \pm 8,7\%$ del que unió el transportador silvestre (**Fig. 33A y Fig. 33B**, $n = 7$, $**p = 0,0019$), confirmándose, por tanto, una menor interacción con la proteína adaptadora y posiblemente alguna dificultad en su salida de RE. Y707C, por su parte, no coimmunoprecipitó una cantidad significativamente distinta de Sec24D que el transportador silvestre (**Fig. 33A y Fig. 33B**, $n = 7$, $^{ns}p = 0,1858$).

El hecho de que la variante A277T no solo se una más a CNX, sino que también esté más ubiquitinada y tenga una menor interacción con Sec24D, sugiere que la mutación causa un problema de plegamiento en el transportador más severo que el provocado por Y707C.

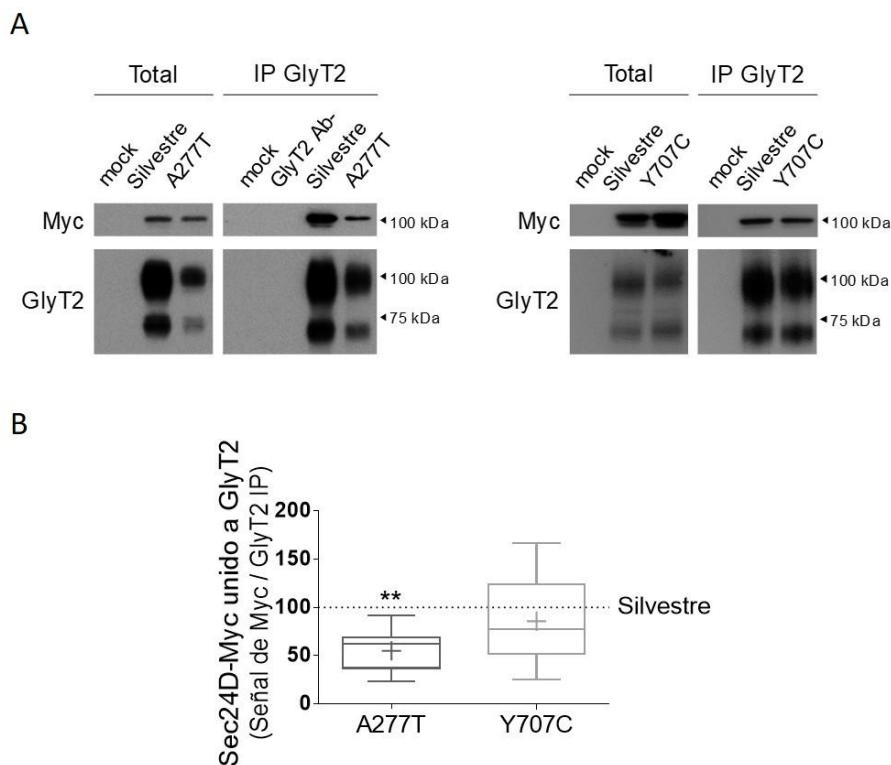


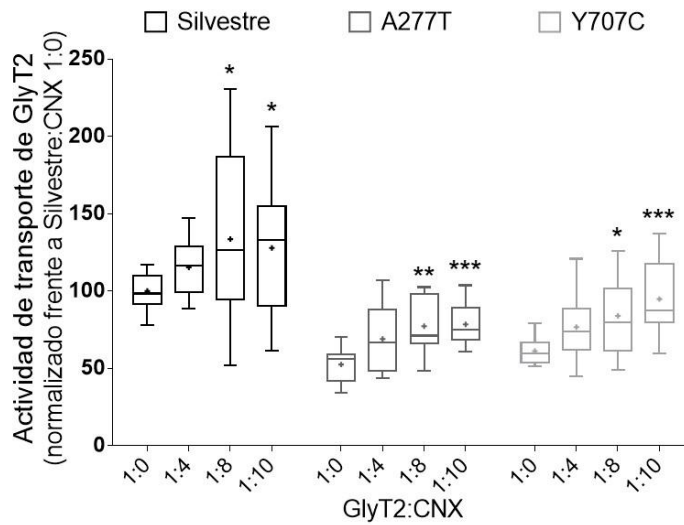
Figura 33. El mutante A277T, pero no Y707C interacciona en menor medida con Sec24D. A) Las células COS-7 que expresan Sec24D-Myc y GlyT2 silvestre, A277T o Y707C fueron lisadas y sometidas a inmunoprecipitación contra GlyT2 en condiciones que permitiesen mantener su interacción con Sec24D-Myc. **B)** Cuantificación de la cantidad de Sec24D-Myc unido a GlyT2. La cantidad de Sec24D-Myc unido a GlyT2 viene expresada como porcentaje de la cantidad determinada para GlyT2 silvestre. $**p$ (A277T) = 0,0019, ^{ns}p (Y707C) = 0,1858; usando la prueba de comparación múltiple de Dunn. n (Silvestre) = 7, n (A277T) = 7, n (Y707C) = 5.

3.5. La sobreexpresión de CNX rescata la función y la llegada a membrana de los mutantes A277T e Y707C

Está descrito por nuestro laboratorio que la sobreexpresión de CNX aumenta la actividad y cantidad total de GlyT2 silvestre [78], así como que lo rescata de la retención en RE producida por su coexpresión junto con el mutante dominante negativo S512R [47]. En este trabajo se quiso determinar si la expresión y función de los mutantes A277T e Y707C eran sensibles a la sobreexpresión de CNX.

Para ello, en el sistema heterólogo COS-7, se coexpresó cada mutante de GlyT2 con CNX en proporciones 1:4, 1:8 y 1:10; y se determinó la actividad de transporte, la cantidad de transportador total y la presencia en superficie de cada variante. Se observó que la presencia de cantidades crecientes de CNX produjo un aumento progresivo del transporte de [³H]-Gly asociado a las variantes, así como un aumento de su expresión total y su cantidad en superficie (**Fig. 34A y Fig. 34B**). En la proporción más alta, GlyT2/CNX 1:10, las dos variantes alcanzaron cotas de transporte cercanas a la actividad del transportador silvestre. Así, los transportes de Gly de A277T e Y707C llegaron al $78,5 \pm 3,3\%$ y al $94,9 \pm 5,9\%$ del transportador silvestre, respectivamente (**Figura. 34A**, $n = 8$, $***p$ (A277T 1: CNX 10) = 0,0003; $***p$ (Y707C 1: CNX 10) = 0,0007), quedando demostrado que su fenotipo es rescatable.

A



B

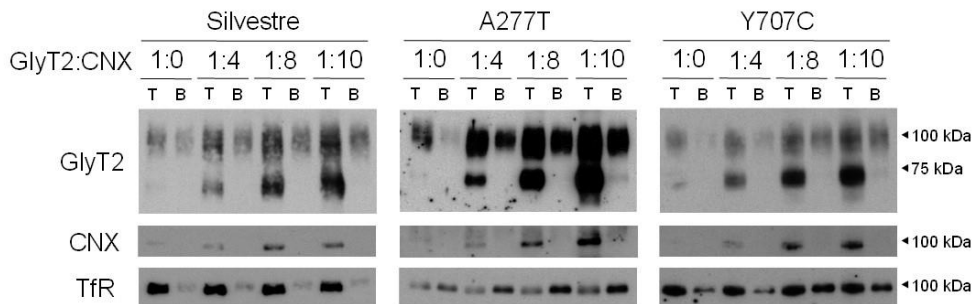


Figura 34. El fenotipo de los mutantes A277T e Y707C se rescata al elevar los niveles de CNX coexpresados en células COS-7. Las células COS-7 que expresan CNX y GlyT2 silvestre, A277T o Y707C en la proporción indicada fueron sometidas a ensayos de transporte de $[^3\text{H}]$ -Gly y biotilación de superficie. **A)** Actividad de transporte asociada a GlyT2. El transporte de Gly viene expresado como porcentaje del obtenido para GlyT2 silvestre expresado en solitario. La significancia estadística del efecto de la sobreexpresión de CNX sobre cada variante se determinó mediante la prueba de comparación múltiple de Dunn, relacionando la condición en la que el transportador se expresaba en solitario con las condiciones en las que se coexpresaba con CNX. * p (Silvestre 1: CNX 8) = 0,0484, * p (Silvestre 1: CNX 10) = 0,0456, ** p (A277T 1: CNX 8) = 0,0010, *** p (A277T 1: CNX 10) = 0,0003, * p (Y707C 1: CNX 8) = 0,0361, *** p (Y707C 1: CNX 10) = 0,0007. $n = 8$. **B)** WB representativo en el que se muestra el efecto de la sobreexpresión de CNX sobre las fracciones total (T) y biotinilada (B) de GlyT2.

3.6. NAG aumenta la presencia en membrana de GlyT2 silvestre en células COS-7 de modo similar a PBA

La acción facilitadora de CNX sobre la expresión de las variantes de GlyT2 asociadas a hiperplexia estimuló la búsqueda de compuestos que pudiesen emular la acción de la chaperona y tuviesen capacidad para rescatar el fenotipo de los mutantes A277T e Y707C. Se probaron cuatro compuestos con potencial para aumentar la presencia en membrana del transportador silvestre y consecuentemente su actividad de transporte: bupropión, ibogaína, ALX 1393 y NAG. Bupropión e ibogaína son dos inhibidores atípicos de SERT y DAT que se unen a su conformación abierta hacia dentro y cuya eficacia como farmacochaperonas ha sido demostrada al rescatar variantes mal plegadas de estos transportadores [100, 101]. ALX 1393 es un inhibidor pseudocompetitivo y reversible de GlyT2 que se une a su conformación abierta hacia fuera [191]. NAG, por su parte, es un inhibidor no competitivo y reversible de GlyT2 [105]. Además de estos cuatro compuestos, como control positivo, se utilizó PBA, una chaperona química con capacidad ya demostrada de mejorar la expresión y función de GlyT2 silvestre [47]. En todos los casos, el tratamiento se inició tras las 4h de incubación con el reactivo de transfección utilizado para expresar GlyT2 en las células COS-7 y duró 48h, intervalo de tiempo durante el cual el transportador está siendo sintetizado. Una vez transcurrido el tiempo de tratamiento, se determinó la expresión en membrana y la actividad del transportador mediante ensayo de biotilación y transporte de [³H]-Gly, respectivamente. Antes de los experimentos de transporte de [³H]-Gly, los compuestos se retiraron del medio mediante 3 lavados con PBS para evitar interferencias durante el ensayo.

Bajo estas condiciones, PBA a 1 mM produjo un aumento del GlyT2 de superficie de en torno al 40% con respecto al tratamiento con su vehículo ($143,1 \pm 14,4\%$; **Fig. 35A y 35B**, $n = 4$, $*p = 0,0286$) y un modesto aumento de la actividad de transporte del 14% ($113,7 \pm 4,7\%$; **Fig. 35C**, $n = 16$, $*p = 0,0246$). En contra de lo que se obtiene para mutantes mal plegados de SERT y DAT [100, 101], los tratamientos con bupropión e ibogaína a 1 μ M produjeron una disminución significativa de la cantidad de GlyT2 presente en membrana (**Fig. 35A**). Así, el tratamiento con bupropión redujo el transportador de superficie hasta una cantidad remanente del $71,8 \pm 7,5\%$ con respecto al tratamiento con su vehículo, y el tratamiento con ibogaína lo hizo quedar en un $59,2 \pm 6,8\%$ (**Fig. 35B**, $n = 6$, $**p$ (Bup) = 0,0022; $**p$ (Ibo) = 0,0022). Sorprendentemente, la reducción de GlyT2 en membrana no trajo consigo una menor actividad asociada al transportador (**Fig. 35C**, $n = 26$, ^{ns}p (Bup) = 0,3020; ^{ns}p (Ibo) = 0,2386). En cuanto a ALX 1393, el tratamiento con una concentración de 10 nM produjo un aumento de la fracción de superficie de en torno al 20% ($119,5 \pm 6,1\%$ del tratamiento con el vehículo, **Fig. 35A y 35B**, $n = 4$, $*p =$

0,0286). Un aumento en membrana que, en este caso, sí que repercutió en un aumento mínimo de la actividad de transporte, obteniéndose una actividad del $105,7 \pm 1,93\%$ con respecto al tratamiento con el vehículo (**Fig 35C**, $n = 23$, $*p = 0,0489$). Finalmente, la incubación con NAG $10 \mu\text{M}$ produjo un aumento importante de la fracción de superficie de GlyT2, llegando en este caso a una presencia en membrana para el transportador del $175,5 \pm 35,8\%$ (**Fig. 35A y 35B**, $n = 4$, $*p = 0,0286$). Sin embargo, el aumento en membrana fue acompañado por un pequeño aumento en la actividad del 10% ($109,5 \pm 2,2\%$; **Fig. 35C**, $n = 21$, $**p = 0,0046$), similar al obtenido tras el tratamiento con PBA.

A pesar del modesto incremento de la actividad, el gran efecto sobre la fracción de superficie de GlyT2 observado tras el tratamiento con NAG dio indicios del potencial de este compuesto para la mejora de la expresión del transportador. Aunque ALX 1393 también mejoró en cierta medida la función de GlyT2, la necesidad de altas concentraciones de Na^+ para su unión al transportador hace difícil su interacción con el mismo en el lumen de RE, donde las concentraciones son bajas y, por tanto, es poco probable que el efecto observado se deba a una acción durante el plegamiento de GlyT2 [192]. Por estos motivos, de aquí en adelante se prosiguió trabajando con NAG, excluyendo de los ensayos el resto de los compuestos.

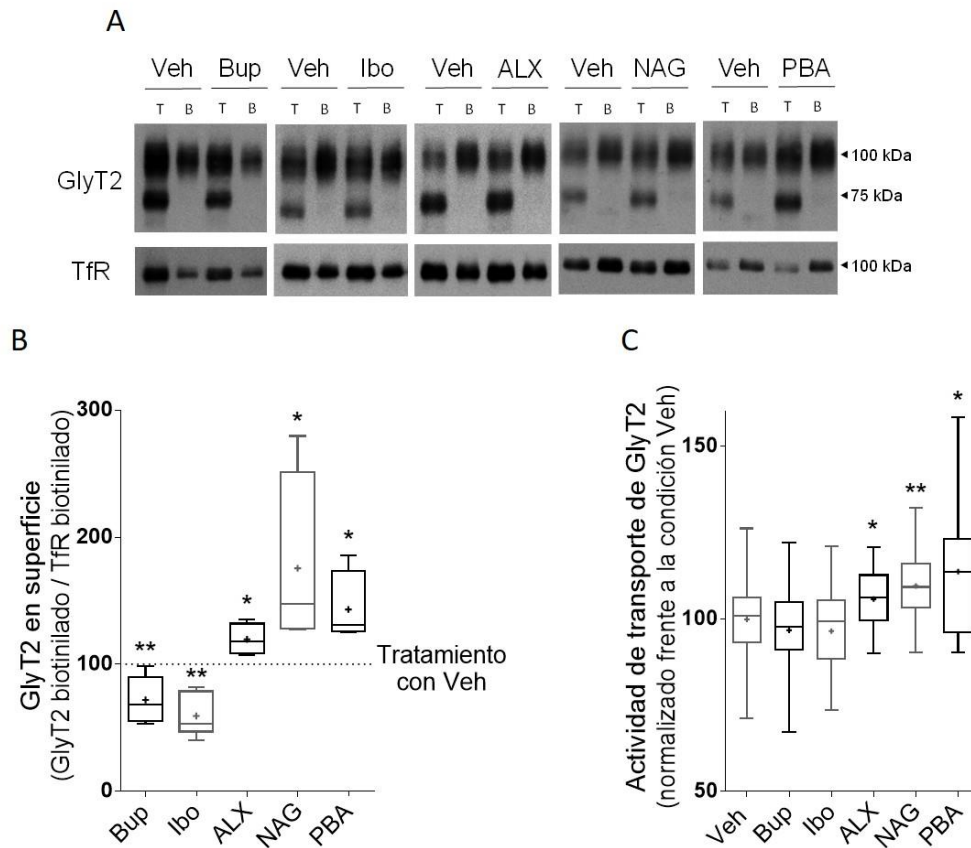


Figura 35. NAG y PBA aumentan la presencia en superficie y actividad de transporte de GlyT2 silvestre expresado en COS-7. Las células COS-7 que expresan GlyT2 silvestre fueron tratadas durante las 48h de biogénesis del transportador con bupropión (Bup) 1 μ M, ibogaína (Ibo) 1 μ M, ALX 1393 (ALX) 10 nM, NAG 10 μ M, PBA 1 mM o sus respectivos vehículos (Veh). Tras el tratamiento, las células fueron sometidas a ensayos de biotinilación de superficie y transporte de [3 H]-Gly. **A)** WB representativo en el que se muestra el efecto de la incubación con los distintos compuestos sobre las fracciones total (T) y biotinilada (B) de GlyT2 silvestre. **B)** Cuantificación de la fracción B de GlyT2 silvestre. TfR fue utilizado como control de carga. El nivel de GlyT2 en superficie viene expresado como porcentaje del obtenido para el tratamiento con Veh en cada caso. ** p (Bup) = 0,0022; ** p (Ibo) = 0,0022; * p (ALX) = 0,0286; * p (NAG) = 0,0286; * p (PBA) = 0,0286; usando la prueba de Kolmogorov-Smirnov. n (Bup) = 6, n (Ibo) = 6, n (ALX) = 4, n (NAG) = 4, n (PBA) = 4. **C)** Actividad de transporte asociada a GlyT2 silvestre. El transporte de Gly viene expresado como porcentaje del obtenido para el tratamiento con Veh en cada caso. ^{ns}p (Bup) = 0,3020; ^{ns}p (Ibo) = 0,2386; * p (ALX) = 0,0489; ** p (NAG) = 0,0046; * p (PBA) = 0,0246; usando la prueba de Kolmogorov-Smirnov. n (Bup) = 26, n (Ibo) = 26, n (ALX) = 23, n (NAG) = 21, n (PBA) = 16.

3.7. NAG tiene efecto inhibitor sobre la actividad de GlyT2 en células COS-7

Como se ha mencionado en la introducción, cuando NAG se aplica desde el medio extracelular durante el ensayo de transporte, la actividad de GlyT2 resulta inhibida a través de una interacción directa con el transportador, lo que se ha comprobado sobre GlyT2 expresado en oocitos de *Xenopus laevis* [105]. Hasta ahora, en este trabajo se había estudiado el efecto sobre la presencia en membrana y actividad de GlyT2 silvestre tras una exposición larga a NAG, pero dado que el compuesto se eliminaba de forma previa a los ensayos de transporte de [3 H]-

Gly, no se había caracterizado el efecto inhibitorio directo sobre la actividad de GlyT2 en las células COS-7.

Para estudiarlo, se llevaron a cabo dos abordajes distintos a la hora de realizar los ensayos de transporte de [³H]-Gly en presencia de concentraciones crecientes de NAG (5-200 μM). En el primero de ellos (**Fig. 36A**), el ensayo de transporte en presencia del NAG se hizo directamente, sin que hubiese un tratamiento previo con el inhibidor, de forma que las células se pusieron en contacto con el medio de transporte que contenía Gly fría, [³H]-Gly y NAG simultáneamente. En el segundo (**Fig. 36B**), se realizó una incubación de 10 min previa al ensayo con NAG a las mismas concentraciones que posteriormente se usarían durante el transporte. Así NAG podía ocupar su sitio de unión en GlyT2 antes de que la Gly se hiciese presente. Como se puede observar en la **Figura 36**, con ambos abordajes la actividad de GlyT2 se redujo de una manera dependiente de la concentración de NAG, aunque el efecto inhibitorio fue más drástico cuando se realizó el pretratamiento. Curiosamente, en el abordaje con pretratamiento, a concentraciones bajas de NAG (5 y 25 μM) se produjo un aumento del transporte de GlyT2 de en torno al 20% (**Fig. 36B**), lo que sugiere la existencia de algún mecanismo complementario al de inhibición.

Con todo ello, estos resultados demuestran que NAG es capaz de inhibir de un modo dependiente de concentración la actividad de GlyT2 en COS-7 cuando se añade al medio extracelular durante los ensayos de transporte de [³H]-Gly.

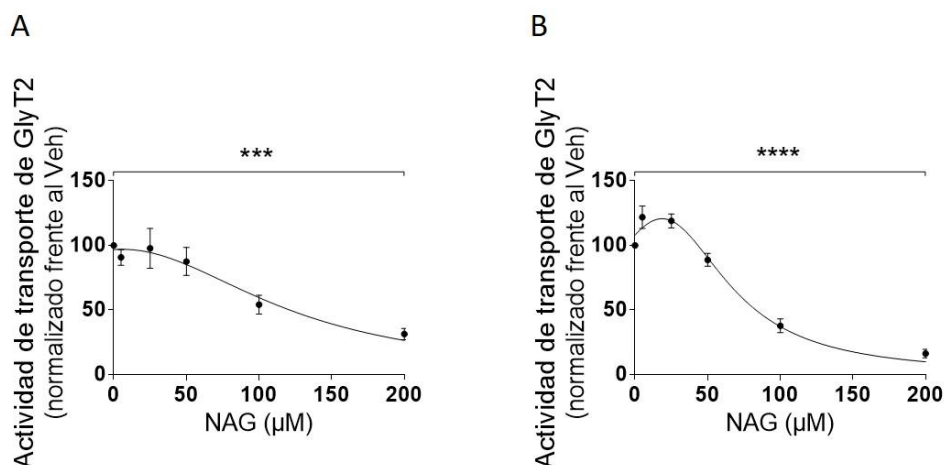


Figura 36. NAG inhibe el transporte de Gly asociado a GlyT2 en células COS-7 de manera dependiente de la concentración. Las células COS-7 que expresan GlyT2 silvestre fueron sometidas a transporte de [³H]-Gly en presencia de NAG a las concentraciones indicadas. **A)** Actividad de transporte asociada a GlyT2 silvestre en presencia de NAG sin un tratamiento previo con el inhibidor. El transporte de Gly viene expresado como porcentaje del obtenido en ausencia de NAG. *** $p = 0,0009$; usando la prueba de Kruskal-Wallis. $n = 6$. **B)** Actividad de transporte asociada a GlyT2 silvestre en presencia de NAG con un tratamiento previo de 10 min con el inhibidor a las mismas concentraciones utilizadas durante el ensayo. El transporte de Gly viene expresado como porcentaje del obtenido en ausencia de NAG. **** $p = 0,0001$; usando la prueba de Kruskal-Wallis. $n = 15$.

3.8. NAG disminuye la interacción de GlyT2 silvestre con CNX en células COS-7

Para proseguir con la caracterización del efecto de NAG sobre GlyT2, se quiso probar si el tratamiento durante 48h con este compuesto a una concentración de 10 μ M producía diferencias en la interacción del transportador silvestre con CNX, de forma que se realizaron ensayos de coimmunoprecipitación en células COS-7. Las diferencias en el grado de asistencia de CNX a GlyT2 durante el tratamiento podrían ser la causa de la mayor expresión en membrana del transportador y podrían proporcionar indicios sobre el mecanismo de actuación de NAG. Como se hizo anteriormente, también se utilizó PBA, aunque esta vez se desconocían los efectos que tendría sobre la interacción de CNX con GlyT2.

Tras el tratamiento con NAG 10 μ M, la cantidad de GlyT2 que coimmunoprecipitó con CNX se redujo a un $57,2 \pm 8,7\%$ de la condición vehículo (**Fig. 37A y 37B**, $n = 4$, $*p = 0,0286$). Además, se observó que la interacción de GlyT2 con CNX dependía de la concentración utilizada de NAG, obteniéndose la máxima reducción de la interacción con 10 μ M (**Fig. 37C**). De forma similar, el tratamiento con PBA 1 mM también produjo una disminución en la cantidad de GlyT2 coimmunoprecipitado con CNX, que llegó a ser del $43,8 \pm 19,9\%$ (**Fig. 37D y 37E**, $n = 3$, $*p = 0,0475$).

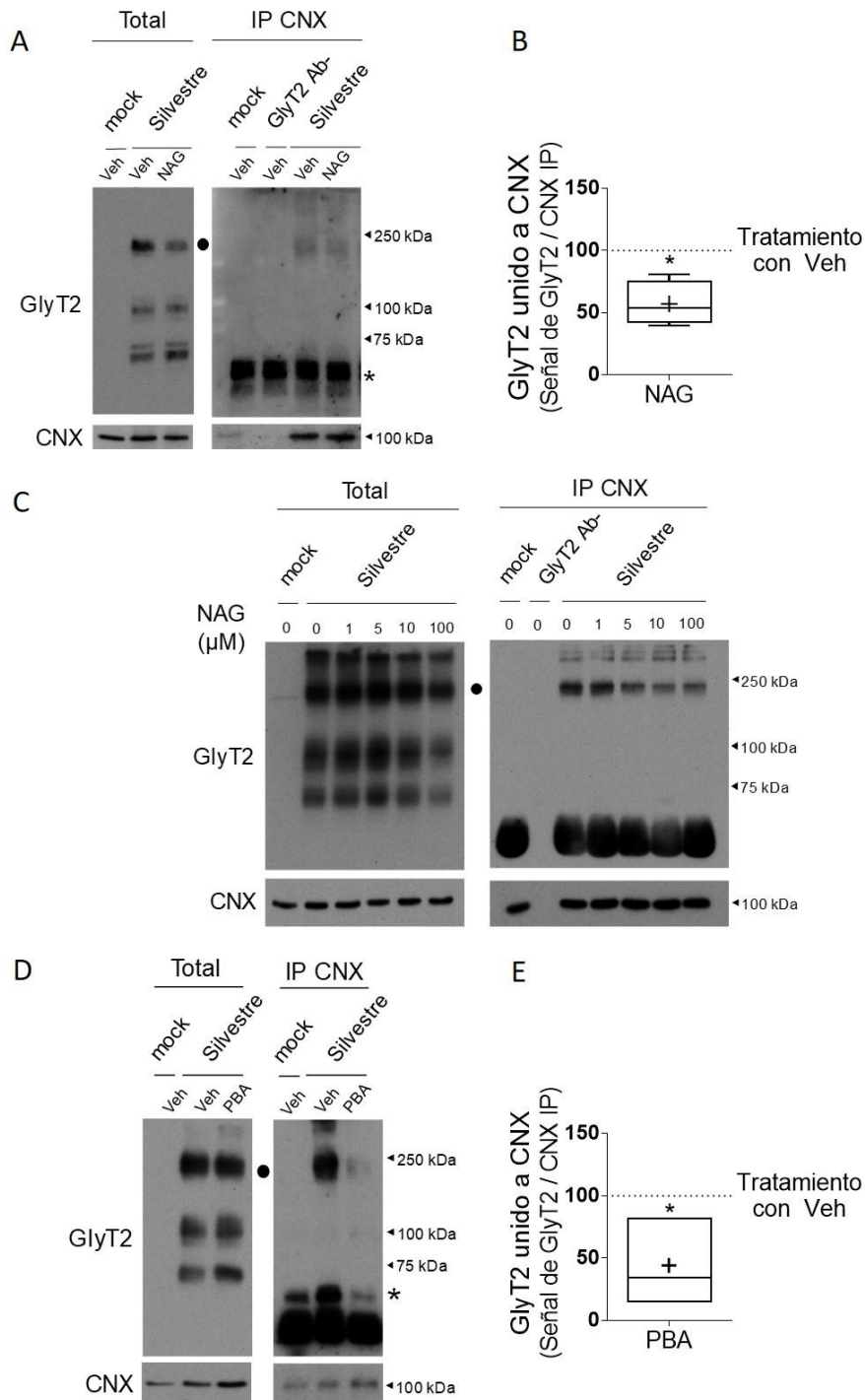


Figura 37. NAG y PBA disminuyen la interacción de GlyT2 silvestre con CNX. Las células COS-7 que expresan GlyT2 silvestre fueron tratadas durante las 48h de biogénesis del transportador con NAG 10 μ M (A, B), NAG a distintas concentraciones (C) o PBA 1 mM (D, E). Tras el tiempo de incubación, las células fueron lisadas y sometidas a inmunoprecipitación con anti-CNX. **A)** WB representativo en el que se muestra el efecto de NAG 10 μ M sobre la unión de GlyT2 a CNX. **B)** Cuantificación de la cantidad de GlyT2 unido a CNX tras el tratamiento con NAG 10 μ M. La cantidad de GlyT2 unido a CNX viene expresada como porcentaje de la cantidad determinada para GlyT2 silvestre. * $p = 0,0286$; usando la prueba de Komogorov-Smirnov. $n = 4$. **C)** WB representativo en el que se muestra el efecto de NAG a concentraciones crecientes sobre la unión de GlyT2 a CNX. **D)** WB representativo en el que se muestra el efecto de PBA 1 mM sobre la unión de GlyT2 a CNX. **E)** Cuantificación de la cantidad de GlyT2 unido a CNX tras el tratamiento con PBA 1 mM. La cantidad de GlyT2 unido a CNX viene expresada como porcentaje de la cantidad determinada para GlyT2 silvestre. * $p = 0,0475$; usando la prueba t de Student desapareada $n = 3$.

3.9. NAG aumenta la actividad y presencia en membrana de A277T e Y707C en neuronas primarias de corteza

A continuación, se quiso determinar si NAG tenía la capacidad de rescatar a los mutantes A277T e Y707C. Para ensayarlo en un sistema más cercano al sistema endógeno de GlyT2, los mutantes fueron expresados en neuronas primarias de corteza cerebral de rata, que se trataron con NAG 10 μ M durante las 48h posteriores a la incubación con el reactivo de transfección (entre DIV 5 y 7).

En neuronas primarias, al igual que se observaba en COS-7, los dos mutantes mostraron una actividad y expresión en membrana reducidas (**Fig. 38A y 38B**, tratamiento con los vehículos). A277T presentó una actividad del $58,6 \pm 4,0\%$ (**Fig. 38A**, $n = 32$, $####p < 0,0001$) con respecto al silvestre y una presencia en membrana del $40,1 \pm 7,7\%$ (**Fig. 38C**, $n = 13$, $##p = 0,0094$). Y707C, por su parte, mostró una actividad y expresión en membrana del $54,2 \pm 4,3\%$ (**Fig. 38A**, $n = 33$, $####p < 0,0001$) y del $31,4 \pm 11,15\%$ (**Fig. 38C**, $n = 7$, $#p = 0,0186$), respectivamente.

En cuanto al resultado de los tratamientos con NAG, se observaron incrementos importantes en la actividad y expresión en superficie de los mutantes A277T e Y707C (**Fig. 38A y 38B**, tratamiento con NAG). El transporte y presencia en membrana de A277T aumentaron hasta llegar a un $148,8 \pm 14,8\%$ (**Fig. 38A**, $n = 18$, $****p < 0,0001$) y un $260,5 \pm 87,2\%$ (**Fig. 38C**, $n = 5$, $**p = 0,0033$) del silvestre, respectivamente; mientras que, en el caso de Y707C, se determinó una actividad del $129,3 \pm 13,8\%$ (**Fig. 38A**, $n = 18$, $****p < 0,0001$) con respecto al silvestre y una expresión en membrana del $337,4 \pm 99,0\%$ (**Fig. 38C**, $n = 5$, $**p = 0,0028$).

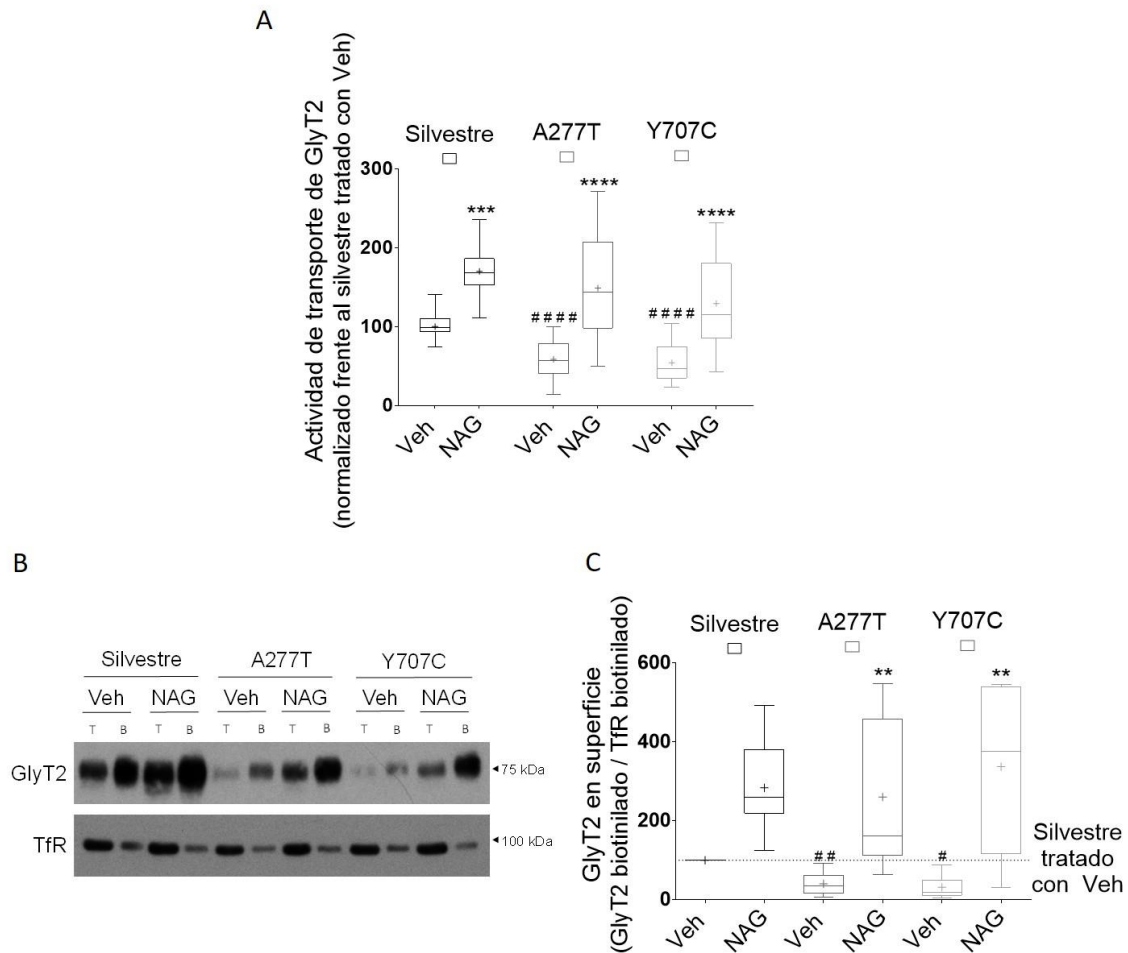


Figura 38. NAG aumenta la presencia en superficie y actividad de transporte de los mutantes A277T e Y707C en neuronas corticales. Las neuronas corticales de rata que expresan GlyT2 silvestre, A277T o Y707C fueron tratadas durante las 48h de biogénesis de los transportadores con NAG 10 μ M. Tras el tratamiento, las células fueron sometidas a ensayos de transporte de [3 H]-Gly y biotinilación de superficie. **A)** Actividad de transporte asociada a GlyT2. El transporte de Gly viene expresado como porcentaje del obtenido para GlyT2 silvestre tratado con vehículo (Veh). Las almohadillas (#) marcan diferencias estadísticamente significativas obtenidas al comparar la condición Veh del transportador silvestre frente a la condición Veh de los mutantes A277T o Y707C. #### $p < 0,0001$; usando la prueba de comparación múltiple de Dunn. n (Silvestre + Veh) = 46, n (A277T + Veh) = 32, n (Y707C + Veh) = 33. Los asteriscos (*) marcan diferencias estadísticamente significativas determinadas al comparar la condición Veh y condición NAG de cada variante. **** p (Silvestre + NAG) = 0,0004; **** p (A277T + NAG) < 0,0001; **** p (Y707C + NAG) < 0,0001; usando la prueba de comparación múltiple de Dunn. n (Silvestre + NAG) = 25, n (A277T + NAG) = 18, n (Y707C + NAG) = 18. **B)** WB representativo en el que se muestra el efecto de la incubación con NAG 10 μ M sobre las fracciones total (T) y biotinilada (B) de GlyT2. **C)** Cuantificación de la fracción B de GlyT2. TfR fue utilizado como control de carga. El nivel de GlyT2 en superficie viene expresado como porcentaje del determinado para el silvestre tratado con Veh. Almohadillas (#) y asteriscos (*) señalan lo mismo que en (A). ## p (A277T + Veh) = 0,0094; # p (Y707C + Veh) = 0,0186; ** p (A277T + NAG) = 0,0033; ** p (Y707C + NAG) = 0,0028; usando la prueba de comparación múltiple de Dunn. (Silvestre + Veh) = 15, n (A277T + Veh) = 13, n (Y707C + Veh) = 7, n (Silvestre + NAG) = 8, n (A277T + NAG) = 5, n (Y707C + NAG) = 5.

Además, con el objetivo de estudiar si la capacidad de NAG de mejorar la función de GlyT2 se debía a un mecanismo específico, también se analizó el efecto de este compuesto sobre el transportador homólogo GlyT1 en las mismas condiciones en las que había aumentado la actividad y expresión de los mutantes A277T e Y707C. A nivel de actividad, el tratamiento

durante 48h con NAG 10 μ M aumentó el transporte de Gly asociado a GlyT1, aunque en menor medida que para GlyT2, alcanzándose unos valores del $112,4 \pm 3,2\%$ respecto al tratamiento con su vehículo (**Fig. 39A**, $n = 9$, $**p = 0,0056$). Sin embargo, la expresión en superficie sí que se vio aumentada por el tratamiento de modo similar a GlyT2, cuantificándose en un $330,6 \pm 60,1\%$ (**Fig. 39B y 39C**, $n = 3$, $*p = 0,0185$).

Con todo esto, los resultados sugieren que NAG tiene capacidad real de mejorar la expresión en membrana y función de los mutantes A277T e Y707C. Sin embargo, dado que NAG también es capaz de aumentar la presencia en superficie de GlyT1, así como de producir incrementos moderados en su actividad, es probable que el mecanismo que subyace al efecto observado sobre las variantes de GlyT2 no se deba a un mecanismo específico sobre este transportador.

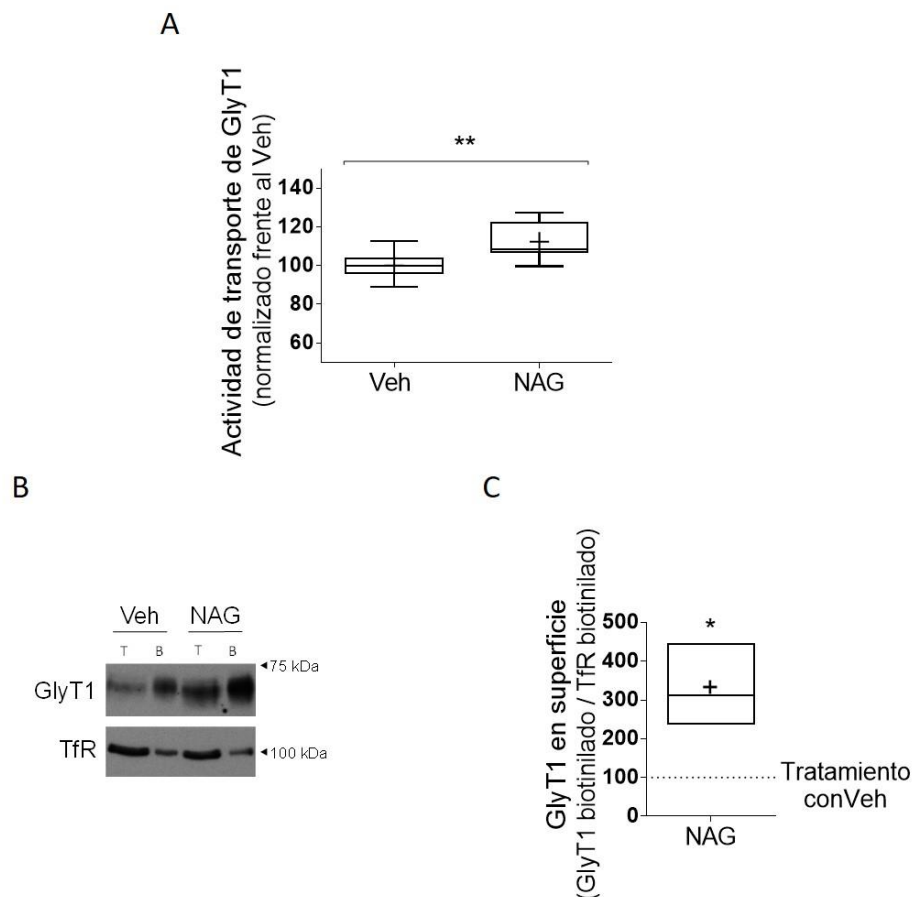


Figura 39. NAG también aumenta la presencia en superficie y actividad de GlyT1 en neuronas corticales. Las neuronas corticales de rata que expresan GlyT1 fueron tratadas durante las 48h de biogénesis del transportador con NAG 10 μ M. Tras el tratamiento, las células fueron sometidas a ensayos de transporte de [3 H]-Gly y biotinilación de superficie. **A)** Actividad de transporte asociada a GlyT1. El transporte de Gly viene expresado como porcentaje del obtenido para el tratamiento con vehículo (Veh). $**p = 0,0056$; usando la prueba U de Mann-Whitney. $n = 9$. **B)** WB representativo en el que se muestra el efecto de la incubación con NAG 10 μ M sobre las fracciones total (T) y biotinilada (B) de GlyT1. **C)** Cuantificación de la fracción B de GlyT1. TfR fue utilizado como control de carga. El nivel de GlyT2 en superficie viene expresado como porcentaje de la cantidad determinada para el tratamiento con Veh. $*p = 0,0185$; usando la prueba t de Student despareada. $n = 3$.

3.10. NAG promueve la salida de RE de A277T e Y707C en neuronas primarias de corteza

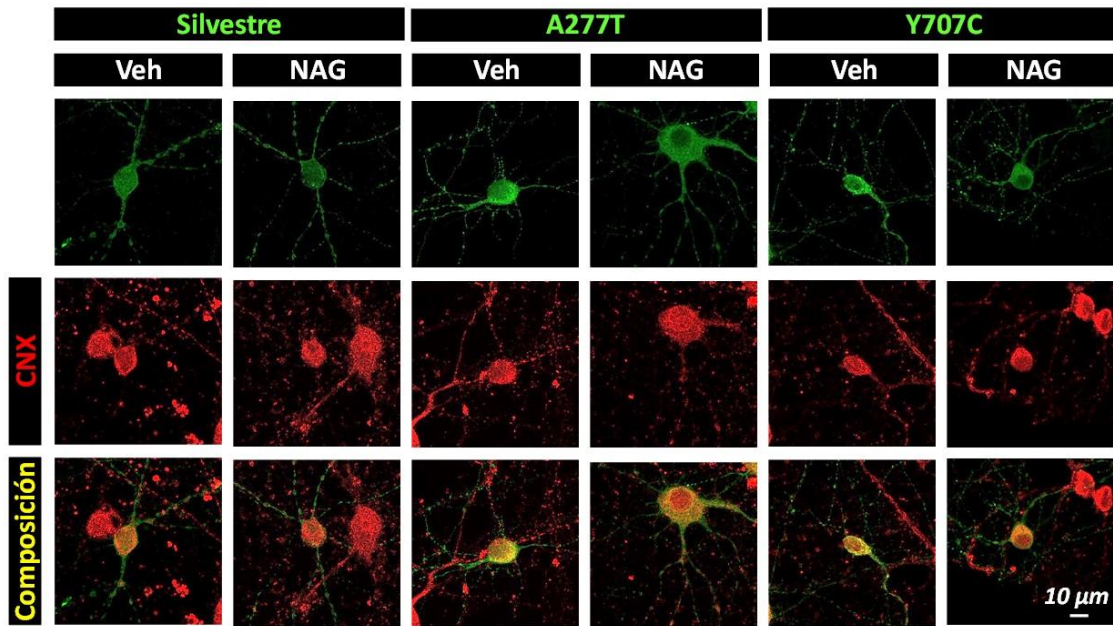
Finalmente, se quiso estudiar cómo influía el tratamiento con NAG sobre el grado de retención en RE de los mutantes A277T e Y707C. Una vez más, se utilizaron neuronas primarias de corteza cerebral de rata, que fueron transfectadas con GlyT2 silvestre o con las variantes A277T e Y707C y tratadas con NAG 10 μ M durante las 48h posteriores a la transfección. Tras el tratamiento, las neuronas se sometieron a doble inmunocitofluorescencia utilizando anticuerpos frente a GlyT2 y CNX. El grado de retención en RE se determinó utilizando el coeficiente de colocalización de Manders.

Como era de esperar, en las células no tratadas ambos mutantes presentaron cierto grado de retención en el RE, colocalizando con CNX alrededor de un 30% más que el transportador silvestre (**Fig. 40A**). En concreto, A277T e Y707C colocalizaron con CNX un $128,3 \pm 6,2\%$ y un $135,2 \pm 6,9\%$, respectivamente (**Fig. 40B**, n (A277T + Veh) = 29, n (Y707C + Veh) = 29, #p (A277T) = 0,0234, ##p (Y707C) = 0,0025), valores muy cercanos a los determinados en COS-7 (**Fig. 30**).

En cuanto a las neuronas tratadas, NAG redujo el grado de solapamiento de los mutantes con CNX a los niveles del transportador silvestre en condiciones control. De esta forma, el solapamiento con CNX de A277T e Y707C se redujo, llegándose a un $94,9 \pm 5,0\%$ y a un $105,6 \pm 7,0\%$ del solapamiento mostrado por el transportador silvestre, respectivamente (**Fig. 40B**, n (A277T + NAG) = 33, n (Y707C + NAG) = 32, **p (A277T) = 0,0016, **p (Y707C) = 0,0075).

En conclusión, estos resultados sugieren que NAG está promoviendo el aumento de la actividad de los mutantes A277T e Y707C mediante la reducción de su retención en RE y el consecuente aumento de su expresión en membrana plasmática.

A



B

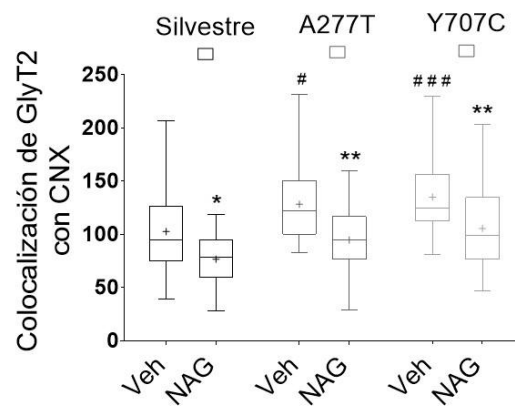


Figura 40. NAG disminuye la colocalización de los mutantes A277T e Y707C con CNX en neuronas corticales. A) Las neuronas corticales de rata que expresan GlyT2 silvestre, A277T o Y707C fueron tratadas durante las 48h de biogénesis de los transportadores con NAG 10 μM. Tras el tratamiento, las células se sometieron a una doble inmunocitofluorescencia utilizando anticuerpos frente a GlyT2 y CNX. **B)** Grado de colocalización de GlyT2 silvestre y mutantes con CNX determinado mediante el coeficiente de solapamiento de Manders. El coeficiente de solapamiento de Manders determina la proporción de solapamiento de un canal sobre otro; en este caso, la proporción del canal verde (GlyT2) que solapaba sobre el canal rojo (CNX). El grado de colocalización viene expresado como porcentaje del determinado para GlyT2 silvestre tratado con vehículo (Veh). Las almohadillas (#) marcan diferencias estadísticamente significativas obtenidas al comparar la condición Veh del transportador silvestre frente a la condición Veh de los mutantes A277T o Y707C. # p (A277T) = 0,0234, ## p (Y707C) = 0,0025; usando la prueba de comparaciones múltiples de Holm-Sidak. n (Silvestre + Veh) = 32, n (A277T + Veh) = 29, n (Y707C + Veh) = 29. Los asteriscos (*) marcan diferencias estadísticamente significativas determinadas al comparar la condición Veh y condición NAG de cada variante. ** p (A277T + NAG) = 0,0016; ** p (Y707C + NAG) = 0,0075; usando la prueba de comparaciones múltiples de Holm-Sidak. n (Silvestre + NAG) = 31, n (A277T + NAG) = 33, n (Y707C + NAG) = 32.

Discusión

1. Estudio de una posible modulación funcional de GlyT2 a través de la ruta de señalización de Hh

Los datos recogidos en la primera parte del Bloque I de resultados muestran que la activación con purmorfamina del receptor Smo en neuronas de tallo cerebral y médula espinal de rata promueve la disminución de la actividad y de los niveles de proteína de GlyT2 de una manera dependiente del tiempo y de la concentración. Esta regulación se ha corroborado en embriones de pez cebra, donde se ha demostrado que la inhibición de Smo con ciclopamina aumenta los niveles proteicos del transportador. Con todo ello, estos resultados proporcionan los primeros indicios tanto *in vitro* como *in vivo* de la modulación de GlyT2 por la vía de señalización de Hh.

Los resultados obtenidos en neuronas mediante qPCR y ensayo de ubiquitinación sugieren que la modulación a través de la señalización de Smo afecta a GlyT2 tanto a nivel transcripcional/postranscripcional como a nivel postraduccion. No obstante, tras 16h de tratamiento con purmorfamina, es la ubiquitinación del transportador el mecanismo predominante en la regulación, puesto que los ensayos en presencia de PYR 41 producen la recuperación total de la expresión proteica del transportador y la disminución de los niveles de mRNA observada, aunque es del 30%, queda lejos de la caída determinada a nivel de proteína y de actividad. A falta de determinar los niveles del mRNA de GlyT2 a tiempos de tratamiento más largos para poder sacar una conclusión definitiva, quizá la regulación del transportador a nivel transcripcional/postranscripcional sea un mecanismo secundario que tenga un efecto sobre su actividad y expresión proteica a largo plazo. Por tanto, aunque sea aventurado con los datos actuales, es razonable pensar que Smo promueva no solo la degradación del GlyT2 a través de su ubiquitinación, sino también la modulación de sus niveles de mRNA para asegurar una reducción total de su actividad.

Como ya se ha comentado anteriormente, la ruta de señalización de Hh en vertebrados se inicia cuando uno de los ligandos Hh se une a Ptch y este receptor desreprime la función de Smo [56]. En los abordajes llevados a cabo en esta Tesis Doctoral, al utilizar purmorfamina o ciclopamina, se ha actuado directamente sobre Smo y, dado que los tres ligandos Hh convergen en la activación de este receptor [57, 58], no se han aportado indicios sobre cuál de ellos regula la función de GlyT2 de forma fisiológica o si todos lo hacen. Sin embargo, teniendo en cuenta las funciones descritas para los tres ligandos, es posible hipotetizar sobre ello. Es poco probable que Dhh module a GlyT2, puesto que no se han descrito funciones en SNC y su acción parece estar restringida a la regulación de procesos en las gónadas y a la promoción de la supervivencia y

mielinización de axones de nervios periféricos tras su liberación por las células de Schwann [57, 193]. *Ihh*, por su parte, sí que se ha relacionado con procesos en SNC, pero la bibliografía es escasa. Entre las funciones descritas, *Ihh* se ha demostrado imprescindible en pez cebra para la generación de progenitores de oligodendrocitos a partir de los precursores de motoneuronas [174] y, además, se ha propuesto que es responsable de una adquisición parcial del fenotipo ventral en la médula espinal de embriones de ratón deficientes en *Shh*, aunque su contribución es dudosa cuando *Shh* está activa [194]. Con todo ello, aunque sus funciones puedan solapar con las de *Shh*, y teniendo en cuenta que solo está demostrada la acción de *Ihh* sobre una población limitada de células durante el desarrollo de la médula espinal, es poco plausible que *Ihh* module de forma fisiológica a GlyT2. Finalmente, las funciones de *Shh* en SNC están ampliamente descritas, estando bien caracterizada su implicación en la adquisición de un fenotipo ventral durante el desarrollo del tubo neural a través de la modulación de la proliferación celular, especificación y guía axonal [195-197]; pero también su papel en adultos, donde controla la fisiología sináptica entre otras funciones [62, 198, 199]. Se ha descubierto que la ruta de *Shh* regula la función sináptica excitadora: sus componentes están presentes en terminales presinápticos [196, 200, 201] y su activación aumenta la frecuencia de las corrientes postsinápticas excitadoras [196]. También se ha demostrado que la activación de la vía de *Shh* inhibe la actividad de los transportadores de Glu EAAC1 y GLT1, provocando grandes aumentos extracelulares de Glu que dan lugar a desequilibrios en los circuitos neuronales y convulsiones [185, 202]. Con respecto a la neurotransmisión glicinérgica inhibitoria, no está descrito si *Shh* modula su función. Sin embargo, teniendo en cuenta que *Smo* controla la expresión de GlyT2 y que *Shh* modula la biología de las sinapsis excitadoras, es probable que *Shh* también regule sinapsis glicinérgicas inhibitorias. Por tanto, cabe esperar que *Shh* sea el ligando de *Hh* que regule de forma fisiológica la expresión de GlyT2. En todo caso, futuros trabajos esclarecerán esta cuestión.

El pez cebra expresa homólogos para más del 70% de los genes humanos, lo que hace de él un buen modelo animal para obtener resultados que puedan ser trasladados a seres humanos [203]. Además, los distintos tipos de neurotransmisión también están conservados y las propiedades de las sinapsis glicinérgicas son muy similares a las observadas en mamíferos. Por ejemplo, ciertas mutaciones en GlyT1 de pez cebra producen una transmisión glicinérgica excesiva como consecuencia de una menor recaptura de Gly [204, 205], defectos en la función de GlyR producen un fenotipo similar al de hiperplexia [206, 207] y GlyT2 puede ser usado como marcador fiable de neuronas glicinérgicas [53]. En este trabajo se han realizado tratamientos de 24h con ciclopamina en embriones de pez cebra entre las 24 y las 48 hpf, determinándose por WB un aumento de la expresión proteica total de GlyT2, y por inmunohistofluorescencia un

aumento del transportador en secciones transversales de la médula espinal. Estos resultados son comparables a los obtenidos en neuronas primarias de rata, en los que la administración de ciclopamina evitaba la reducción de los niveles de GlyT2 promovida por purmorfamina, y sugieren que la vía de Hh modula de forma fisiológica la expresión del transportador durante el desarrollo. En pez cebra los eventos clave para el desarrollo del SNC están conservados y ocurren en las primeras 120 hpf (5 dpf): el cierre del tubo neural se produce alrededor de las 16 hpf, la proliferación neuronal entre las 12 y 84 hpf, y la migración neuronal entre las 18 y 96 hpf [208, 209]. En cuanto a los elementos de la neurotransmisión glicinérgica, el mRNA de GlyT2 se empieza a expresar a las 20 hpf [53, 54] y el de la subunidad $\alpha 1$ del GlyR, que parece ser la subunidad con un papel central en la función motora del pez, se expresa a partir de las 24 hpf [210]. Los tratamientos realizados en este trabajo se han hecho en la ventana de las 24 a las 48 hpf, un lapso de tiempo que puede ser clave para la correcta expresión de GlyT2 y diferenciación de las neuronas glicinérgicas. En este sentido, previamente se ha propuesto que GlyT2 podría tener un papel en la maduración de las sinapsis glicinérgicas [6], lo que, de confirmarse, haría de la modulación del transportador por parte de la vía de Hh un mecanismo relevante en la correcta especificación de los circuitos glicinérgicos durante el desarrollo.

En definitiva, los resultados aquí mostrados indican que la vía de Hh regula la expresión de GlyT2 y que este es un mecanismo conservado, que ocurre tanto *in vitro* como *in vivo* en neuronas glicinérgicas de diferentes especies de vertebrados. La relevancia de este mecanismo tendrá que ser explorada en trabajos futuros.

2. Análisis del papel de las E3 ubiquitín ligasas LNX1 y LNX2 en la regulación de GlyT2

La segunda parte del Bloque I de resultados de la Tesis Doctoral que aquí se presenta proporciona evidencias que demuestran que las E3 ubiquitín ligasas LNX1 y LNX2 regulan la función de GlyT2 en el sistema heterólogo COS-7. Los resultados de coimmunoprecipitación, ubiquitinación y transporte de Gly revelan que LNX1 y LNX2 son capaces de interactuar con GlyT2 y ubiquitinar un grupo de Lys del C-t del transportador para controlar su expresión y actividad. Además, mediante el silenciamiento de LNX2 en cultivos primarios de médula espinal y tallo cerebral, el sistema endógeno de expresión de GlyT2, se ha demostrado que LNX2 controla la expresión del transportador tanto en condiciones basales como tras la activación de PKC. Por tanto, estos resultados han permitido identificar por primera vez a una E3 ubiquitín ligasa que controla la ubiquitinación, niveles de expresión y actividad de GlyT2, lo que sugiere que LNX2 puede tener un papel fisiológico en el control de la transmisión glicinérgica.

A pesar de haber observado la interacción, ubiquitinación y degradación de GlyT2 por parte de LNX1-p80 en un sistema heterólogo, no se pudo detectar el mensajero de esta isoforma en neuronas de médula espinal y tallo cerebral, lo cual concuerda con lo descrito por otros autores, que nunca han podido detectar ni el mRNA ni la proteína de LNX1-p80 en SNC [141, 143, 148]. Curiosamente, aunque no se ha encontrado en SNC, sí que se ha demostrado por inmunofluorescencia la presencia de esta variante en células de Schwann perisinápticas de la unión neuromuscular [143]. La falta de la isoforma p80 en el sistema endógeno de expresión de GlyT2 indicaría, por tanto, que esta E3 ubiquitín ligasa no está regulando a través de ubiquitinación la función de GlyT2 de forma fisiológica. En cuanto a la ubiquitinación y degradación de GlyT2 por parte de LNX1-p80 que se observa en células COS-7, es probable que se deba a su homología con LNX2, ya que sus dominios RING presentan un 73% de identidad y un 83% de similitud de secuencia [142]. A pesar de todo, los resultados obtenidos con LNX1-p80 y GlyT2 en sistema heterólogo abren la puerta a explorar la interacción de esta isoforma con otros transportadores homólogos a GlyT2, siendo quizá un primer candidato GlyT1, ya que está estrechamente relacionado con GlyT2 y se expresa en tejidos periféricos como riñón o pulmón, donde también está presente LNX1-p80 [141, 211]. Lo que sí podría tener una relevancia fisiológica es la interacción de GlyT2 con la isoforma p70. Esta es la isoforma corta de LNX1, que carece del dominio RING, se expresa exclusivamente en SNC [141] y cuya interacción con GlyT2 se ha demostrado en COS-7 pero no se ha estudiado en profundidad. Dado que LNX1 y LNX2 tienen múltiples dominios PDZ y se ha sugerido que actúan como proteínas de andamiaje molecular [142], se podría especular con que LNX1-p70 (y también LNX2) formase complejos multimoleculares con GlyT2 y distintas proteínas de su interactoma para coordinar de forma precisa su localización subcelular y función. Anteriormente se ha demostrado la interacción de GlyT2 con distintas proteínas presinápticas, entre las que se incluyen STX1A [130], las ATPasas de Ca^{2+} de membrana plasmática PMCA2 y PMCA3 [128] y las subunidades $\alpha 3$ y $\beta 2$ de la NKA [127], de forma que es plausible que p70 actúe como proteína de andamiaje para favorecer la interacción de estas proteínas con GlyT2. En ese sentido, futuros trabajos podrían centrarse en descubrir la función fisiológica de la interacción de GlyT2 con p70 o, incluso, con p62, la otra isoforma sin dominio RING y cuya expresión en médula espinal parece ser mayor que la de p70 [143].

LNX2, por su parte, sí que parece tener una relevancia fisiológica en la regulación de GlyT2 a través de su actividad E3 ubiquitín ligasa, como sugieren los experimentos realizados con shRNA en neuronas de médula espinal y tallo cerebral. Sin embargo, es esencial entender en qué condiciones una sinapsis glicinérgica puede modular a LNX2 para controlar la recaptura presináptica de Gly por parte de GlyT2. Los dominios PDZ2 y PDZ4 de LNX1 interactúan con

PKC α [180, 212], la isoforma de esta kinasa dependiente de Ca²⁺, cuya función como regulador de la plasticidad presináptica ha sido ampliamente estudiada [184]. Los resultados que se muestran aquí indican que la activación de PKC con PMA acelera la ubiquitinación de GlyT2 a través de LNX2, sugiriendo que este puede ser un mecanismo adicional que contribuye a los efectos que PKC tiene sobre la transmisión glicinérgica [213]. Puesto que otros transportadores de neurotransmisores también son regulados por PKC [214-218] y ubiquitinación [215, 219, 220], es posible que LNX2 medie en la regulación de estos transportadores promovida por la activación de PKC. A nivel de mecanismo, aún queda por esclarecer de qué manera PKC promueve la degradación de GlyT2 a través de LNX2. Puesto que en células COS-7 el mutante 4KR de GlyT2 es insensible a la modulación causada por la sobreexpresión de LNX2 y este mutante carece de la Lys 791 necesaria para la degradación promovida por la activación de PKC [131], al menos esta Lys debe ser ubiquitinada por LNX2 para que se produzca el proceso. Sobre el evento que desencadena la acción de LNX2 sobre GlyT2, podría tratarse de una fosforilación, aunque habría que determinar si afecta a LNX2, a GlyT2 o a alguna otra proteína que también medie en el proceso. PKC es una serina (Ser)/treonina (Thr) kinasa y para LNX1 y LNX2 no se ha demostrado la presencia en su estructura de ningún motivo susceptible de ser fosforilado por ella y ni siquiera se ha caracterizado en profundidad ningún tipo de regulación de estas ligasas a través de fosforilación. Únicamente se ha descrito la fosforilación de LNX1 en su N-t tras su coexpresión en HEK 293 con la tirosina (Tyr) kinasa c-Src, aunque no se ha demostrado su relevancia fisiológica [221]. Aun así, al ser un campo prácticamente inexplorado, no hay que descartar que existan Ser y Thr en LNX2 susceptibles de ser fosforiladas por PKC. Con respecto a GlyT2, sí que se han encontrado sitios potenciales de fosforilación por PKC en el N-t [222] o en el IL 2 [223]. No obstante, el sitio potencial del N-t no ha sido explorado y los resultados obtenidos en nuestro laboratorio al sustituir la Thr 419 y la Ser 420 consenso del dominio IL 2 descartan la fosforilación por PKC en esta secuencia de GlyT2 [223]. A falta de estudiar otros posibles sitios consenso, no parece muy probable que una fosforilación directa de GlyT2 por PKC sea el evento que desencadene la acción de LNX2, sobre todo teniendo en cuenta los trabajos realizados en GlyT1 y DAT, donde la eliminación de todos los sitios potenciales de fosforilación por PKC no evita el efecto inhibitorio observado tras tratar con PMA [224, 225].

Por otro lado, LNX2 no parece estar implicada en la modulación de GlyT2 promovida por la activación de la vía de Hh, como indican los resultados obtenidos en neuronas deficientes en LNX2, donde la degradación del transportador provocada por el tratamiento de 16h con purmorfamina se sigue produciendo. Este resultado indicaría que el control de la actividad de GlyT2 por parte de LNX2 y, por tanto, el papel de esta E3 ubiquitín ligasa como moduladora de la neurotransmisión glicinérgica inhibitoria, depende del contexto neuronal. Por otro lado,

también se exploró si PKC estaba implicada en la degradación mediada por Hh, puesto que, además del efecto conocido sobre GlyT2 [131, 132, 181], previamente se había descrito que la activación de Shh induce la ubiquitinación y degradación de GLT1 vía PKC en astrocitos [185]. Sin embargo, la degradación de GlyT2 se mantuvo en las neuronas donde además de purmorfamina se utilizó el inhibidor de PKC, lo que sugiere que el mecanismo que modula a GlyT2 es independiente de esta kinasa y diferente al que modula a GLT1.

Una característica de las proteínas LNX es que, aunque los niveles de mRNA son fácilmente detectables, la cantidad de proteína presente en distintos tejidos es escasa, de forma que para poder detectarlas se tenga normalmente que recurrir a la inmunoprecipitación [143, 151, 152, 155, 226]. Durante la realización de este trabajo se utilizaron distintos anticuerpos comerciales frente a las LNX. Sin embargo, estos anticuerpos solo funcionaron tras la sobreexpresión de construcciones de LNX1 o LNX2 unidas a Myc o FLAG y los mejores resultados, que son los que se han mostrado en las figuras de esta Tesis Doctoral, se obtuvieron con anticuerpos frente a estas etiquetas. El mantenimiento de unos niveles bajos de proteína puede representar una forma de regulación de su actividad, de manera que cuando es necesaria su función, se disparen mecanismos para la producción de más proteína a partir del mRNA ya existente. En el caso de LNX1-p70, existe un marco de lectura abierto en la región no traducida 5' (uORF) de su mRNA [143]. Los uORFs evitan la traducción de la secuencia principal por parte de los ribosomas, y aunque se ha sugerido que la síntesis de LNX1-p70 es regulada a través de este mecanismo, parece que no regula ni a LNX1-p80 ni LNX2, habiéndose propuesto para ellos una regulación de su expresión a nivel postraducciona [143]. Curiosamente, Nayak y Sivaraman demostraron que LNX2 se autoubiquitinaba y que esto reducía su capacidad de ubiquitinar a NUMB en ensayos *in vitro*, aunque no aportaron ningún indicio de que pudiese afectar a su estabilidad [138]. Independientemente de esto, LNX2 también podría tener algún tipo de regulación a nivel de mRNA, puesto que se identificó como una posible diana del miRNA miR-939 [227]. En general, el control estricto de los niveles proteicos no es exclusivo de las proteínas LNX y, de hecho, ha sido previamente descrito que un incremento temporal en la traducción de un mRNA ya existente puede ser un mecanismo de adaptación a corto plazo [228]. En el caso de las E3 ubiquitin ligasas, sus interacciones se dan de manera constitutiva en muchos casos, de forma que la regulación de su función se produce a nivel de transcripción, traducción o degradación [229].

En definitiva, con los resultados que se presentan en esta Tesis Doctoral se ha incluido a GlyT2 entre las dianas de las LNX relacionadas con la función sináptica como CAST [149, 150], liprina- α 1 [149] o conexina36 [148] y apuntan a un papel de estas E3 ubiquitin ligasas en la regulación de la neurotransmisión glicinérgica inhibidora. Por un lado, ha quedado demostrada

la capacidad de las LNX de ubiquitinar y promover la degradación al transportador, de forma que LNX2 podría tener un papel importante en la modulación de la función sináptica. Por otro lado, dado que las LNX presentan 4 dominios PDZ para su interacción simultánea con diversas dianas [141, 142], se abre la puerta a explorar el papel de estas E3 ubiquitín ligasas como moléculas de andamiaje en la organización subcelular de GlyT2 y otras proteínas de la presinapsis glicinérgica. Futuros trabajos con LNX1-p70, LNX1-p62 o LNX2 resolverán esta cuestión.

3. Caracterización de mutantes asociados a hiperplexia y búsqueda de compuestos capaces de rescatar su fenotipo

Finalmente, en el Bloque II de resultados se ha demostrado que las variantes A277T e Y707C, expresadas en COS-7 y en neuronas de corteza, presentan una actividad de transporte de Gly y una expresión en membrana plasmática disminuidas, siendo consecuencia, en parte, de su retención en RE. Dado que estos mutantes de rata presentan una disminución en su actividad similar a la observada para los homólogos humanos asociados a hiperplexia, A275T e Y705C, los defectos descritos en este trabajo podrían ser atribuibles a las variantes humanas y aportarían nueva información sobre las bases moleculares que sustentan la función deficitaria de estos mutantes.

En particular, A277T parece sufrir una retención relativamente severa en el RE de células COS-7, como demuestran su mayor asociación con CNX (alrededor de 3 veces) y su menor interacción con Sec24D (la mitad) en comparación con el transportador silvestre. Sin embargo, esta retención es menos importante que la determinada para el mutante S512R (homólogo de rata de la variante S510R asociada a hiperplexia), para el cual, además de no observarse presencia en membrana, se determinó una asociación mucho más estrecha con CNX (alrededor de 6 veces mayor que el silvestre) y una interacción con Sec24D bastante menor (en torno a 4 veces menor que el silvestre) [47]. Además, en este trabajo también se demostró un efecto dominante negativo de la variante S512R sobre el tráfico de GlyT2 silvestre, lo cual no se ha ensayado para el mutante A277T pero sí que se estudió para el homólogo humano A275T [43]. En el artículo en el que se descubrió esta mutación, Carta y colaboradores no observaron una reducción sustancial del transporte de Gly cuando A275T y el transportador silvestre se coexpresaban en HEK 293, lo que los llevó a sugerir que, al menos *in vitro*, no había un efecto dominante negativo. Sin embargo, dado que en el paciente portador no se encontró afectado el otro alelo y el padre, que también portaba la mutación, presentaba sobresaltos, los autores

sugirieron que *in vivo* sí que debía de haber efecto dominante negativo [43]. Sea como sea, la mutación A277T debe causar alteraciones graves en el plegamiento de GlyT2 que promueven su retención en RE, lo cual es muy probable si este mutante tiene afectada su interacción con Na⁺ y podría tener alterado el sitio de unión a Gly como se ha predicho para A275T [43].

Las inmunocitofluorescencias realizadas en COS-7 y neuronas de corteza demostraron que Y707C colocaliza con CNX en la misma proporción que A277T y que, por tanto, ambos mutantes presentan una retención en RE. Sin embargo, al contrario que para el mutante A277T, los experimentos de inmunoprecipitación no mostraron ni una mayor ubiquitinación de Y707C tras el tratamiento con MG-132 en relación al fenotipo silvestre ni pudieron demostrar una menor interacción con Sec24D. Cuando se describió la mutación Y705C, se demostró que la Cys introducida impedía al transportador llegar a membrana debido a la disrupción de un puente disulfuro del EL 2 establecido entre la Cys 311 y la Cys 320. Sin embargo, no se especificó de qué manera ocurría esto y no se observó colocalización clara de Y705C con marcadores de RE, aparato de Golgi o endosomas, lo que llevó a sugerir que el mutante no estaba retenido en un compartimento concreto de la vía secretora, sino que progresaba a lo largo del sistema endomembrana de forma más lenta [46]. Teniendo en cuenta todos estos resultados y dado que la interacción de Y707C con Sec24D fue un $14,2 \pm 22,6\%$ menor que la del silvestre, aunque no estadísticamente significativa, cabe pensar que este mutante sufre una retención en RE menos severa que A277T, quizá por defectos menores en su plegamiento. Es posible que la Tyr sustituida, que es accesible desde el exterior ya que se encuentra en la porción C-t del TM 11, muy cerca de la cara extracelular del transportador [46], no tenga un papel fundamental en el plegamiento del núcleo del transportador. Aun así, en cómputo global, la presencia en membrana plasmática de los mutantes A277T e Y707C está reducida de forma similar, de manera que el mutante Y707C debe sufrir retenciones en otros componentes del sistema endomembrana que sean más graves que en el caso de A277T.

Con independencia de su mayor o menor grado de retención en RE, ambos mutantes tienen que sufrir un defecto en su plegamiento que es rescatable, como se ha demostrado con la sobreexpresión de CNX y los tratamientos con NAG. Del cribado de compuestos con potencial de mejorar la función de GlyT2 en COS-7, se obtuvieron varios resultados sorprendentes.

El primero de ellos es que bupropión e ibogaína 1 μM promovieron efectos opuestos a los obtenidos por otros autores para DAT silvestre [101]. En dicho trabajo, realizado en HEK 293, la incubación durante 16h con bupropión e ibogaína 100 μM aumentaba la expresión en membrana y la cantidad de proteína madura frente a la inmadura del transportador, lo que sugiere que estos compuestos tienen capacidad para facilitar la maduración de DAT. Bupropión e ibogaína son inhibidores atípicos de transportadores de monoaminas que impiden su función

al bloquearlos en conformación abierta hacia dentro, y se ha propuesto que, durante el plegamiento, estos transportadores han de adoptar dicha conformación para la adquisición de la conformación nativa [74, 79, 81]. Por tanto, se especula con que bupropion e ibogaína actúen como farmacochaperonas y que el efecto que se observa a nivel de maduración de los transportadores con los que interactúan se deba a su capacidad de forzar su conformación abierta hacia dentro. En el caso de GlyT2, al menos bupropión también promueve la conformación abierta hacia dentro [192], pero el tratamiento con este alcaloide no aumentó su expresión en membrana, ni produjo cambios significativos en su maduración, sino que, por el contrario, disminuyó su presencia en superficie. Curiosamente, esta menor cantidad de proteína en membrana no se tradujo en una menor capacidad de transporte de Gly asociada al transportador por parte de las células COS-7, que se mantuvo en los mismos valores que para las no tratadas. Con todo eso, parece que la fracción de GlyT2 en la membrana de células tratadas con bupropión, pese a ser inferior, tiene la misma capacidad de transportar Gly que la fracción de membrana de células no tratadas. Se podría decir, entonces, que en las células tratadas con bupropión el porcentaje de unidades de GlyT2 en la fracción de membrana con una capacidad óptima de transporte es mayor que en el caso de las células no tratadas, lo que apoyaría la hipótesis de que la adquisición de una conformación abierta hacia dentro facilita el plegamiento. No obstante, el hecho de que, en cómputo global, el tratamiento con bupropión no mejore la capacidad de transporte de las células asociado a GlyT2, lo convierte en un compuesto poco prometedor. Aunque no se ha demostrado la capacidad de ibogaína de bloquear a GlyT2 en conformación abierta hacia dentro, es probable que la tenga, puesto que los efectos que se observan sobre el transportador tras el tratamiento son similares a los observados para bupropión.

El inhibidor del transporte de GlyT2, ALX 1393, a una concentración de 10 nM, sí que produjo un aumento significativo de la cantidad de GlyT2 silvestre en membrana, lo que se tradujo en un aumento mínimo de su actividad. Aunque la capacidad de unirse a GlyT2 e inhibir su función está demostrada [103, 104], las posibilidades que tiene de actuar sobre el plegamiento de GlyT2 en RE son sin embargo escasas. En primer lugar, porque se desconoce si este compuesto es capaz de atravesar la membrana plasmática de las células. En ese sentido, en un trabajo reciente se observó que la cantidad de ALX 1393 presente en líquido cefalorraquídeo de ratones una hora después de su administración intravenosa era menor del 5%, lo que sugiere que ALX 1393 difícilmente permeaba la barrera hematoencefálica [104]. En segundo lugar, porque, aunque permease la membrana plasmática y llegase al lumen del RE, no podría interactuar con GlyT2 en ese contexto. ALX 1393 se une a la conformación abierta hacia fuera de GlyT2, necesitando una concentración de Na^+ suficiente para conformar el sitio Na1 [192],

mientras que la concentración del catión en el lumen del RE es mínima [79]. Es quizá por este motivo que los denominados inhibidores típicos de DAT, que tienen un mecanismo de inhibición similar al de ALX 1393, no han dado resultado a otros autores [101]. El aumento de GlyT2 en membrana tras el tratamiento con ALX 1393, por tanto, debe ser resultado de la unión del inhibidor con el transportador en la superficie celular, puesto que la concentración de Na⁺ extracelular en las condiciones en las que se cultivan las COS-7 sí que permite la interacción. En cuanto al mecanismo que subyace a este fenómeno, es pronto para sacar cualquier conclusión, pero podría ser materia de estudio de futuros trabajos. En ese sentido, quizá analizar la endocitosis de GlyT2 en presencia ALX 1393 sea un buen punto de partida.

De todos los compuestos ensayados en COS-7, el más prometedor fue NAG, ya que, a una concentración de 10 μ M, consiguió aumentar la presencia en membrana plasmática y mejorar la actividad del transportador silvestre a unos valores similares a los obtenidos con PBA. Además, el tratamiento con NAG de los mutantes A277T e Y707C expresados en neuronas corticales de rata aumentó en gran medida su actividad y expresión en membrana y redujo su presencia en RE. En cuanto al mecanismo de acción, con los resultados obtenidos en este trabajo no es posible sacar una conclusión definitiva. Un indicio de que, al menos, el mecanismo de acción afecta a procesos que ocurren en el RE es que, tras el tratamiento de las COS-7 con NAG, la cantidad de transportador que coinmunoprecipitó con CNX fue significativamente menor que en la condición control. Teniendo esto en cuenta, se podría pensar que actúa como una farmacochaperona, uniéndose específicamente a GlyT2 durante el plegamiento y facilitándolo. En este sentido, la menor interacción del transportador con CNX tras el tratamiento con NAG 10 μ M es un resultado similar al obtenido por otros autores que han trabajado con farmacochaperonas. Concretamente, El-Kasaby y colaboradores demostraron que ibogaína reducía la interacción de CNX con un mutante del C-t de SERT [100], y Asjad y colaboradores demostraron que el tratamiento con noribogaína reducía la interacción de HSP70 con un grupo de mutantes de DAT asociados a parkinsonismo infantil y juvenil [85]. Lo esperable de una farmacochaperona es que, al interaccionar específicamente con su diana, facilite su plegamiento y esta no necesite tanto de la asistencia de chaperonas moleculares, de forma que el número de complejos formados entre chaperona y proteína en plegamiento se reduzca o, al menos, dure menos en el tiempo. No obstante, es poco probable que NAG actúe sobre el plegamiento de GlyT2 como una farmacochaperona. Este tipo de compuestos, cuando son inhibidores, favorecen el plegamiento a través del mismo mecanismo por el que producen la inhibición, es decir, uniéndose de forma específica a su diana y atrapándola en una conformación determinada [79, 81]. En el caso de NAG, una concentración de 10 μ M no inhibió la actividad de GlyT2 en células COS-7, lo que sugiere que a esa concentración no se está produciendo una

interacción específica del inhibidor con su sitio en GlyT2 ni, consecuentemente, la adquisición de algún tipo de conformación por parte del transportador. Además, esa misma concentración también aumenta la expresión de GlyT1 en membrana plasmática de neuronas, cuando está descrito que NAG, ni siquiera a concentraciones mayores, tiene un efecto inhibitorio sobre su función [105, 106], lo que sugiere que el efecto sobre GlyT2 quizá no sea tan específico como el que se espera de una farmacochaperona. Por otro lado, se podría pensar que NAG realizase su acción mediante una interacción menos específica pero que también mejorase el plegamiento de GlyT2, es decir, que actuase como una chaperona química. En ese sentido, tras realizar tratamientos con NAG y con PBA en COS-7, se han obtenido resultados similares para el transportador silvestre a nivel de actividad, expresión en membrana e interacción con CNX, lo que, unido al hecho de que NAG contiene una larga fracción hidrofóbica, podría apoyar la idea de que ambos compuestos actúen de una forma similar, es decir, favoreciendo la creación de un contexto hidrofóbico alrededor de GlyT2 que facilite su plegamiento. Sin descartar esta opción, tampoco hay que obviar que NAG no tiene por qué estar mejorando el plegamiento de GlyT2, puesto que una menor interacción de GlyT2 con CNX puede deberse a un bloqueo de la asistencia de la chaperona [97]. En este supuesto, el tratamiento con NAG estaría favoreciendo la llegada a membrana del GlyT2 al promover que el transportador pueda escapar del control ejercido por CNX. Como es probable que NAG llegue al lumen del RE debido a su estructura [230], la inhibición de la acción de CNX podría deberse a la unión directa del compuesto con GlyT2, una interacción que bloquee de alguna manera la asistencia de CNX, o podría deberse a algún tipo de mecanismo menos específico que no tuviese por qué ejercerse en el lumen del RE. Por ejemplo, está demostrado que CNX utiliza Ca^{2+} como cofactor para su unión a las proteínas en plegamiento [77, 231] y que una depleción de los niveles de Ca^{2+} del RE puede afectar a esta interacción, promoviendo una mayor llegada a membrana de la proteína en cuestión. Esto es lo que se observó para el mutante ΔF508 del CFTR tras inhibir la ATPasa de Ca^{2+} del RE (SERCA) con tapsigargina [97]. Sin embargo, en un trabajo reciente con GlyT2, la inhibición de la SERCA en COS-7 no parecía alterar la actividad de la forma silvestre ni rescató el efecto dominante negativo que ejercía sobre él el mutante S512R [47]. Aun así, estos resultados no son suficientes para descartar que una depleción de Ca^{2+} a nivel de RE pueda favorecer la llegada a membrana de GlyT2. En el caso de NAG, entre sus acciones se han descrito dos que podrían tener efectos sobre la concentración de Ca^{2+} dentro del RE y afectar a la función de CNX: la movilización de Ca^{2+} desde el RE al citoplasma mediada por la activación de GPR18 [232] y la inhibición de la entrada de Ca^{2+} dependiente de depósito [233]. Con todo ello, sería interesante tratar de esclarecer en futuros trabajos el mecanismo de acción de NAG sobre GlyT2. Un primer abordaje sería el estudio del efecto de NAG sobre variantes de GlyT2 con mutaciones en el sitio

de unión alostérico de NAG y lípidos similares que ha sido recientemente identificado [124], lo que puede ser un buen método para determinar si es necesaria una interacción específica del compuesto con el transportador y aportaría indicios de su acción o no como farmacochaperona. Un segundo abordaje sería la realización de tratamientos conjuntos con NAG y algún inhibidor de GPR18, lo que constituiría un primer paso para estudiar la posible implicación de este receptor.

De cualquier modo, en esta Tesis Doctoral queda demostrado que un tratamiento prolongado durante 48h con NAG 10 μ M mejora enormemente la salida de RE, expresión en membrana y actividad de las variantes A277T e Y707C, lo que convierte a NAG en un compuesto con capacidad real de rescatar *in vitro* el fenotipo de mutantes de GlyT2 asociados a hiperplexia que presenten problemas de retención en RE. A pesar de ello, con los resultados obtenidos aquí, aún es pronto para concluir si NAG es un buen candidato para el ensayo en modelos animales de hiperplexia. Futuros trabajos deberán explorar esta posibilidad.

Conclusiones

1. La inducción de la vía de Hedgehog en neuronas de médula espinal y tallo cerebral a través de la activación específica del receptor Smo promueve la disminución de la actividad y expresión proteica de GlyT2.
2. Dicha modulación promovida por la activación de Smo se produce mayoritariamente a través de un aumento en la ubiquitinación de GlyT2 y en menor medida por una disminución del mRNA del transportador.
3. La inhibición del receptor Smo en embriones de pez cebra entre las 24 y las 48 hpf produce un aumento en la expresión proteica de GlyT2, lo que sugiere que la vía de Hedgehog regula los niveles de GlyT2 durante el desarrollo.
4. Las E3 ubiquitin ligasas LNX1-p80 y LNX2 interactúan con GlyT2, promoviendo su ubiquitinación y degradación en el sistema heterólogo COS-7.
5. LNX1-p80 y LNX2 ubiquitan una o varias lisinas (Lys 751, Lys 773, Lys 787 y Lys 791) del extremo C-terminal de GlyT2, lo que modula los niveles de expresión y la actividad de transporte de GlyT2.
6. La supresión de LNX2 endógena en neuronas de médula espinal y tallo cerebral pone de manifiesto la regulación constitutiva que ejerce sobre los niveles de GlyT2 y demuestra su papel en la degradación de transportador inducida por la activación de PKC.
7. Los mutantes de rata A277T e Y707C muestran una actividad de transporte reducida en COS-7 similar a la observada para sus homólogos humanos A275T e Y705C, lo que confirma la utilidad de las variantes de rata para el estudio de estas dos mutaciones asociadas a hiperplexia.
8. La menor actividad de las variantes A277T e Y707C se corresponde con una menor presencia en membrana plasmática y mayor retención en retículo endoplásmico determinadas en sistema heterólogo. No obstante, el mutante A277T parece tener una retención en retículo endoplásmico más severa que el mutante Y707C, como sugiere su menor interacción con Sec24D en células COS-7.
9. N-araquidonil glicina rescata el fenotipo de los mutantes A277T e Y707C en neuronas primarias de corteza cerebral, aumentando su actividad, presencia en superficie y disminuyendo su retención en retículo endoplásmico.

Bibliografía

1. Legendre, P., *The glycinergic inhibitory synapse*. Cell Mol Life Sci, 2001. **58**(5-6): p. 760-93.
2. Hernandez, M.S. y L.R. Troncone, *Glycine as a neurotransmitter in the forebrain: a short review*. J Neural Transm (Vienna), 2009. **116**(12): p. 1551-60.
3. Harvey, R.J., *GlyR 3: An Essential Target for Spinal PGE2-Mediated Inflammatory Pain Sensitization*. Science, 2004. **304**(5672): p. 884-887.
4. Zeilhofer, H.U., *Loss of glycinergic and GABAergic inhibition in chronic pain-- contributions of inflammation and microglia*. Int Immunopharmacol, 2008. **8**(2): p. 182-7.
5. Zeilhofer, H.U., et al., *Glycine receptors and glycine transporters: targets for novel analgesics?* Cell Mol Life Sci, 2018. **75**(3): p. 447-465.
6. Friauf, E., et al., *Developmental expression of the glycine transporter GLYT2 in the auditory system of rats suggests involvement in synapse maturation*. J Comp Neurol, 1999. **412**(1): p. 17-37.
7. Friauf, E., B. Hammerschmidt, y J. Kirsch, *Development of adult-type inhibitory glycine receptors in the central auditory system of rats*. J Comp Neurol, 1997. **385**(1): p. 117-34.
8. Pourcho, R.G. y D.J. Goebel, *Immunocytochemical demonstration of glycine in retina*. Brain Research, 1985. **348**(2): p. 339-342.
9. Pourcho, R.G. y M.T. Owczarzak, *Glycine receptor immunoreactivity is localized at amacrine synapses in cat retina*. Visual Neuroscience, 1991. **7**(6): p. 611-618.
10. Nong, Y., et al., *Glycine binding primes NMDA receptor internalization*. Nature, 2003. **422**(6929): p. 302-7.
11. Zafra, F., et al., *Glycine Transporters and Its Coupling with NMDA Receptors*. Adv Neurobiol, 2017. **16**: p. 55-83.
12. Lynch, J.W., *Native glycine receptor subtypes and their physiological roles*. Neuropharmacology, 2009. **56**(1): p. 303-9.
13. Harvey, R.J. y B.K. Yee, *Glycine transporters as novel therapeutic targets in schizophrenia, alcohol dependence and pain*. Nat Rev Drug Discov, 2013. **12**(11): p. 866-85.
14. Neal, M.J., *Uptake of [14C]-glycine by rat spinal cord*. Br J Pharmacol, 1969. **36**(1): p. 205P-206P.
15. López-Corcuera, B., A. Geerlings, y C. Aragón, *Glycine neurotransmitter transporters: an update*. Mol Membr Biol, 2001. **18**(1): p. 13-20.
16. Burgos, C.F., G.E. Yévenes, y L.G. Aguayo, *Structure and Pharmacologic Modulation of Inhibitory Glycine Receptors*. Mol Pharmacol, 2016. **90**(3): p. 318-25.

17. Grudzinska, J., et al., *The beta subunit determines the ligand binding properties of synaptic glycine receptors*. *Neuron*, 2005. **45**(5): p. 727-39.
18. Meyer, G., et al., *Identification of a gephyrin binding motif on the glycine receptor beta subunit*. *Neuron*, 1995. **15**(3): p. 563-72.
19. Sola, M., et al., *Structural basis of dynamic glycine receptor clustering by gephyrin*. *EMBO J*, 2004. **23**(13): p. 2510-9.
20. Rees, M.I., et al., *Hyperekplexia associated with compound heterozygote mutations in the beta-subunit of the human inhibitory glycine receptor (GLRB)*. *Hum Mol Genet*, 2002. **11**(7): p. 853-60.
21. Zafra, F. y C. Giménez, *Glycine transporters and synaptic function*. *IUBMB Life*, 2008. **60**(12): p. 810-7.
22. Adams, R.H., et al., *Gene structure and glial expression of the glycine transporter GlyT1 in embryonic and adult rodents*. *J Neurosci*, 1995. **15**(3 Pt 2): p. 2524-32.
23. Borowsky, B. y B.J. Hoffman, *Analysis of a gene encoding two glycine transporter variants reveals alternative promoter usage and a novel gene structure*. *J Biol Chem*, 1998. **273**(44): p. 29077-85.
24. Hanley, J.G., E.M. Jones, y S.J. Moss, *GABA receptor rho1 subunit interacts with a novel splice variant of the glycine transporter, GLYT-1*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(2): p. 840-6.
25. Ebihara, S., et al., *Gene structure and alternative splicing of the mouse glycine transporter type-2*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004. **317**(3): p. 857-64.
26. Zafra, F., et al., *Regional distribution and developmental variation of the glycine transporters GLYT1 and GLYT2 in the rat CNS*. *Eur J Neurosci*, 1995. **7**(6): p. 1342-52.
27. Jursky, F. y N. Nelson, *Developmental expression of the glycine transporters GLYT1 and GLYT2 in mouse brain*. *J Neurochem*, 1996. **67**(1): p. 336-44.
28. Cubelos, B., C. Giménez, y F. Zafra, *Localization of the GLYT1 glycine transporter at glutamatergic synapses in the rat brain*. *Cereb Cortex*, 2005. **15**(4): p. 448-59.
29. Gomeza, J., et al., *Inactivation of the glycine transporter 1 gene discloses vital role of glial glycine uptake in glycinergic inhibition*. *Neuron*, 2003. **40**(4): p. 785-96.
30. Gomeza, J., et al., *Deletion of the mouse glycine transporter 2 results in a hyperekplexia phenotype and postnatal lethality*. *Neuron*, 2003. **40**(4): p. 797-806.
31. Tsai, G., et al., *Gene knockout of glycine transporter 1: characterization of the behavioral phenotype*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. **101**(22): p. 8485-90.
32. Aragón, C. y B. López-Corcuera, *Glycine transporters: crucial roles of pharmacological interest revealed by gene deletion*. *Trends Pharmacol Sci*, 2005. **26**(6): p. 283-6.

33. Roux, M.J. y S. Supplisson, *Neuronal and glial glycine transporters have different stoichiometries*. *Neuron*, 2000. **25**(2): p. 373-83.
34. Supplisson, S. y M.J. Roux, *Why glycine transporters have different stoichiometries*. *FEBS Lett*, 2002. **529**(1): p. 93-101.
35. Thomas, R.H., et al., *Genotype-phenotype correlations in hyperekplexia: apnoeas, learning difficulties and speech delay*. *Brain*, 2013. **136**(Pt 10): p. 3085-95.
36. James, V.M., et al., *Molecular mechanisms of glycine transporter GlyT2 mutations in startle disease*. *Biol Chem*, 2012. **393**(4): p. 283-9.
37. López-Corcuera, B., E. Arribas-González, y C. Aragón, *Hyperekplexia-associated mutations in the neuronal glycine transporter 2*. *Neurochem Int*, 2019. **123**: p. 95-100.
38. Bakker, M.J., et al., *Startle syndromes*. *Lancet Neurol*, 2006. **5**(6): p. 513-24.
39. Andermann, F., et al., *Startle disease or hyperekplexia: further delineation of the syndrome*. *Brain*, 1980. **103**(4): p. 985-97.
40. Harvey, R.J., et al., *The genetics of hyperekplexia: more than startle!* *Trends Genet*, 2008. **24**(9): p. 439-47.
41. Bode, A. y J.W. Lynch, *The impact of human hyperekplexia mutations on glycine receptor structure and function*. *Mol Brain*, 2014. **7**: p. 2.
42. Rees, M.I., et al., *Mutations in the gene encoding GlyT2 (SLC6A5) define a presynaptic component of human startle disease*. *Nat Genet*, 2006. **38**(7): p. 801-6.
43. Carta, E., et al., *Mutations in the GlyT2 gene (SLC6A5) are a second major cause of startle disease*. *J Biol Chem*, 2012. **287**(34): p. 28975-85.
44. Eulenburg, V., et al., *Mutations within the human GLYT2 (SLC6A5) gene associated with hyperekplexia*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006. **348**(2): p. 400-5.
45. Kitzenmaier, A., et al., *The P429L loss of function mutation of the human glycine transporter 2 associated with hyperekplexia*. *Eur J Neurosci*, 2019. **50**(12): p. 3906-3920.
46. Giménez, C., et al., *A novel dominant hyperekplexia mutation Y705C alters trafficking and biochemical properties of the presynaptic glycine transporter GlyT2*. *J Biol Chem*, 2012. **287**(34): p. 28986-9002.
47. Arribas-González, E., et al., *Molecular basis of the dominant negative effect of a glycine transporter 2 mutation associated with hyperekplexia*. *J Biol Chem*, 2015. **290**(4): p. 2150-65.
48. Tijssen, M.A., et al., *The effects of clonazepam and vigabatrin in hyperekplexia*. *J Neurol Sci*, 1997. **149**(1): p. 63-7.
49. Bakker, M.J., E.A. Peeters, y M.A. Tijssen, *Clonazepam is an effective treatment for hyperekplexia due to a SLC6A5 (GlyT2) mutation*. *Mov Disord*, 2009. **24**(12): p. 1852-4.

50. Zou, G., et al., *Human Hyperekplexic Mutations in Glycine Receptors Disinhibit the Brainstem by Hijacking GABAA Receptors*. iScience, 2019. **19**: p. 634-646.
51. Huang, M., et al., *Ptf1a, Lbx1 and Pax2 coordinate glycinergic and peptidergic transmitter phenotypes in dorsal spinal inhibitory neurons*. Dev Biol, 2008. **322**(2): p. 394-405.
52. Sunagawa, M., et al., *Distinct development of the glycinergic terminals in the ventral and dorsal horns of the mouse cervical spinal cord*. Neuroscience, 2017. **343**: p. 459-471.
53. Higashijima, S., G. Mandel, y J.R. Fetcho, *Distribution of prospective glutamatergic, glycinergic, and GABAergic neurons in embryonic and larval zebrafish*. J Comp Neurol, 2004. **480**(1): p. 1-18.
54. Moly, P.K., et al., *Identification of initially appearing glycine-immunoreactive neurons in the embryonic zebrafish brain*. Dev Neurobiol, 2014. **74**(6): p. 616-32.
55. Batista, M.F. y K.E. Lewis, *Pax2/8 act redundantly to specify glycinergic and GABAergic fates of multiple spinal interneurons*. Dev Biol, 2008. **323**(1): p. 88-97.
56. Carballo, G.B., et al., *A highlight on Sonic hedgehog pathway*. Cell Commun Signal, 2018. **16**(1): p. 11.
57. Varjosalo, M. y J. Taipale, *Hedgehog: functions and mechanisms*. Genes Dev, 2008. **22**(18): p. 2454-72.
58. Andrews, M.G., et al., *New perspectives on the mechanisms establishing the dorsal-ventral axis of the spinal cord*. Curr Top Dev Biol, 2019. **132**: p. 417-450.
59. Briscoe, J. y P.P. Therond, *The mechanisms of Hedgehog signalling and its roles in development and disease*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2013. **14**(7): p. 416-29.
60. Yao, P.J., R.S. Petralia, y M.P. Mattson, *Sonic Hedgehog Signaling and Hippocampal Neuroplasticity*. Trends Neurosci, 2016. **39**(12): p. 840-850.
61. Sibilla, S. y L. Ballerini, *GABAergic and glycinergic interneuron expression during spinal cord development: dynamic interplay between inhibition and excitation in the control of ventral network outputs*. Prog Neurobiol, 2009. **89**(1): p. 46-60.
62. Álvarez-Buylla, A. y R.A. Ihrie, *Sonic hedgehog signaling in the postnatal brain*. Semin Cell Dev Biol, 2014. **33**: p. 105-11.
63. Yamashita, A., et al., *Crystal structure of a bacterial homologue of Na⁺/Cl⁻-dependent neurotransmitter transporters*. Nature, 2005. **437**(7056): p. 215-23.
64. Rudnick, G., et al., *The SLC6 transporters: perspectives on structure, functions, regulation, and models for transporter dysfunction*. Pflugers Arch, 2014. **466**(1): p. 25-42.

65. Krishnamurthy, H. y E. Gouaux, *X-ray structures of LeuT in substrate-free outward-open and apo inward-open states*. *Nature*, 2012. **481**(7382): p. 469-474.
66. Penmatsa, A., K.H. Wang, y E. Gouaux, *X-ray structures of Drosophila dopamine transporter in complex with nisoxetine and reboxetine*. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2015. **22**(6): p. 506-508.
67. Coleman, J.A., E.M. Green, y E. Gouaux, *X-ray structures and mechanism of the human serotonin transporter*. *Nature*, 2016. **532**(7599): p. 334-339.
68. Pramod, A.B., et al., *SLC6 transporters: structure, function, regulation, disease association and therapeutics*. *Mol Aspects Med*, 2013. **34**(2-3): p. 197-219.
69. Pérez-Siles, G., et al., *An aspartate residue in the external vestibule of GLYT2 (glycine transporter 2) controls cation access and transport coupling*. *Biochem J*, 2012. **442**(2): p. 323-34.
70. Benito-Muñoz, C., et al., *Modification of a Putative Third Sodium Site in the Glycine Transporter GlyT2 Influences the Chloride Dependence of Substrate Transport*. *Front Mol Neurosci*, 2018. **11**: p. 347.
71. Subramanian, N., et al., *Identification of a 3rd Na⁺ Binding Site of the Glycine Transporter, GlyT2*. *PLoS One*, 2016. **11**(6): p. e0157583.
72. Guna, A. y R.S. Hegde, *Transmembrane Domain Recognition during Membrane Protein Biogenesis and Quality Control*. *Curr Biol*, 2018. **28**(8): p. R498-R511.
73. Chiba, P., M. Freissmuth, y T. Stockner, *Defining the blanks--pharmacochaperoning of SLC6 transporters and ABC transporters*. *Pharmacol Res*, 2014. **83**: p. 63-73.
74. Freissmuth, M., T. Stockner, y S. Sucic, *SLC6 Transporter Folding Diseases and Pharmacochaperoning*. *Handb Exp Pharmacol*, 2018. **245**: p. 249-270.
75. Barlowe, C. y A. Helenius, *Cargo Capture and Bulk Flow in the Early Secretory Pathway*. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2016. **32**: p. 197-222.
76. McCaffrey, K. y I. Braakman, *Protein quality control at the endoplasmic reticulum*. *Essays Biochem*, 2016. **60**(2): p. 227-235.
77. Hebert, D.N. y M. Molinari, *In and out of the ER: protein folding, quality control, degradation, and related human diseases*. *Physiol Rev*, 2007. **87**(4): p. 1377-408.
78. Arribas-González, E., et al., *Calnexin-assisted biogenesis of the neuronal glycine transporter 2 (GlyT2)*. *PLoS One*, 2013. **8**(5): p. e63230.
79. Bhat, S., A.H. Newman, y M. Freissmuth, *How to rescue misfolded SERT, DAT and NET: targeting conformational intermediates with atypical inhibitors and partial releasers*. *Biochem Soc Trans*, 2019. **47**(3): p. 861-874.

80. Maattanen, P., et al., *ERp57 and PDI: multifunctional protein disulfide isomerases with similar domain architectures but differing substrate-partner associations*. *Biochem Cell Biol*, 2006. **84**(6): p. 881-9.
81. Asjad, H.M.M., et al., *Relax, Cool Down and Scaffold: How to Restore Surface Expression of Folding-Deficient Mutant GPCRs and SLC6 Transporters*. *Int J Mol Sci*, 2017. **18**(11).
82. Zanetti, G., et al., *COPII and the regulation of protein sorting in mammals*. *Nat Cell Biol*, 2011. **14**(1): p. 20-8.
83. Fernández-Sánchez, E., et al., *Mechanisms of endoplasmic-reticulum export of glycine transporter-1 (GLYT1)*. *Biochem J*, 2008. **409**(3): p. 669-81.
84. Rubenstein, R.C., M.E. Egan, y P.L. Zeitlin, *In vitro pharmacologic restoration of CFTR-mediated chloride transport with sodium 4-phenylbutyrate in cystic fibrosis epithelial cells containing delta F508-CFTR*. *J Clin Invest*, 1997. **100**(10): p. 2457-65.
85. Asjad, H.M.M., et al., *Pharmacochaperoning in a Drosophila model system rescues human dopamine transporter variants associated with infantile/juvenile parkinsonism*. *J Biol Chem*, 2017. **292**(47): p. 19250-19265.
86. Germain, D.P., et al., *Treatment of Fabry's Disease with the Pharmacologic Chaperone Migalostat*. *N Engl J Med*, 2016. **375**(6): p. 545-55.
87. Wainwright, C.E., et al., *Lumacaftor-Ivacaftor in Patients with Cystic Fibrosis Homozygous for Phe508del CFTR*. *N Engl J Med*, 2015. **373**(3): p. 220-31.
88. Cortez, L. y V. Sim, *The therapeutic potential of chemical chaperones in protein folding diseases*. *Prion*, 2014. **8**(2).
89. Kolb, P.S., et al., *The therapeutic effects of 4-phenylbutyric acid in maintaining proteostasis*. *Int J Biochem Cell Biol*, 2015. **61**: p. 45-52.
90. Rubenstein, R.C. y P.L. Zeitlin, *A pilot clinical trial of oral sodium 4-phenylbutyrate (Buphenyl) in deltaF508-homozygous cystic fibrosis patients: partial restoration of nasal epithelial CFTR function*. *Am J Respir Crit Care Med*, 1998. **157**(2): p. 484-90.
91. Zeitlin, P.L., et al., *Evidence of CFTR function in cystic fibrosis after systemic administration of 4-phenylbutyrate*. *Mol Ther*, 2002. **6**(1): p. 119-26.
92. Morrison, C., *Fresh from the biotech pipeline—2019*. *Nature Biotechnology*, 2020. **38**(2): p. 126-131.
93. Pruliere-Escabasse, V., et al., *Modulation of epithelial sodium channel trafficking and function by sodium 4-phenylbutyrate in human nasal epithelial cells*. *J Biol Chem*, 2007. **282**(47): p. 34048-57.

94. Fujiwara, M., et al., *Effects of the chemical chaperone 4-phenylbutylate on the function of the serotonin transporter (SERT) expressed in COS-7 cells*. J Pharmacol Sci, 2013. **122**(2): p. 71-83.
95. El-Kasaby, A., et al., *Rescue by 4-phenylbutyrate of several misfolded creatine transporter-1 variants linked to the creatine transporter deficiency syndrome*. Neuropharmacology, 2019. **161**: p. 107572.
96. Rubenstein, R.C. y P.L. Zeitlin, *Sodium 4-phenylbutyrate downregulates Hsc70: implications for intracellular trafficking of DeltaF508-CFTR*. Am J Physiol Cell Physiol, 2000. **278**(2): p. C259-67.
97. Egan, M.E., et al., *Calcium-pump inhibitors induce functional surface expression of Delta F508-CFTR protein in cystic fibrosis epithelial cells*. Nat Med, 2002. **8**(5): p. 485-92.
98. El-Kasaby, A., et al., *A cytosolic relay of heat shock proteins HSP70-1A and HSP90beta monitors the folding trajectory of the serotonin transporter*. J Biol Chem, 2014. **289**(42): p. 28987-9000.
99. Van Goor, F., et al., *Correction of the F508del-CFTR protein processing defect in vitro by the investigational drug VX-809*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(46): p. 18843-8.
100. El-Kasaby, A., et al., *Mutations in the carboxyl-terminal SEC24 binding motif of the serotonin transporter impair folding of the transporter*. J Biol Chem, 2010. **285**(50): p. 39201-10.
101. Beerepoot, P., V.M. Lam, y A. Salahpour, *Pharmacological Chaperones of the Dopamine Transporter Rescue Dopamine Transporter Deficiency Syndrome Mutations in Heterologous Cells*. J Biol Chem, 2016. **291**(42): p. 22053-22062.
102. Caulfield, W.L., et al., *The first potent and selective inhibitors of the glycine transporter type 2*. J Med Chem, 2001. **44**(17): p. 2679-82.
103. Xu, T.X., N. Gong, y T.L. Xu, *Inhibitors of GlyT1 and GlyT2 differentially modulate inhibitory transmission*. Neuroreport, 2005. **16**(11): p. 1227-31.
104. Mingorance-Le Meur, A., et al., *Reversible inhibition of the glycine transporter GlyT2 circumvents acute toxicity while preserving efficacy in the treatment of pain*. Br J Pharmacol, 2013. **170**(5): p. 1053-63.
105. Wiles, A.L., et al., *N-Arachidonyl-glycine inhibits the glycine transporter, GLYT2a*. J Neurochem, 2006. **99**(3): p. 781-6.
106. Edington, A.R., et al., *Extracellular loops 2 and 4 of GLYT2 are required for N-arachidonylglycine inhibition of glycine transport*. J Biol Chem, 2009. **284**(52): p. 36424-30.

107. Jeong, H.J., R.J. Vandenberg, y C.W. Vaughan, *N-arachidonyl-glycine modulates synaptic transmission in superficial dorsal horn*. Br J Pharmacol, 2010. **161**(4): p. 925-35.
108. Connor, M., C.W. Vaughan, y R.J. Vandenberg, *N-acyl amino acids and N-acyl neurotransmitter conjugates: neuromodulators and probes for new drug targets*. Br J Pharmacol, 2010. **160**(8): p. 1857-71.
109. Hanus, L., et al., *N-Acyl amino acids and their impact on biological processes*. Biofactors, 2014. **40**(4): p. 381-8.
110. Burstein, S.H., et al., *Resolution of inflammation by N-arachidonoylglycine*. J Cell Biochem, 2011. **112**(11): p. 3227-33.
111. McHugh, D., et al., *N-arachidonoyl glycine, an abundant endogenous lipid, potently drives directed cellular migration through GPR18, the putative abnormal cannabidiol receptor*. BMC Neurosci, 2010. **11**: p. 44.
112. McHugh, D., et al., *siRNA knockdown of GPR18 receptors in BV-2 microglia attenuates N-arachidonoyl glycine-induced cell migration*. J Mol Signal, 2012. **7**(1): p. 10.
113. McHugh, D., et al., *Delta(9)-THC and N-arachidonoyl glycine regulate BV-2 microglial morphology and cytokine release plasticity: implications for signaling at GPR18*. Front Pharmacol, 2014. **4**: p. 162.
114. Caldwell, M.D., et al., *A GPR18-based signalling system regulates IOP in murine eye*. Br J Pharmacol, 2013. **169**(4): p. 834-43.
115. Oh, D.Y., et al., *Identification of farnesyl pyrophosphate and N-arachidonoylglycine as endogenous ligands for GPR92*. J Biol Chem, 2008. **283**(30): p. 21054-64.
116. Burstein, S.H., et al., *Oxidative metabolism of anandamide*. Prostaglandins Other Lipid Mediat, 2000. **61**(1-2): p. 29-41.
117. Barbara, G., et al., *T-type calcium channel inhibition underlies the analgesic effects of the endogenous lipoamino acids*. J Neurosci, 2009. **29**(42): p. 13106-14.
118. Huang, S.M., et al., *Identification of a new class of molecules, the arachidonyl amino acids, and characterization of one member that inhibits pain*. J Biol Chem, 2001. **276**(46): p. 42639-44.
119. Succar, R., V.A. Mitchell, y C.W. Vaughan, *Actions of N-arachidonyl-glycine in a rat inflammatory pain model*. Mol Pain, 2007. **3**: p. 24.
120. Vuong, L.A., V.A. Mitchell, y C.W. Vaughan, *Actions of N-arachidonyl-glycine in a rat neuropathic pain model*. Neuropharmacology, 2008. **54**(1): p. 189-93.
121. Mostyn, S.N., et al., *Synthesis and Characterization of Novel Acyl-Glycine Inhibitors of GlyT2*. ACS Chem Neurosci, 2017. **8**(9): p. 1949-1959.

122. Carland, J.E., et al., *Oleoyl-L-carnitine inhibits glycine transport by GlyT2*. Br J Pharmacol, 2013. **168**(4): p. 891-902.
123. Mostyn, S.N., et al., *Development of an N-Acyl Amino Acid That Selectively Inhibits the Glycine Transporter 2 To Produce Analgesia in a Rat Model of Chronic Pain*. J Med Chem, 2019. **62**(5): p. 2466-2484.
124. Mostyn, S.N., et al., *Identification of an allosteric binding site on the human glycine transporter, GlyT2, for bioactive lipid analgesics*. Elife, 2019. **8**.
125. Núñez, E., et al., *The neuronal glycine transporter GLYT2 associates with membrane rafts: functional modulation by lipid environment*. J Neurochem, 2008. **105**(6): p. 2080-90.
126. Pike, L.J., *Rafts defined: a report on the Keystone Symposium on Lipid Rafts and Cell Function*. J Lipid Res, 2006. **47**(7): p. 1597-8.
127. de Juan-Sanz, J., et al., *Na⁺/K⁺-ATPase is a new interacting partner for the neuronal glycine transporter GlyT2 that downregulates its expression in vitro and in vivo*. J Neurosci, 2013. **33**(35): p. 14269-81.
128. de Juan-Sanz, J., et al., *Presynaptic control of glycine transporter 2 (GlyT2) by physical and functional association with plasma membrane Ca²⁺-ATPase (PMCA) and Na⁺-Ca²⁺ exchanger (NCX)*. J Biol Chem, 2014. **289**(49): p. 34308-24.
129. Núñez, E., et al., *Subcellular localization of the neuronal glycine transporter GLYT2 in brainstem*. Traffic, 2009. **10**(7): p. 829-43.
130. Geerlings, A., et al., *Calcium- and syntaxin 1-mediated trafficking of the neuronal glycine transporter GLYT2*. J Biol Chem, 2001. **276**(20): p. 17584-90.
131. de Juan-Sanz, J., et al., *Endocytosis of the neuronal glycine transporter GLYT2: role of membrane rafts and protein kinase C-dependent ubiquitination*. Traffic, 2011. **12**(12): p. 1850-67.
132. de Juan-Sanz, J., et al., *Constitutive endocytosis and turnover of the neuronal glycine transporter GlyT2 is dependent on ubiquitination of a C-terminal lysine cluster*. PLoS One, 2013. **8**(3): p. e58863.
133. Weissman, A.M., *Themes and variations on ubiquitylation*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2001. **2**(3): p. 169-78.
134. Li, X., et al., *A patent review of the ubiquitin ligase system: 2015-2018*. Expert Opin Ther Pat, 2018. **28**(12): p. 919-937.
135. Iconomou, M. y D.N. Saunders, *Systematic approaches to identify E3 ligase substrates*. Biochem J, 2016. **473**(22): p. 4083-4101.

136. Hicke, L., *Protein regulation by monoubiquitin*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2001. **2**(3): p. 195-201.
137. Zheng, N. y N. Shabek, *Ubiquitin Ligases: Structure, Function, and Regulation*. Annu Rev Biochem, 2017. **86**: p. 129-157.
138. Nayak, D. y J. Sivaraman, *Structural basis for the indispensable role of a unique zinc finger motif in LNX2 ubiquitination*. Oncotarget, 2015. **6**(33): p. 34342-57.
139. Guo, Z., et al., *Proteomics strategy to identify substrates of LNX, a PDZ domain-containing E3 ubiquitin ligase*. J Proteome Res, 2012. **11**(10): p. 4847-62.
140. Flynn, M., O. Saha, y P. Young, *Molecular evolution of the LNX gene family*. BMC Evol Biol, 2011. **11**: p. 235.
141. Dho, S.E., et al., *The mammalian numb phosphotyrosine-binding domain. Characterization of binding specificity and identification of a novel PDZ domain-containing numb binding protein, LNX*. J Biol Chem, 1998. **273**(15): p. 9179-87.
142. Rice, D.S., G.M. Northcutt, y C. Kurschner, *The Lnx family proteins function as molecular scaffolds for Numb family proteins*. Mol Cell Neurosci, 2001. **18**(5): p. 525-40.
143. Lenihan, J.A., et al., *Tight, cell type-specific control of LNX expression in the nervous system, at the level of transcription, translation and protein stability*. Gene, 2014. **552**(1): p. 39-50.
144. Gulino, A., L. Di Marcotullio, y I. Screpanti, *The multiple functions of Numb*. Exp Cell Res, 2010. **316**(6): p. 900-6.
145. Nie, J., et al., *LNX functions as a RING type E3 ubiquitin ligase that targets the cell fate determinant Numb for ubiquitin-dependent degradation*. EMBO J, 2002. **21**(1-2): p. 93-102.
146. Bekri, A., M. Liao, y P. Drapeau, *Glycine Regulates Neural Stem Cell Proliferation During Development via Lnx1-Dependent Notch Signaling*. Front Mol Neurosci, 2019. **12**: p. 44.
147. Young, Paul W., *LNX1/LNX2 proteins: functions in neuronal signalling and beyond*. Neuronal Signaling, 2018. **2**(2).
148. Lynn, B.D., et al., *E3 ubiquitin ligases LNX1 and LNX2 localize at neuronal gap junctions formed by connexin36 in rodent brain and molecularly interact with connexin36*. Eur J Neurosci, 2018. **48**(9): p. 3062-3081.
149. Lenihan, J.A., O. Saha, y P.W. Young, *Proteomic analysis reveals novel ligands and substrates for LNX1 E3 ubiquitin ligase*. PLoS One, 2017. **12**(11): p. e0187352.
150. Higa, S., et al., *The active zone protein CAST directly associates with Ligand-of-Numb protein X*. Biochem Biophys Res Commun, 2007. **354**(3): p. 686-92.

151. Young, P., et al., *LNK1 is a perisynaptic Schwann cell specific E3 ubiquitin ligase that interacts with ErbB2*. Mol Cell Neurosci, 2005. **30**(2): p. 238-48.
152. D'Agostino, M., et al., *Ligand of Numb proteins LNK1p80 and LNK2 interact with the human glycoprotein CD8alpha and promote its ubiquitylation and endocytosis*. J Cell Sci, 2011. **124**(Pt 21): p. 3545-56.
153. Takahashi, S., et al., *The E3 ubiquitin ligase LNK1p80 promotes the removal of claudins from tight junctions in MDCK cells*. J Cell Sci, 2009. **122**(Pt 7): p. 985-94.
154. Kansaku, A., et al., *Ligand-of-Numb protein X is an endocytic scaffold for junctional adhesion molecule 4*. Oncogene, 2006. **25**(37): p. 5071-84.
155. Mirza, M., et al., *The cell surface protein coxsackie- and adenovirus receptor (CAR) directly associates with the Ligand-of-Numb Protein-X2 (LNK2)*. Exp Cell Res, 2005. **309**(1): p. 110-20.
156. Zafra, F., et al., *Glycine transporters are differentially expressed among CNS cells*. J Neurosci, 1995. **15**(5 Pt 2): p. 3952-69.
157. Manders, E.M.M., F.J. Verbeek, y J.A. Aten, *Measurement of co-localization of objects in dual-colour confocal images*. Journal of Microscopy, 1993. **169**(3): p. 375-382.
158. Wu, X., et al., *A small molecule with osteogenesis-inducing activity in multipotent mesenchymal progenitor cells*. J Am Chem Soc, 2002. **124**(49): p. 14520-1.
159. Wu, X., et al., *Purmorphamine induces osteogenesis by activation of the hedgehog signaling pathway*. Chem Biol, 2004. **11**(9): p. 1229-38.
160. Sinha, S. y J.K. Chen, *Purmorphamine activates the Hedgehog pathway by targeting Smoothed*. Nat Chem Biol, 2006. **2**(1): p. 29-30.
161. Horiuchi, M., O. El Far, y H. Betz, *Ulip6, a novel unc-33 and dihydropyrimidinase related protein highly expressed in developing rat brain*. FEBS Lett, 2000. **480**(2-3): p. 283-6.
162. Chen, J.K., et al., *Small molecule modulation of Smoothed activity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(22): p. 14071-6.
163. Byrne, E.F., et al., *Multiple ligand binding sites regulate the Hedgehog signal transducer Smoothed in vertebrates*. Curr Opin Cell Biol, 2018. **51**: p. 81-88.
164. Xie, P., et al., *The covalent modifier Nedd8 is critical for the activation of Smurf1 ubiquitin ligase in tumorigenesis*. Nat Commun, 2014. **5**: p. 3733.
165. Nguyen, A.T., et al., *UBE2O remodels the proteome during terminal erythroid differentiation*. Science, 2017. **357**(6350).
166. Yang, Y., et al., *Inhibitors of ubiquitin-activating enzyme (E1), a new class of potential cancer therapeutics*. Cancer Res, 2007. **67**(19): p. 9472-81.

167. Cheng, R.K., S. Jesuthasan, y T.B. Penney, *Time for zebrafish*. Front Integr Neurosci, 2011. **5**: p. 40.
168. Xi, Y., S. Noble, y M. Ekker, *Modeling neurodegeneration in zebrafish*. Curr Neurol Neurosci Rep, 2011. **11**(3): p. 274-82.
169. Fidelin, K. y C. Wyart, *Inhibition and motor control in the developing zebrafish spinal cord*. Curr Opin Neurobiol, 2014. **26**: p. 103-9.
170. Souders, C.L., 2nd, et al., *High-throughput assessment of oxidative respiration in fish embryos: Advancing adverse outcome pathways for mitochondrial dysfunction*. Aquat Toxicol, 2018. **199**: p. 162-173.
171. Mandrell, D., et al., *Automated zebrafish chorion removal and single embryo placement: optimizing throughput of zebrafish developmental toxicity screens*. J Lab Autom, 2012. **17**(1): p. 66-74.
172. Strahle, U., P. Blader, y P.W. Ingham, *Expression of axial and sonic hedgehog in wildtype and midline defective zebrafish embryos*. Int J Dev Biol, 1996. **40**(5): p. 929-40.
173. Chandrasekhar, A., et al., *Role of sonic hedgehog in branchiomotor neuron induction in zebrafish*. Mech Dev, 1998. **76**(1-2): p. 101-15.
174. Chung, A.Y., et al., *Indian Hedgehog b Function Is Required for the Specification of Oligodendrocyte Progenitor Cells in the Zebrafish CNS*. Journal of Neuroscience, 2013. **33**(4): p. 1728-1733.
175. Ravanelli, A.M. y B. Appel, *Motor neurons and oligodendrocytes arise from distinct cell lineages by progenitor recruitment*. Genes Dev, 2015. **29**(23): p. 2504-15.
176. Ravanelli, A.M., et al., *Sequential specification of oligodendrocyte lineage cells by distinct levels of Hedgehog and Notch signaling*. Dev Biol, 2018. **444**(2): p. 93-106.
177. Klatt Shaw, D., et al., *Intracellular Calcium Mobilization Is Required for Sonic Hedgehog Signaling*. Dev Cell, 2018. **45**(4): p. 512-525 e5.
178. Chu, T., et al., *Effect of chloroquine and leupeptin on intracellular accumulation of amyloid-beta (A beta) 1-42 peptide in a murine N9 microglial cell line*. FEBS Lett, 1998. **436**(3): p. 439-44.
179. Seguin, S.J., et al., *Inhibition of autophagy, lysosome and VCP function impairs stress granule assembly*. Cell Death Differ, 2014. **21**(12): p. 1838-51.
180. Wolting, C.D., et al., *Biochemical and computational analysis of LNX1 interacting proteins*. PLoS One, 2011. **6**(11): p. e26248.
181. Fornés, A., et al., *Trafficking properties and activity regulation of the neuronal glycine transporter GLYT2 by protein kinase C*. Biochem J, 2008. **412**(3): p. 495-506.

182. Shapira, R., et al., *Activation of protein kinase C augments evoked transmitter release*. Nature, 1987. **325**(6099): p. 58-60.
183. Vaughan, P.F., J.H. Walker, y C. Peers, *The regulation of neurotransmitter secretion by protein kinase C*. Mol Neurobiol, 1998. **18**(2): p. 125-55.
184. Fioravante, D., et al., *Protein kinase C is a calcium sensor for presynaptic short-term plasticity*. Elife, 2014. **3**: p. e03011.
185. Wang, Y., et al., *Sonic hedgehog induces GLT-1 degradation via PKC delta to suppress its transporter activities*. Neuroscience, 2017. **365**: p. 217-225.
186. Miyauchi, Y., et al., *Investigation of the Endoplasmic Reticulum Localization of UDP-Glucuronosyltransferase 2B7 with Systematic Deletion Mutants*. Mol Pharmacol, 2019. **95**(5): p. 551-562.
187. Andersen, S., et al., *The N-terminally truncated micro3 and micro3-like opioid receptors are transcribed from a novel promoter upstream of exon 2 in the human OPRM1 gene*. PLoS One, 2013. **8**(8): p. e71024.
188. Sander, G., et al., *Intracellular localization map of human herpesvirus 8 proteins*. J Virol, 2008. **82**(4): p. 1908-22.
189. Sagne, C., et al., *SDS-resistant aggregation of membrane proteins: application to the purification of the vesicular monoamine transporter*. Biochem J, 1996. **316 (Pt 3)**: p. 825-31.
190. Thibaudeau, T.A. y D.M. Smith, *A Practical Review of Proteasome Pharmacology*. Pharmacol Rev, 2019. **71**(2): p. 170-197.
191. Vandenberg, R.J., et al., *Glycine transporter2 inhibitors: Getting the balance right*. Neurochem Int, 2016. **98**: p. 89-93.
192. Benito-Muñoz, C., et al., *Structural determinants of the glycine transporter 2 (GlyT2) for the selective inhibitors ALX1393 and ORG25543*. En preparación.
193. Jung, J., et al., *Desert hedgehog is a mediator of demyelination in compression neuropathies*. Experimental Neurology, 2015. **271**: p. 84-94.
194. Wijgerde, M., et al., *A direct requirement for Hedgehog signaling for normal specification of all ventral progenitor domains in the presumptive mammalian spinal cord*. Genes Dev, 2002. **16**(22): p. 2849-64.
195. Belgacem, Y.H. y L.N. Borodinsky, *Sonic hedgehog signaling is decoded by calcium spike activity in the developing spinal cord*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2011. **108**(11): p. 4482-4487.
196. Mitchell, N., et al., *Sonic hedgehog regulates presynaptic terminal size, ultrastructure and function in hippocampal neurons*. J Cell Sci, 2012. **125**(Pt 18): p. 4207-13.

197. Robbins, D.J., D.L. Fei, y N.A. Riobo, *The Hedgehog Signal Transduction Network*. Science Signaling, 2012. **5**(246): p. re6-re6.
198. Ihrie, R.A., et al., *Persistent sonic hedgehog signaling in adult brain determines neural stem cell positional identity*. Neuron, 2011. **71**(2): p. 250-62.
199. Garcia, A.D.R., et al., *The Elegance of Sonic Hedgehog: Emerging Novel Functions for a Classic Morphogen*. J Neurosci, 2018. **38**(44): p. 9338-9345.
200. Masdeu, C., et al., *Distribution of Smoothed at hippocampal mossy fiber synapses*. Neuroreport, 2007. **18**(4): p. 395-9.
201. Petralia, R.S., et al., *Sonic hedgehog distribution within mature hippocampal neurons*. Commun Integr Biol, 2011. **4**(6): p. 775-7.
202. Feng, S., et al., *Sonic hedgehog is a regulator of extracellular glutamate levels and epilepsy*. EMBO Rep, 2016. **17**(5): p. 682-94.
203. Miller, G.W., et al., *Opportunities and challenges for using the zebrafish to study neuronal connectivity as an endpoint of developmental neurotoxicity*. NeuroToxicology, 2018. **67**: p. 102-111.
204. Cui, W.W., et al., *The zebrafish shocked gene encodes a glycine transporter and is essential for the function of early neural circuits in the CNS*. J Neurosci, 2005. **25**(28): p. 6610-20.
205. Ogino, K. y H. Hirata, *Defects of the Glycinergic Synapse in Zebrafish*. Front Mol Neurosci, 2016. **9**: p. 50.
206. Hirata, H., et al., *Zebrafish bandoneon mutants display behavioral defects due to a mutation in the glycine receptor beta-subunit*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(23): p. 8345-50.
207. Ganser, L.R., et al., *Distinct phenotypes in zebrafish models of human startle disease*. Neurobiol Dis, 2013. **60**: p. 139-51.
208. Kimmel, C.B., et al., *Stages of embryonic development of the zebrafish*. Dev Dyn, 1995. **203**(3): p. 253-310.
209. Walter, K.M., et al., *Ontogenetic expression of thyroid hormone signaling genes: An in vitro and in vivo species comparison*. PLoS One, 2019. **14**(9): p. e0221230.
210. Klymkowsky, M., et al., *Individual knock out of glycine receptor alpha subunits identifies a specific requirement of glra1 for motor function in zebrafish*. Plos One, 2019. **14**(5).
211. López-Corcuera, B., C. Benito-Muñoz, y C. Aragón, *Glycine Transporters in Glia Cells: Structural Studies*. Adv Neurobiol, 2017. **16**: p. 13-32.
212. Stiffler, M.A., et al., *PDZ domain binding selectivity is optimized across the mouse proteome*. Science, 2007. **317**(5836): p. 364-9.

213. Nishizaki, T. y Y. Ikeuchi, *Activation of endogenous protein kinase C enhances currents through alpha 1 and alpha 2 glycine receptor channels*. Brain Res, 1995. **687**(1-2): p. 214-6.
214. Sato, K., H. Betz, y P. Schloss, *The recombinant GABA transporter GAT1 is downregulated upon activation of protein kinase C*. FEBS Lett, 1995. **375**(1-2): p. 99-102.
215. Barrera, S.P., et al., *PKC-Dependent GlyT1 Ubiquitination Occurs Independent of Phosphorylation: Inespecificity in Lysine Selection for Ubiquitination*. PLoS One, 2015. **10**(9): p. e0138897.
216. Jayanthi, L.D., et al., *Evidence for biphasic effects of protein kinase C on serotonin transporter function, endocytosis, and phosphorylation*. Mol Pharmacol, 2005. **67**(6): p. 2077-87.
217. Qian, Y., et al., *Protein kinase C activation regulates human serotonin transporters in HEK-293 cells via altered cell surface expression*. J Neurosci, 1997. **17**(1): p. 45-57.
218. Sorkina, T., et al., *RNA interference screen reveals an essential role of Nedd4-2 in dopamine transporter ubiquitination and endocytosis*. J Neurosci, 2006. **26**(31): p. 8195-205.
219. Hong, W.C. y S.G. Amara, *Differential targeting of the dopamine transporter to recycling or degradative pathways during amphetamine- or PKC-regulated endocytosis in dopamine neurons*. FASEB J, 2013. **27**(8): p. 2995-3007.
220. González-González, I.M., et al., *PKC-dependent endocytosis of the GLT1 glutamate transporter depends on ubiquitylation of lysines located in a C-terminal cluster*. Glia, 2008. **56**(9): p. 963-74.
221. Weiss, A., et al., *c-Src is a PDZ interaction partner and substrate of the E3 ubiquitin ligase Ligand-of-Numb protein X1*. FEBS Letters, 2007. **581**(26): p. 5131-5136.
222. Liu, Q.R., et al., *Cloning and expression of a spinal cord- and brain-specific glycine transporter with novel structural features*. J Biol Chem, 1993. **268**(30): p. 22802-8.
223. Fornés, A., et al., *The Second Intracellular Loop of the Glycine Transporter 2 Contains Crucial Residues for Glycine Transport and Phorbol Ester-induced Regulation*. Journal of Biological Chemistry, 2004. **279**(22): p. 22934-22943.
224. Sato, K., et al., *Modulation of a recombinant glycine transporter (GLYT1b) by activation of protein kinase C*. J Neurochem, 1995. **65**(5): p. 1967-73.
225. Granas, C., et al., *N-terminal truncation of the dopamine transporter abolishes phorbol ester- and substance P receptor-stimulated phosphorylation without impairing transporter internalization*. J Biol Chem, 2003. **278**(7): p. 4990-5000.

226. Lenihan, J.A., et al., *Decreased Anxiety-Related Behaviour but Apparently Unperturbed NUMB Function in Ligand of NUMB Protein-X (LNX) 1/2 Double Knockout Mice*. Mol Neurobiol, 2017. **54**(10): p. 8090-8109.
227. Chen, G., et al., *MicroRNA-939 inhibits cell proliferation via targeting LRSAM1 in Hirschsprung's disease*. Aging (Albany NY), 2017. **9**(12): p. 2471-2479.
228. Liu, Y., A. Beyer, y R. Aebersold, *On the Dependency of Cellular Protein Levels on mRNA Abundance*. Cell, 2016. **165**(3): p. 535-50.
229. Metzger, M.B., et al., *RING-type E3 ligases: master manipulators of E2 ubiquitin-conjugating enzymes and ubiquitination*. Biochim Biophys Acta, 2014. **1843**(1): p. 47-60.
230. Burstein, S.H., *N-Acyl Amino Acids (Elmiric Acids): Endogenous Signaling Molecules with Therapeutic Potential*. Mol Pharmacol, 2018. **93**(3): p. 228-238.
231. Ellgaard, L. y E.-M. Frickel, *Calnexin, Calreticulin, and ERp57: Teammates in Glycoprotein Folding*. Cell Biochemistry and Biophysics, 2003. **39**(3): p. 223-248.
232. Kohno, M., et al., *Identification of N-arachidonylglycine as the endogenous ligand for orphan G-protein-coupled receptor GPR18*. Biochem Biophys Res Commun, 2006. **347**(3): p. 827-32.
233. Deak, A.T., et al., *The endocannabinoid N-arachidonoyl glycine (NAGly) inhibits store-operated Ca²⁺ entry by preventing STIM1-Orai1 interaction*. J Cell Sci, 2013. **126**(Pt 4): p. 879-88.

