



FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

**“TRANSPORTADOR DE GLICINA GLYT2: LOCALIZACIÓN SUBCELULAR,
ASOCIACIÓN CON BALSAS LIPÍDICAS Y BIOGÉNESIS”**

Tesis doctoral

Pablo Alonso Torres

Madrid, 9 de junio de 2017

Universidad Autónoma de Madrid

FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

Tesis Doctoral presentada para optar al grado de Doctor en Bioquímica

Fdo. Pablo Alonso Torres

Licenciado en Biología y Bioquímica

Madrid, 9 de junio de 2017

El presente trabajo: “Transportador de glicina GlyT2: localización subcelular, asociación con balsas lipídicas y biogénesis”, presentado por Pablo Alonso Torres para optar al grado de Doctor en Bioquímica, ha sido realizado bajo mi dirección en el departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad Autónoma de Madrid.

Revisado el texto, estoy conforme con su presentación para ser juzgado.

Madrid, 9 de junio de 2017

La directora de la Tesis

Dra. Beatriz López Corcuera

Profesora Titular de la Universidad Autónoma de Madrid

He leído/escuchado muchas veces de otras tesis: “lo más difícil de escribir han sido los agradecimientos”, la verdad es que tengo que disentir, además de lo complejo y duro que ha sido juntar toda esta información y reflexiones, tengo bastante claro a quienes debo dar las gracias:

Me gustaría empezar por darle las gracias a Ester, nunca se ha separado de mi lado ni ha tratado de sacarme una idea de la cabeza, ni cuando dije “quiero dedicarme a la ciencia” ni cuando dije “quiero dejar la ciencia”, el amor parte de la comprensión y el respeto, intentaré aplicármelo más yo también.

Gracias a mis hijos, Isabel y Rodrigo, quienes me recuerdan a diario el sentido de la vida y la razón de nuestra existencia y, por fin, me han hecho comprender lo que siempre me dijo mi madre cuando le apenaba verme pasarlo mal o se alegraba por mí y decía “lo entenderás cuando tengas hijos”.

Por supuesto agradecer a mis padres Roberto y María que me han dado todas las comodidades (y caprichos) y han puesto a mi alcance todo lo necesario para mi formación, que ha sido bastante larga. Gracias, especialmente, a mi madre, que me aguantó, prácticamente sola, durante más de 2 décadas, una luchadora incansable y, por cierto, co-autora de la portada.

Entrando ya en el área científica, querría agradecer en primer lugar a Enri sus conocimientos y paciencia explicando el uso de la “báscula”, el “chismazu” y demás aparataje delicado del labo generación tras generación de pre-docs; también, gracias a mis co-doctorandos: Amparo, Inma, Lara, Quique, Gon, Noemí que hicieron muy llevaderas las muchas horas en cultivos o rascando pocillos... grandes personas a las que les deseo lo mejor; gracias a los sabios del 330/340, Carmen, Cecilio y Paco por sus consejos y comprensión; también a las nuevas generaciones del labo, gracias Lucía por hacer un poco más fácil toda la burocracia y a Esther ayudándome con algunos de los resultados y figuras; gracias a Carol por sus consejos y ayuda domando el word y el endnote durante la fase de escritura; y me dejo para el final a Beatriz, sin la que esta tesis no habría sido posible, muchas gracias por tu confianza hace más de 15 años y por ayudarme tanto en esta segunda oportunidad que pocas veces se tiene.

Mención especial a mis colegas actuales con los que llevo los 10 últimos años compartiendo momentos MUY intensos y que consiguen hacer de Janssen la mejor compañía, también gracias a los “jefes” por entender la necesidad (sobre todo espiritual) de cerrar adecuadamente este capítulo de mi vida.

Y gracias a todos mis familiares y amigos que, aunque no os haya nombrado, os llevo muy dentro del corazón.

Gracias

Pablo

RESUMEN

La glicina actúa como neurotransmisor inhibitor en áreas caudales del sistema nervioso central de vertebrados y está implicada en el procesamiento de la información sensorial y motora. La retirada de la glicina sináptica se realiza por proteínas transportadoras que la incorporan a la célula junto con iones sodio y cloruro. GlyT2, el transportador presente en la membrana plasmática de neuronas presinápticas, se ocupa de suministrar glicina al terminal glicinérgico y de reciclar el neurotransmisor sináptico para su inclusión en las vesículas de secreción. Su función es necesaria para el correcto funcionamiento de la neurotransmisión glicinérgica. Se han identificado mutaciones en el gen humano de GlyT2 como causantes de un desorden neurológico denominado hiperplexia o “enfermedad del sobresalto”, caracterizado por respuestas exageradas ante estímulos triviales, táctiles o auditivos, y alteraciones respiratorias. GlyT2 es también una proteína relevante en el procesamiento de la información nociceptiva. En esta Tesis doctoral se ha llevado a cabo un análisis de la localización subcelular del transportador, a partir de sinaptosomas de tallo cerebral de rata, mediante técnicas bioquímicas e inmunológicas que han identificado la naturaleza de las vesículas intracelulares de GlyT2. El transportador se encuentra en vesículas grandes y pequeñas donde co-localiza con sinaptofisina, Rab11 y, en las más grandes, también con VIAAT. Rab5A, GAT1, sinaptotagmina2 y VAMP2 no se asocian a vesículas de GlyT2. Se ha demostrado la regulación funcional del tráfico de GlyT2 por la GTPasa Rab11 que está presente en vesículas endosomales que contienen GlyT2.

Por otro lado, mediante fraccionamiento de las membranas de tallo cerebral esta Tesis demuestra que GlyT2 está asociado a balsas lipídicas y que su actividad se regula de manera reversible por los niveles de colesterol y esfingolípidos en la membrana.

Adicionalmente se ha realizado un estudio en células en cultivo mediante marcaje metabólico e inmunoprecipitación del transportador expresado para analizar los requerimientos de la biogénesis de GlyT2. Este estudio constituye un marco adecuado para facilitar el progreso a la membrana de mutantes de hiperplexia. Se ha comprobado que GlyT2 se sintetiza como precursor inmaduro con N-glicosilación incompleta que da lugar a la forma de mayor tamaño presente en superficie que contiene glicanos en cuatro asparaginas de EL2. La N-glicosilación estabiliza el plegamiento de GlyT2 y condiciona la distribución asimétrica en células MDCK. En el RE, GlyT2 es asistido en su biogénesis por la chaperona CNX. Mediante mutagénesis de los sitios de glicosilación y herramientas farmacológicas hemos demostrado que la unión a CNX depende del número y posición de los azúcares del transportador, así como de interacciones proteína-proteína. La expresión de GlyT2 y su actividad de transporte se atenúan al reducir la expresión de CNX mediante un ARNi específico de la chaperona. Finalmente, se han investigado las vías de degradación del transportador que puede degradarse vía proteasoma, posiblemente mediado por ERAD, aunque la degradación del transportador de membrana plasmática es sobre todo lisosomal.

ABSTRACT

Glycine acts as an inhibitory neurotransmitter in caudal areas of the central nervous system of vertebrates and is involved in the processing of sensory and motor information. The removal of the synaptic glycine is performed by transporter proteins that reuptake the transmitter into the cell along with sodium and chloride ions. GlyT2, the presynaptic neuronal transporter, is responsible for delivering glycine to the glycinergic terminal and for recycling the synaptic neurotransmitter for inclusion in the secretory vesicles. Its function is necessary for the proper functioning of glycinergic neurotransmission. Mutations in the human GlyT2 gene have been identified as causing a neurological disorder called hyperekplexia or "startle disease", characterized by exaggerated responses to trivial, tactile or auditory stimuli, and respiratory disturbances. GlyT2 is also a relevant protein in the processing of nociceptive information. In this Doctoral Thesis an analysis of the subcellular localization of the transporter from rat cerebral stem synaptosomes, has been carried out using biochemical and immunological techniques that have identified the nature of the intracellular vesicles of GlyT2. The transporter is found in large and small vesicles where it co-localizes with synaptophysin, Rab11 and, in larger ones, also with VIAAT. Rab5A, GAT1, synaptotagmin2 and VAMP2 are not associated with GlyT2 vesicles. Functional regulation of the traffic of GlyT2 by the small GTPase Rab11, present in endosomal vesicles containing GlyT2, has been demonstrated.

On the other hand, by means of fractionation of brain stem membranes we have demonstrated that GlyT2 is associated with lipid rafts and that glycine transport activity is reversibly regulated by the levels of cholesterol and sphingolipids in the membrane.

In addition, a study in cells in culture was carried out by metabolic labeling and immunoprecipitation of the expressed transporter to analyze the requirements of GlyT2 biogenesis. This study provides an adequate framework to facilitate progress to the membrane of hyperekplexia mutants. GlyT2 has been shown to be synthesized as an immature precursor with incomplete N-glycosylation resulting in the larger surface form containing glycans in four EL2 asparagines. N-glycosylation stabilizes the folding of GlyT2 and conditions the asymmetric distribution in MDCK cells. In the RE, GlyT2 is assisted in its biogenesis by the chaperone CNX. By mutagenesis of the glycosylation sites and pharmacological tools we have shown that CNX binding depends on the number and position of the transporter sugars as well as protein-protein interactions. Expression of GlyT2 and its transport activity are attenuated by reducing the expression of CNX by a specific RNAi of the chaperone. Finally, the degradation pathways of the transporter have been investigated. It can be degraded via the proteasome, possibly mediated by ERAD, although the degradation of the plasma membrane transporter is mainly lysosomal.

ÍNDICE

0. ABREVIATURAS.....	10
1. INTRODUCCIÓN.....	15
1.1 Las conexiones del sistema nervioso: neuronas y sinapsis.....	15
1.2 La glicina: neurotransmisor inhibidor del sistema nervioso central.....	18
1.2.1 Neurotransmisión glicinérgica.....	19
1.2.2 Neurotransmisión glutamatérgica.....	20
1.3 Transportadores de glicina: papel modulador de la señal de glicina.....	21
1.3.1 Tipos de transportadores de glicina: GlyT1 y GlyT2.....	21
1.3.2 Localización, estructura y función de los transportadores de glicina.....	22
1.3.3 Mecanismos reguladores de la actividad de GlyT2.....	27
1.4 Tráfico intracelular de GlyT2.....	27
1.4.1 Regulación de GlyT2 en la vía secretora.....	28
1.4.3 Regulación de la endocitosis de GlyT2.....	32
1.4.3 Estudio de la localización vesicular de GlyT2 mediante marcadores.....	36
1.5 Dominios lipídicos “rafts” y sistema nervioso.....	40
1.5.1 Papel de los lipid rafts en las membranas de las neuronas.....	43
1.5.2 Relación del colesterol de la membrana plasmática con la regulación de la actividad de proteínas en el sistema nervioso.....	45
1.6 Papel de la N-glicosilación en la actividad de las proteínas.....	45
1.7 Potencial farmacológico de GlyT2: hiperplexia y dolor.....	51
2. OBJETIVOS.....	54
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	55
3.1 Materiales utilizados.....	55
3.2 Generación de un antisuero de rata policlonal específico contra GlyT2.....	57
3.3 Construcción de plásmidos para técnicas de microscopía confocal de fluorescencia.....	57
3.4 Cultivos celulares y expresión de proteínas.....	57
3.4.1 Cultivo y transfección de células COS7.....	57
3.4.2 Cultivo y transfección de células MDCK.....	58
3.5 Cultivos primarios de neuronas de tallo cerebral de rata.....	58
3.6 Obtención de sinaptosomas de médula espinal y tallo cerebral.....	58
3.7 Fraccionamiento subcelular a partir de sinaptosomas de médula espinal y tallo cerebral.....	59
3.8 Aislamiento de membranas resistentes a detergentes (lipid rafts) de sinaptosomas de tallo cerebral.....	60

3.9 Aislamiento de membranas de tejidos celulares	60
3.10 Determinación de colesterol	61
3.11 Proteólisis limitada	61
3.12 Electroforesis, inmunodetección y cuantificación densitométrica	61
3.13 Experimentos de transporte de [³ H]-glicina en cultivos celulares	62
3.14 Biotinilación de proteínas de superficie en sinaptosomas y cultivos celulares	63
3.15 Aislamiento de rafts a partir de sinaptosomas biotinilados	64
3.16 Experimentos de doble inmunofluorescencia	64
3.16.1 En cultivos primarios de neuronas	64
3.16.2 En secciones de médula espinal y tallo cerebral	65
3.17 Coinmunoprecipitación e inmunoprecipitación secuencial de GlyT2 y calnexina en células COS7	66
3.18 Ensayos de inmovilización sobre partículas magnéticas revestidas de proteína A	67
3.19 Técnicas de Inmunohistoquímica	67
3.19.1 Inmunohistoquímica pre-inclusión (preembedding) en muestras de tejido	67
3.19.2 Inmunohistoquímica post-inclusión (postembedding) en sinaptosomas	68
3.20 Técnicas de inmunomarcaje	69
3.20.1 Inmunomarcaje de las balsas lipídicas de membrana	69
3.20.2 Inmunomarcaje de fracciones vesiculares de tallo cerebral purificadas en gradiente de glicerol	69
3.21 Técnica de ARNi	70
3.22 Experimentos de pulso y caza en cultivos celulares	71
3.23 Modificación de carbohidratos en la molécula de GlyT2	71
4. RESULTADOS	72
4.1 Localización celular y subcelular de GlyT2 en neuronas del tallo cerebral y médula espinal	72
4.1.1 Confirmación de la presencia de GlyT2 en la membrana plasmática de neuronas inhibitoras	72
4.1.2 Distribución de GlyT2 en la membrana plasmática y el interior celular de la neurona presináptica	74
4.1.3 Caracterización de las vesículas de tráfico intracelular que contienen GlyT2 en terminales nerviosas	76
4.1.4 Presencia de GlyT2 en endosomas de reciclaje: relación con la proteína Rab11	87
4.2 Localización de GlyT2 en microdominios lipídicos ricos en colesterol o lipid rafts	96
4.2.1 Distribución de GlyT2 en diferentes fracciones de membrana	96
4.2.2 Localización de GlyT2 en la superficie de la membrana plasmática	98

4.2.3 Evaluación del desplazamiento lateral de GlyT2 en la membrana de balsas lipídicas por efecto del nivel de colesterol.....	101
4.2.4 Estudio de la relación de los componentes lipídicos de los dominios raft de membrana con la actividad de GlyT2 en la recaptación de glicina	105
4.3 Análisis de la biogénesis y la modificación por N-glicosilación de GlyT2	110
4.3.1 Caracterización de intermediarios de glicosilación de GlyT2: efecto de los inhibidores de la glicosilación sobre la actividad del transporte de GlyT2	110
4.3.2 Estudio de mutantes de N-glicosilación de GlyT2	118
4.3.3 Propiedades del mutante completamente deglicosilado de GlyT2 (N1234)	126
4.3.4 Determinación de la actividad de transporte de los mutantes, expresión en superficie y distribución asimétrica en células polarizadas	130
4.3.5 Mecanismos de degradación de GlyT2: inhibición del lisosoma o del proteasoma	134
5. DISCUSIÓN.....	137
5.1 Localización celular y subcelular de GlyT2 en neuronas del tallo cerebral y médula espinal	137
5.1.1 GlyT2 está presente en la membrana plasmática de neuronas inhibitoras, pero en mayor medida se encuentra en vesículas intracelulares	137
5.1.2 GlyT2 está presente en varios tipos de vesículas presinápticas	138
5.1.3 Rab11 está implicada en el tráfico intracelular de GlyT2 a través de endosomas de reciclaje	139
5.2 Localización de GlyT2 en microdominios lipídicos ricos en colesterol o lipid rafts	141
5.2.1 GlyT2 se asocia a los microdominios rafts de membrana plasmática y membranas intracelulares.....	141
5.2.2 El funcionamiento óptimo de GlyT2 depende de su asociación a microdominios de membrana ricos en colesterol.....	142
5.3 Análisis de la biogénesis y la modificación por N-glicosilación de GlyT2	145
5.3.1 GlyT2 se sintetiza en el RE como un precursor inmaduro glicosilado.....	145
5.3.2 La calnexina participa activamente en la biogénesis de GlyT2	145
5.3.3 La glicosilación estabiliza la conformación y la actividad de transporte.....	147
5.4 Distribución asimétrica de GlyT2 en células polarizadas (MDCK)	148
6. CONCLUSIONES	151
7. BIBLIOGRAFÍA	152
8. ANEXO, PUBLICACIONES	169

0. ABREVIATURAS

ADNc: ácido desoxirribonucleico complementario

AMPA: ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico

ARNds: ácido ribonucleico de doble cadena

ARNd-si: ácido ribonucleico de silenciamiento

ARNi: ácido ribonucleico de interferencia

ARNm: ácido ribonucleico mensajero

ATP: adenosín trifosfato

ATPasa: adenosintrifosfatasa

BSA: albúmina de suero bovino

CHAPS: ácido3-((3-colamidopropil) dimetilamonio)-1-propanosulfónico

CNX: calnexina

COPII: de las siglas en inglés *coat protein complex II*

COS7: línea celular de fibroblastos de riñón de primate

CRMP5: de las siglas en inglés *Collapsin Response Mediator Protein 5*

dDAT: transportador de dopamina de *Drosophila melanogaster*

DIV: días *In Vitro*

DMEM: modificación del medio de cultivo celular Basal Medium Eagle (BME) que contiene 4 veces la concentración de aminoácidos y vitaminas.

DMSO: dimetilsulfóxido

DTT: ditioneitol

dn: mutantes dominantes negativos

EC50: concentración efectiva media de un fármaco

ECL: acrónimo del inglés "*Enhanced chemiluminescence*" traducido como reactivo intensificador de quimioluminiscencia

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

ELISA: acrónimo del inglés "*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*" traducido como 'ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas'

EMC: endocitosis mediada por clatrina

EndoD: endoglicosidasa D

EndoH: endoglicosidasa H

ERAD: acrónimo del inglés "*Endoplasmic-reticulum-associated protein degradation*" traducido como "degradación proteica asociada al retículo endoplasmático".

GABA: ácido γ -amino butírico

GAPs: proteínas activadoras de actividad GTPasa

GAT1: transportador de GABA 1

GEF: factores intercambiadores de nucleótidos de guanina

GFP: proteína verde fluorescente

GLYT: transportador de glicina

GSK3: glucógeno sintasa 3 kinasa

GST: glutathion-S-transferasa

GTP: guanosintrifosfato

GTPasa: guanosintrifosfatasa

HBM: medio tamponado con HEPES

HBS: solución salina tamponada con HEPES

HBSS: solución salina equilibrada de Hank

HEPES: ácido 4-(2-hidroxietil)piperazin-1-iletanosulfónico

HPRT: hipoxantina fosforribosiltransferasa

hSERT: transportador de serotonina humano

IgG: inmunoglobulina tipo G

Km: constante cinética de Michaelis-Menten

MAP2: proteína asociada a microtúbulo 2

MBS: tampón salino tamponado con ácido 2-(N-morfolino) etanosulfónico

MDCK: línea celular de epitelio de riñón canino Madin-Darby

M β CD: metil- β -ciclodextrina

NCX: intercambiador Na⁺/Ca²⁺

NMDA: N-metil-D-aspartato

NSS: de las siglas en inglés *neurotransmitter sodium symporter*

NT: tampón neutralizante, de las siglas en inglés *neutralize tagment*

PAS: proteína-A-Sefarosa

PBS: tampón fosfato salino

PC12: línea celular derivada de médula suprarrenal de rata en cultivo

PERK: proteína kinasa transmembrana de la familia PEK residente en la membrana del retículo endoplasmático

PGS: proteína-G-sefarosa

PI: fosfatidil inositol

PIP₂: fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato

PKC: proteín kinasa C

PMA: forbol 12-miristato 13-acetato

PMCA: ATPasa de calcio de membrana plasmática

PMSF: fluoruro de fenilmetilsulfonilo

PSF: de las siglas en inglés *Point Spread Function*, es el límite de resolución que tiene el equipo donde se han tomado las imágenes.

PNGasa: péptido N.glicosidasa

PSD: proteína de la densidad post-sináptica

RE: retículo endoplasmático

RIPA: tampón de lisis de ensayo de radioinmunoprecipitación

RTF: receptor de transferrina

SDS-PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico

SLC6: de las siglas en inglés *Solute Carrier 6*

SNAP: proteína asociada a sinaptosoma

SNARE: receptor de proteína de fijación soluble de NSF

SNC: sistema nervioso central

STAG2: sinaptotagmina 2

SYN: sinaptofisina

TGN: red Trans Golgi

TM: dominio transmembrana

TNT: tampón Tris-NaCl-Tween

UPR: respuesta a proteínas desplegadas

VAMP2: proteína de membrana asociada a vesículas tipo 2

VGAT: de las siglas en inglés *Vesicular GABA Transporter*

VGLUT2: transportador vesicular marcador de neuronas excitadoras glutamatérgicas

VIAAT: transportador vesicular marcador de neuronas inhibitoras glicinérgicas/GABAérgicas

$V_{m\acute{a}x}$: velocidad máxima de una enzima, aquella que se obtendría cuando toda la enzima se encuentra unida al sustrato

VS: vesícula sináptica

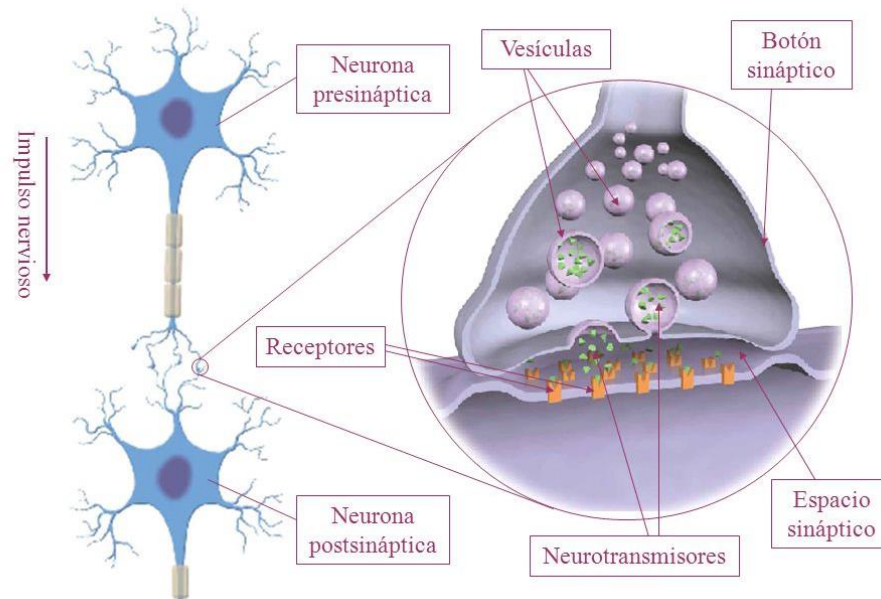
1. INTRODUCCIÓN

1.1 Las conexiones del sistema nervioso: neuronas y sinapsis

El sistema nervioso (SN) recibe, procesa e interpreta estímulos externos e internos para dar lugar a una respuesta rápida que permita reaccionar al organismo ante estos estímulos. La unidad celular encargada de transmitir la información a lo largo del sistema nervioso es la neurona. Las **neuronas** son células que contienen los orgánulos más comunes, como el retículo endoplasmático, el aparato de Golgi, mitocondrias, lisosomas, etc., pero además presentan una diferenciación específica a nivel morfológico y una composición proteínica única, lo que les permite realizar su función de recepción, integración y transmisión de una señal eléctrica a lo largo de su membrana plasmática. En una neurona se pueden diferenciar un cuerpo celular conocido como soma, las dendritas y el axón, y en función del tamaño que tengan, de la ramificación de las dendritas o de la expresión de ciertas proteínas, se determinan los diferentes subtipos neuronales que se pueden encontrar en el sistema nervioso.

Las neuronas se comunican unas con otras gracias a una estructura muy diferenciada y especializada denominada **sinapsis**. En general, se compone de la terminación del axón de una neurona, que se ensancha y forma el botón presináptico, el cual se posiciona sobre la dendrita, o menos frecuentemente sobre el soma o axón de otra neurona, que es la que recibe la información de la primera. La región donde sucede esta conexión se denomina región postsináptica, y entre las membranas de ambas neuronas, la presináptica y la postsináptica, se localiza el espacio conocido como hendidura sináptica, con unas dimensiones que están entre 20 a 50 nm de anchura (Ilustración 1) (Lerma 2010).

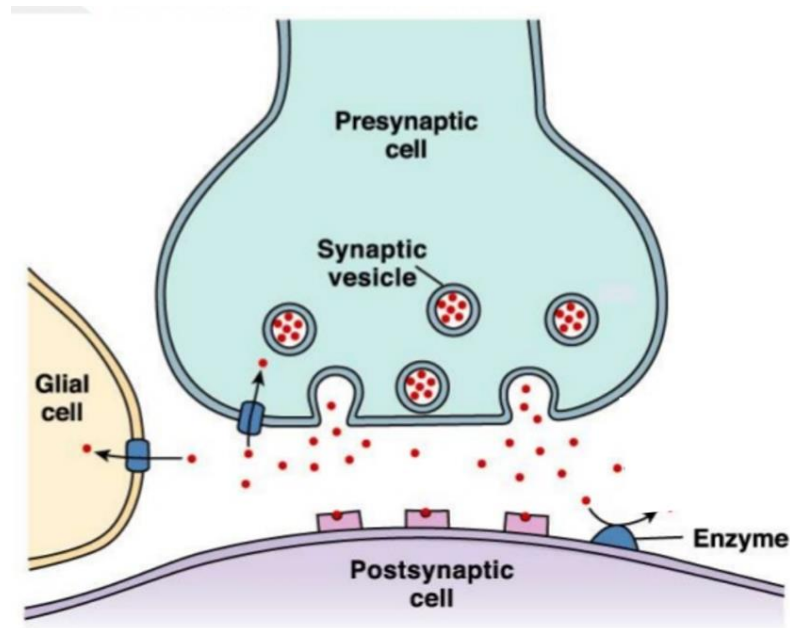
Ilustración 1. Esquema de una sinapsis química entre dos neuronas



Se representa un modelo de sinapsis química, con la liberación de neurotransmisores en vesículas desde la neurona presináptica, que atraviesan el espacio sináptico y actúan sobre los receptores específicos en la membrana de la neurona postsináptica.

Las sinapsis pueden ser eléctricas o químicas, en este último caso tienen lugar gracias a la liberación de unas sustancias conocidas como **neurotransmisores**. Existen varios tipos de neurotransmisores con diferentes funciones en la transmisión de la señal nerviosa: derivados de aminas (dopamina, serotonina, norepinefrina, etc.), aminoácidos (glutamato, glicina, ácido gamma-aminobutírico, etc.), purinas (como el ATP), otras pequeñas moléculas como la acetilcolina o neuropéptidos como la somatostatina. Los neurotransmisores clásicos funcionan de manera similar mediante un mecanismo de liberación desde el terminal presináptico, unión al receptor postsináptico específico y excitación o inhibición de la neurona postsináptica. A excepción de los neuropéptidos que se inactivan mediante hidrólisis y la acetilcolina que también puede utilizar esta vía, la señal de los neurotransmisores pequeños cesa mediante la recaptación del neurotransmisor a través de transportadores específicos neuronales y gliales (Ilustración 2) (Lerma 2010).

Ilustración 2. Liberación y recaptación del neurotransmisor en la sinapsis



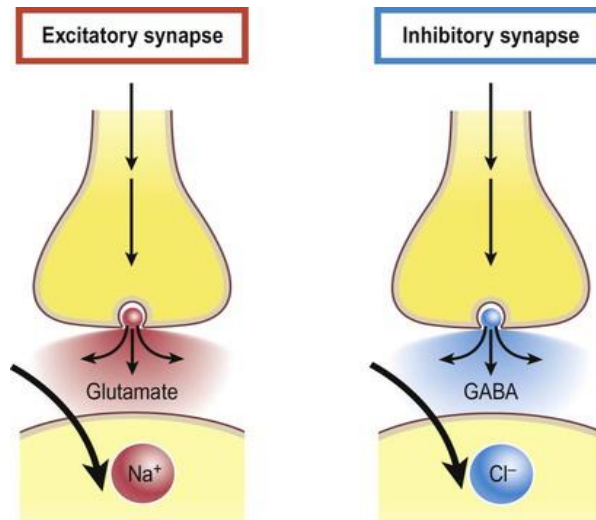
Se representa un esquema de la liberación de neurotransmisor en vesículas sinápticas desde la neurona presináptica, que tras actuar sobre los receptores específicos en la membrana de la neurona postsináptica, puede ser reciclado mediante la recaptación en las células gliales próximas o la propia neurona presináptica, a través de transportadores específicos.

La liberación del neurotransmisor desde el terminal nervioso tiene lugar mediante la fusión de las vesículas donde se ha almacenado previamente con la membrana plasmática en una región especializada conocida como zona activa. Tras el potencial de acción, el calcio penetra en la neurona a través de canales dependientes de voltaje que se abren por la despolarización provocando la exocitosis de las vesículas sinápticas (VS) y la liberación del neurotransmisor en una escala de tiempo de milisegundos (entre 0,3 y 3 ms). Esta acción tan rápida y precisa se produce gracias a la participación de varias proteínas, entre las que destacan la sinaptotagmina y las proteínas del complejo SNARE que se describirán más adelante en el apartado 1.4 (Rizzoli 2014).

Existen diferentes tipos de neurotransmisores, que pueden ser excitadores, como el glutamato, o inhibidores, como la glicina o el GABA (ácido γ -amino butírico). Los primeros provocan la despolarización de la neurona postsináptica aumentando la permeabilidad para cationes, mientras que los segundos la hiperpolarizan aumentando selectivamente la permeabilidad para el cloruro (Ilustración 3). Las señales excitadoras aproximan el potencial de reposo de la membrana al umbral de disparo de un potencial de acción, mientras que las inhibitoras lo alejan. La neurona postsináptica integra las señales excitadoras e inhibitoras que recibe y, en función de la suma resultante, genera o no un potencial de acción y transmite así la señal nerviosa. Sin

embargo, un mismo neurotransmisor puede funcionar como excitador o inhibidor según los diferentes tipos de receptores con los que interacciona, generando así respuestas diferentes en la neurona postsináptica (Lerma 2010).

Ilustración 3. Sinapsis excitadoras e inhibitoras



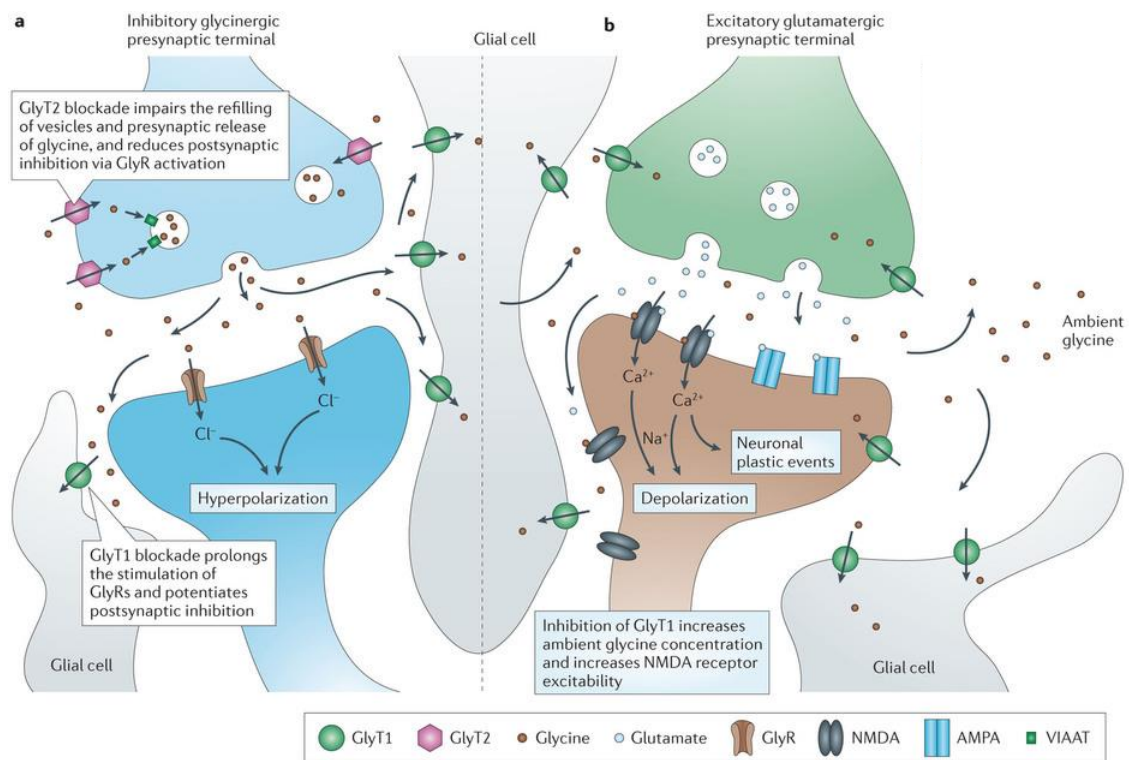
Se representan dos ejemplos de sinapsis química, las excitadoras mediadas por glutamato, o por acetilcolina, y las inhibitoras mediadas por GABA, o por glicina. En el primer caso, los principales receptores implicados son canales catiónicos inespecíficos, mientras que en el segundo son canales aniónicos.

La mayoría de los neurotransmisores, una vez realizada su función, se retiran del espacio sináptico gracias a la acción de unos **transportadores** específicos localizados en la membrana de las neuronas o las células de la glía adyacentes. Por un lado, estos transportadores constituyen el mecanismo más importante para la terminación de la transmisión de la señal en la sinapsis, pero por otro lado tienen otra función importante, la de asegurar la disponibilidad de niveles adecuados del neurotransmisor en la neurona presináptica para la próxima vez que se requiera transmitir la señal (Lerma 2010).

1.2 La glicina: neurotransmisor inhibidor del sistema nervioso central

La glicina es un pequeño aminoácido que, como neurotransmisor, tiene un doble papel en el sistema nervioso central. Por un lado, es neurotransmisor inhibidor en las vías glicinérgicas pero también es co-agonista del glutamato sobre el receptor *N*-metil-D-aspartato (NMDA) en vías glutamatérgicas excitadoras. La terminación de la neurotransmisión se produce por la recaptación de la glicina a través de transportadores específicos dependientes de sodio y cloruro, GlyT1 y GlyT2, que se localizan en la membrana plasmática de las terminales nerviosas y en los astrocitos próximos a la sinapsis (Ilustración 4) (Harvey y col. 2013).

Ilustración 4. Regulación de la neurotransmisión en sinapsis glicinérgicas y glutamatérgicas a través de los transportadores de glicina



(a) En las sinapsis glicinérgicas inhibitorias, GlyT2 mantiene una concentración elevada de glicina en los terminales presinápticos, mientras que la señal inhibitoria finaliza gracias al transporte activo de GlyT1 (células gliales) y GlyT2 (neurona presináptica). La introducción de la glicina hacia el interior de las vesículas se lleva a cabo por el transportador vesicular VIAAT, permitiendo así la reutilización del neurotransmisor en el siguiente ciclo de liberación. El bloqueo de GlyT1 prolonga la estimulación de los receptores de glicina y potencia la inhibición postsináptica. La inhibición completa de GlyT2 puede reducir la neurotransmisión al alterar la recaptación vesicular en el terminal presináptico. **(b)** En las sinapsis glutamatérgicas que expresan receptores de NMDA, GlyT1 se localiza en los terminales pre y postsináptico, así como en las células de la glía cercanas, contribuyendo a reducir la concentración extracelular de glicina en el espacio sináptico. (Harvey y col. 2013)

1.2.1 Neurotransmisión glicinérgica

La glicina es considerada como el principal neurotransmisor inhibitorio en las áreas posteriores del sistema nervioso central en los vertebrados. Participa en el control de la generación del ritmo motor durante el movimiento en la médula espinal y el tallo cerebral, a través de un sistema inhibitorio de retroalimentación mediado por interneuronas glicinérgicas (Legendre 2001). La glicina interviene también en el procesamiento de la información auditiva, a través de los núcleos cocleares, el complejo de la oliva superior y el colículo inferior (Wenthold y col. 1990) y la información visual, mediante la modulación de los campos receptivos en la retina (Pourcho RG 1990). Además, la glicina está implicada en la supresión de señales nociceptivas en la médula espinal (Harvey y col. 2004).

La glicina se acumula en las vesículas sinápticas del terminal presináptico mediante la actividad del transportador vesicular de aminoácidos inhibidores (VIAAT), que transporta glicina o GABA en intercambio con protones hacia el interior vesicular (Juge y col. 2009) (Ilustración 4). El transportador VIAAT presenta una afinidad reducida por la glicina (mM), por lo que requiere elevadas concentraciones del aminoácido en el terminal para el relleno eficiente de vesículas (Gasnier 2004).

Tras la despolarización de la neurona glicinérgica, la glicina se libera a la hendidura sináptica mediante exocitosis dependiente de calcio. (Mulder y col. 1974). La glicina liberada al espacio sináptico interacciona y activa receptores postsinápticos específicos (GlyRs). Estos receptores pertenecen a la misma familia que los receptores de GABA_{A/C}, la superfamilia de receptores pentaméricos cuyo paradigma es el receptor nicotínico de acetilcolina (Zafra y col. 1997). Al interaccionar con su receptor postsináptico, la glicina abre un canal de cloruro que hiperpolariza la membrana y genera un potencial postsináptico inhibitorio (Werman y col. 1967). La acción finaliza mediante la acción de proteínas de membrana plasmática, GlyT1 y GlyT2, que transportan específicamente la glicina retirándola de la hendidura sináptica (Zafra y col. 1995, Zafra y col. 1997) (Ilustración 4). De esta forma, los transportadores, por un lado, reducen los niveles de glicina en el espacio sináptico deteniendo la señal, y por otro lado permiten el reciclaje del neurotransmisor para su uso en las próximas sinapsis glicinérgicas.

1.2.2 Neurotransmisión glutamatérgica

La glicina también funciona como un neurotransmisor excitador en la neurotransmisión glutamatérgica a través de receptores tipo NMDA (Johnson y col. 1987, Betz y col. 2006). Estos receptores tienen un papel importante en el desarrollo neuronal, el aprendizaje, la memoria, la plasticidad sináptica y la neurodegeneración (Cull-Candy y col. 2001).

Los receptores tipo NMDA son canales catiónicos operados por ligando que permiten el paso a iones sodio, potasio y, sobre todo, son altamente permeables al calcio (Mayer y col. 1987) (Ilustración 4). La glicina se comporta como co-agonista obligado de glutamato en la activación de estos receptores heteroméricos que están formados por la asociación de dos tipos de subunidades, la NR1 donde se encuentra el sitio de unión a glicina, y uno de los cuatro tipos de subunidad NR2 descritos (de la A a la D), que une glutamato y modula la afinidad del sitio de unión (Cull-Candy y col. 2001).

Para que se produzca la apertura del canal y la entrada de iones calcio al interior celular, provocando la máxima activación del receptor NMDA, se requiere la unión de los dos neurotransmisores, dos moléculas de glutamato y dos de glicina (Benveniste y col. 1991, Clements y col. 1991).

La interacción de la glicina con la subunidad NR1 es necesaria para la internalización de la proteína desde la membrana plasmática a través de una vía dependiente de clatrina (Kemp y col. 1993, Nong y col. 2003). La unión de la glicina al receptor tipo NMDA incrementa la afinidad de éste por el glutamato y provoca una menor unión de antagonistas al sitio del glutamato en la subunidad NR2 (Bergeron y col. 1998).

1.3 Transportadores de glicina: papel modulador de la señal de glicina

La glicina liberada al espacio sináptico es rescatada hacia el interior de los terminales nerviosos por transportadores específicos localizados en la membrana de la neurona o de células de la glía adyacentes. Este transporte se genera en contra de un gradiente de concentración de varios órdenes de magnitud, por lo que requiere una gran energía que se consigue gracias a la Na⁺-K⁺-ATPasa, que genera y mantiene un gradiente electroquímico de sodio a través de la membrana plasmática. Se conocen dos tipos de transportadores de glicina de alta afinidad en el sistema nervioso de mamíferos, GlyT1 y GlyT2, codificados por diferentes genes (*SLC6A9* y *SLC6A5*) y que además pueden presentarse en distintas isoformas generadas por procesamiento alternativo de los ARN mensajeros o bien por el uso de diferentes promotores de transcripción (Lopez-Corcuera y col. 2001).

1.3.1 Tipos de transportadores de glicina: GlyT1 y GlyT2

Los transportadores GlyT1 y GlyT2 pertenecen a la familia génica de los transportadores SLC6 (*Solute Carrier 6*) o NSS (*neurotransmitter sodium symporter*), que incluye a transportadores de otros neurotransmisores importantes como los de noradrenalina, dopamina, serotonina y GABA (Kristensen y col. 2011). Los transportadores de esta familia requieren el transporte de iones cloruro junto al sodio y el neurotransmisor.

Los transportadores GlyT1 y GlyT2 son proteínas que solo comparten alrededor del 48% en rata y 50% en humano de la secuencia de aminoácidos y además presentan diferencias relevantes

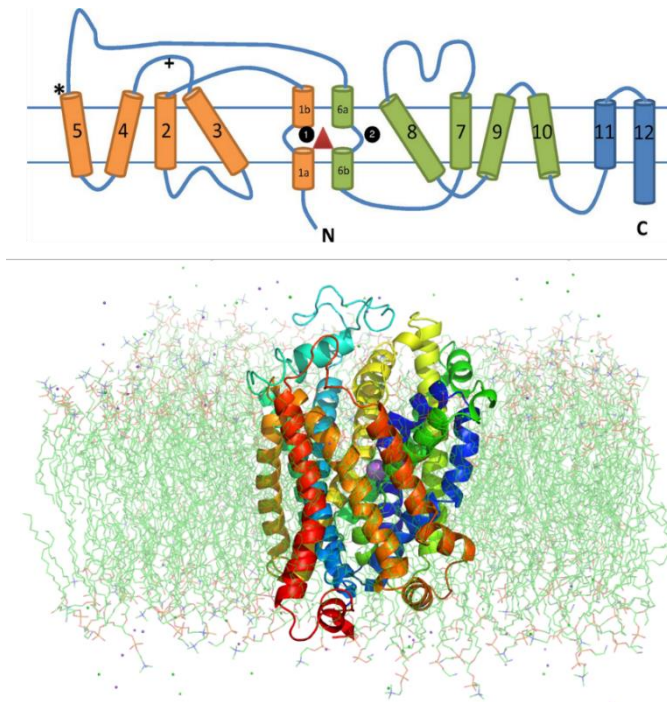
en su función, farmacología y distribución tisular y celular (Eulenburg y col. 2005, Dohi y col. 2009). Sin embargo, tienen papeles complementarios en la neurotransmisión glicinérgica inhibitoria (Lopez-Corcuera y col. 2001, Aragon y col. 2003, Aragon y col. 2005).

1.3.2 Localización, estructura y función de los transportadores de glicina

GlyT1 se expresa principalmente en el SNC, sobre todo en astrocitos (Adams y col. 1995) aunque también se ha encontrado en otras células, como las neuronas glutamatérgicas del hipocampo (Cubelos y col. 2005). Por otro lado, también puede encontrarse GlyT1 en otras localizaciones tisulares, como el hígado, el páncreas o el intestino. Sin embargo, GlyT2 se expresa exclusivamente en las sinapsis glicinérgicas del SNC del tallo cerebral y la médula espinal, concretamente en las interneuronas glicinérgicas (Jursky y col. 1995).

Existen modelos estructurales tridimensionales de GlyT1 y GlyT2 (Perez-Siles y col. 2012) que han proporcionado importantes claves para comprender el efecto de determinadas mutaciones en residuos críticos implicados en la unión del sodio y de la glicina (Eulenburg y col. 2006, Rees y col. 2006, Harvey y col. 2008, Gimenez y col. 2012, Carta y col. 2012). Según este modelo, basado en el transportador de leucina ortólogo procariota LeuTAa (Yamashita y col. 2005), GlyT2 posee una estructura formada por 12 dominios transmembrana (TM) conectados entre sí por 5 bucles intracelulares y 6 extracelulares y con los extremos amino y carboxilo terminal orientados hacia el interior celular. Los dominios TM 1-5 se posicionan en una conformación antiparalela con respecto a los dominios TM 6-10 (Perez-Siles y col. 2011, Perez-Siles y col. 2012) (Ilustración 5).

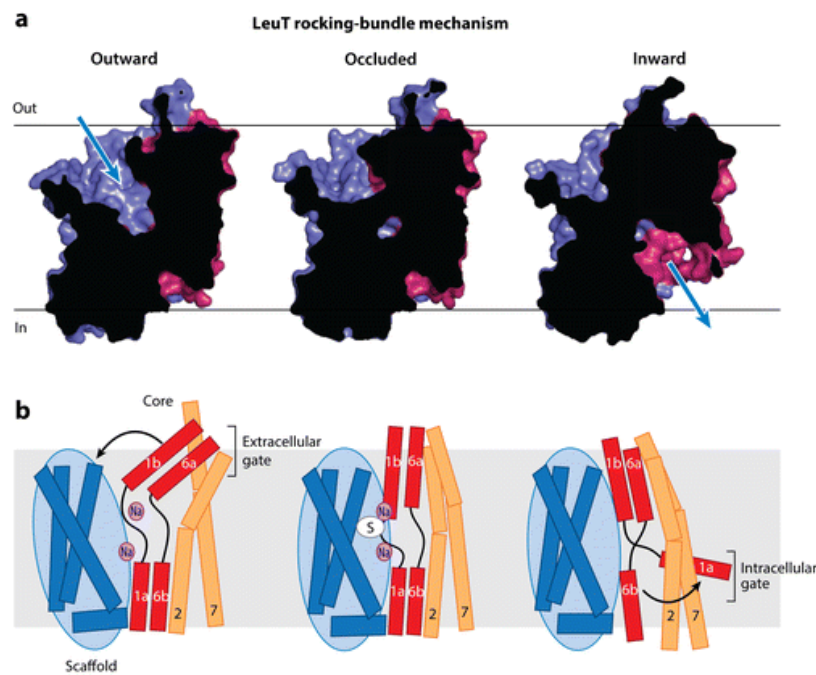
Ilustración 5. Esquema de la estructura de GlyT2 y la familia SLC6 en dominios transmembrana



El transportador GlyT2 contiene 12 dominios transmembrana, con los extremos N y C-terminal orientados hacia el citosol de la neurona. Los dominios se conectan entre sí por 5 bucles intracelulares y 6 extracelulares. El sitio de unión al sustrato se localiza entre las hélices 1 y 6 (triángulo rojo). Los números (1) y (2) determinan la posición de unión de los iones de sodio (Broer y col. 2011). En el panel inferior se aprecia una visión lateral del modelo de GlyT2 realizado por homología con dDAT. Los distintos dominios transmembrana aparecen en colores y el sustrato como una esfera.

Los dos grupos de TMs invertidos se entrelazan para formar dos haces de cuatro hélices cada uno: un haz llamado de andamiaje (*scaffold*) más estático y un haz llamado núcleo (*core*) que se mueve durante el transporte. Los sitios de unión a sustrato e iones se encuentran en el centro, donde las hélices TM1 y TM6 se desenrollan parcialmente. Durante el transporte de glicina, la proteína transportadora se abre a un lado de la membrana para cargar los sustratos y luego al lado opuesto para liberarlos experimentando rotación de un haz sobre el otro y dando lugar a las conformaciones hacia fuera y hacia dentro mediante cambios conformacionales durante esta transformación (hipótesis del acceso alternante)(Rudnick y col. 2014) (Ilustración 6).

Ilustración 6. Conformaciones hacia afuera y hacia dentro de LeuT



a) El transportador en conformación abierta "hacia fuera" (outward-open) vacío, ocluido "hacia afuera" (outward-occluded) y conformación abierta "hacia dentro" (inward-open). Se muestra el haz de andamiaje (scaffold) en morado y el núcleo (core) en granate, destacando la vía de translocación del sustrato.

b) Representación esquemática de la rotación del dominio del núcleo (rojo y naranja) frente al dominio de andamiaje (azul). Otros cambios conformacionales locales adicionales de los TMs extracelulares 1b, 6a (rojo) y 7 (naranja), e intracelular TM1a definen respectivamente las puertas de entrada y salida del sustrato, respectivamente. Los dos iones de sodio, Na1 y Na2 se muestran como esferas granates y el sustrato se representa como un óvalo blanco. (Drew y col. 2016)

Los modelos generados sobre GlyT1 y GlyT2 han permitido identificar residuos cruciales en la actividad de transporte y función de GlyTs (Rees y col. 2006, Carta y col. 2012) como, por ejemplo, el único residuo responsable de la diferente sensibilidad de los transportadores GlyT1 y GlyT2 al inhibidor competitivo, sarcosina (N-metilglicina), sustrato selectivo de GlyT1. La presencia de una serina (Ser481) en el sitio de unión al sustrato de GlyT2 impide su interacción con sarcosina, que es de mayor tamaño que la propia glicina, mientras que en el caso de GlyT1 la presencia de un residuo de glicina en la posición equivalente (Gly403), permite tanto la unión del inhibidor competitivo como su transporte (Vandenberg y col. 2007).

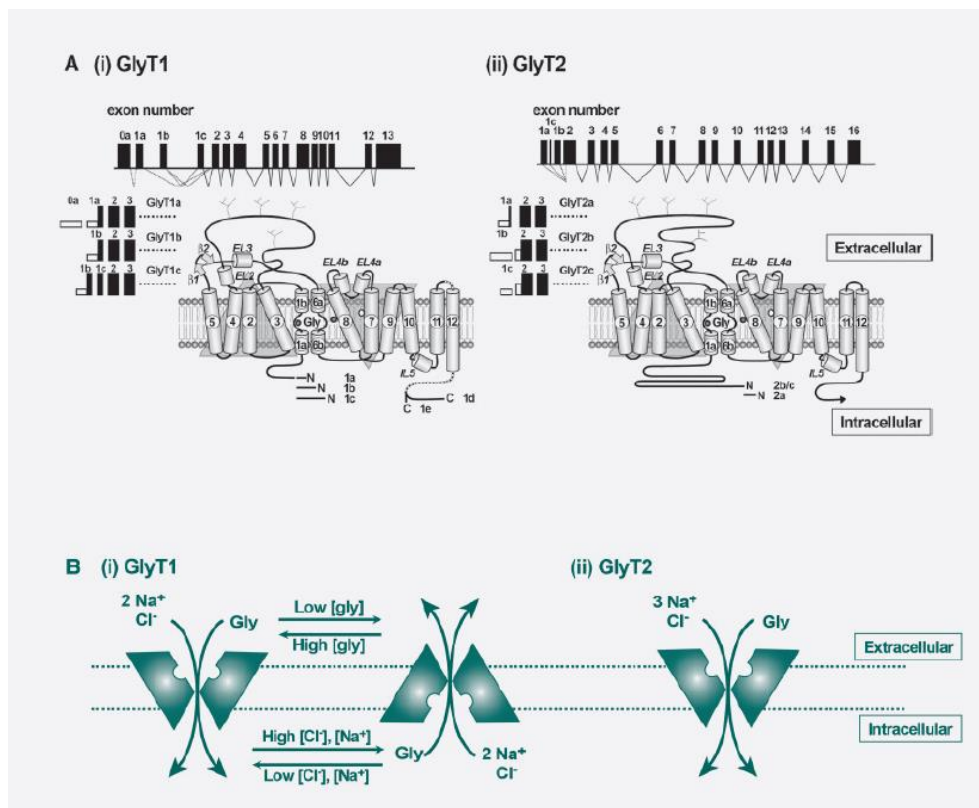
Recientemente se ha resuelto la estructura cristalográfica de dos homólogos eucariotas SLC6, el transportador de dopamina de *Drosophila melanogaster* (dDAT), y el transportador de serotonina humano (hSERT), en la conformación hacia fuera (Penmatsa y col. 2013, Coleman y col. 2016). En ambos casos destaca la presencia de moléculas de colesterol asociadas a las proteínas transportadoras, aunque en diferentes posiciones, lo que es especialmente relevante

en el caso de GlyT2 que, como se demuestra en esta tesis, está asociado a dominios lipídicos de la membrana (Nunez y col. 2008, de Juan-Sanz y col. 2011). De hecho, la actividad óptima de transporte de GlyT2, al igual que la de DAT, se produce cuando el transportador se localiza en los *lipid rafts* (balsas lipídicas) (de Juan-Sanz y col. 2011). Algunas mutaciones en GlyT2, por ejemplo, la Ser512, aunque no está implicada directamente en la unión al colesterol podría alterar el sitio de unión de éste en el transportador GlyT2 (Penmatsa y col. 2013, Arribas-González y col. 2015).

Por otro lado, GlyT1 y GlyT2 comparten un bucle hidrofílico entre los dominios transmembrana III y IV que contiene varios sitios de N-glicosilación. De hecho, ambos transportadores son proteínas altamente glicosiladas (Martinez-Maza y col. 2001). Para que el transportador GlyT2 pueda ejercer su función requiere la N-glicosilación en el bucle 2 extracelular (Scott y col. 2014). Esta modificación es fundamental para que el transportador llegue a la zona correcta de la membrana donde tendrá que ejercer su función, y por lo tanto, la N-glicosilación es imprescindible en la fisiología de la neurona glicinérgica (Martinez-Maza y col. 2001).

En cuanto a su papel fisiológico, las particularidades de GlyT1 y GlyT2 se basan sobre todo en sus propiedades termodinámicas únicas. GlyT1 cataliza el cotransporte de sodio/cloruro/glicina con una estequiometría de 2:1:1, mientras que en el caso de GlyT2 ésta es de 3:1:1, es decir, transporta un ion sodio adicional (Lopez-Corcuera y col. 1998, Roux y col. 2000). Así, se asegura el transporte de glicina al terminal axónico debido a que la fuerza motriz para el transporte contra gradiente de concentración de sustrato es dos órdenes de magnitud mayor para GlyT2 que para GlyT1. Esta característica hace que GlyT2 presente una marcada limitación a llevar a cabo el transporte reverso, mientras que GlyT1 puede responder a necesidades fisiológicas importando o exportando glicina, en función del entorno químico que se dé en cada caso (Supplisson y col. 2002) (Ilustración 7).

Ilustración 7. Diferencias estructurales, génicas y de transporte entre GlyT1 y GlyT2



A) Estructura del gen de GlyT1 (SLC6A9, 14 exones) y GlyT2 (SLC6A5, 16 exones). GlyT1 posee tres variantes de “splicing” que difieren en su N-terminal (GlyT1a-c) y dos variantes que difieren en su C-terminal (GlyT1d-e) mientras que GlyT2 solo posee tres variantes en su N-terminal (GlyT2a-c). GlyT2 presenta mayor longitud del extremo amino terminal, con unos 200 aminoácidos. B) Diferencias en el ciclo de transporte de glicina por GlyT1 y GlyT2. Mientras que GlyT1 acopla el transporte a 2 iones Na⁺, GlyT2 necesita cotransportar 3 iones Na⁺. Esta diferencia en el acoplamiento iónico implica que GlyT1 necesita menor fuerza motriz para el transporte que GlyT2, lo que le permite funcionar en modo reverso dependiendo de los cambios en la concentración extracelular de sustrato o gradientes iónicos, mientras que GlyT2 carece de esta posibilidad (Dohi y col. 2009).

Los estudios realizados en ratones *knockout* han revelado las funciones de los dos transportadores que parecen ser claramente diferentes. Mientras que el papel principal de GlyT1 en el SNC es terminar la señal de la neurona glicinérgica mediante la retirada de glicina de la hendidura sináptica, en el caso de GlyT2 su principal función es la reposición del reservorio de glicina en la neurona presináptica (Gomez y col. 2003, Gomez y col. 2003).

GlyT2 está implicado en la retirada y el reciclaje de glicina de la sinapsis inhibitora pues el transportador vesicular VIAAT (VGAT) tiene baja afinidad y necesita suficiente aporte de glicina al terminal (McIntire y col. 1997, Aragon y col. 2003, Gomez y col. 2003, Gomez y col. 2003). La glicina presináptica captada por GlyT2 ha demostrado ser la única fuente de transmisor capaz de liberarse en las sinapsis glicinérgicas (Rousseau y col. 2008). Además, GlyT2 ayuda a GlyT1 en la regulación de los niveles de glicina en la sinapsis (Aragon y col. 2005, Vandenberg y col. 2016).

1.3.3 Mecanismos reguladores de la actividad de GlyT2

Se conoce que la actividad de GlyT2 puede ser regulada por varios **mecanismos** como: la actividad neuronal (Geerlings y col. 2001); la activación de quinasas como la proteína quinasa C (PKC) (Fornes y col. 2008, de Juan-Sanz y col. 2011) o la glucógeno sintasa 3 quinasa (GSK3) (Jimenez y col. 2015); el ambiente lipídico de la membrana (de Juan-Sanz y col. 2011); la activación de receptores como los purinérgicos P2Y y P2X (Jimenez y col. 2011, Villarejo-López 2017); la ubiquitinación (de Juan-Sanz y col. 2013); la función de la calnexina (chaperona del retículo endoplasmático)(Arribas-Gonzalez y col. 2015), la activación de la proteína Na⁺/K⁺-ATPasa (de Juan-Sanz y col. 2013); la función de proteínas reguladoras de calcio como la ATPasa de calcio de membrana plasmática (PMCA) y el intercambiador Na⁺/Ca²⁺ (NCX) (de Juan-Sanz y col. 2014). Los endocannabinoides N-araquidonil glicina y N-oleil glicina inhibiben selectivamente a GlyT2 frente a GlyT1 (Vandenberg y col. 2014). Muchos de estos mecanismos inciden en el control del tráfico intracelular de GlyT2. Uno de los objetivos de esta tesis es profundizar en el conocimiento de estos mecanismos, especialmente en **la interacción de GlyT2 con CNX**.

Otro interesante mecanismo de regulación de la actividad de GlyT2 descrito en esta tesis es la asociación del transportador con **microdominios ricos en colesterol y esfingolípidos** (*membrane rafts*). Además, la endocitosis del transportador está también relacionada con su asociación a *rafts* (Fornes y col. 2008, de Juan-Sanz y col. 2011).

1.4 Tráfico intracelular de GlyT2

El transportador GlyT2 ejerce su función en la superficie de axones y terminales presinápticos de las neuronas glicinérgicas pero también es abundante en el interior celular. Anteriormente a esta tesis, no se conocían con exactitud los compartimentos intracelulares en los que se distribuía el transportador GlyT2. De hecho, cuando GlyT2 se expresa en sistemas heterólogos como las células COS7 o PC12, solo el 20% del total de GlyT2 está accesible en la superficie de la membrana plasmática y este porcentaje disminuye aún más en el caso del estudio de los sinaptosomas (Geerlings y col. 2001, Geerlings y col. 2002). Por lo tanto, es interesante profundizar en el estudio del tráfico intracelular de GlyT2 para conocer con exactitud dónde se localiza y cómo se puede regular su actividad en los diferentes compartimentos en los que se encuentra.

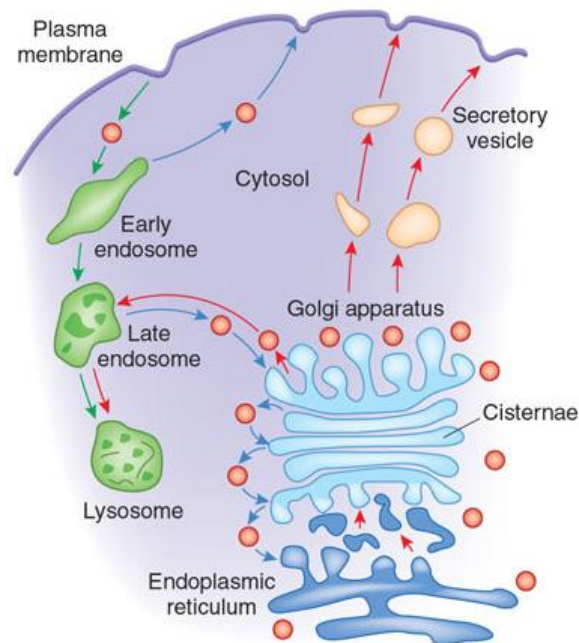
De hecho, el **tráfico intracelular** de una proteína de membrana es un mecanismo de regulación rápido y versátil de su actividad. En el caso concreto de la actividad neuronal, el tráfico de proteínas juega un papel fundamental y es el principal mecanismo por el que se regulan los transportadores de neurotransmisores como GlyT2 (Blakely y col. 2000, Melikian 2004). El equilibrio entre la exocitosis (llegada a la membrana plasmática de la neurona presináptica) y la endocitosis (retirada desde la membrana) del transportador GlyT2 determina el tiempo de acción del neurotransmisor en la sinapsis (Kessels y col. 2009, Blakely y col. 2012).

En trabajos del laboratorio se ha demostrado que GlyT2, al igual que la mayor parte de proteínas de membrana, tiene un tráfico regulado mediante exo- o endocitosis y uno constitutivo que recicla continuamente desde la membrana al interior celular y viceversa (Fornes y col. 2008, de Juan-Sanz y col. 2013). El primero puede estar modulado por diversos mecanismos, por ejemplo, la exocitosis de GlyT2 está regulada, entre otros factores como se expondrá más adelante, por incrementos de los niveles de Ca^{2+} y syntaxina-1A, que a su vez son dependientes de la función neuronal (Geerlings y col. 2001).

1.4.1 Regulación de GlyT2 en la vía secretora

Se estima que aproximadamente un tercio de las proteínas traducidas en genomas eucariotas entra en la vía secretora (Dancourt y col. 2010). Esta vía está compuesta por un complejo sistema de endomembranas y determina la ubicación de cada proteína en la célula y, por ende, que esta pueda ejercer su función correctamente (Ilustración 8).

Ilustración 8. Compartimentos intracelulares implicados en el tráfico de proteínas



Los compartimentos intracelulares implicados en el tráfico intracelular de proteínas son dinámicos y se comunican entre ellos, por ejemplo, a través de vesículas, que pueden viajar largas distancias desde el compartimento donde se formaron hacia el compartimento destino (PL 2010).

El tráfico de GlyT2 hacia y desde la membrana plasmática ha sido estudiado en los últimos años con el foco en la vía secretora tardía (de Juan-Sanz y col. 2011, de Juan-Sanz y col. 2013). Sin embargo, se conoce poco de la biogénesis y tráfico del transportador a través de la vía secretora temprana. Esto es relevante, dada la importancia de la vía en el plegamiento de las proteínas y en la fisiología y patologías relacionadas con la neurotransmisión glicinérgica.

El ingreso en la vía secretora de las proteínas de membrana como GlyT2 comienza mediante la síntesis en ribosomas asociados al RE y la translocación cotraduccional a la membrana del retículo (Walter y col. 1994). La proteína naciente debe plegarse y procesarse en el RE, lo que requiere la interacción con proteínas tipo chaperonas (Hebert y col. 2007). En concreto, la **calnexina** es una proteína de membrana integral de tipo I responsable del plegamiento y el control de calidad de las glicoproteínas de nueva síntesis (Parodi 2000).

También en el RE se producen múltiples **modificaciones postraduccionales** como son la glicosilación inicial o las modificaciones redox, (Perri y col. 2015), así como las adiciones de lípidos como las palmitoilaciones, que también se producen en el aparato de Golgi (Aicart-Ramos y col. 2011). La **N-glicosilación** de GlyT2 es parcialmente responsable de su llegada a la membrana plasmática y su distribución asimétrica en células polarizadas, aunque no es

absolutamente necesaria para la actividad del transportador (Olivares y col. 1995, Martínez-Maza y col. 2001). En el siguiente apartado se analiza con más detalle este mecanismo de regulación del tráfico de GlyT2. Por otro lado, el estudio de las propiedades redox de GlyT2, una proteína con 22 cisteínas, así como de las posibles modificaciones de estas cisteínas, se encuentra en marcha en el laboratorio (Gimenez y col. 2012, De Felipe 2017).

El transporte en vesículas en este sistema de endomembranas es un proceso altamente regulado que debe su selectividad a la cubierta proteica que recubre cada vesícula. La salida del retículo se produce en vesículas COPII (*coat protein complex II*) que representan un importante punto de control de calidad de las proteínas ya que estas deben estar correctamente plegadas y ensambladas para ser exportadas (Vembar y col. 2008). El primer paso en la captura de las proteínas cargo se produce por la unión coordinada de los componentes de COPII Sar1 GTPasa, el complejo Sec23-Sec24, seguido por el complejo Sec13-Sec31 (Barlowe y col. 1994). Algunas mutaciones de GlyT2 impiden la correcta unión a proteínas Sec24D que forman parte de la cubierta interna de las vesículas de COPII que seleccionan las proteínas cargo (Arribas-Gonzalez y col. 2015). Por otro lado, la mutación del motivo RL homólogo en los transportadores de GABA se ha implicado en la interacción con Sec24D (Farhan y col. 2007), impide también la salida del retículo de GlyT1 (Fernandez-Sanchez y col. 2008) y GlyT2 (Arribas-González 2017).

La salida del aparato de Golgi y la llegada de las proteínas a la membrana plasmática está regulada por distintas proteínas. Un conjunto de proteínas reguladoras del tráfico de membrana son las **GTPasas Rab**, a su vez reguladas por otras proteínas que modulan su actividad GTPasa. Las Rabs son proteínas solubles, asociadas a membrana mediante cadenas de geranil-geranilo unidas a cisteínas C-terminales (Gomes y col. 2003). Se encargan de coleccionar proteínas efectoras de localización restringida a un compartimento membranoso concreto de manera dependiente de GTP. Hay distintas GTPasas localizadas en diferentes compartimentos membranosos cuyas proteínas efectoras regulan la generación y dirección de vesículas de tráfico, controlando su especificidad, tal y como se comenta más adelante (Zhen y col. 2015, Wojnacki y col. 2016).

La fusión de las vesículas secretoras con la membrana plasmática (y otras membranas) está mediado por **proteínas SNARE** (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor*) que determinan la especificidad de la fusión y la hacen termodinámicamente posible. Las v-SNAREs presentes en las vesículas interaccionan para la fusión con las t-SNAREs en membranas diana. En el caso de las vesículas sinápticas (VS), la v-SNARE es VAMP o sinaptobrevina y las t-SNAREs de la membrana plasmática son syntaxina 1 y SNAP25. Las SNAREs tienen un dominio *coiled-coil* (dos en SNAP-25) de unos 70 aminoácidos. La interacción de los

dominios de v y t-SNAREs conduce a la formación de un complejo trans-SNARE o SNARE *pin* que puede ejercer gran tensión y lleva las membranas opuestas lo suficientemente cerca como para catalizar la fusión. Tras la fusión, el complejo cis-SNARE que ha quedado en las membranas fusionadas se desensambla por la ATPasa sensible a N-etilmaleimida (NSF) y su cofactor SNAP que reciclan el complejo SNARE para una nueva fusión (Sudhof y col. 2009). Las SNAREs son proteínas transmembrana, algunas con un TM C-terminal, otras con modificaciones lipídicas como la palmitoilación (SNAP25). Su actividad está muy regulada por distintos mecanismos como la unión a otras proteínas, la fosforilación (Wojnacki y col. 2016), el entorno lipídico (Lang y col. 2001).

En las terminaciones sinápticas, las interacciones de GlyT2 con las proteínas **sintenina-1** y **SNARE sintaxina 1A** estabilizan y regulan la inserción del transportador en la membrana (Geerlings y col. 2000, Geerlings y col. 2001, Ohno y col. 2004). Como ya se ha mencionado, la sintaxina 1A y el calcio son responsables de la rápida llegada de GlyT2 a la superficie de la neurona en respuesta a la liberación de glicina al espacio sináptico (Geerlings y col. 2000). Esto hace suponer que el tráfico de GlyT2 se produce en vesículas que podrían ser vesículas sinápticas. Mediante un primer análisis por microscopía electrónica de sinaptosomas purificados se encontró que el transportador se asocia con pequeñas vesículas similares a las vesículas sinápticas (*small synaptic-like vesicles*) (Geerlings y col. 2001).

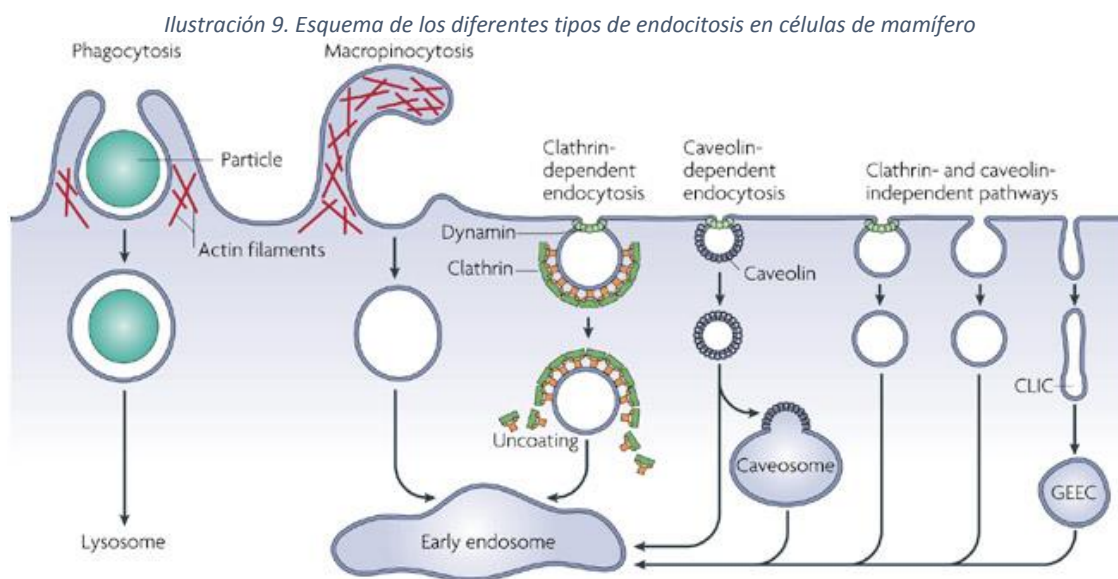
Por otro lado, el extremo N-terminal de GlyT2 interacciona con una proteína implicada en el crecimiento axonal, **Ulip-6** (CRMP5, *Collapsin Response Mediator Protein 5*). Aunque se desconoce cómo regula esta interacción a GlyT2, se sugiere que podría reducir su presencia en membrana controlando su tráfico de acuerdo con el papel de proteínas homólogas a Ulip-6 (Horiuchi y col. 2005).

Recientemente, se ha demostrado en el laboratorio que la expresión en membrana de GlyT2 puede ser estimulada mediante activación de la glucógeno sintasa 3 kinasa (**GSK3**), aunque el mecanismo de esta regulación no ha sido investigado (Jimenez y col. 2015). También la activación de receptores purinérgicos **P2X3** genera un aumento de la expresión en superficie del transportador (Villarejo-López 2017). En este último caso, la liberación de glicina es también producida por agonistas P2X3 y precede a la expresión en superficie de GlyT2, lo que de nuevo sugiere el tráfico de GlyT2 en vesículas tipo sinápticas.

1.4.3 Regulación de la endocitosis de GlyT2

La endocitosis es el proceso celular básico mediante el cual la célula internaliza una gran variedad de sustancias. Existen distintos tipos de endocitosis según la molécula que vaya a internalizarse. Una vez endocitadas, las proteínas de membrana se dirigen al sistema endosomal, una red túbulo-vesicular muy dinámica que se extiende por todo el citoplasma celular y que regula la degradación y/o reciclaje de las proteínas internalizadas (Murphy y col. 2009) (Ilustración 8).

La endocitosis es un mecanismo de la célula que permite regular la composición lipídica y proteica de la membrana plasmática, con el fin de reaccionar a determinados estímulos del entorno o del interior celular. La endocitosis se puede producir por diferentes mecanismos que varían en función de las proteínas o lípidos implicados. En la Ilustración 9 se resumen los principales procesos de endocitosis a pequeña escala que tienen lugar en la célula.



La endocitosis mediada por clatrina es fundamental para regular la entrada de una variedad de receptores postsinápticos y transportadores de neurotransmisores de diversos tipos en neuronas y células de la glía (Jung y col. 2007, Royle y col. 2010). Las proteínas endocitadas mediante clatrina se dirigen hacia el endosoma temprano. (Mayor y col. 2007).

La **endocitosis mediada por clatrina** (EMC) constituye la vía mayoritaria de internalización de proteínas en células eucariotas. Este proceso es básico en el terminal presináptico para que la sinapsis funcione de forma correcta ya que permite la retirada y reciclaje de las VS tras su fusión durante la liberación del neurotransmisor. Por otro lado, la endocitosis mediada por clatrina también es clave para la regulación de cantidad de receptores postsinápticos y transportadores

de neurotransmisores de diversos tipos en neuronas y células de la glía (Jung y col. 2007, Royle y col. 2010, Merrifield y col. 2014, Mahapatra y col. 2016, Liang y col. 2017).

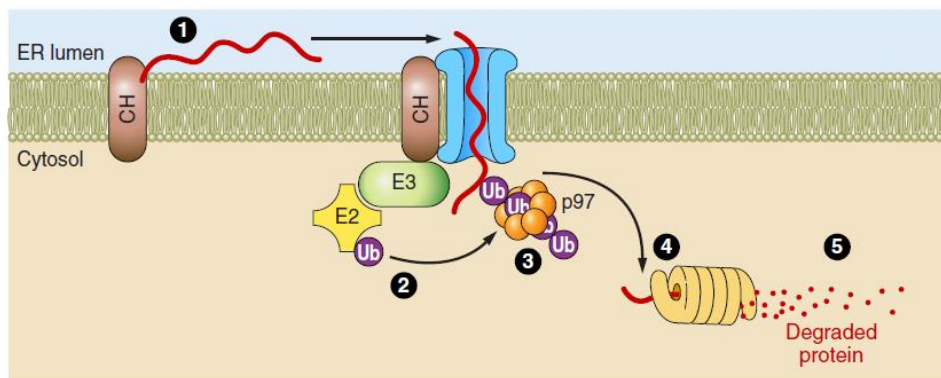
La endocitosis mediada por **clatrina** está altamente regulada y en ella participan una gran variedad de proteínas, entre las cuales la clatrina, la dinamina y hasta 60 diferentes tipos de adaptadores que operan en una secuencia ordenada, tienen un papel relevante (Merrifield y col. 2014). Otros factores implicados son el lípido de membrana fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP₂) que no solo activa a los canales de calcio dependientes de voltaje sino que interacciona con muchas de las proteínas involucradas en la endocitosis mediada por clatrina facilitando su organización (Liang y col. 2017). También es relevante el papel del citoesqueleto en el andamiaje de proteínas como la dinamina. Esta GTPasa media la fisión de la vesícula endocítica que es el último paso del proceso de endocitosis, aunque recientemente se le ha adjudicado un papel aún no bien definido en exocitosis (Mahapatra y col. 2016).

Nuestro grupo ha demostrado recientemente que la endocitosis mediada por clatrina es el principal mecanismo responsable de la internalización constitutiva y regulada de GlyT2 y se ha propuesto que la lisina 791 del C-terminal es clave en la internalización del transportador mediada por PKC (de Juan-Sanz y col. 2011). El destino inicial de las proteínas endocitadas a través de una vía dependiente de clatrina son los **endosomas tempranos**. Desde estos compartimentos intracelulares, las proteínas pueden volver a la membrana plasmática por un proceso de reciclaje, dirigirse a otros orgánulos celulares o ser degradadas en los lisosomas (Ungewickell y col. 2007) (Ilustración 8).

Por otro lado, las proteínas de membrana de la familia SLC6 como GlyT2, así como otros canales receptores y transportadores (Traub y col. 2007), también pueden ser endocitadas mediante un proceso dependiente de **ubiquitinación**. De esta forma, las proteínas se internalizan a través del sistema endosomal y, en función del marcaje que reciban, su destino es uno u otro. La ubiquitinación es una modificación postraducciona que supone la unión covalente de la ubiquitina (polipéptido de 76 aminoácidos) a la proteína diana (Urbe 2005). Este mecanismo tiene lugar en numerosos procesos celulares, como la degradación de proteínas, la reparación del ADN, la remodelación de la cromatina o la regulación del ciclo celular. De hecho, la ubiquitinación es clave en el control de calidad que se produce en el RE a través del sistema ERAD (degradación asociada al RE). Esta ruta de degradación se inicia con el reconocimiento de la proteína aberrante (por ejemplo porque se haya plegado de forma incorrecta), se ubiquitina y tras este marcaje la proteína sale del RE de vuelta al citosol mediante retrotraslocación, será en el citosol donde el proteosoma la degrada (Foot y col. 2017) (Ilustración 10). El proceso de

ERAD es especialmente relevante cuando se produce en las células la llamada respuesta a proteínas mal plegadas (UPR), un mecanismo que contrarresta alteraciones de plegamiento (estrés) en el RE y que puede restaurar la proteostasis (Perri y col. 2015). La activación moderada de la UPR señala la inhibición de la traducción, la expansión de la membrana del RE, la sobreexpresión y localización de chaperonas para corregir los defectos de plegamiento, así como el aumento de la degradación de proteínas. De este modo, se reduce el estrés de RE. La unión de chaperonas específicas a los núcleos hidrofóbicos expuestos de intermediarios de plegamiento evita la agregación proteica y promueve su estabilización (Kim y col. 2013). Sin embargo, bajo condiciones crónicas o de estrés de RE irreversible, la activación de UPR desencadena señales proapoptóticas que dan lugar a muerte celular (Hetz y col. 2014).

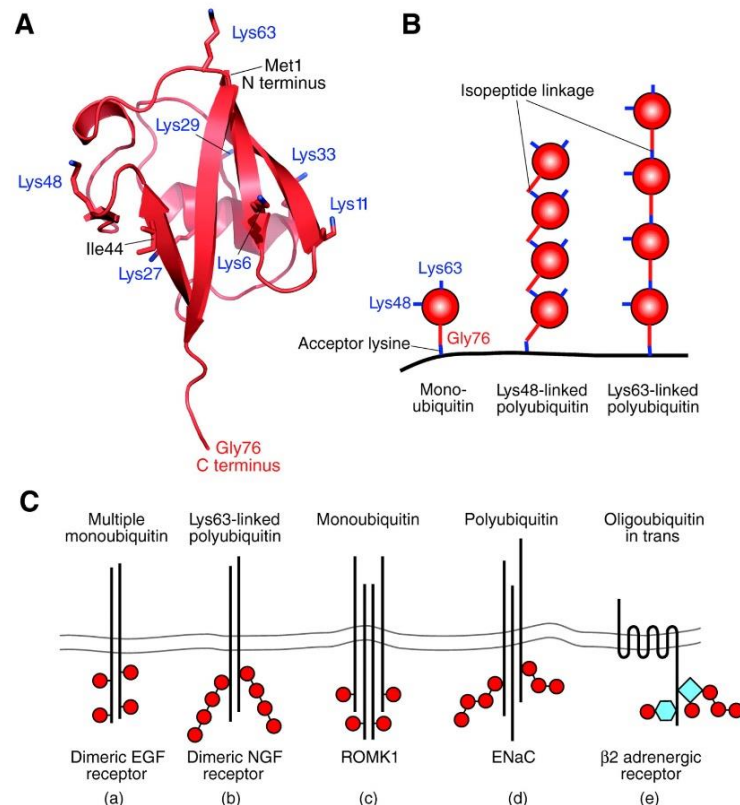
Ilustración 10. Degradación de proteínas asociada al RE (ERAD)



El proceso de ERAD se divide en múltiples pasos: 1) reconocimiento de la proteína aberrante por parte de las chaperonas (Ch); 2) ubiquitinación; 3) retraslación de la proteína ubiquitinada en un proceso dependiente de energía que requiere la participación de la ATPasa p97; 4) liberación al proteosoma; 5) degradación de la proteína. (Foot y col. 2017)

Por otro lado, se ha demostrado que el sistema de ubiquitinación también regula la estabilidad y el tráfico de numerosas proteínas pre y postsinápticas en el SNC (Haas y col. 2008) (Ilustración 11) y, en concreto, se ha propuesto que es el mecanismo que media la endocitosis dependiente de PKC de los transportadores de neurotransmisores, como puede ser GlyT2 (Miranda y col. 2005, Sorkina y col. 2006, Gonzalez-Gonzalez y col. 2008, Fernandez-Sanchez y col. 2009).

Ilustración 11. Ubiquitinación de las proteínas como mecanismo regulador



(A) Molécula de ubiquitina. (B) Esquema de los distintos modos de ubiquitinación. (C) Modelos de ubiquitinación de proteínas para su endocitosis. (Traub y col. 2007)

Además de promover la internalización, la ubiquitinación de las proteínas de membrana neuronales puede dirigir las hacia reciclaje o degradación en **lisosomas** (Schwarz y col. 2012).

Una de las vías más conocidas de regulación de endocitosis de GlyT2 son las dependientes de PKC (Fornes y col. 2008, de Juan-Sanz y col. 2011). La activación de PKC por ésteres de forbol como el forbol 12-miristato 13-acetato (PMA), conduce a una reducción aguda en la actividad de los transportadores de la familia SLC6, incluido GlyT2 (Melikian 2004, Bröer y col. 2012). Esta regulación negativa del transporte de GlyT2 se debe a una internalización desde la membrana plasmática que está mediada por la ubiquitinación de residuos de lisina presentes en el extremo carboxilo terminal. La ubiquitinación es necesaria tanto para la endocitosis constitutiva como la regulada por PKC, aunque en residuos concretos distintos y destina a GlyT2 a diferentes compartimentos intracelulares (de Juan-Sanz y col. 2011, de Juan-Sanz y col. 2013).

Por otro lado, el tráfico de GlyT2 desde la membrana hacia los lisosomas para su degradación se regula mediante la interacción de GlyT2 con la subunidad catalítica $\alpha 3$ de la Na^+/K^+ ATPasa,

descubierto recientemente a partir de un estudio proteómico con un inmunoprecipitado obtenido con anticuerpo anti-GlyT2 de tejido neural. La unión específica de esteroides cardiotónicos (ouabaína) a la Na^+/K^+ ATPasa regula la endocitosis y degradación de GlyT2 *in vivo* mediante un mecanismo conservado evolutivamente reproducido en neuronas primarias de rata, embriones de pez cebra y ratas adultas inyectadas con ouabaína (de Juan-Sanz y col. 2013).

1.4.3 Estudio de la localización vesicular de GlyT2 mediante marcadores

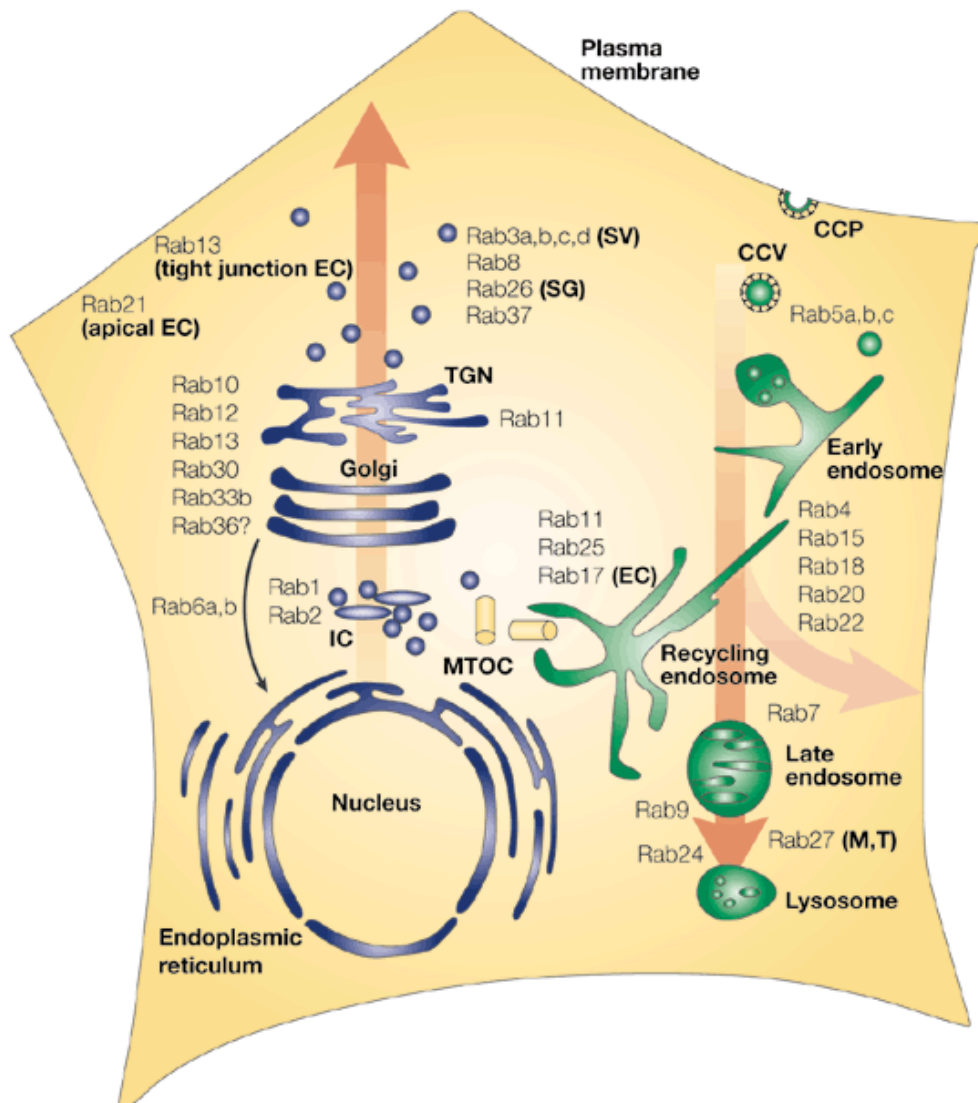
Un abordaje para el estudio de la localización de una proteína de membrana como GlyT2 es la comparación de su distribución intracelular con la de proteínas marcadoras de los diferentes orgánulos de la vía secretora.

Las proteínas SNARE, que median la especificidad del acoplamiento y la fusión de las vesículas, son buenos marcadores de localización intracelular. GlyT2 colocaliza en la membrana plasmática con las t-SNAREs syntaxina 1A, y SNAP-25, marcadoras de la membrana diana de la exocitosis de vesículas. Sin embargo, la v-SNARE sinaptobrevina (VAMP2) permite identificar vesículas que van a fusionarse con la membrana plasmática como las vesículas sinápticas. El análisis del proteoma de las vesículas sinápticas ha proporcionado un buen número de proteínas de localización exclusiva en vesículas sinápticas como la propias sinaptobrevina, la sinaptofisina, la sinaptotagmina 1 presentes en numerosas copias por vesícula o la ATPasa vacuolar, sorprendentemente menos numerosa en número de copias (Takamori y col. 2006). Asimismo, son exclusivos de vesículas sinápticas los transportadores vesiculares VIAAT o VGLUT2, específicos de las neuronas glicinérgicas/GABAérgicas y glutamatérgicas, respectivamente que permiten identificar las vesículas cargadas con el correspondiente neurotransmisor (Chaudhry y col. 1998, Todd y col. 2003).

Otros marcadores que pueden proporcionar información son los principales reguladores del tráfico intracelular de proteínas: las GTPasas Rab, que se distribuyen en diferentes compartimentos celulares y regulan el transporte entre los distintos orgánulos (Zerial y col. 2001, Zhen y col. 2015). Las GTPasas Rab actúan como interruptores moleculares, siendo activas en su forma unida a GTP pero no unidas a GDP. La unión a GTP es necesaria para promover el cambio conformacional requerido para la interacción con su efector específico. Por ejemplo, Rab3a interacciona con rabfilina-3A, Rab5a con rabaptina-5, etc...(Zhen y col. 2015). La activación de las Rabs se facilita, como para otras GTPasas, mediante la acción de GEFs (factores

intercambiadores de nucleótidos de guanina) y GAPs (proteínas activadoras de actividad GTPasa), que ayudan a conferir especificidad pues muchos son selectivos de familia o de GTPasa. Los efectores son muy variados en sus acciones pueden ser motores, kinasas, fosfatasa, reguladores de fusión, de modo que el reclutamiento de efectores de una manera controlada en el espacio y en el tiempo contribuye fuertemente a la fidelidad y especificidad del tráfico vesicular (Zhen y col. 2015). Así, la gran diversidad que existe de proteínas Rab concuerda con la complejidad reconocida del propio tráfico intracelular (Ilustración 12). A diferencia de las proteínas SNARE, que están ancladas de forma irreversible a las membranas mediante dominios TM, las proteínas Rab circulan a través del citosol y las diferentes membranas celulares a las que se anclan a través de prenilaciones, por lo que son buenas candidatas para estudiar la compartimentación de una proteína o definir la direccionalidad de los procesos de transporte de vesículas (Zhen y col. 2015).

Ilustración 12. Distribución de las GTPasas Rab en el tráfico de proteínas desde la membrana

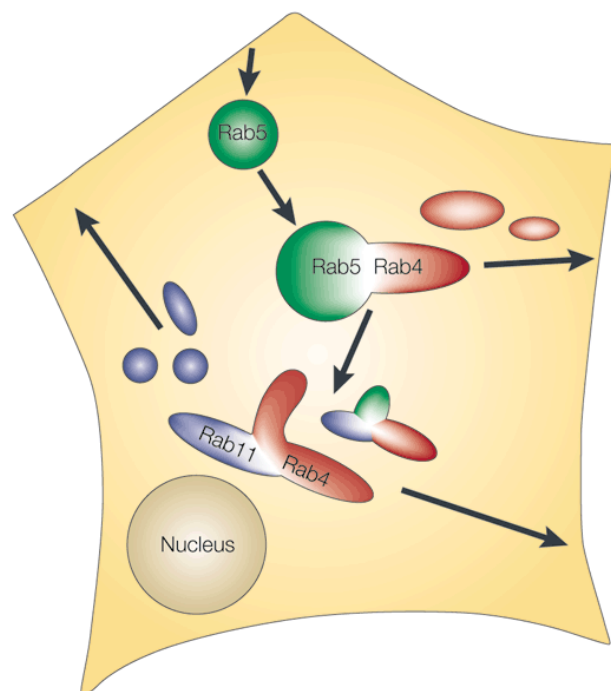


Resumen esquemático de la localización intracelular de las proteínas Rab en células de mamífero. Algunas proteínas son específicas de tipo celular (por ejemplo, Rab3a de las neuronas) o de tejido (por ejemplo, Rab17 del epitelio) o muestran una localización celular específica (por ejemplo, Rab13 en uniones estrechas). Abreviaturas: CCV, vesícula recubierta de clatrina; CCP, hendidura recubierta de clatrina; EC, células epiteliales; IC, compartimento intermedio entre RE y Golgi; M, melanosomas; MTOC, centro organizador de microtúbulos; SG, gránulos secretores; SV, vesículas sinápticas; T, gránulos de células-T; TGN, red trans Golgi (Zerial y col. 2001)

La localización específica de las diferentes proteínas Rab en determinados compartimentos de membrana y su habilidad para regular específicamente diferentes pasos del tráfico intracelular, las convierte en herramientas ideales para el estudio de la localización subcelular de GlyT2 (Zhen y col. 2015). Su colocalización con una determinada proteína, como puede ser GlyT2, refleja la ruta de reciclaje de la proteína en cuestión (Zerial y col. 2001) (Ilustración 12).

Las primeras proteínas Rab identificadas, **Rab8 y Rab1**, han demostrado su relevancia en el transporte de vesículas en la vía de la exocitosis (Zhen y col. 2015). Concretamente, la proteína Rab8 está implicada en el tráfico desde la red trans Golgi hacia la superficie (Huber y col. 1993). Sin embargo, otras proteínas Rab están implicadas en eventos de endocitosis (Zhen y col. 2015). Es el caso de Rab5, que es un marcador del endosomas tempranos (Zerial y col. 2001), o **Rab4 y Rab11**, que también tienen un papel importante en el reciclaje de proteínas desde los endosomas tempranos (*“short loop” recycling*) y de los endosomas de reciclaje hacia la membrana plasmática (*“long loop” recycling*), respectivamente (Jones y col. 2006) (Ilustración 13). El receptor de transferrina es un ejemplo de proteína de membrana que regresa rápidamente a la misma desde los endosomas tempranos a través de un mecanismo controlado por Rab4 y que puede reciclarse por una vía más lenta desde los endosomas de reciclaje mediante la participación de Rab11 (Uzan-Gafsou y col. 2007, Bonecchi y col. 2008, Henry y col. 2008).

Ilustración 13. Esquema de los dominios de las GTPasas Rab en endosomas



Estudios realizados con proteína fluorescente verde (GFP) han demostrado que las proteínas Rab4, Rab5 y Rab11 están compartimentadas en la membrana de los endosomas tempranos. Las proteínas cargo fluyen secuencialmente a través de los dominios Rabs tal y como muestran las flechas (Zerial y col. 2001)

En esta tesis se ha realizado un estudio de la colocalización de GlyT2 con las proteínas GTPasas Rab con el fin de determinar su distribución subcelular, tal y como se muestra en el bloque de

Resultados (Nunez y col. 2009). Por otro lado, actualmente, nuestro grupo de investigación está confirmando mediante estudios de proteómica y otras técnicas, la interacción y colocalización de GlyT2 con otras proteínas características de vesículas sinápticas, como SNAP-25, SV2, sinaptobrevina y sinaptotagmina (De Juan-Sanz, y col., sin publicar).

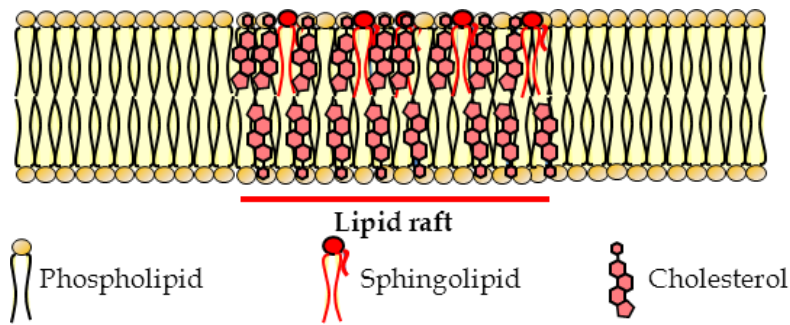
1.5 Dominios lipídicos “rafts” y sistema nervioso

En 1997 se describió por primera vez un mecanismo molecular que explicaba la heterogeneidad lateral de las membranas biológicas, la base molecular del modelo es la asociación lateral preferente de los esfingolípidos saturados de cadena larga y el colesterol en la cara externa de la membrana, de manera que el colesterol se incluye entre las moléculas de esfingolípidos rellenando los espacios entre ellos (Simons y col. 1997).

Este modelo se denominó *lipid raft* (literalmente del inglés: balsa lipídica) para finalmente asentarse como un principio de sub-compartimentación de la membrana implicado no sólo en el tráfico post Golgi sino también en la endocitosis, señalización, procesamiento de proteínas, reciclado de membrana y muchas otras funciones (Simons y col. 1997, Sonnino y col. 2015).

Los *lipid rafts* o *rafts* son pequeños subdominios (10-200 nm) de las membranas celulares, especializados, heterogéneos, altamente dinámicos, enriquecidos en colesterol, esfingolípidos y proteínas, que compartimentan procesos celulares (Pike 2006) (Ilustración 14). Se asocian de una manera especial con el citoesqueleto celular y se han definido operacionalmente por su resistencia a la solubilización en frío por detergentes no iónicos. La propensión a formar *rafts* está positivamente correlacionada con el contenido de esteroides que se maximiza en la membrana plasmática, donde el citoesqueleto de actina juega un papel central en la organización esfingolípidos-colesterol (Lingwood y col. 2010).

Ilustración 14. Esquema de una balsa lipídica en la membrana plasmática (lipid raft)

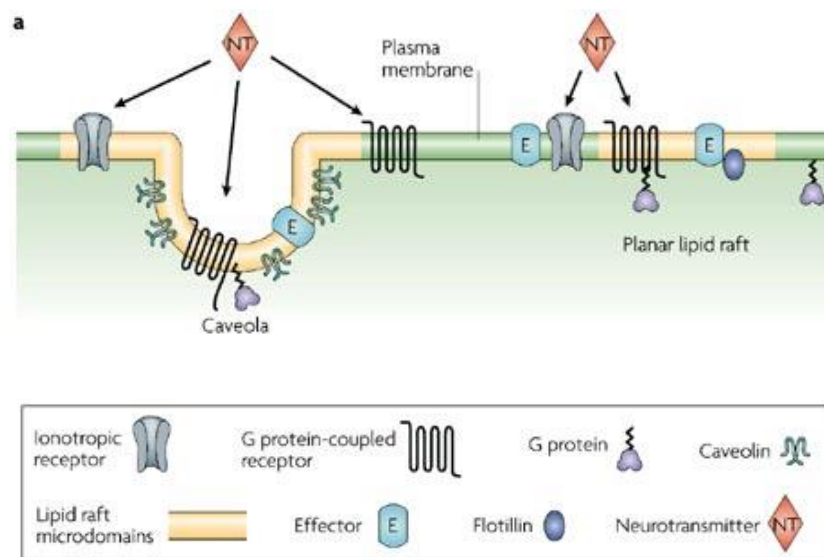


Las balsas lipídicas son ricas en colesterol, fosfolípidos y esfingolípidos, lo que les confiere propiedades estructurales y funcionales únicas, permitiendo el movimiento de las proteínas contenidas en el lipid raft.

En los *lipid rafts* tienen lugar determinadas modificaciones postraduccionales, como la fosforilación o la ubiquitinación, así como interacciones entre proteínas, imprescindibles en determinadas funciones celulares. En este modelo, las proteínas de membrana se rodean de un revestimiento de lípidos en analogía a la solvatación de proteínas globulares por el agua (Brown 2017).

Se reconocen dos tipos de balsas lipídicas: las caveolas, pequeñas invaginaciones langeniformes que contienen proteínas de la familia de las caveolinas, y las balsas lipídicas planas, que no presentan invaginaciones y contienen proteínas de la familia de las flotilinas (Ilustración 15). En el caso de las células nerviosas, la mayoría de tipos neuronales no presentan caveolinas sino que sus membranas contienen balsas lipídicas planas enriquecidas en flotilinas (Colin y col. 2016).

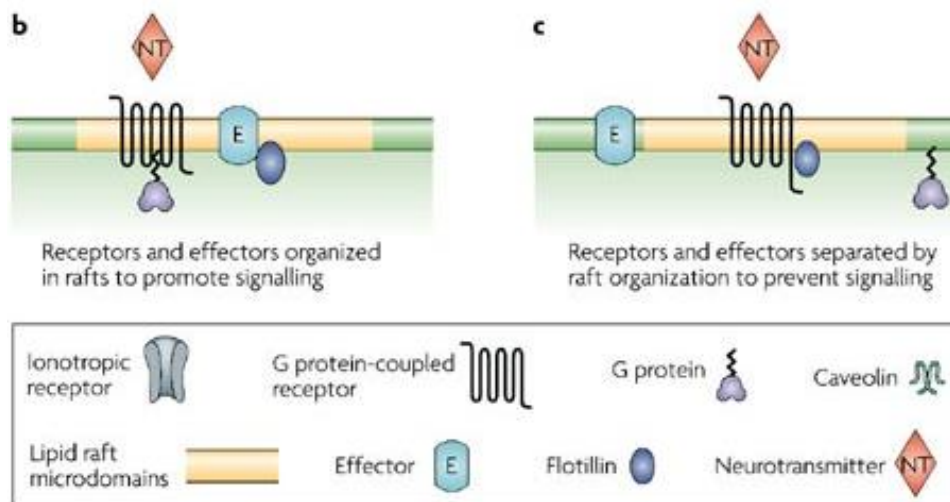
Ilustración 15. Tipos de lipid raft: caveolas y balsas lipídicas planas



Las caveolas presentan invaginaciones de la membrana y la caveolina es la principal proteína que forma parte de la estructura. En el caso de las balsas planas no se aprecian invaginaciones de la membrana y la flotilina es la proteína mayormente implicada (Allen y col. 2007).

Los pequeños *rafts* se pueden estabilizar en algunos casos para formar plataformas más grandes a través de las interacciones proteína-proteína y proteína-lípido (Pike 2006). De esta forma, los *lipid rafts* pueden mediar una gran variedad de funciones celulares, por ejemplo, la señalización celular al modular la actividad de ciertas moléculas contenidas en la membrana cuando se desplazan lateralmente entre los dominios *raft* y no *raft* (Lingwood y col. 2010)

Ilustración 16. Organización de receptores y efectores en las balsas lipídicas y efecto en su actividad



El neurotransmisor actúa sobre su receptor acoplado a una proteína G responsable de transmitir la señalización al interior de la célula. Este receptor se localiza en una balsa lipídica plana y si el efector y la flotilina se encuentran en la misma balsa se transmite la señal. Por el contrario, si el receptor y el efector se sitúan en zonas alejadas se evita la propagación de la señal de la sinapsis (Allen y col. 2007).

1.5.1 Papel de los lipid rafts en las membranas de las neuronas

En el sistema nervioso, la presencia de *rafts* es crucial en la fisiología de la neurosecreción pues la concentración de las proteínas SNARE implicadas en los eventos de fusión de vesículas sinápticas es 25 veces mayor en *rafts* que en regiones no *raft* (Sonnino y col. 2014). Los *rafts* juegan un papel importante en la señalización sináptica, como se ha comprobado por el enriquecimiento de proteínas sinápticas tales como SNAP o PSD en *rafts* de membranas cerebrales de rata (Salaun y col. 2005).

En las neuronas, los *rafts* participan en la adhesión celular neuronal, la transmisión sináptica, la orientación axonal, el desarrollo neuronal y la función de la neurona (Tsui-Pierchala y col. 2002). En el caso concreto de la sinapsis, este fenómeno es particularmente importante, ya que, no solo los eventos de fusión tienen lugar en dominios *raft* de la presinapsis sino que varios receptores de neurotransmisores se localizan en *lipid rafts*, como GABA, NMDA, AMPA, nACh y P2X, y su actividad depende de la integridad de estos subdominios (Hering y col. 2003, Frank y col. 2004, Dalskov y col. 2005, Zhu y col. 2006).

Numerosas proteínas se asocian de forma preferente a los *lipid rafts*, entre ellas los transportadores de neurotransmisores (Butchbach y col. 2004, Jayanthi y col. 2004, Samuvel y col. 2005, Sepulveda y col. 2006). Los *rafts* son dominios más empaquetados que el resto de la

membrana *no-raft* y funcionan como plataformas móviles en las cuales se organizan los componentes de la membrana, entre ellos los complejos de proteínas responsables del tráfico celular y de la señalización (Ilustración 16). Muchas proteínas de membrana son reguladas mediante movimiento lateral desde o hacia dominios *raft*, lo que afecta a su interacción con lípidos o con otras proteínas (interactoma), repercutiendo en su actividad (Sonnino y col. 2014). Las interacciones laterales entre los componentes de los *rafts* están moduladas en tiempo y en espacio, por lo que alteraciones de estas modulaciones correlacionan positivamente con el envejecimiento y también con enfermedades neurodegenerativas como Niemann–Pick tipo C. En estos casos, el grado de orden de los lípidos de membrana es un parámetro que requiere un estricto control. De hecho, se ha especulado que el desarrollo de agentes que puedan unirse eficientemente a grupos concretos de lípidos en la membrana y que puedan reorganizarlos lateralmente podrían convertirse en fármacos innovadores dirigidos a los *rafts* (Sonnino y col. 2014).

GlyT2, como demostramos en esta tesis, se asocia a *lipid rafts* y en estos subdominios interacciona con la bomba Ca^{2+} -ATPasa (PMCA) y el intercambiador Na^+ - Ca^{2+} (NCX1), lo que le permite actuar con estas proteínas de membrana de forma coordinada en la recaptación de la glicina modulando los niveles de sodio y calcio tras la liberación del neurotransmisor (de Juan-Sanz y col. 2014). Todas estas proteínas presentan una actividad óptima cuando se localizan en las balsas lipídicas (Tortelote y col. 2004, Jiang y col. 2007, Zhang y col. 2009, Jiang y col. 2012). Asimismo, la activación de PKC, un mecanismo que regula la actividad de GlyT2, produce un desplazamiento del transportador desde los dominios *raft* a los *no raft* en la membrana, modulando así su actividad (Fornes y col. 2008).

La asociación de proteínas de membrana específicas del sistema nervioso como GlyT2 con los *lipid rafts* adquiere especial importancia en el contexto de las funciones neuronales como la liberación de neurotransmisores y la transmisión sináptica. De hecho, se ha propuesto que los dominios *rafts* ricos en colesterol funcionan como reguladores espaciales de la exocitosis (Salaun y col. 2004) y que están implicados en la formación de la sinapsis (Pfrieger 2003). Muchas proteínas de las vesículas sinápticas están asociadas a los *lipid rafts*, incluyendo la sinaptofisina y el receptor soluble de proteína fijadora de factor sensible a N-etilmaleimida, además de otras SNARE de función importante en la fusión de las vesículas (Lang y col. 2001, Gil y col. 2005).

1.5.2 Relación del colesterol de la membrana plasmática con la regulación de la actividad de proteínas en el sistema nervioso

La regulación del colesterol juega un papel importante en el sistema nervioso central (Mahley 2016). Una de las funciones principales del colesterol en las neuronas es mantener los *lipid rafts* y su retirada provoca una pérdida gradual de las sinapsis y espinas dendríticas, muchas veces implicado en enfermedades neurodegenerativas (Hering y col. 2003).

El colesterol participa en el proceso de exocitosis, promueve la curvatura de la membrana y su retirada conduce a una inhibición dosis dependiente y sensible a Ca^{2+} de la fusión de las vesículas (Churchward y col. 2005, Kumar y col. 2015). En células PC12 se ha detectado un descenso en la exocitosis de dopamina al reducir el colesterol (Salaun y col. 2005). La retirada o alteración en los niveles de colesterol limita la capacidad de la membrana plasmática de fusionarse (Ledesma y col. 2012) y también impacta en la transmisión sináptica y la función cerebral (Kumar y col. 2015).

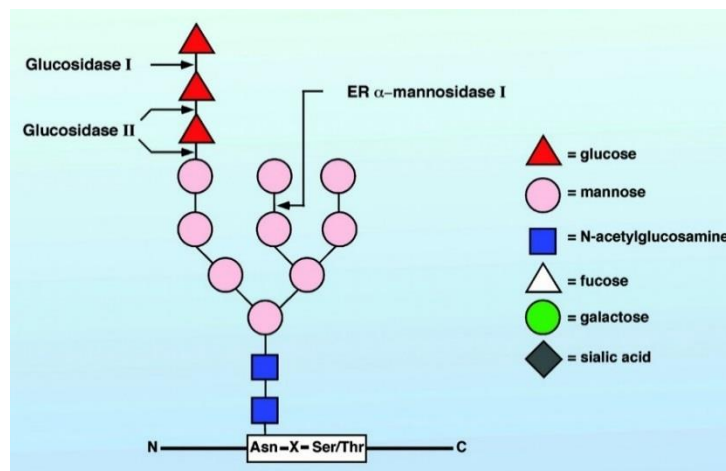
El colesterol realiza múltiples funciones en el cerebro (Pfrieger 2003) incluyendo la regulación de los transportadores de neurotransmisores en la membrana plasmática, como por ejemplo el transportador de serotonina (Magnani y col. 2004, Samuvel y col. 2005), el de norepinefrina (Jayanthi y col. 2004), DAT (Adkins y col. 2007) o transportadores de aminoácidos excitadores (Butchbach y col. 2004) que se distribuyen en dominios ricos en colesterol.

1.6 Papel de la N-glicosilación en la actividad de las proteínas

La N-glicosilación representa una de las modificaciones de proteínas postraduccionales más frecuente en células eucariotas. Entre las funciones mejor conocidas de la N-glicosilación destacan su papel en el plegamiento de las proteínas y el control de calidad en la vía secretora en la célula. En el exterior celular los N-glicanos también son importantes en muchos procesos, como la comunicación celular y la adhesión (Scott y col. 2014).

En el retículo endoplasmático, la N-glicosilación de una proteína naciente comienza con la transferencia, por parte de la oligosacaril transferasa, de un oligosacárido de 14 residuos donado por el dolicolfosfato a un residuo de asparragina en secuencia consenso (Asn-X-Ser/Thr) de la proteína (Ilustración 17).

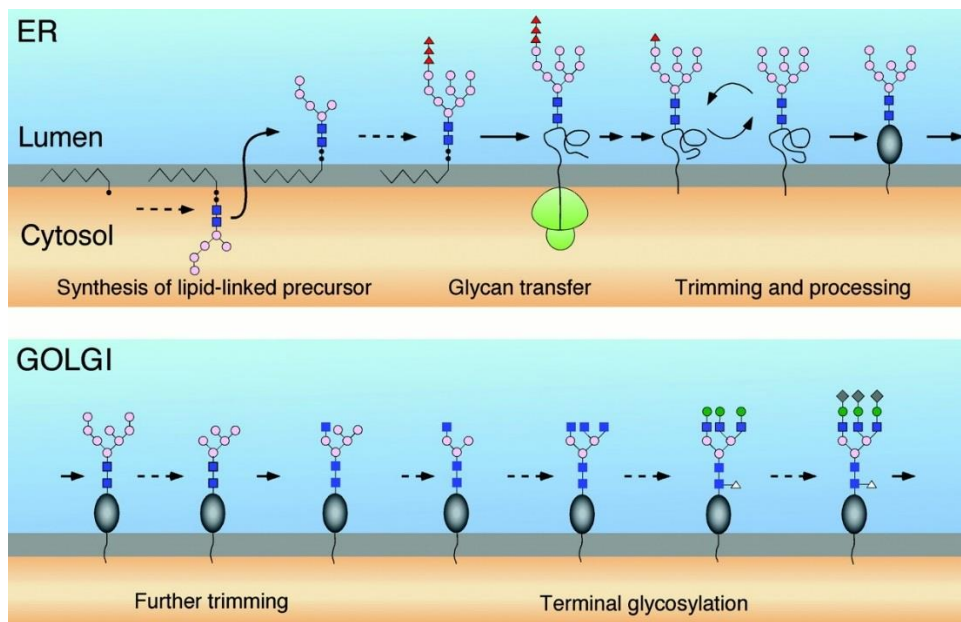
Ilustración 17. Oligosacárido que se transfiere en una N-glicosilación



Estructura del oligosacárido que se transfiere en el RE a la proteína que está siendo sintetizada en una Asn en secuencia consenso (Asn-X-Ser/Thr)(Helenius y col. 2001)

Inmediatamente después de que el oligosacárido sea transferido, la glucosidasa I y la glucosidasa II retiran las 2 glucosas más externas de forma secuencial. La forma monoglucosilada resultante se une a calnexina, una lectina monovalente anclada a la membrana del RE, o a calreticulina, su homólogo soluble. La calnexina y la calreticulina se asocian con ERp57, una tiorredoxina oxidoreductasa, implicada en la formación de puentes disulfuro que contribuye al plegamiento de la proteína. Cuando la glucosidasa II retira la glucosa restante, la glicoproteína se disocia de la calnexina o la calreticulina (Helenius y col. 2004).

Ilustración 18. Biosíntesis del oligosacárido transferido en la N-glicosilación



La síntesis del oligosacárido se inicia en el lado citosólico del retículo endoplasmático y posteriormente se trasloca al lumen donde finaliza la adición de azúcares hasta completar 14 residuos. El complejo oligosacariltransferasa transfiere el oligosacárido a la Asn de la proteína nascente. Los residuos de glucosa y de manosa se van retirando por la acción de las glucosidasas I y II y de la manosidasa. En el RE también está presente la glucosiltransferasa pudiéndose realizar varios ciclos de de-glucosilación y re-glucosilación hasta que el plegamiento sea el adecuado y el complejo pueda pasar al aparato de Golgi donde se podrían añadir otros residuos de azúcares (Helenius y col. 2001).

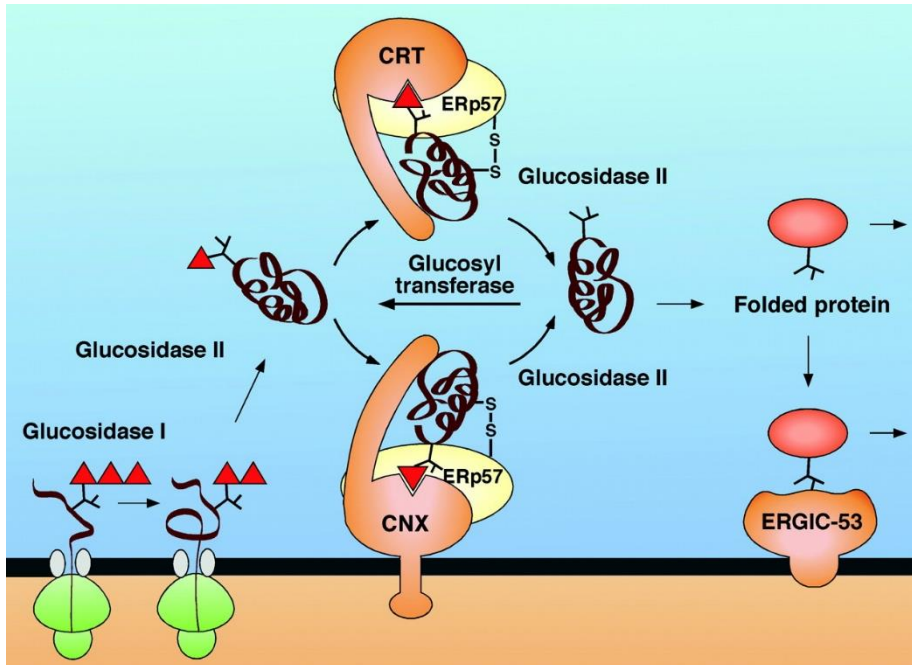
El plegamiento de la proteína se inicia en el RE (Retículo Endoplasmático) cotraduccionalmente y se completa una vez finalizada la traducción. Algunas *Heat Shock Proteins*, como GRP78/BiP, actúan como chaperonas facilitando el plegamiento de las proteínas y su distribución desde el RE al aparato de Golgi si se ha plegado correctamente. La salida del RE es asistida por la acción de lectinas de unión a manosas tales como ERGIC-53, VIP36 y VIPL (Vagin y col. 2009).

Si el plegamiento de la glicoproteína no se ha completado, ésta será sustrato de la glucosiltransferasa del lumen del RE que la re-glucosilará y de nuevo se unirá a calnexina (calreticulina, ERp57) u otros asistentes en el plegamiento hasta que alcance el plegamiento adecuado. Si después de varios ciclos de de-glucosilación/re-glucosilación la glicoproteína no se pliega convenientemente, quedará retenida en el RE y finalmente será degradada mediante ERAD (degradación asociada a retículo endoplasmático) (Ilustración 10, Ilustración 18 e Ilustración 19) (Helenius y col. 2001).

De esta forma, la N-glicosilación, y en particular el ciclo calnexina/calreticulina, juegan un papel principal en el **plegamiento y el control de calidad** de las glicoproteínas recién sintetizadas

ayudando a que solo las proteínas que están correctamente plegadas pasen al aparato de Golgi y desde allí a su destino final (Helenius y col. 2001, Vagin y col. 2009).

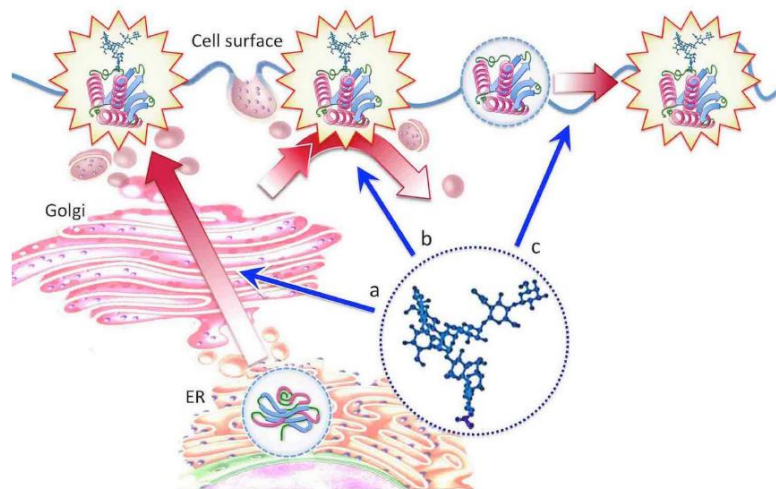
Ilustración 19. Ciclo de calnexina/calreticulina



Cuando se retiran 2 de las 3 glucosas del oligosacárido, la proteína naciente se une a calnexina o a calreticulina. La proteína se expone a otros factores de plegamiento como ERp57. Cuando la glucosa restante es retirada por la glucosidasa II, el complejo se disocia. Si la proteína no está correctamente plegada podría repetirse el ciclo o dirigirse a degradación. Una vez que la proteína está plegada adecuadamente saldrá del RE y se dirigirá al aparato de Golgi. La salida de algunas proteínas es asistida por la lectina ERGIC-53 (Helenius y col. 2001).

Además del control de calidad, la N-glicosilación puede afectar a la actividad de las glicoproteínas a través de numerosos mecanismos, por ejemplo, facilitando su estabilidad, mejorando el tráfico intracelular, promoviendo su distribución en la superficie celular en el caso de proteínas de membrana (regulando la endocitosis y/o el reciclaje hacia la membrana plasmática), participando en la interacción con otras lectinas, o mediando efectos electrostáticos o estéricos en la dinámica y conformación de las proteínas, alterando así sus propiedades biofísicas (Ilustración 20) (Scott y col. 2014).

Ilustración 20. Efectos principales de la N-glicosilación de las proteínas



Los N-glicanos pueden potenciar la función de las glicoproteínas facilitando su plegamiento y mejorando el tráfico hacia la superficie celular (a), mejorando la estabilidad de la proteína en la superficie celular a través de la regulación retirada de la proteína y el reciclaje hacia la membrana (b), y aumentando la actividad de la proteína mediante modificaciones en las propiedades biofísicas de la misma (c) (Scott y col. 2014).

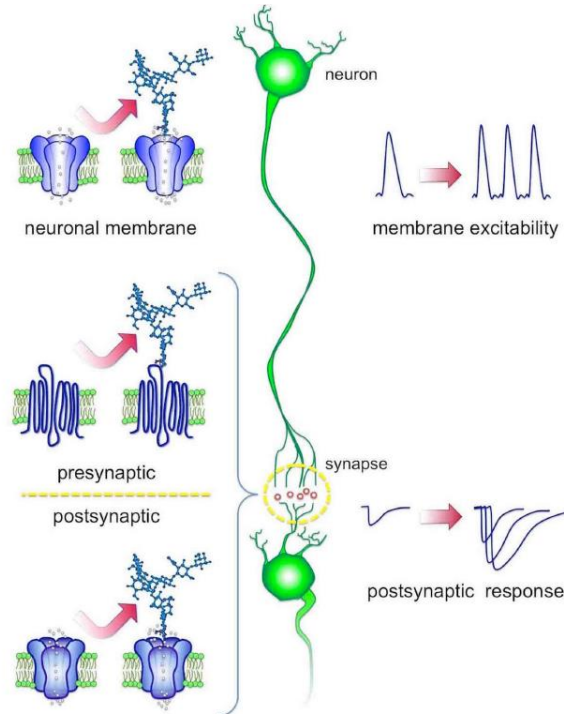
En el caso del sistema nervioso, son numerosas las proteínas implicadas en la transmisión neuronal que requieren añadir carbohidratos a su dominio N-terminal. El papel de estas modificaciones suele depender del contexto molecular y celular y pueden llegar a ser determinantes y esenciales para la función de la proteína en cuestión. Se ha descrito la importancia de los N-glicanos en diferentes aspectos del desarrollo neuronal, por ejemplo, en la adhesión celular o el direccionamiento axonal. Sin embargo, se conoce menos la relevancia de la N-glicosilación en la regulación de la fisiología neuronal (Scott y col. 2014).

Numerosos estudios han descrito la importancia de la glicosilación de las proteínas en diferentes aspectos de la transmisión sináptica, aunque las diferencias celulares y las bases moleculares de estos efectos son complejas y no se conocen con exactitud. No obstante, la glicosilación es necesaria para el funcionamiento correcto de las neuronas ya que controla la función de varias moléculas clave en la sinapsis (Kleene y col. 2004, Dityatev y col. 2010, Dani y col. 2012).

Recientemente, se han determinado nuevos roles de los glicanos en los procesos sinápticos y el control de la excitabilidad neuronal. Se ha descrito que los N-glicanos afectan en gran medida la función de varias proteínas sinápticas implicadas en pasos clave de la transmisión sináptica, incluyendo la liberación de neurotransmisores, la recepción y la recaptación de éstos. La glicosilación regula también el número de proteínas en la membrana, como por ejemplo es el caso de los canales iónicos, controlando así las respuestas a estímulos externos y la excitabilidad

neuronal. Por otro lado se ha descrito la relevancia de la N-glicosilación en la función de proteínas vesiculares sinápticas, como SV2 (Ilustración 21) (Scott y col. 2014).

Ilustración 21. Efectos principales de la N-glicosilación en la transmisión sináptica



La N-glicosilación de los canales iónicos dependientes de voltaje afecta a la excitabilidad de la neurona, incrementando los potenciales de acción (parte superior, sinapsis eléctrica). Por otro lado, en la sinapsis química (parte inferior), tanto las proteínas sinápticas como los receptores de neurotransmisores se modulan mediante N-glicosilación (Scott y col. 2014).

Normalmente, los receptores de neurotransmisores presentan varias moléculas de N-glicanos en sus dominios extracelulares. Los últimos estudios apuntan a la importancia de estas modificaciones en la función, por ejemplo, en el caso de los receptores nicotínicos de acetilcolina donde pueden promover el plegamiento de dominios funcionales de la proteína sin afectar a las interacciones entre las subunidades del receptor o su expresión en la superficie celular. Otro ejemplo son los receptores de glutamato ionotrópicos, entre los que se encuentran los receptores AMPA, kainato y NMDA, la mayoría de los cuales se encuentran glicosilados en los dominios amino-terminales implicados en el ensamblaje y en los dominios de unión al ligando. En el caso de los receptores NMDA, la inhibición de la N-glicosilación provoca una reducción significativa de su expresión funcional (Scott y col. 2014).

Los transportadores de la familia SLC6, como GlyT2, se presentan N-glicosilados en la región extracelular más amplia que es el bucle externo 2. Este bucle es muy móvil durante los cambios conformacionales de la proteína durante el transporte y ha sido implicado en el mecanismo de

transporte en muchos miembros de la familia, lo que sugiere que esta modificación es importante para su función (Smicun y col. 1999, Martínez-Maza y col. 2001). Mientras que la eliminación de la glicosilación mediante mutagénesis o tratamiento con glicosidasa reduce el número de transportadores en la superficie celular, no parece que afecte en gran medida a la unión del ligando o a la actividad propia del transportador. Se ha considerado que la reducción en el número de moléculas de transportador en la membrana se debe a una alteración en la estabilidad de la proteína o en el tráfico de la proteína hacia la membrana plasmática (Scott y col. 2014).

1.7 Potencial farmacológico de GlyT2: hiperplexia y dolor

El fenotipo de ratones GlyT2^{-/-} presenta características similares a los síntomas de un tipo de enfermedad hereditaria humana que aparece en la primera etapa postnatal, la **hiperplexia**. Se relaciona con síntomas propios de una hipoglicinemia, tales como una coordinación motora alterada, rigidez muscular, espasticidad, temblores frecuentes y convulsiones (Gomez y col. 2003).

Se ha demostrado que la neurotransmisión glicinérgica inhibitoria está directamente relacionada con la hiperplexia hereditaria (comúnmente conocida como el síndrome del bebé entumecido). Se trata de una enfermedad poco común que se manifiesta muy pronto tras el nacimiento, o incluso puede aparecer ya en el periodo intrauterino. Es característica de este síndrome clínico la respuesta exagerada a estímulos somatosensoriales y la hipertonia muscular. Quien la padece suele reaccionar con sobresaltos enérgicos y sostenidos manteniendo una rigidez en el tronco y las extremidades claramente apreciable, con aparición de temblores frecuentes que recuerdan a respuestas epilépticas. El riesgo de muerte súbita en los bebés que presentan esta enfermedad es elevado como consecuencia de fallos cardiorrespiratorios y espasmos laríngeos (Suhren O 1966, Saenz-Lope y col. 1984, Praveen y col. 2001).

La hiperplexia es una sinaptopatía que cursa con una alterada neurotransmisión glicinérgica. Las proteínas más importantes implicadas en la hiperplexia son el receptor de glicina y GlyT2. No se descarta la implicación en la enfermedad de otras proteínas reguladoras del tráfico intracelular del receptor y el transportador (Gimenez y col. 2008). Se han descrito mutaciones relacionadas con la aparición de hiperplexia hereditaria tanto en el receptor de glicina como en el transportador GlyT2 (Ilustración 22) (Shiang y col. 1993, Rees y col. 1994, Eulenburg y col. 2006,

Rees y col. 2006). Nuestro grupo ha caracterizado dos mutaciones en GlyT2 encontradas en pacientes de hiperplexia que, en contra de la mayoría descritas, son dominantes. Una de ellas fue identificada por el grupo a través de la secuenciación de los 16 exones del gen SLC6A5 en pacientes de hiperplexia. Es una mutación “missense” que introduce una cisteína en la cara externa de la proteína provocando la formación de un enlace disulfuro aberrante con dos cisteínas endógenas alterando la estructura 3D del transportador y entorpeciendo su avance hacia la superficie celular. También altera la función de transporte interfiriendo en la acción de dos moduladores cruciales de la neurotransmisión glicinérgica inhibitoria: pH y zinc. La importancia de esta regulación de GlyT2 era desconocida lo que abre nuevas vías de investigación (Gimenez y col. 2012).

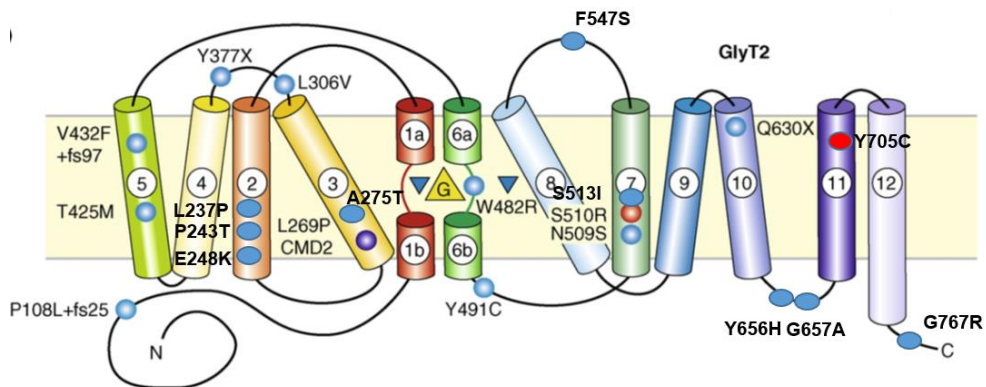
Otro estudio reciente analizó el efecto dominante-negativo de un mutante de hiperplexia que bloquea el tráfico de GlyT2 en el RE mediante formación de heterómeros que pueden rescatarse mediante sobreexpresión de calnexina. Este mutante de plegamiento defectuoso no produce un transportador maduro, sino que el transportador inmaduro se retiene en el RE. Por analogía del rescate con calnexina, se ha demostrado que chaperonas farmacológicas convencionales pueden rescatar a GlyT2 en neuronas primarias (Arribas-Gonzalez y col. 2015).

El tratamiento con agentes que pudieran incrementar la eficacia de la transmisión de glicina inhibitoria podría beneficiar a pacientes con hiperplexia y presentar por tanto potencial terapéutico. Es por ello que se están haciendo esfuerzos en este sentido, como es nuestra línea de investigación basada en estudiar los mecanismos que regulan la actividad y el tráfico de GlyT2 (Aragon y col. 2005).

Otro aspecto importante en la fisiología y patología de GlyT2 es su implicación en vías nociceptivas. La acción moduladora de GlyT2 (y GlyT1) en vías glicinérgicas es especialmente relevante en las interneuronas glicinérgicas inhibitorias de las astas dorsales de la médula espinal. Esta red neuronal constituye la primera estación de la señal nociceptiva en su progreso hacia centros superiores del SNC donde se hace consciente. Así, la acción inhibitoria de estas neuronas se opone al avance de la información nociceptiva excitadora y constituye una compuerta de acceso de la misma al cerebro (Melzack y col. 1965). Esta teoría de la compuerta de acceso se ha confirmado recientemente pues diferentes estudios han demostrado que la inhibición farmacológica tanto de GlyT1 como de GlyT2 produce analgesia (Harvey y col. 2013), ya que el **dolor** se relaciona con una disminución en la neurotransmisión inhibitoria tanto GABAérgica como glicinérgica en las astas dorsales de la médula espinal favoreciendo la

activación de interneuronas glutamatergicas y el progreso del impulso doloroso al cerebro (Zeilhofer 2008, Foster y col. 2015). La analgesia producida al aumentar la concentración de glicina en estas sinapsis manifiesta la importancia de la neurotransmisión glicinérgica inhibitoria en la señalización nociceptiva. En este sentido, el desarrollo de nuevos inhibidores de los transportadores de glicina podría encontrar aplicación en el tratamiento del dolor tanto inflamatorio como neuropático.

Ilustración 22. Mutaciones de GlyT2 descritas en pacientes con hiperplexia



Se señalan las mutaciones descritas sobre una representación topológica de GlyT2, por homología con el transportador bacteriano LeuTAa. En azul se marcan las mutaciones de carácter recesivo y en rojo las dominantes. En morado se muestran las mutaciones generadas en modelos animales (Harvey y col. 2008).

2. OBJETIVOS

El principal objetivo de esta tesis fue estudiar la localización subcelular del transportador de glicina GLYT2 y los mecanismos de control de su tráfico intracelular, fundamentales para la funcionalidad del mismo y su papel en la fisiología y patologías del sistema nervioso central, ya que dependen de la presencia del transportador en la membrana plasmática.

Los objetivos específicos de esta tesis fueron los siguientes:

1. Describir la localización subcelular de GlyT2 analizando el tipo de vesículas de tráfico intracelular y los componentes de las mismas en tejido nervioso.
2. Estudiar el papel del entorno lipídico en la función de GlyT2 y su presencia en balsas lipídicas (*lipid rafts*) en tallo cerebral de rata.
3. Analizar el papel de la glicosilación en la biogénesis, el tráfico y distribución del transportador en células polarizadas.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materiales utilizados

Las ratas Wistar se criaron en condiciones estándar en el CBMSO (Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, Madrid, España) siguiendo las políticas actuales para el uso de animales en investigación de neurociencia. Todos los productos químicos se adquirieron de Sigma-Aldrich (St Louis, MO). Los anticuerpos utilizados se obtuvieron de las siguientes fuentes: GlyT2 (conejo) como se caracterizó previamente (Todd y col. 2003); VIAAT (conejo) fue una donación del Dr. B. Gasnier (Instituto de Biología Físico-Química, París, Francia); GAT1 fue proporcionado por el Dr. N. C. Danbolt (Universidad de Oslo, Noruega); 14E12 (marcador lisosomal, conejo) lo proporcionó el Dr. I. Vicente Sandoval (CBMSO, Madrid, España); La Na⁺ / K⁺ ATPasa (clon C464.6) de Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY); La sinaptofisina (clon SP15) de Oncogene Research Products (Cambridge, MA) y la sinaptofisina (clon SVP38) de Sigma; Rab5A y Rab3A de Santa Cruz Biotech. (Santa Cruz, CA); Rab11 de Transduction Laboratories (Lexington, KY). VGLUT2 (conejo), VAMP2 y sinaptotagmina 2 fueron de Synaptic Systems (Göttingen, Alemania). TfR procedía de Zymed Laboratories. Flotilina-1 (Ratón) de Transduction Laboratories (Lexington, KY); MAP2 (pollo, policlonal) de Abcam (Cambridge, Reino Unido); Calnexina de Stressgen (Canadá); Tubulina de Sigma; PERK (C33E10) de Cell Signalling Technology Inc. (Danvers, MA).

Los anticuerpos secundarios acoplados a fluoróforos procedían de Molecular Probes (San Diego, CA). El inhibidor de GlyT2 ORG25543 fue donado por el Dr. Zoran Rankovic (Organon, Escocia, Reino Unido).

Los anticuerpos secundarios unidos a peroxidasa de rábano empleados para los experimentos de *inmunodetección* fueron de los siguientes orígenes: anti-conejo de cabra y anti-ratón de cabra procedían de Nordic Immunological Laboratories Tilburg (Holanda); anti-ratón de conejo de Pierce (Rockford, IL); anti-rata de conejo de Sigma (St Louis, MO); anti-cobaya de conejo de Zymed Laboratories (San Francisco, CA).

Las bandas de proteínas se visualizaron con el método de detección de quimioluminiscencia mejorada (ECL) (GE Healthcare) y se cuantificó la intensidad en un densitómetro de imágenes calibrado GS-800 usando los *softwares* Quantity One y ORIGIN.

Todos los mutantes Rab y los anticuerpos Rab4 y Rab8 fueron proporcionados por el Dr. José A. Esteban (Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, Madrid, España). Se utilizaron los dominantes negativos (dn): Rab4 S22N; Rab8 T22N; Rab5 S34N y Rab11 S25N.

En los experimentos que se incluyen en esta tesis se emplearon diferentes tampones que se listan a continuación:

- Tampón de cultivo NB/B27 50:1 en volumen, de Invitrogen, 0,5 mM de glutamina, 0,05 mg/ml de gentamicina, 0,01% de estreptomicina, 100 μ U/mL de penicilina G y 5% de suero de vaca bovino (Invitrogen, San Diego, CA)
- Tampón de ensayo: MgCl₂ 2 mM, NaPO₄ 120 mM, Na₂HPO₄ 80 mM β -mercaptoetanol 100 mM y O-nitofenil- β D-galactopiranosido 1,33 mg/ml
- Tampón de gradiente: HEPES / KOH 4 mM a pH 7,4, EDTA 2 mM, fosfatidil-inositol (PI)
- Tampón HBM: NaCl 140 mM, KCl 5 mM, MgCl₂ 1 mM, Na₂HPO₄ 1,2 mM, NaHCO₃ 5 mM, glucosa 10 mM y HEPES-NaOH 20 mM, pH 7,4
- Tampón HBS: NaCl 150 mM, HEPES Tris 10 mM, pH 7,4, CaCl₂ 1 mM, KCl 5 mM, MgSO₄ 1 mM, glucosa 10 mM
- Tampón de carga Laemmli:
 - Tris-Cl 60 mM pH 6,8, 2% SDS, 10% glicerol, 5% β -mercaptoetanol, 0,01% azul bromofenol.
 - Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8, 2% SDS, 20% glicerol, ditiotreititol 100 mM
- Tampón MBS: ácido 2-(N-morfolino) etanosulfónico 25 mM y NaCl 150 mM, pH 6,5
- Tampón NT: MesNa 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, 0,2% albúmina de suero bovino, 0,18% glucosa, Tris 20 mM, pH 8,6
- Tampón RIPA: Tris-HCl 10 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, 1% Triton X-100, 0,1% SDS y 0,25% desoxicolato sódico
- Tampón TBS: Tris 30 mM, NaCl 150 mM, pH 8,2
- Tampón TNT: Tris/HCl 100 mM pH 7,5, NaCl 300 mM y 0,2% Tritón X-100
- Tampón A: NaCl 135 mM, fosfato sódico 0,0 mM
- Tampón B: NaCl 300 mM, Tris-HCl 100 mM, pH 7,4
- Tampón C: NaCl 300 mM, Tris-HCl 100 mM, pH 7,4, con 1% suero de ternero recién nacido (v/v)
- Tampón PBS: NaCl 137 mM, CaCl₂ 0,9 mM, KCl 2,68 mM, KH₂PO₄ 1,47 mM, MgCl₂ 0,49 mM, Na₂HPO₄ 7,37 mM [pH 7.4] y glucosa 10 mM
- PBS-EDTA: PBS + 1mM ácido etilendiamino tetra acético (EDTA)
- Tampón PB 0,1M: NaH₂PO₄ 0,019M y Na₂HPO₄ 0,081M

3.2 Generación de un antisuero de rata policlonal específico contra GlyT2

Un fragmento de 570 pb del ADNc de GlyT2 que codifica los 193 primeros aminoácidos del extremo N-terminal de GlyT2a de rata se fusionó a GST (Nt-GLYT2-GST) y se utilizó para inmunizar dos ratas Wistar mediante inyecciones intradérmicas siguiendo el procedimiento estándar de inmunización (Todd y col. 2003).

3.3 Construcción de plásmidos para técnicas de microscopía confocal de fluorescencia

Los mutantes de N-glicosilación de GlyT2 de rata previamente generados en el laboratorio (Lopez-Corcuera y col. 2001) o construidos por mutagénesis dirigida utilizando el kit QuikChange (Stratagene), se insertaron en un vector pCDNA3 como se ha descrito anteriormente (Jimenez y col. 2011). Dos colonias de *Escherichia coli* independientes que portaban los plásmidos mutantes se caracterizaron por secuenciación de ADN y actividad de transporte de [³H] glicina. Se secuenció la región de codificación completa de cada construcción para verificar que sólo se había introducido la mutación deseada. El clon ADNc de CNX de ratón (IMAGE número 2582119) se adquirió de Source Bioscience Lifesciences.

3.4 Cultivos celulares y expresión de proteínas

3.4.1 Cultivo y transfección de células COS7

Las células pertenecientes a la línea celular COS7 (American Type Culture Collection) se cultivaron a 37°C y CO₂ al 5% en medio Eagle modificado por Dulbecco suplementado con suero bovino fetal al 10%. La expresión transitoria se realizó con Neofectin™ (MidAtlantic Biolabs), de acuerdo con el protocolo del fabricante. Los resultados reproducibles se obtuvieron con 50-60% de células confluentes en placas de 60 mm o de 6 pocillos usando 5,5 µg y 2,5 µg de ADN total, respectivamente. Las células se incubaron durante 48 h a 37°C hasta su utilización. La eficacia de la transfección se determinó co-transfectando los ADNc con el plásmido pSV-β-galactosidasa (Promega) y midiendo la actividad de la β-galactosidasa 24 h después de la solubilización celular con glicilglicina 25 mM pH 7,8, Triton X-100 al 0,5%, DTT 1 mM ml/pocillo. Tras la centrifugación (15.000 g) durante 2 min, los sobrenadantes (15 µl) se transfirieron a una placa de 96 pocillos junto con 1 volumen de tampón de ensayo y se incubaron durante 20 min a 37°C. La absorbancia se midió a 420 nm en un ELISA Dynatech MR5000 y se normalizó con la concentración de proteína.

3.4.2 Cultivo y transfección de células MDCK

Se cultivaron células MDCK (American Type Culture Collection) a 37°C y 5% de CO₂ en medio de alta glucosa Eagle modificado por Dulbecco suplementado con suero bovino fetal al 10%. La expresión transitoria se realizó usando LipofectAMINE 2000 de Invitrogen, siguiendo los procedimientos del proveedor. Se obtuvieron resultados reproducibles con 60-70% de células confluentes en placas de 100 mm utilizando 4 µg de ADNc total de GlyT2 silvestre y cualquiera de las construcciones de Rabdn: pEGFP-Rab4S22N, pEGFP-Rab8T22N y pEGFP-Rab11S25N a 1:3 o la relación indicada, por peso. Las células se incubaron durante 48 h a 37°C hasta su utilización. Las células se sometieron a inmunofluorescencia como se ha descrito en trabajos previos (Fornes y col. 2008) usando anticuerpos primarios anti-GlyT2 y anti-TfR, Rab5 o 14E12. GlyT2, Rabdn mutante y endógena. Los niveles de expresión de Rab se midieron por inmunodetección y densitometría como se ha descrito anteriormente.

Para los experimentos de distribución polarizada de GlyT2, las células MDCK se cultivaron en placas multipocillo tipo Transwell con membrana de policarbonato con poros de 8 µm (Sigma-Aldrich). Se mantuvieron en DMEM suplementado con suero de ternera fetal al 10% y L-glutamina 2 mM a 37°C, CO₂ al 7%. Posteriormente se ensayó la expresión del transportador por inmunocitoquímica.

3.5 Cultivos primarios de neuronas de tallo cerebral de rata

Se aislaron tallos cerebrales de fetos de rata Wistar de 16 días de edad en solución salina equilibrada de Hank (HBSS), y se disociaron con papaína activada de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Papain Dissociation System, Worthington, Lakewood, NJ). Las células se resuspendieron en tampón de cultivo NB/B27 50:1 en volumen. Las células se sembraron en placas de 24 pocillos revestidas de poli-L-lisina (13 µg/ml) a una densidad de 300.000 células / pocillo. Cada 3 días, la mitad del volumen del pocillo se reemplazó con tampón de cultivo fresco sin suero.

3.6 Obtención de sinaptosomas de médula espinal y tallo cerebral

Los sinaptosomas se obtuvieron a partir de tallo cerebral y médula espinal de ratas de 3 meses de edad como se describe en estudios previos (Huttner y col. 1983, Geerlings y col. 2001, Ferguson y col. 2003). Brevemente, se prepararon sinaptosomas crudos mediante

homogenización del tejido en 10 ml/g de sacarosa 0,32M, HEPES/KOH 4 mM pH 7,3, fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 0,4 mM y centrifugación diferencial (10 min a 800 g, seguido de 15 min a 9200 g del primer sobrenadante, S1). El precipitado sinaptosomal crudo (P2) se purificó mediante gradiente de Percoll, se lavó y se concentró por centrifugación a 4°C a 9200 g para eliminar el Percoll. El precipitado se resuspendió en medio HBM a una concentración de 2mg/ml.

3.7 Fraccionamiento subcelular a partir de sinaptosomas de médula espinal y tallo cerebral

El precipitado sinaptosomal crudo (P2) se lavó por centrifugación (10.200 g, 15 min) y los sinaptosomas se lisaron por choque osmótico (homogeneización en agua destilada e incubación del material durante 30 min a 4°C tamponada mediante la adición de 1M de HEPES / KOH pH 7,3). Después de centrifugar durante 20 min a 25.000 g, se recogió la fracción de grandes fragmentos de membrana (LP1) y el sobrenadante (LS1) se centrifugó adicionalmente durante 2 h a 165.000 g para producir el precipitado LP2. Se utilizó un cóctel de inhibidor de proteasa durante el procedimiento (PI, Sigma-Aldrich, St Louis, MO). Las muestras de proteínas se retiraron para el análisis por inmunodetección y las concentraciones de proteínas se determinaron por el método de Bradford.

Los componentes vesiculares en la fracción LP2 se fraccionaron adicionalmente mediante sedimentación en gradientes de sacarosa de 10-25% de glicerol y 50-800 mM, como se ha descrito en trabajos previos (Ferguson y col. 2003). El precipitado de LP2 se resuspendió pasando el sedimento 10 veces a través de una aguja de calibre 23 y 5 veces a través de una aguja de calibre 30 en 1,5 ml de un tampón de gradiente que contenía sacarosa 20 mM (gradiente de glicerol) o sacarosa 40 mM (gradiente de sacarosa). El material se colocó en capas sobre un gradiente de 10 ml de glicerol al 10-25% establecido sobre un cojín de 0,5 ml de sacarosa al 55% y se centrifugó durante 1,5 h. Alternativamente, la suspensión se aplicó sobre un gradiente de sacarosa de 11 ml de 50-800 mM y se centrifugó durante 3 h a 100.000 g en un rotor SW40. Se recogieron fracciones de 1 ml desde la parte superior de cada gradiente y las proteínas se precipitaron con ácido tricloroacético al 6% en presencia de desoxicolato al 0,02% antes de los análisis posteriores.

3.8 Aislamiento de membranas resistentes a detergentes (*lipid rafts*) de sinaptosomas de tallo cerebral

Las balsas lipídicas (*lipid rafts*) de membrana de sinaptosomas de tallo cerebral de rata se aislaron de acuerdo con un procedimiento estándar (Samuvel y col. 2005). Los sinaptosomas purificados se resuspendieron (Geerlings y col. 2001) a 2 mg de proteína/ml en tampón MBS que contenía 0,5% de Triton X-100 y fluoruro de fenilmetilsulfonilo 0,4 mM + PI a una relación detergente/proteína de 3,33.

Las membranas sinaptosomales se solubilizaron pasándolas a través de una aguja de calibre 25 seguido de una incubación de 30 min a 4°C. Se añadieron volúmenes iguales de sacarosa al 80% (p/v) al lisado y se mezclaron completamente. En el fondo de un tubo de ultracentrífuga SW40 se depositaron 4 ml del lisado en sacarosa al 40% y sobre ellos se añadieron sucesivamente 4 ml de sacarosa al 30% y al 5% en MBS + PI. Tras una centrifugación a 185.000 g durante 18 h a 4°C, se recogieron fracciones de 1 ml desde la parte superior del tubo. Las proteínas de cada fracción se precipitaron con ácido tricloroacético frío al 10% y se sometieron a electroforesis en gel SDS-PAGE al 10% e inmunodetección.

3.9 Aislamiento de membranas de tejidos celulares

Los cultivos celulares se recuperaron con PBS-EDTA y por centrifugación a 1.000 rpm durante 5 min, se resuspendieron en PBS-EDTA y se lisaron mecánicamente haciendo pasar la muestra 5 veces a través de una aguja de 0,5 mm de diámetro. El precipitado se eliminó por centrifugación (3.500 rpm durante 10 min) y se recogió el sobrenadante. El precipitado se resuspendió en PBS-EDTA y se pasó 5 veces a través de una aguja de 0,3 mm de diámetro, etapa que se repitió dos veces más. El precipitado se desechó y el sobrenadante recogido en los 3 pasos anteriores se centrifugó a 18.000 rpm durante 45 min. El sobrenadante se descartó y el sedimento enriquecido en membrana se resuspendió en un volumen mínimo de PBS-EDTA. La concentración de proteína se determinó por el método de Bradford y se ajustó a 0,5 mg/ml.

3.10 Determinación de colesterol

El contenido de colesterol se determinó colorimétricamente utilizando la reacción de cloruro férrico en una disolución de ácido sulfúrico/ácido acético (Sepulveda y col. 2006). En resumen, 30 μ l de cada fracción se mezclaron con 240 μ l de cloroformo/metanol (2/1, v/v), y la fase que contenía los lípidos se transfirió a un tubo de vidrio y se secó con nitrógeno gaseoso. El colesterol se extrajo añadiendo 0,75 ml de ácido acético y 0,5 ml de reactivo de cloruro férrico (preparado mezclando 1 ml de FeCl_3 al 2,5% (p/v) en H_3PO_4 al 85% con 11,5 ml de H_2SO_4 concentrado) a cada tubo. Las muestras se incubaron durante 30 min y se leyó la absorbancia a 550 nm. Se usaron disoluciones estándar de colesterol para la calibración.

3.11 Proteólisis limitada

Se incubaron membranas (25 ml) a partir de una fracción enriquecida obtenida por fraccionamiento subcelular con 0-100 mg/ml de papaína (Roche) y DTT 0,8 mM en un volumen final de 50 ml de PBS durante 15 min a temperatura ambiente (22°C). La digestión se detuvo añadiendo 5 mM de E-64 (Roche) durante 5 min sobre hielo y la muestra se centrifugó durante 90 min a 4°C y 14.000 rpm. El sobrenadante se desechó y el sedimento se resuspendió en tampón de carga Laemmli y se incubó durante 20 min a 37°C. Finalmente, las muestras se separaron por SDS-PAGE y las proteínas se visualizaron mediante inmunodetección.

3.12 Electroforesis, inmunodetección y cuantificación densitométrica

El SDS-PAGE y la inmunodetección se realizaron de la forma descrita en trabajos anteriores (Lopez-Corcuera y col. 1998). Las muestras se separaron en SDS-PAGE utilizando un gel de concentración al 4% y geles de resolución del 6% ó 7,5%. Las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa mediante electrotransferencia semi-seca (Life Technologies Inc.: 1,2 mA/cm² durante 2 h) y las membranas se bloquearon en PBS con leche desnatada al 5% durante 4 h a 25°C. Las membranas se incubaron durante toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario deseado: anti-GlyT2 (1:1.000), anti-CNX (1:1.000) o anti-PERK (1:1.000).

Después de varios lavados, los anticuerpos primarios unidos se detectaron con anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa de rábano de los siguientes orígenes y diluciones: anti-conejo de cabra (utilizado a una dilución de 1/5.000 o 1/6.000 según el experimento); anti-ratón

de cabra (1/6.000 a 1/10.000); anti-ratón de conejo (1/6.000); anti-rata de conejo (1/5.000 o 1/6.000 según el experimento); anti-cobaya de conejo (1/3.000).

En algunos experimentos se empleó la tubulina o la calnexina como control interno. Para ello, se retiraron los anticuerpos de la membrana y se volvió a incubar con anti-tubulina ó anti-calnexina (1:3.000) o anti-calnexina, que se detectaron con IgG anti-conejo conjugado con peroxidasa.

Las bandas de proteínas se visualizaron con el método de ECL y se cuantificó la intensidad en un densitómetro de imágenes calibrado GS-800 usando el software Quantity One, empleando exposiciones de película dentro del rango lineal.

3.13 Experimentos de transporte de [³H]-glicina en cultivos celulares

Los ensayos de transporte en células se realizaron a 37°C como se ha descrito previamente para células en cultivo (Lopez-Corcuera y col. 2001). Los ensayos se realizaron en solución salina tamponada con HEPES (HBS). La solución de transporte contenía 2 µCi/ml de glicina marcada con [³H]-glicina (1,6 TBq/mmol) y se determinó el contenido de [³H]-glicina. El transporte de glicina mediado por GlyT2 en cultivos primarios de neuronas se definió como sensible a ORG25543 (2 µM), y se normalizó a la concentración de proteína determinada usando el método de Bradford. Todos los ensayos se realizaron por triplicado y los experimentos se repitieron al menos tres veces con los mismos resultados. En el caso de cultivos celulares transfectados el transporte de [³H]-glicina mediado por GlyT2 se midió como la diferencia entre la acumulación de glicina en células transfectadas con el cDNA de GlyT2 menos la acumulación de células transfectadas con un plásmido vacío (*mock*), normalizada por la concentración de proteína. Los ajustes de regresión no lineal de datos de ensayos de transporte se realizaron utilizando el software ORIGIN. Las barras representan el error estándar de la media de muestras en triplicado y los experimentos representativos mostrados se repitieron al menos 3 veces con resultados comparables.

3.14 Biotinilación de proteínas de superficie en sinaptosomas y cultivos celulares

Las proteínas de superficie de sinaptosomas se marcaron con una versión modificada de un protocolo previamente descrito en otros trabajos (Geerlings y col. 2001, Lopez-Corcuera y col. 2001, Fornes y col. 2004). En resumen, los sinaptosomas purificados (3 mg/ml) se dejaron en hielo durante 15 min. Se añadió un volumen igual de 3 mg/ml de NHS-SS-biotina en tampón HBM y la mezcla se incubó durante 1 h a 4°C. Posteriormente el proceso se paró añadiendo lisina 1 M en tampón HBM (1/9 del volumen total) durante 15 min. Una vez centrifugados, los precipitados se resuspendieron en tampón HBM a 2 mg de proteína/ml y se lisaron durante 30 min a 4°C, añadiendo un volumen igual de 2 x tampón de lisis de ensayo de radioinmunoprecipitación (RIPA) suplementado con PI. Las proteínas solubilizadas se incubaron con bolas de agarosa-estreptavidina durante 2 h a temperatura ambiente, se precipitaron, se lavaron tres veces con tampón RIPA y las proteínas biotiniladas unidas se eluyeron con tampón de carga Laemmli durante 15 min a 70°C. Utilizando la separación en SDS-PAGE e inmunodetección, se analizaron alícuotas de extractos totales, fracciones no unidas y fracciones unidas.

Los cultivos celulares de células COS7 o MDCK se crecieron en placas de 6 pocillos (Nunc), se lavaron 3 veces con PBS suplementado con CaCl₂ 0,1 mM y MgCl₂ 1 mM (PBSc) y se incubaron 30 min con Sulfo-NHS-Biotina en PBSc (1,0 mg/ml, Pierce) a 4°C. Tras 2 lavados de 30 min a 4°C se añadió 100 mM L-lisina en PBSc y se lavó con NaCl 150 mM en Tris-HCl 50 mM pH 7,4 con PI. Las células se lisaron con tampón RIPA con PI. Una alícuota del lisado se reservó para detección de proteína total y el resto se incubó con estreptavidina agarosa durante 2 h a 22°C con agitación. Tras centrifugación se separa una alícuota de sobrenadante (proteínas no biotiniladas) y el precipitado se lava varias veces con RIPA y las proteínas biotiniladas se eluyen con 2x tampón Laemmli. Las muestras se analizan por electroforesis e inmunodetección (Lopez-Corcuera y col. 2001).

La biotinilación reversible de sinaptosomas se realizó como se describe (Loder y col. 2003, Fornes y col. 2008), con modificaciones. Los sinaptosomas biotinilados se lavaron con glucosa al 0,18% en PBS/Ca²⁺/ Mg²⁺ suplementado con albúmina de suero bovino al 0,2% precalentada (37°C). Se dejó continuar la endocitosis durante 1 h a 37°C en ausencia / presencia de MβCD, se detuvo a 4°C durante 15 min y se retiró la biotina superficial residual incubando dos veces durante 15 min con tampón NT recién preparado. En estas condiciones se observó una biotina superficial residual de aproximadamente 10%. Los sinaptosomas se lisaron y se procesaron como se ha descrito anteriormente.

3.15 Aislamiento de *rafts* a partir de sinaptosomas biotinilados

Sinaptosomas purificados (3 mg/ml) se trataron con vehículo o M β CD durante 1 h a 37°C y se dejaron en hielo durante 15 min. Se añadió un volumen igual de 3 mg/ml de NHS-SS-biotina en tampón MBS y la mezcla se incubó durante 1 h a 4°C. Posteriormente el proceso se paró añadiendo lisina 1 M en tampón HBM (1/9 del volumen total) durante 15 min.

Después de lavar con tampón MBS, los precipitados se resuspendieron a 2 mg de proteína/ml y se lisaron durante 30 min a 4°C en tampón RIPA suplementado con PI o bien se aislaron las balsas lipídicas de membrana (*rafts*) mediante solubilización con Triton X-100 y centrifugación en gradiente como se ha descrito. Las fracciones *raft* 4-6 o las fracciones no *raft* 9-12 se juntaron y solubilizaron durante 30 min a 4°C en RIPA como se ha descrito previamente. Las proteínas solubilizadas se incubaron con partículas de estreptavidina-agarosa durante 2 h a 22°C, se sedimentaron, se lavaron tres veces con tampón RIPA y las proteínas biotiniladas unidas se eluyeron con tampón de carga Laemmli durante 15 min a 70°C.

Las alícuotas de extractos totales, fracciones no unidas y fracciones unidas se analizaron mediante SDS-PAGE e inmunodetección para detectar GlyT2, y se re-hibridaron las membranas para calnexina como control interno de proteína aplicada. En nuestras condiciones, el reactivo de biotinilación impermeable a la membrana fue incapaz de marcar proteínas intracelulares. Se detectó menos del 0,2% de la inmunoreactividad total de calnexina en las fracciones biotiniladas de sinaptosomas y neuronas intactas.

3.16 Experimentos de doble inmunofluorescencia

3.16.1 En cultivos primarios de neuronas

Los cultivos de neuronas de tallo cerebral se crecieron durante 15 días *in vitro* y se sometieron a inmunofluorescencia como se describe en trabajos anteriores (Fornes y col. 2004). Se fijaron con paraformaldehído al 2% en PBS, se lavaron tres veces con 1 ml de PBS y se bloquearon durante 30 min con suero al 10% en TNT.

Las muestras se incubaron posteriormente con los anticuerpos primarios: anti-GlyT2 (conejo 1/1.000 o 1/500 según el experimento), anti-MAP2 1/200, anti-VIAAT 1/500, anti-Rab11 1/500, o anti-sinaptofisina 1/500, en TNT que contenía 1% de suero durante 1 h. Las células se lavaron tres veces con TNT y se incubaron durante 1 h con el anticuerpo secundario (anti-conejo Alexa R488, 1/500, verde; anti-conejo Alexa R488, 1/500, rojo; anti-pollo Alexa 647 1/200, azul; anti-

rata Alexa 555, 1/500, verde; anti-ratón Alexa 647 1/200, azul; o anti-ratón Alexa R488, 1/500, rojo) en TNT con 1% de suero.

Después de tres lavados con TNT, los cubreobjetos se montaron en portaobjetos de microscopio con Vectashield. Las células se visualizaron utilizando diferentes microscopios según el experimento: microscopio láser confocal LSM510 acoplado a un microscopio vertical Axio Imager.Z1 M (Zeiss); Microradiance, BioRad con un microscopio Axioskop 2 (Zeiss) o META LSM510 acoplado a un microscopio invertido AXIOVERT200 (Zeiss).

Para la cuantificación del efecto de M β CD en las neuronas de tallo cerebral, las imágenes de 12 bits adquiridas con un objetivo Zeiss de 63x con zoom 1,7 y 38 nm/píxel siguiendo el criterio de Nyquist fueron deconvolucionadas usando la relación señal/ruido óptima y el parámetro PSF. Las imágenes deconvolucionadas fueron sometidas a la misma intensidad de umbral definida por el usuario (alrededor de 90) para restar fondo y seleccionar GlyT2 puncta. Se utilizó el módulo "Análisis de Morfometría Integrado" del software MetaMorph (v.61r6). El área total entre 200 y 400 regiones creadas automáticamente alrededor de los objetos del umbral definido en las imágenes deconvolucionadas se midió a partir de campos elegidos aleatoriamente. Los datos de tamaño se dan en el texto y se expresan como media \pm error estándar de la muestra.

3.16.2 En secciones de médula espinal y tallo cerebral

Las ratas Wistar adultas se anestesiaron profundamente mediante inyección intraperitoneal de pentobarbital (100 mg/kg) y se perfundieron a través de la aorta ventricular izquierda con una solución fijadora de paraformaldehído al 4% o glutaraldehído al 0,05% en fosfato sódico 0,1 M pH 7,4, precedido por un flujo corto (10-15 segundos) de fosfato sódico 0,1 M pH 7,4 sin fijador. La aurícula derecha se cortó al comienzo de la perfusión. Los líquidos de perfusión se administraron mediante una bomba peristáltica a 50 ml/min, comenzando los 20 segundos después de la toracotomía. El tallo cerebral y la médula espinal se extrajeron y se mantuvieron durante toda la noche en solución fijadora. Después de lavar en PBS, se cortó el tejido con un vibrátomo en cortes de 50 μ m que se almacenaron en PBS con 0,02% de azida sódica durante un máximo de 3 semanas.

La doble inmunofluorescencia se realizó como se ha descrito en trabajos previos (Cubelos y col. 2005). Los cortes se dejan secar 45 min sobre portaobjetos a 22°C. Se lavan 10 min con PB 0,1 M – pH 7,4 y se tratan 20 min con metanol al 10% en PB. Tras 2 lavados de 10 min con PB 0,1 M

pH 7,4 y uno con PBS, se colocan los portaobjetos en horizontal en una caja cerrada herméticamente y se añade la solución de bloqueo durante 1 h a temperatura ambiente (solución de bloqueo: Tritón X-100 0,3%, FBS 5%, albumina (BSA) 2%, gelatina 0,2% en PBS). Una vez retirada, se añade el anticuerpo primario en 10% de solución de bloqueo y se incuba toda la noche a 4°C. Una vez lavados con PBS (10 min x 3) se colocan los portaobjetos en cámara horizontal e incuban con anticuerpo secundario en 10% de solución de bloqueo 2 h a temperatura ambiente. Tras 3 lavados de 15 min con PBS en agitación, se fija un cubreobjetos con mowiol-dabco sobre la muestra. Se deja secar 24-48 h antes de la toma de imágenes.

3.17 Coinmunoprecipitación e inmunoprecipitación secuencial de GlyT2 y calnexina en células COS7

Las células COS7 transfectadas se lavaron dos veces con N-metilmaleimida 20 mM en PBS y se solubilizaron durante 15 min a 4°C en 1 ml de ácido3-((3-colamidopropil) dimetilamonio)-1-propanosulfónico (CHAPS) en HBS. Los complejos CNX-GlyT2 también se obtuvieron en Triton X-100 y digitonina en la misma concentración, aunque CHAPS mostró la potencia de solubilización más alta. El material solubilizado se centrifugó a 10.000 g durante 15 min. Se retuvo una porción del lisado (proteína total) y el resto se incubó con 30 µl de proteína A ó G sefarosa en tampón de lisis al 50% (PAS o PGS), Sigma, St Louis, MO, USA. La mezcla se pre-aclaró por incubación durante 30 min a 4°C con rotación continua, se centrifugó y los sobrenadantes fueron incubados durante 2 h a 4°C con 1,5 µg de anticuerpo anti-GlyT2 (Zafra y col. 1995) o anti-CNX. Posteriormente, se añadieron 30 µl de partículas y la mezcla se incubó durante 1 h a 4°C con rotación constante. Tras 3 lavados con CHAPS al 0,5% en HBS enfriado con hielo antes de añadir tampón Laemli SDS-PAGE a cada muestra (30 µl). Las proteínas unidas se disociaron de la matriz por calentamiento a 75°C durante 15 min antes de la separación en SDS-PAGE.

Para la inmunoprecipitación secuencial, las proteínas inmunoprecipitadas se eluyeron de la sefarosa añadiendo 150 µl de SDS al 1% en HBS a 75°C durante 30 min y se centrifugaron. El sobrenadante se diluyó con 1,35 ml de CHAPS al 1% en HBS para disminuir la concentración de SDS al 0,1% y se transfirió a un nuevo tubo que contenía 1,5 µg de anticuerpo anti-GlyT2. La mezcla se incubó durante toda la noche a 4°C. Los inmunocomplejos se unieron a las partículas, se eluyeron como se ha descrito y se sometieron a SDS-PAGE.

3.18 Ensayos de inmunoaislamiento sobre partículas magnéticas revestidas de proteína A

Las fracciones que contenían GlyT2 se inmunoaislaron utilizando un método modificado al descrito en trabajos previos (Deken y col. 2003). Las partículas magnéticas recubiertas de proteína A se incubaron durante la noche con un anticuerpo puente (IgG *linker*) de cabra anti-rata a 10 µg/mg de partículas en 100 µM de H₃BO₃, pH 9,5. Las partículas se recogieron, se lavaron con PBS-BSA al 0,1% y se bloquearon en Tris 0,2 M-BSA al 0,1% a pH 8,5 durante 4 h a 37°C. Las partículas recubiertas con IgGs se incubaron posteriormente durante toda la noche con el anticuerpo anti-GlyT2 de rata (30 µg/mg de partículas) o el suero preinmune correspondiente en EDTA 2 mM, suero fetal de ternera al 5% en PBS a pH 7,4. Después se lavaron y se incubaron durante toda la noche con fracciones vesiculares del tallo cerebral (LP2) a 200 µg/mg de partículas. Las partículas recubiertas de IgGs se recuperaron, se lavaron extensamente y se guardaron como fracción unida al anticuerpo. Los sobrenadantes y las disoluciones de lavado de las partículas recubiertas se mezclaron, precipitaron y se guardaron como fracción no unida. Las fracciones unidas y no unidas se sometieron a SDS-PAGE e inmunodetección.

3.19 Técnicas de Inmunohistoquímica

3.19.1 Inmunohistoquímica pre-inclusión (*preembedding*) en muestras de tejido

Las ratas Wistar se anestesiaron y se perfundieron tal y como se ha descrito previamente. El tejido cerebral se fijó durante toda la noche, como se ha indicado en apartados anteriores, y se almacenó a 4°C en una disolución de conservación que constaba de una parte fijadora y nueve partes de fosfato de sodio 0,1 M hasta que se procesó para inmunohistoquímica *preembedding* en microscopio electrónico.

Se cortaron secciones con un vibrátomo (40 µm de espesor) y se almacenaron (4°C, de 12 h a 3 semanas) en fosfato de sodio 0,1 M con NaN₃ (0,2-1 mg/ml). Después se lavaron las secciones en fosfato sódico 0,1 M, se incubaron (30 min) en etanolamina 1 M con fosfato sódico 0,1 M, se lavaron (3 x 1 min) en tampón A, se incubaron en tampón B con suero de ternero recién nacido al 10% (v/v) y NaN₃ (1 mg/mL), y luego se incubaron (12-48 h, 4°C o temperatura ambiente) con anticuerpos (5 µg/ml) diluidos en tampón C.

Las secciones se lavaron (3 x 1 min y 2 x 10 - 20 min) en tampón C, se incubaron (1 h) con anticuerpos secundarios biotinilados de burro anti-rata (1: 100) y cabra anti-rata conjugados con partículas de oro de 10 nm (Cell Microscopy Center, Utrecht University, the Netherlands)

diluidas 1:40 en tampón C, lavadas (3 x 1 min y 2 x 15 min) en tampón C, incubadas (1 h) con complejo estreptavidina- peroxidasa de rábano biotinilada en tampón C y lavadas (3 x 1 min y 2 x 15 min) en tampón C. Después se lavaron las secciones (3 x 1 min) en tampón A, se incubaron durante 6 min en fosfato de sodio 0,1 M con H₂O₂ (0,1 mg/ml) y diaminobenzidina (0,5 mg/ml). Tras 6 min de preincubación en fosfato sódico / diaminobenzidina sin H₂O₂, la reacción se detuvo con fosfato sódico 0,1M (2 x 3 min). Las secciones se trataron con osmio (30-45 min, 10 mg/ml en fosfato de sodio 0,1 M), se lavaron (3 x 1 min) en fosfato de sodio 0,1 M, se deshidrataron en etanoles de gradación creciente (50%, 70%, 80%, 96% 1 x 5 min y 100% 3 x 10 min) y finalmente en óxido de propileno (2 x 5 min), y se incluyeron en la resina Durcupan ACM. Se cortaron secciones ultrafinas (40 µm) en ángulo recto para estudiar las partes del tejido en contacto inmediato con los reactivos. Las secciones se contrastaron (10 mg/ml de acetato de uranilo 10-15 min y 3 mg/ml de citrato de Pb 1-2 min) y se examinaron en un microscopio electrónico JEOL-1010. Como control, los anticuerpos primarios fueron sustituidos por IgG pre-inmunes, o IgG inmune liberada de IgG específica por inmuno-adsorción con la correspondiente proteína de fusión (antígeno del anticuerpo).

3.19.2 Inmunohistoquímica post-inclusión (*postembedding*) en sinaptosomas

Los sinaptosomas se purificaron a partir de tallo cerebral y médula espinal de rata (3 meses, macho) según se ha descrito previamente en otros estudios (Geerlings y col. 2001) y se resuspendieron en tampón HBM frío. El precipitado de sinaptosomas obtenido por centrifugación se resuspendió en un fijador frío (paraformaldehído 4%, glutaraldehído 0,1% en fosfato de sodio 0,1 M pH 7,4) y se mantuvo a 4°C.

Los precipitados de sinaptosomas fijados se deshidrataron en etanol y se incluyeron (*embedding*) en la resina acrílica LR-White. Se obtuvieron secciones ultrafinas con un ultramicrotomo ULTRACUTE (Leica), en rejillas de níquel revestidas con carbono/colodión de 200 cuadrículas.

La inmunotinción doble con anticuerpos anti Rab11 y anti GlyT2 se realizó como se describe a continuación. Después de un paso de bloqueo con TBS que contenía albúmina de suero bovino al 0,1% y gelatina al 1%, las secciones se incubaron durante 1 h con anti-Rab11 diluido en el mismo tampón de bloqueo, seguido de un anticuerpo de puente de IgG de conejo anti-ratón (DakoCytomation, Denmark). Los anticuerpos se detectaron con proteína A conjugada con partículas de oro de 10 o 15 nm. Posteriormente, las secciones se fijaron con glutaraldehído al

0,5% en PBS, y los grupos aldehído libres se inactivaron con cloruro de amonio. Se realizó un inmunomarcaje secuencial con el anticuerpo anti-GlyT2, detectado con un anticuerpo puente conejo anti-rata y proteína A conjugada con partículas de oro de 10 o 15 nm. Se incluyeron controles que carecían de anticuerpos anti Rab11 o anti GlyT2.

3.20 Técnicas de inmunomarcaje

3.20.1 Inmunomarcaje de las balsas lipídicas de membrana

Las balsas de membrana purificadas se marcaron mediante inmunomarcaje con oro coloidal siguiendo un protocolo previamente utilizado en el laboratorio (Geerlings y col. 2001). Las muestras se fijaron con glutaraldehído al 0,5% en TBS y se bloqueó la unión no específica en TBS que contenía 0,5% de albúmina de suero bovino y 0,2% de gelatina. Las rejillas se incubaron con anticuerpo anti-GlyT2 de conejo (1:5) durante 60 min. No se detectó ningún marcaje cuando se omitió el anticuerpo, se preabsorbió con el antígeno GlyT2 o se usaron fracciones de balsas lipídicas de corteza cerebral que es un área no glicinérgica.

Después del marcaje con el anticuerpo, las rejillas se lavaron durante 3 min con TBS y luego se incubaron durante 45 min con proteína A conjugada con oro de 10 nm. El material se lavó de nuevo (3,2 min con PBS), se fijó durante 2 min con 2% de glutaraldehído en PBS, se lavó suavemente con agua y se tiñó negativamente durante 50 s en una solución acuosa al 2% de acetato de uranilo. Las muestras se visualizaron en un microscopio electrónico JEM-1010 y las imágenes se tomaron usando una cámara digital Bioscan 792. La concentración de anticuerpo se tituló previamente para asegurar que las partículas de oro estaban siempre asociadas con membranas.

3.20.2 Inmunomarcaje de fracciones vesiculares de tallo cerebral purificadas en gradiente de glicerol

Las fracciones vesiculares de tallo cerebral de rata obtenidas por fraccionamiento subcelular de sinaptosomas y purificadas en gradiente de glicerol se marcaron con inmunoglobulina siguiendo un protocolo modificado para doble marcaje (Melikian 2004). Tras la fijación con glutaraldehído al 0,5% en TBS se bloquearon las uniones inespecíficas en TBS que contenía 0,5% de albúmina de suero bovino y 0,2% de gelatina. Los anticuerpos primarios utilizados fueron: sinaptofisina (1:30), GlyT2 (rata, 1: 2), VIAAT (conejo, 1:50), Na⁺/K⁺ ATPasa (1: 200), VAMP2 (1:

200), sinaptotagmina 2 (1:50), Rab11 (1:10), Rab5A (1:2), y GAT1 (1:10). Las rejillas se incubaron simultáneamente con dos anticuerpos primarios: anti-GlyT2 y el anticuerpo contra la proteína marcada, durante 90 min. El anticuerpo GlyT2 se omitió en las incubaciones control. La especificidad de este anticuerpo se demostró por la ausencia de marcaje cuando el anticuerpo fue preabsorbido con el antígeno GlyT2, y cuando se utilizaron fracciones del gradiente de corteza cerebral que es un área carente de GlyT2.

Después del marcaje con los anticuerpos, las rejillas se lavaron durante 3 x 10 min con TBS y luego se incubaron durante 45 min con los anticuerpos secundarios correspondientes conjugados con partículas de oro coloidal de 5 y 10 nm, respectivamente. Después, las rejillas se hicieron flotar sobre tres gotas de TBS, se fijaron con glutaraldehído al 2% en PBS durante 2 min y se lavaron con agua doblemente destilada antes de tinción negativa durante 40 segundos con una solución al 2% de acetato de uranilo. Las muestras se visualizaron en un microscopio electrónico JEOL-1010 y las imágenes se tomaron usando una cámara digital Bioscan 792. Cada concentración de anticuerpo se tituló para asegurar la mejor relación señal/ruido. Se comprobó que la marca detectada con cada anticuerpo no estaba influenciada por la presencia del otro anticuerpo, y no se observaron cambios cuando se usaron partículas de 5 ó 10 nm para cualquiera de los anticuerpos primarios. Sin embargo, debido a que las partículas pequeñas de 5 nm penetran más fácilmente, se asoció siempre este tamaño de partícula al primer antígeno (GlyT2) y la partícula de 10 nm más grande al segundo anticuerpo (la proteína marcadora).

3.21 Técnica de ARNi

El ARNm de silenciamiento de CNX se obtuvo mediante la generación y transfección de moléculas pequeñas de ARNd-si específico para CNX en células COS7 como se indica a continuación. Se transcribió *in vitro* un producto de amplificación de CNX de 300 pares de bases (número IMAGE 2582119) flanqueado por un promotor T7 (RZPD, Centro de Recursos Alemán para Investigación en Genoma) utilizando el kit Dicer de siRNA X-tremeGENE (Roche) siguiendo las instrucciones del fabricante. El ARNd resultante se digirió posteriormente con la enzima Dicer recombinante, se purificó el ARN digerido y se transfectó el ARN-d en células COS7 utilizando el Reactivo de Transfección siRNA X-tremeGENE con 2,5 μ l/0,2 μ g de ARN-d. La eficiencia de silenciamiento del CNX-ARNi se evaluó mediante inmunodetección 48 h post-transfección y fue del 85-90%. El ARNi de hipoxantina fosforribosiltransferasa (HPRT) se utilizó como control.

3.22 Experimentos de pulso y caza en cultivos celulares

Las células se cultivaron hasta un 80-90% de confluencia en placas p60 o p100, se incubaron con medio libre de metionina durante 1 h. Posteriormente, se marcaron por pulso durante 15 min con 0,25 mCi/ml [³⁵S] metionina / cisteína (Redivue Promix, Amersham) y se cazaron durante periodos variables en DMEM 10% suero de ternero fetal que contenía cicloheximida 1 mM para detener rápidamente la elongación de cadenas polipeptídicas nacientes. El marcaje se detuvo mediante la adición de PBS enfriado con hielo que contenía 20 mM de N-etilmaleimida recién preparada para evitar la oxidación de grupos sulfhidrilo libres. Las proteínas fueron inmunoprecipitadas con anticuerpo contra GlyT2 (Zafra y col. 1995) o secuencialmente con anti-CNX y anti-GlyT2, como se ha descrito anteriormente. Las muestras se separaron en geles SDS-PAGE, se fijaron y se trataron con el reactivo de fluorografía Amplifier (Amersham). Los geles se secaron y se expusieron durante 4-12 días a -70°C, y las bandas de proteínas se cuantificaron después por densitometría.

3.23 Modificación de carbohidratos en la molécula de GlyT2

Los inmunoprecipitados de GlyT2 fueron digeridos con la endoglicosidasa deseada (PNGasa F o Endoglicosidasa H o D) en un pequeño volumen del tampón apropiado, siguiendo las instrucciones del fabricante. Para el tratamiento con tunicamicina, las células que expresan GlyT2 se trataron con 1-10 µg/ml de tunicamicina o vehículo (DMSO) durante el tiempo y a la temperatura indicados en los pies de figura, inmunoprecipitados con los anticuerpos deseados y resueltos por SDS-PAGE.

4. RESULTADOS

4.1 Localización celular y subcelular de GlyT2 en neuronas del tallo cerebral y médula espinal

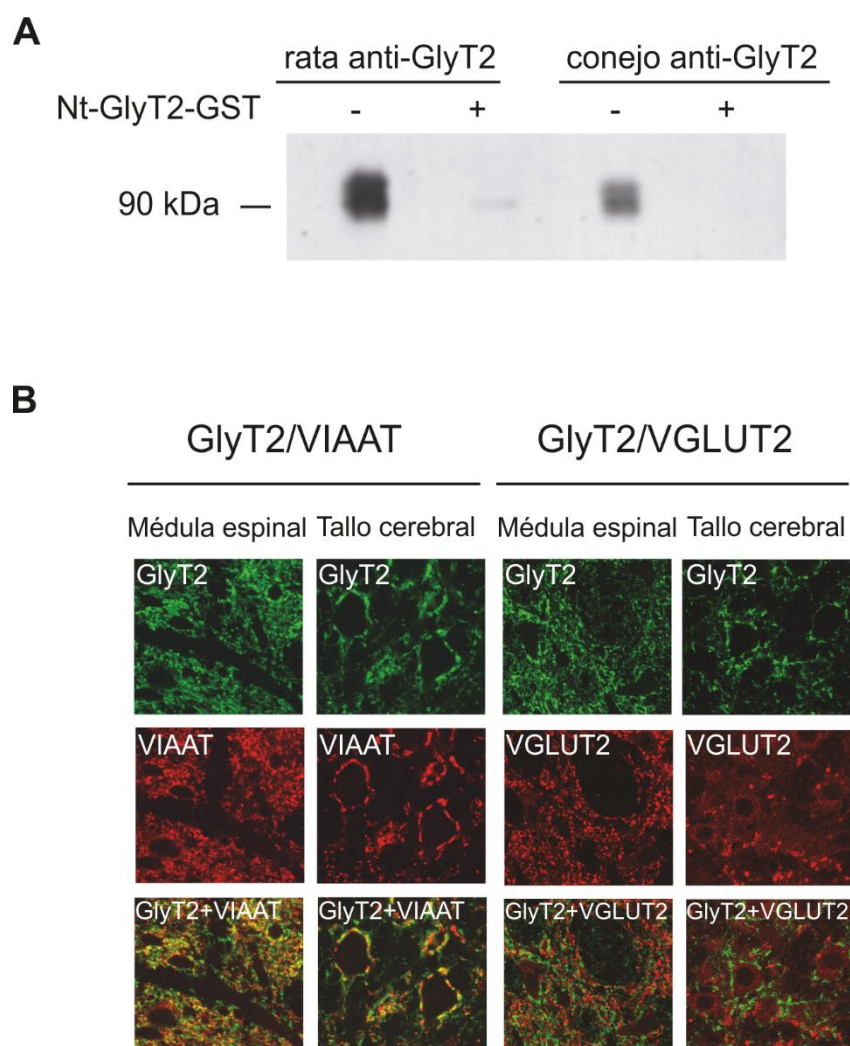
4.1.1 Confirmación de la presencia de GlyT2 en la membrana plasmática de neuronas inhibitoras

Con el objetivo de confirmar la distribución celular de GlyT2 se obtuvo en el laboratorio un anticuerpo nuevo frente al dominio N-terminal de GlyT2 de rata (rGlyT2). El nuevo anticuerpo se desarrolló en rata, especie que permitía realizar ensayos de inmunofluorescencia múltiple para detectar simultáneamente los transportadores vesiculares VIAAT (marcador de neuronas inhibitoras glicinérgicas/GABAérgicas) o VGLUT2 (marcador de neuronas excitadoras glutamatérgicas) (Chaudhry y col. 1998, Todd y col. 2003).

El nuevo anticuerpo reconoció una banda única del tamaño esperable en el tejido cerebral (90 kDa) y su inmunodetección fue desplazada por la proteína de fusión Nt-GlyT2-Glutation-S-transferasa (Nt-GlyT2-GST) que se utilizó como antígeno (Figura 1A).

Se realizaron ensayos de inmunohistoquímica utilizando este anticuerpo con muestras de tallo cerebral y médula espinal que permitieron demostrar la presencia de GlyT2 en las terminales sinápticas de las neuronas que contenían VIAAT, pero no en las que presentaban VGLUT (Figura 1B).

Figura 1. Colocalización de GlyT2 y VIAAT pero no de GlyT2 y VGLUT2 en tallo cerebral y médula espinal



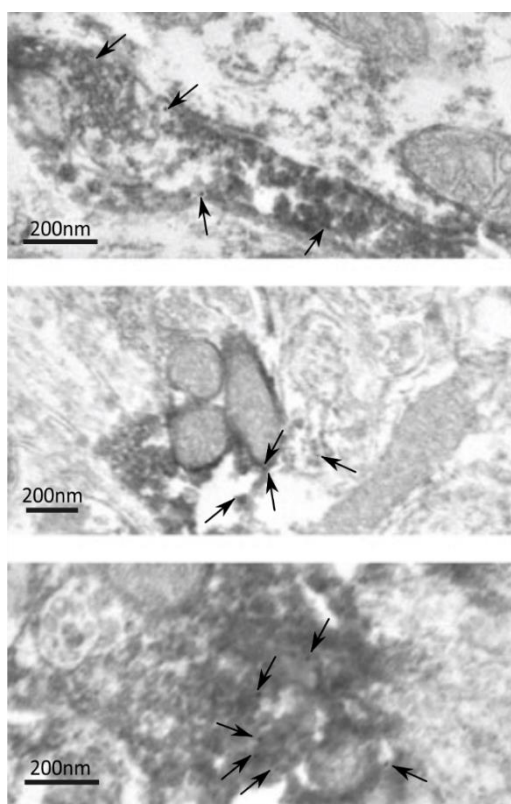
(A) Caracterización del antisuero policlonal específico frente a rGlyT2 obtenido en rata. En cada carril se aplicaron 20 µg de homogeneizado de tallo cerebral y se realizaron inmunodetecciones con el antisuero indicado, en presencia (+) o ausencia (-) de la proteína de fusión GST utilizada como el antígeno para generar el anticuerpo (Nt-GlyT2-GST). Las diluciones de anticuerpo utilizadas fueron: 1/100 (anti-rGlyT2 de rata) y 1/1000 (anti-rGlyT2 de conejo). **(B)** Doble inmunofluorescencia en cortes de tejido. Los cortes de médula espinal (asta dorsal) y de tallo cerebral (núcleo coclear ventral) se marcaron para visualizar GlyT2 (fluorescencia verde) junto al marcador indicado VIAAT (fluorescencia roja, panel izquierdo) o VGLUT2 (fluorescencia roja, panel derecho). La fila inferior muestra la fusión de las imágenes superiores, donde la colocalización de las proteínas se observa como fluorescencia amarilla.

4.1.2 Distribución de GlyT2 en la membrana plasmática y el interior celular de la neurona presináptica

Para estudiar la localización subcelular de GlyT2 se utilizaron técnicas inmunohistoquímicas donde se empleó el anticuerpo anteriormente descrito y muestras de tejido procedentes de médula espinal de rata y sinaptosomas de tallo cerebral.

Con el fin de verificar que el marcaje del nuevo anticuerpo era específico de neuronas glicinérgicas en experimentos de microscopía electrónica, se realizaron ensayos de doble marcaje con peroxidasa y con oro coloidal sobre tejido fijado. Las partículas de oro se localizaban exclusivamente en las estructuras positivas para el marcaje con peroxidasa, específico de los axones y terminales de neuronas glicinérgicas. Sin embargo, apoyando observaciones anteriores de laboratorio (Geerlings y col. 2001, Geerlings y col. 2002), el transportador GlyT2 se identificó tanto asociado a membrana plasmática como a localizaciones intracelulares (Figura 2).

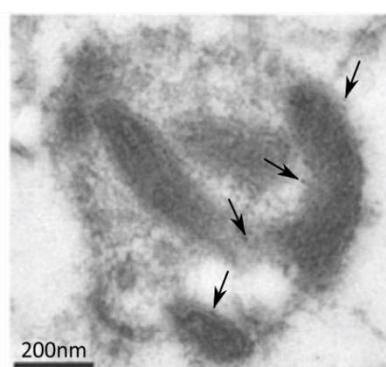
Figura 2 Visualización de GlyT2 en asta ventral de médula espinal de rata



Imágenes representativas del marcaje doble con peroxidasa de rábano y partículas de oro. Las flechas apuntan a las partículas de oro de 10 nm (correspondientes a GlyT2). Barra de escala 200 nm.

En consonancia con estos resultados, los experimentos realizados empleando preparaciones de sinaptosomas también indicaron que las partículas de oro se localizaban dentro de la estructura y en zonas próximas a la membrana sináptica (Figura 3). Aunque los niveles de marcaje fueron relativamente bajos, los ensayos con sinaptosomas, al contrario que los realizados con tejido, permitieron estimar la distribución subcelular de GlyT2. Alrededor del 65-70% de las partículas de oro se detectaron dentro de los sinaptosomas, mientras que en torno al 30-35% se asoció con estructuras de membrana plasmática (n=100).

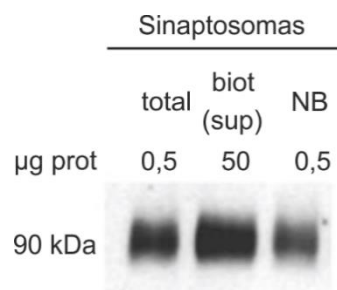
Figura 3 Inmunomarcaje de GlyT2 en sinaptosomas aislados de tejido de tallo cerebral de rata



Imágenes representativas del inmunomarcaje con oro coloidal. Las flechas apuntan a las partículas de oro de 5 nm (correspondientes a GlyT2). Barra de escala 200 nm.

Para confirmar estos datos, se llevaron a cabo estudios de biotilación utilizando sinaptosomas purificados y marcaje con NHS-SS-biotina. La mayoría de GlyT2 resultó no marcado, apuntando a cifras entorno al 5-10% del total accesible en la superficie de la membrana (Figura 4).

Figura 4 Inmunodetección de sinaptosomas purificados sometidos a biotilación previa



Procesamiento de las muestras: biotilación de la superficie de los sinaptosomas, lisado, separación con estreptavidina-agarosa e inmunodetección mediante el anticuerpo anti-GlyT2. Biot: biotilado; sup: superficie; NB: no biotilado

En resumen, aunque la eficiencia de los experimentos de biotilación puede contribuir a sobreestimar la cantidad de GlyT2 presente en el interior de la célula, parece ser que existe una fracción importante de GlyT2 intracelular en el tejido cerebral. Por lo tanto, el siguiente paso fue investigar la distribución exacta del receptor en los diferentes compartimentos intracelulares de las neuronas presinápticas.

4.1.3 Caracterización de las vesículas de tráfico intracelular que contienen GlyT2 en terminales nerviosas

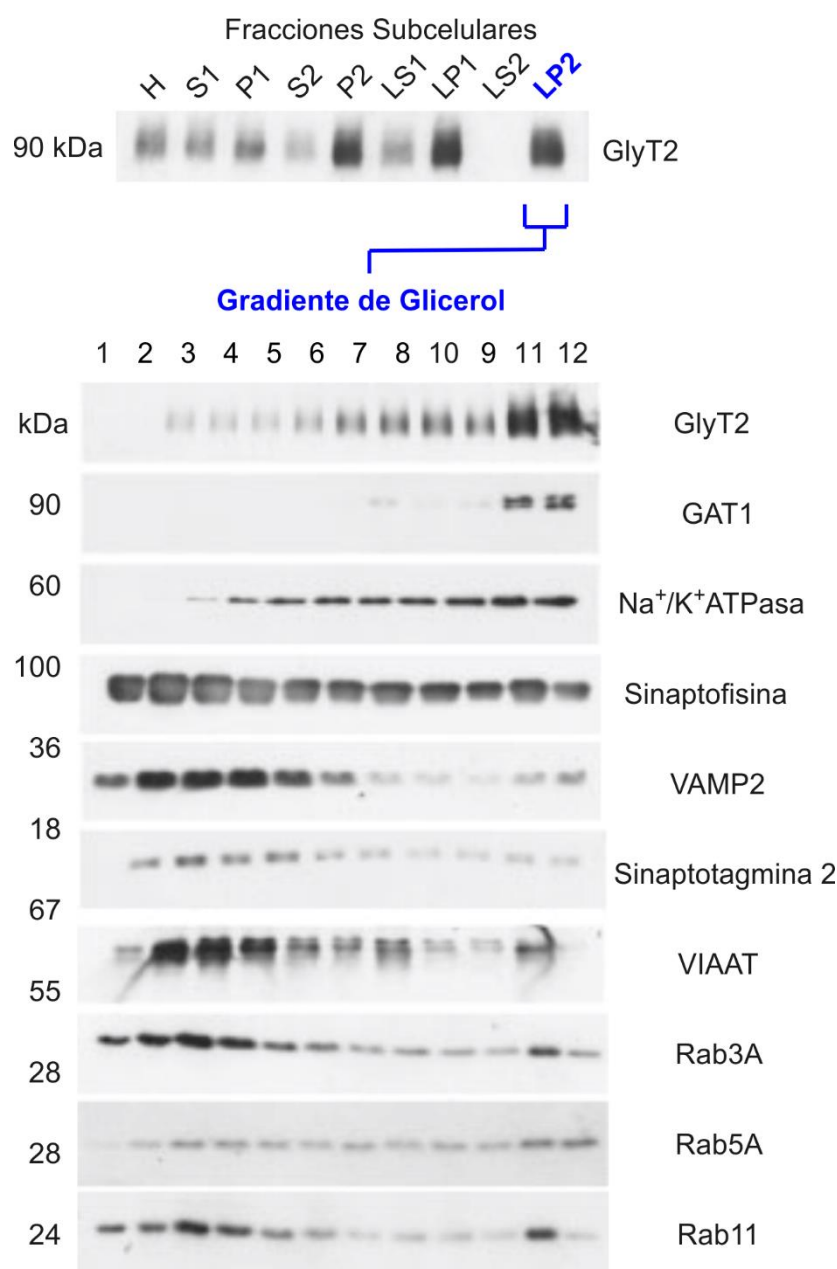
La localización intracelular de GlyT2 en vesículas grandes y endosomas se demostró hace más de una década en experimentos con líneas celulares derivadas de médula suprarrenal de rata en cultivo (PC12) (Geerlings y col. 2002). Sin embargo, la localización del receptor en el tejido nervioso no se había caracterizado hasta el momento y, con este objetivo, se plantearon los siguientes estudios.

Se realizaron experimentos de fraccionamiento de tejido de tallo cerebral por homogeneización y centrifugación diferencial (Huttner y col. 1983) y a continuación se emplearon técnicas de inmunodetección para monitorizar la presencia de GlyT2 en las distintas fracciones subcelulares resultantes del proceso.

En la Figura 5 se puede apreciar que la mayoría del transportador se localiza en la fracción P2, correspondiente a sinaptosomas, y en la fracción LP1 que representa la membrana plasmática de la célula. Además, hay una tercera fracción rica en contenido de GlyT2, la LP2. Con el objetivo de estudiarla con mayor detalle se sometió esta fracción a una centrifugación por gradiente de velocidad con glicerol que permitió separar las membranas de LP2 en función de su tamaño. La muestra resultante se analizó mediante inmunodetección utilizando varias proteínas como marcadores.

- Marcadores de membrana plasmática: GlyT2, GAT1 y Na⁺/K⁺ ATPasa
- Marcadores de vesículas sinápticas: sinaptofisina (SYN), AMP2, sinaptotagmina 2 (STAG2), VIAAT y GTPasas Rab3A, Rab5A y Rab11

Figura 5 Distribución subcelular de GlyT2 en tallo cerebral de rata



(A) Fraccionamiento del tejido de tallo cerebral por centrifugación diferencial y obtención de fracciones (alícuotas de 20 µg) que se detectaron mediante inmunodetección con el anticuerpo anti-GlyT2 (dilución 1/500). H, homogeneizado total; S1, sobrenadante postnuclear; P1, precipitado nuclear; S2, citosol; P2, fracción cruda de sinaptosomas; LS1, sobrenadante de lisado; LP1, precipitado de sinaptosomas lisados; LS2, sobrenadante de vesículas crudas; LP2, precipitado de la fracción LS1. Se muestra un ensayo representativo que se repitió 2 veces más con los mismos resultados. **(B)** Sedimentación por gradiente de velocidad con glicerol de la fracción LP2. Las fracciones del gradiente se recogieron por la parte superior del tubo y se numeraron en orden creciente. Las muestras de cada fracción se sometieron a inmunodetección con anticuerpos primarios frente a las proteínas marcadoras que se indican en la figura: GlyT2, sinaptofisina, VAMP2 y VIAAT (2 µg) o GAT1, Na⁺/K⁺ ATPasa, sinaptotagmina2, Rab3A, Rab5A y Rab11 (8 µg). Se obtuvieron resultados similares en 6 experimentos independientes.

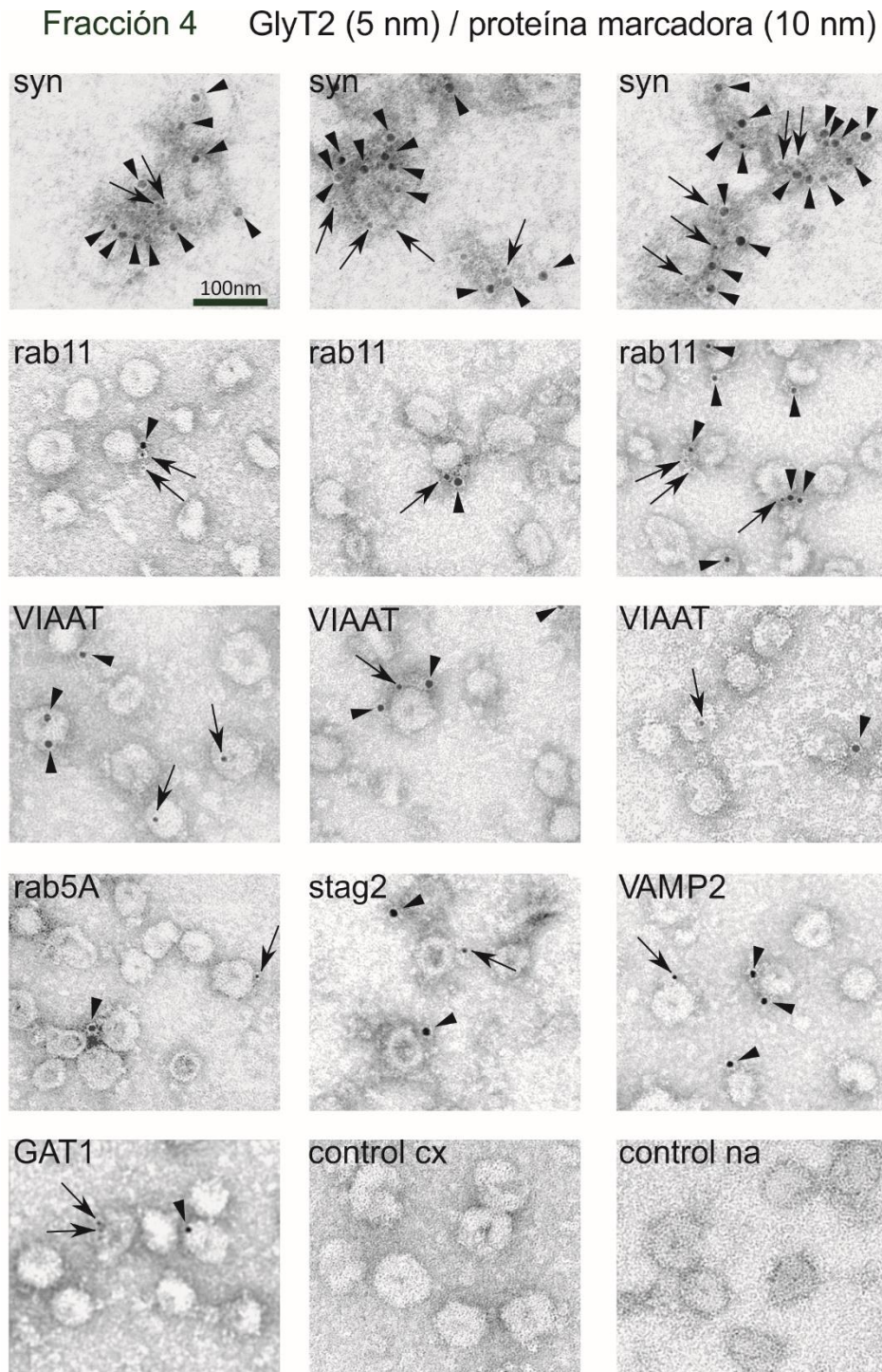
Las fracciones más pesadas eran ricas en transportadores de membrana GlyT2, GAT1 y Na⁺/K⁺ ATPasa, mientras que las fracciones correspondientes a las vesículas sinápticas, las más ligeras, contenían marcadores típicos de estas estructuras como sinaptofisina, AMP2, sinaptotagmina 2, VIAAT y Rab3A (Figura 5B). Sin embargo, también se observó cierto solapamiento entre ambos grupos para algunas proteínas. Las pequeñas moléculas GTPasas rab3A, rab5A y rab11 mostraron una distribución más amplia, lo que sugiere su presencia en vesículas de varios tamaños diferentes además estar en su forma soluble unida a GDP.

Como se aprecia en la imagen obtenida por inmunodetección de la Figura 5B, la mayor proporción de GlyT2 apareció en las fracciones más pesadas de LP2, la 11 y la 12, que incluyen principalmente proteínas de membrana plasmática y, en menor proporción, proteínas de vesículas sinápticas. Como se ha descrito en estudios previos (Morciano y col. 2005), este pico contiene vesículas remanentes asociadas a la membrana plasmática, sinaptosomas incompletos o vesículas acopladas a los sitios de liberación presináptica, sugiriéndose que una gran proporción de GlyT2 del tallo cerebral se localiza bajo la membrana, en zonas conectadas con la superficie. Además, el gradiente de glicerol permitió detectar también una banda tenue inmunorreactiva a GlyT2 en las fracciones que contienen la mayor parte de las vesículas sinápticas (fracciones 3-5) y, por otro lado, apareció otro pico pequeño pero reproducible de GlyT2 en las fracciones 8 y 9, lo que indica que GlyT2 también se localiza en las pequeñas vesículas contenidas en estas fracciones.

Colocalización de GlyT2 y proteínas específicas de vesículas mediante experimentos de microscopía electrónica con doble marcaje

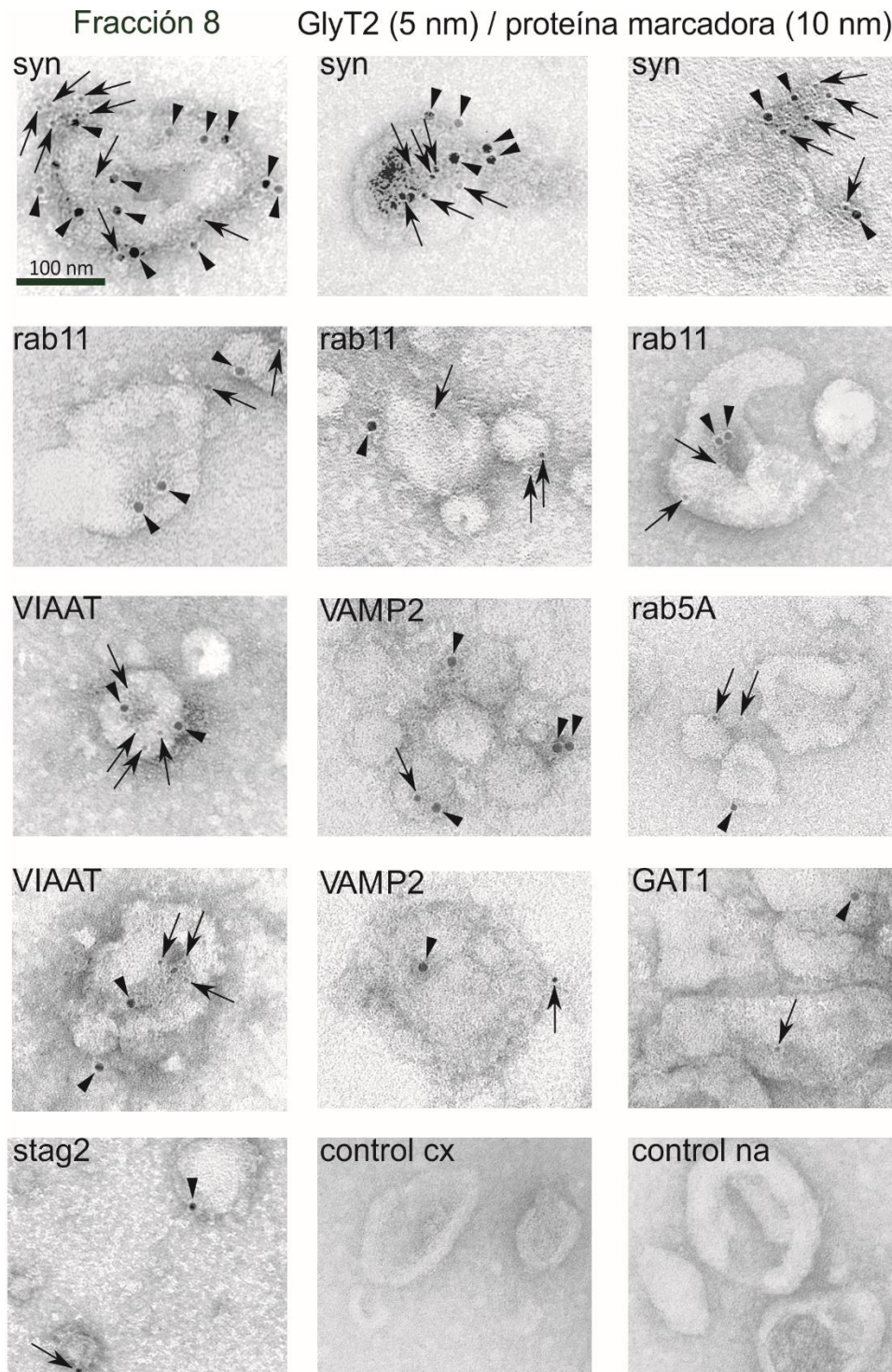
Para caracterizar las vesículas donde está contenido el transportador GlyT2 en el tejido de tallo cerebral, se centró la atención en el estudio de las fracciones 4 y 8 aisladas del gradiente de glicerol, que corresponden con vesículas sinápticas (vesículas más pequeñas) y componentes vesiculares (vesículas más grandes) ricos en GlyT2. Se plantearon estudios de microscopía electrónica tras inmunomarcaje con oro con anticuerpos frente a GlyT2 y proteínas consideradas marcadores. En la Figura 6 y en la Figura 7 se muestran algunas imágenes representativas de estos experimentos.

Figura 6. Micrografías electrónicas de la fracción 4 (vesículas pequeñas) con doble inmunomarcaje con oro



La fracción 4 aislada mediante gradiente de glicerol se sometió a doble marcaje: GlyT2 con partículas de oro coloidal (flechas, partículas de oro de 5 nm) y la proteína marcadora que se indica en la figura en cada caso (puntas de flecha, partículas de oro de 10 nm). Se muestran imágenes representativas. Barra de escala 100 nm. Syn, sinaptofisina; stag2, sinaptotagmina2; control cx, fracción 4 de muestra de córtex de rata (área no glicinérgica); control na, sin incubación con anticuerpo primario.

Figura 7. Micrografías electrónicas de la fracción 8 (vesículas grandes) con doble inmunomarcaje con oro



La fracción 8 aislada mediante gradiente de glicerol sometió a doble marcaje: GlyT2 con partículas de oro coloidal (flechas, partículas de oro de 5 nm) y la proteína marcadora que se indica en la figura en cada caso (puntas de flecha, partículas de oro de 10 nm). Se muestran imágenes representativas. Barra de escala 100 nm. Syn, sinaptofisina; stag2, sinaptotagmina2; control cx, fracción 8 de muestra de córtex de rata (área no glicinérgica); control na, sin incubación con anticuerpo primario.

Según las condiciones de experimentación empleadas, las partículas de oro se asociaron siempre a componentes de membrana porque se utilizaron concentraciones de anticuerpo insuficientes para permitir que aparecieran partículas de oro libre en la preparación.

Como condición control, se utilizaron fracciones derivadas de muestras de corteza cerebral de rata, una zona desprovista de GlyT2 y se comprobó que, en esta muestra, el anticuerpo frente al transportador fue incapaz de marcar ninguna estructura obtenida de las fracciones del gradiente de glicerol.

En las fracciones 4 y 8 procedentes de tallo cerebral se analizó cuantitativamente el marcaje simple o doble y el resultado se muestra en la Tabla 1. Como era de esperar, la fracción 4 contenía más vesículas por unidad de área, ya que contenía vesículas más pequeñas que la fracción 8.

Tabla 1 Distribución relativa de GlyT2 y proteínas marcadoras mediante inmunomarcaje con oro coloidal

	Fracción 4		Fracción 8	
	Vesículas con marcaje simple por 10 μm^2	% del total de vesículas*	Vesículas con marcaje simple por 10 μm^2	% del total de vesículas*
<i>Marcaje simple</i>				
GlyT2	46 \pm 21	6,2 \pm 2,8	78 \pm 12	30 \pm 4,6
Sinaptofisina	760 \pm 85	100 \pm 11,3	257 \pm 26	99 \pm 9,9
VIAAT	87 \pm 39	11,5 \pm 5,2	60 \pm 10	23 \pm 3,8
Rab11	94 \pm 43	12,4 \pm 4,8	73 \pm 22	28 \pm 8,6
<i>Marcaje doble</i>				
GlyT2/sinaptofisina	41 \pm 3	89 \pm 7,2	73 \pm 8	94 \pm 10,8
GlyT2/VIAAT	4 \pm 1	8,7 \pm 3,0	52 \pm 6	67 \pm 7,5
GlyT2/Rab11	21 \pm 2	45 \pm 5,0	52 \pm 7	67 \pm 8,9

*Número de vesículas por 10 μm^2 , 760 \pm 50 (fracción 4) y 260 \pm 22 (fracción 8)

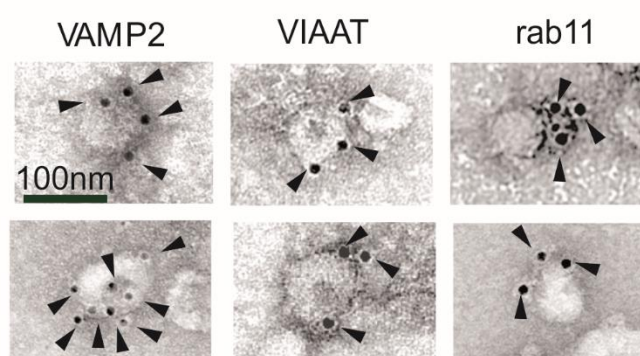
Las fracciones 4 y 8 obtenidas del gradiente de glicerol se sometieron a marcaje con oro y se visualizaron por microscopía electrónica. Se cuantificaron entre 150 y 450 vesículas en cada determinación (3-5 experimentos independientes; elección de 10 áreas diferentes al azar). Los resultados se muestran como promedios \pm error estándar de la media (SEM).

En consonancia con la distribución de GlyT2 en el gradiente de glicerol, el número de vesículas con marcaje simple con anticuerpo anti-GlyT2 fue mayor en la fracción 8 que en la fracción 4: 78 \pm 12 vs. 46 \pm 21 vesículas por 10 μm^2 . Por el contrario, la fracción 4 contenía más vesículas marcadas con sinaptofisina, VAMP2, VIAAT y Rab11, aproximadamente el doble que la fracción 8 (ver Tabla 1). Las diferencias cuantitativas detectadas entre ambas fracciones en estos experimentos de microscopía electrónica fueron menores que las registradas en ensayos de

inmunodetección mostradas previamente (Figura 5), lo que puede deberse a una menor sensibilidad de la técnica de microscopía electrónica respecto a la de inmunodetección. Esto podría deberse a una subestimación de las proteínas que se presentan en múltiples copias por vesícula debido a interferencias en la penetración del oro. Apoyando este argumento, la fracción 4 contenía vesículas donde la proteína marcadora estaba presente en bajos niveles, pero también otras donde el marcador era muy abundante (Figura 6 y Figura 8).

Figura 8. Micrografías electrónicas de vesículas pequeñas inmunomarcadas con oro que contienen múltiples copias de las proteínas marcadoras indicadas

Fracción 4 GlyT2 (5 nm) / proteína marcadora (10nm)



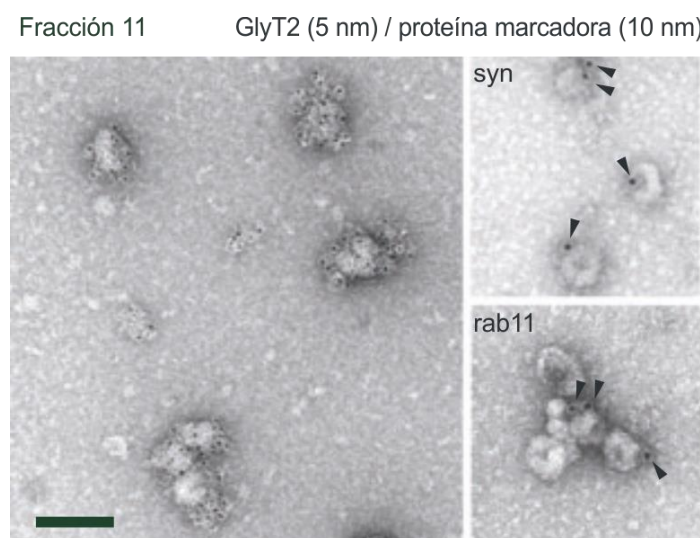
La fracción 4 purificada mediante gradiente de glicerol se sometió a doble marcaje con oro para proteínas marcadoras (partículas de oro de 10 nm) y para GlyT2 (partículas de oro de 5 nm). Las imágenes muestran las vesículas que contienen múltiples copias de las proteínas indicadas (puntas de flecha).

En cuanto a los resultados de doble marcaje para GlyT2 y proteínas marcadoras, se demostró que las vesículas que contenían el transportador GlyT2 estaban mayoritariamente asociadas con la proteína vesicular sinaptofisina, tanto en la fracción 4 como en la fracción 8: el 89% y el 94% de las vesículas marcadas con GlyT2 presentaban además marcaje con sinaptofisina, respectivamente. Además, una porción significativa de las vesículas que contenían GlyT2 también presentaban la GTPasa Rab11, característica de los endosomas de reciclaje: el 45% en la fracción 4 y el 67% en la fracción 8 (ver Tabla 1). Por otro lado, aunque GlyT2 y VIAAT se localizaron en vesículas separadas en la fracción 4 (solo 8,4% de colocalización), en el caso de la fracción 8 se detectó una colocalización de ambas proteínas del 67%.

Se realizaron experimentos similares de doble marcaje utilizando las fracciones 11 y 12 del gradiente de glicerol, las cuales incluyen principalmente proteínas localizadas en la membrana plasmática. Tal y como se aprecia en la Figura 9, la mayoría de las estructuras que contenían GlyT2, donde además el transportador era abundante, prácticamente carecían de sinaptofisina (niveles por debajo del 7%) y Rab11 (niveles menores del 10%), lo que descartó que la

colocalización de GlyT2 y estos marcadores en las estructuras vesiculares presentes en las fracciones 4 y 8 fuera debida al azar.

Figura 9. Micrografías electrónicas de la fracción 11 (membrana plasmática)



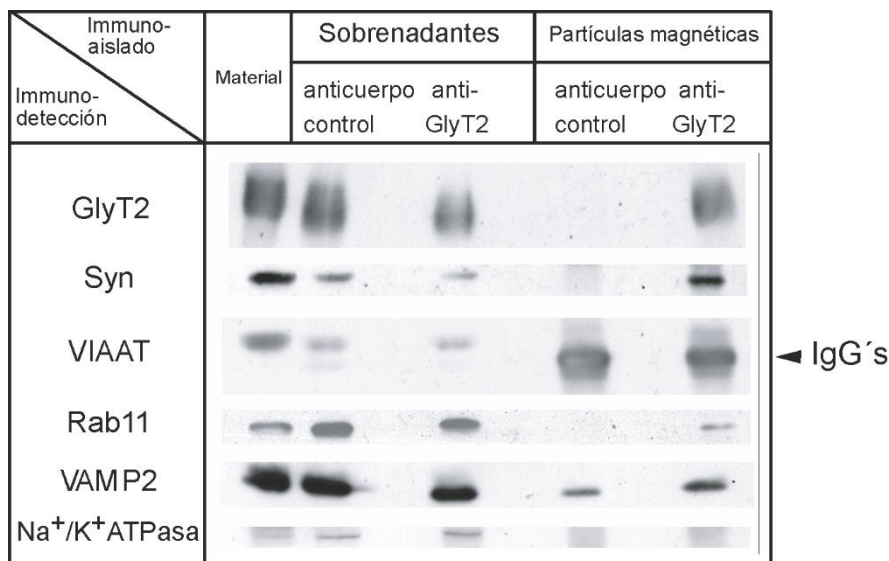
Doble inmunomarcaje con oro de la fracción 11 purificada con gradiente de glicerol. Se muestran imágenes representativas. *syn*: sinaptofisina

El resto de proteínas marcadoras empleadas en los experimentos, como Rab5A, VAMP2, sinaptotagmina2 o GAT1 no mostraron colocalización con GlyT2 en las fracciones 4 y 8 (Figura 6 y Figura 7).

Colocalización de GlyT2 y proteínas específicas de vesículas mediante inmunoadsorción con partículas magnéticas revestidas de proteína A

Con el fin de verificar si la fracción de GlyT2 presente en las vesículas se asociaba a las proteínas indicadas previamente, se sometió la fracción LP2 de tallo cerebral a técnicas de inmunoadsorción empleando el nuevo anticuerpo anti-GlyT2 unido previamente a partículas magnéticas revestidas de proteína A. Tanto las proteínas unidas a las partículas magnéticas como aquellas no unidas que se mantuvieron en el sobrenadante, fueron sometidas a inmunodetección. El $75 \pm 8\%$ de GlyT2 se recuperó unido al anticuerpo en la fracción unida a las partículas magnéticas (Figura 10). Por otro lado, se confirmó la especificidad del anticuerpo ya que no se detectó unión a GlyT2 en partículas magnéticas revestidas de un anticuerpo control.

Figura 10. Colocalización de GlyT2 y proteínas asociadas a vesículas mediante inmunoaislamiento e inmunodetección



Inmunoaislamiento de vesículas LP2 que contienen GlyT2 con el anticuerpo anti-GlyT2 unido a partículas magnéticas revestidas de proteína A. Se utilizó un anticuerpo control irrelevante unido a las partículas como control negativo. Las fracciones unidas a las partículas magnéticas (inmunoaislado) o no unidas (sobrenadante) se analizaron mediante inmunodetección utilizando anticuerpos frente a las proteínas que se indican en la figura (20 µg). Se muestra un resultado representativo de los 4 experimentos que se llevaron a cabo que produjeron resultados idénticos. Syn: sinaptofisina: IgG's: inmunoglobulinas G

Las proteínas marcadoras de estructuras vesiculares Rab11, sinaptofisina y VIAAT fueron inmunodetectadas en las fracciones unidas al anticuerpo anti-GlyT2 pero no al anticuerpo control, lo que apoya su asociación con las vesículas de GlyT2. Por el contrario, la Na⁺/K⁺ ATPasa no se pudo en general detectar asociada a ninguna de las partículas recubiertas de anticuerpo.

Por otro lado, aunque los resultados no se muestran en esta tesis, tampoco se detectó inmunorreactividad de otras proteínas como GAT1, Rab5A y VAMP2 empleando el anticuerpo anti-GlyT2.

Los resultados expuestos se consiguieron mediante condiciones de experimentación en ausencia de detergente, lo que sugiere que el anticuerpo anti-GlyT2 es capaz de aislar vesículas que contienen GlyT2. Para confirmar que el inmunoaislamiento realmente aísla vesículas, se realizó el ensayo en presencia de Triton X-100 al 1% que puede solubilizarlas (Geerlings y col. 2002). Como es esperable, en este caso un 78 ± 7% de GlyT2 permanecía unido a la fracción obtenida con el anticuerpo anti-GlyT2 pero la inmunorreactividad detectada para las proteínas marcadoras fue prácticamente residual. En definitiva, el ensayo de inmunoaislamiento con un

anticuerpo específico de GlyT2 recupera el $70 \pm 10\%$, $19 \pm 4\%$ y $25 \pm 6\%$ del input inicial de sinaptofisina, VIAAT y Rab11, respectivamente (n=4).

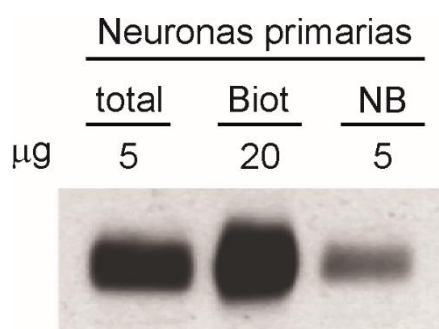
Estos datos, junto a los experimentos de microscopía electrónica con oro, apuntan a que los tres marcadores sinaptofisina, VIAAT y Rab11 están presentes en las vesículas que contienen GlyT2.

Colocalización de GlyT2 y proteínas específicas de vesículas en células completas mediante microscopía confocal

La distribución de GlyT2 y de las proteínas asociadas a vesículas se estudió en neuronas primarias de tallo cerebral mediante técnicas de inmunofluorescencia y microscopía confocal.

Al contrario que en los experimentos con sinaptosomas, en los que se demostró previamente que la mayoría de GlyT2 es resistente a la biotilación en la superficie de la membrana, en neuronas a 15 DIV (días *In Vitro*) se apreció que alrededor del 60% del total de GlyT2 se localizaba en la membrana plasmática y solo el 30% es intracelular (Figura 11).

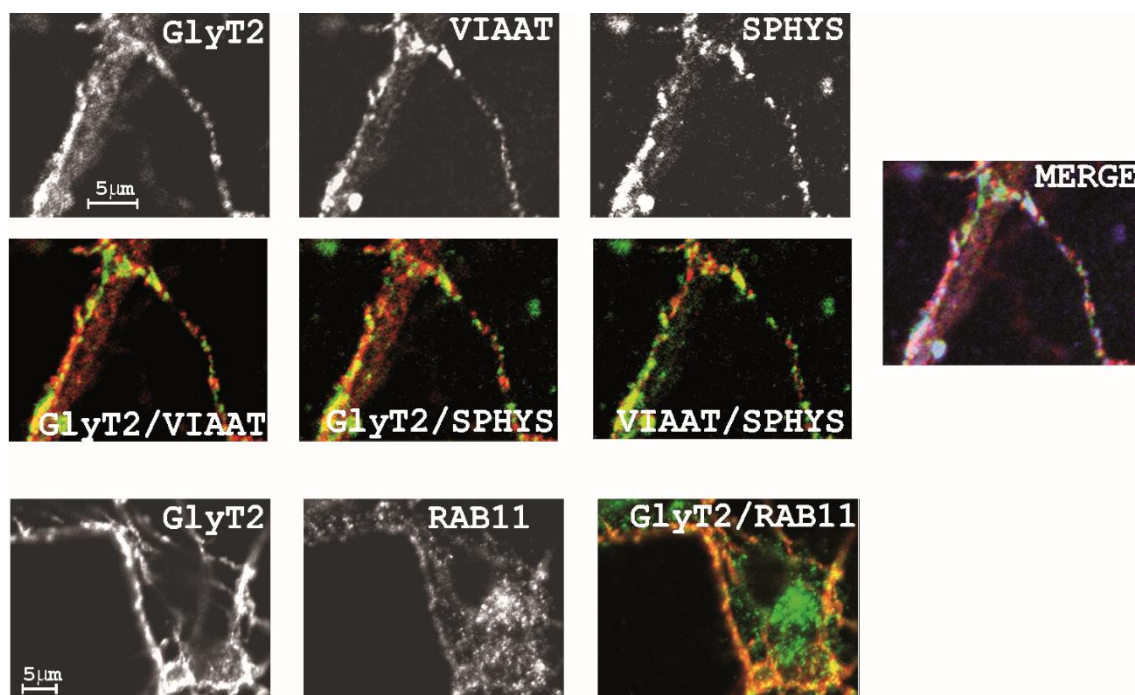
Figura 11. Expresión de GlyT2 en superficie de neuronas primarias de tallo cerebral



Tras 15 días en cultivo, las neuronas primarias de tallo cerebral se marcaron con NHS-SS-biotina, se lisaron y las proteínas de membrana se recuperaron mediante la incubación de las fracciones con una matriz de estreptavidina-agarosa. Posteriormente se analizaron por inmunodetección con el anticuerpo anti-GlyT2. En cada línea del gel SDS-PAGE se aplicó la cantidad de proteínas que se indica en la figura. Biot: biotilado; NB: no biotilado

Debido a la mayor presencia de GlyT2 en la membrana plasmática, en las imágenes de microscopía confocal como las que se muestran en la Figura 12, se apreció un patrón de distribución de GlyT2 en la superficie celular. Aun así, se detectó también una colocalización parcial de GlyT2 y las proteínas marcadoras de vesículas sinápticas VIAAT y sinaptofisina especialmente en el área submembranosa.

Figura 12. Colocalización de GlyT2 y proteínas asociadas a vesículas en neuronas de tallo cerebral en cultivo



Los cultivos primarios de neuronas de tallo cerebral crecidas durante 15 días se fijaron y sometieron a múltiples pasos de inmunotinción para determinar la expresión de las proteínas que se indican en la figura. En blanco y negro se muestran las imágenes de canales simples para GlyT2, VIAAT, sinaptofisina (SPHYS) o Rab11. La superposición de las imágenes superiores que se indican de dos en dos se muestra como fluorescencia roja/verde: GlyT2/VIAAT (panel izquierdo); GlyT2/sinaptofisina (panel central), VIAAT/sinaptofisina (panel derecho), GlyT2/Rab11 (panel inferior derecho). En la inmunofluorescencia triple en la fotografía de la derecha, se muestran los 3 canales simultáneamente (GlyT2, rojo; VIAAT, verde; SPHYS, azul). Barra de escala, 5 μ m.

Los patrones de distribución de inmunofluorescencia de las proteínas detectadas se correspondieron bien con la presencia de GlyT2 en estructuras vesiculares, tal y como se ha evidenciado previamente en los experimentos de microscopía electrónica e inmunoaislamiento con anticuerpo anti-GlyT2. Sin embargo, la amplia distribución de Rab11, que probablemente se deba a la presencia de la forma soluble no unida a membrana, no permite llegar a conclusiones definitivas a partir de los datos obtenidos en células.

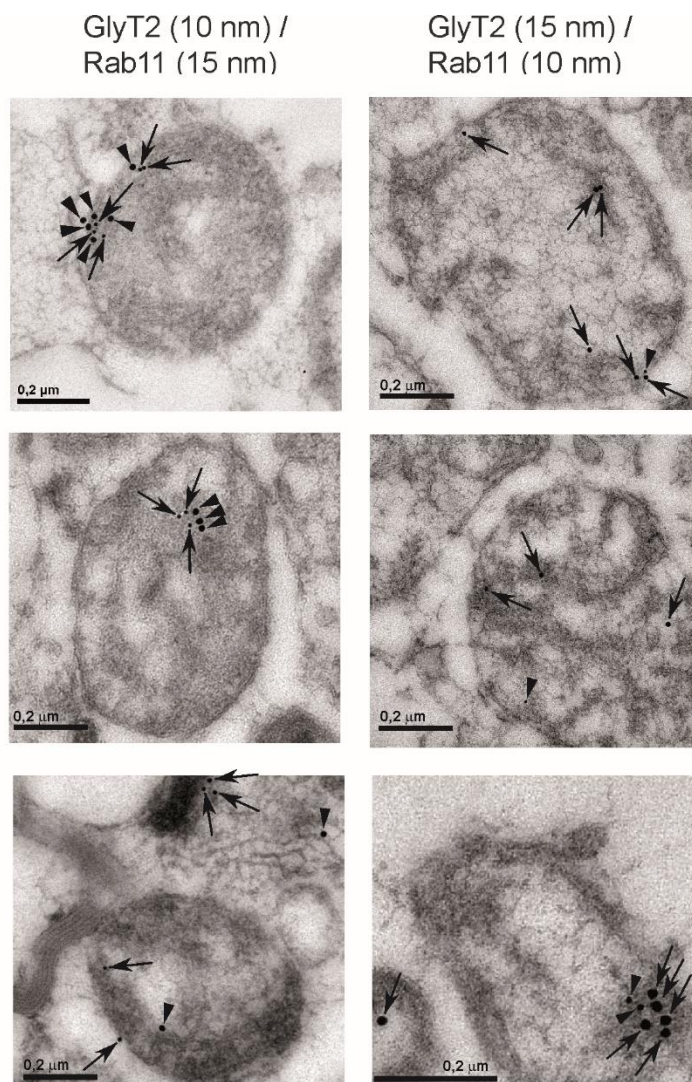
4.1.4 Presencia de GlyT2 en endosomas de reciclaje: relación con la proteína Rab11

Estudio de la colocalización de GlyT2 y Rab11 por microscopía electrónica mediante doble marcaje con oro en tallo cerebral.

Tras los resultados ambiguos de colocalización de GlyT2 y Rab11 mostrados en la Figura 12, se planteó un análisis más exhaustivo donde se trató de localizar ambas proteínas mediante doble inmunomarcaje con oro coloidal en muestras de tejido intacto de tallo cerebral que se visualizaron mediante microscopía electrónica. Sin embargo, puesto que no se consiguieron niveles significativos de marcaje utilizando este método, se decidió probar con preparaciones de sinaptosomas de tallo cerebral obtenidas de muestras fijadas y sometidas a post-inclusión en resina (*post embedding*).

En la Figura 13 se muestran las imágenes de microscopía electrónica obtenidas donde se aprecia un marcaje tenue pero específico de GlyT2 y Rab11 localizados simultáneamente en la mayoría de las estructuras.

Figura 13. Colocalización de GlyT2 y Rab11 mediante doble inmunomarcaje con oro en sinaptosomas de tallo cerebral



Doble inmunomarcaje con oro en muestras de sinaptosomas de tallo cerebral de rata para detectar GlyT2 y Rab11. En cada columna se indican las proteínas asociadas a las partículas de oro. Las flechas marcan la localización del marcaje de GlyT2, mientras que las puntas de flecha indican el marcaje de Rab11. Se muestran imágenes representativas de estos experimentos. Barra de escala, 200 nm.

El bajo nivel de marcaje detectado puede ser debido a las limitaciones de la técnica, principalmente a las dificultades de acceso de los anticuerpos a sus epítomos, la posible pérdida de antigenicidad en el proceso de fijación de la muestra o la reducida penetración de las partículas de oro. Se probó el marcaje secuencial utilizando el anticuerpo anti-GlyT2 en primer lugar y a continuación el anticuerpo anti-Rab11, o bien al contrario, pero no se apreciaron diferencias en los resultados.

Aunque el nivel de resolución de la técnica no permite precisar si GlyT2 y Rab11 comparten la misma vesícula, sí se puede afirmar que ambas proteínas están muy próximas físicamente, lo que podría ser compatible con su presencia en un compartimento endosomal común, según lo que se observa en muchas de las imágenes de microscopía electrónica, donde alrededor del 75% de los sinaptosomas contienen ambas proteínas y en proximidad (n=100).

Estudio del papel de Rab11 en el tráfico de GlyT2 mediante experimentos con mutantes dominantes negativos de GTPasas Rab

Con el fin de caracterizar mejor la asociación específica de GlyT2 con el marcador de endosomas de reciclaje Rab11 y entender mejor el contexto biológico de ésta, se llevaron a cabo diferentes ensayos experimentales donde se emplearon mutantes dominantes negativos (dn) para tres GTPasas pequeñas Rab:

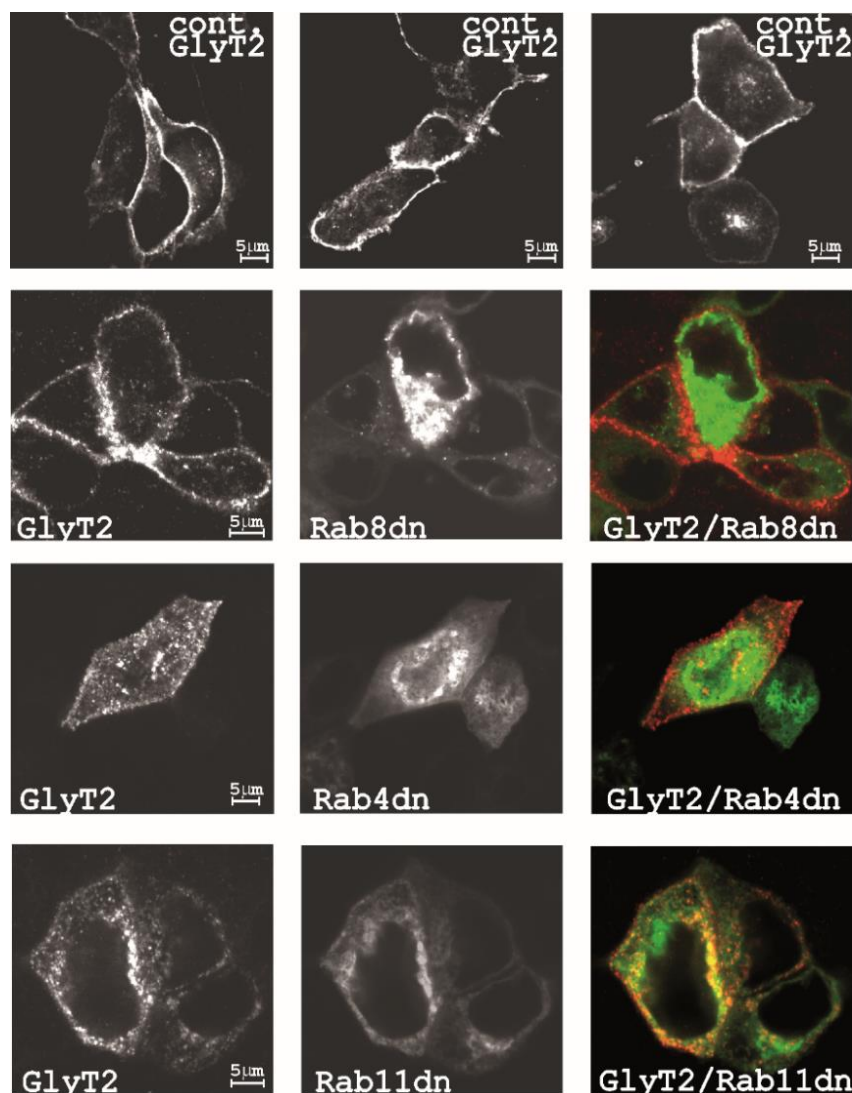
- Rab4, que interviene en el proceso de reciclaje rápido de proteínas endocitadas hacia la membrana plasmática directamente desde los endosomas tempranos (*"short loop" recycling*) (Jones y col. 2006)
- Rab11, involucrada en un proceso de reciclaje a la membrana más lento a través de endosomas específicos de reciclaje (*"long loop" recycling*) (Jones y col. 2006)
- Rab8, que regula el tráfico post-Golgi en la vía secretora desde el TGN (*trans Golgi network*) hacia la superficie celular (Huber y col. 1993, Zerial y col. 2001).

Los mutantes dn de estas GTPasas Rab se utilizaron con el fin de impedir alguno de los pasos en el tráfico de membrana controlado por la GTPasa Rab cuya actividad se silencia y estudiar así la relevancia de cada una de las proteínas en el proceso mediante inmunocitoquímica de fluorescencia (Zerial y col. 2001).

En los experimentos que se presentan en la Figura 14 y en la Figura 15, se coexpresaron la proteína GlyT2 (marcada con fluorescencia roja) y las proteínas mutadas Rab11dn, Rab4dn o Rab8dn fusionadas con la proteína verde fluorescente (GFP) en células MDCK en cultivo (línea celular de epitelio de riñón canino *Madin-Darby*). Como se aprecia en la Figura 14, las células que expresan Rab11dn presentaron una reducción muy marcada de los niveles de GlyT2 en la superficie, que fue más modesta cuando se eliminó la expresión de Rab4. En el

caso de Rab8, no pareció tener efecto sobre los niveles de GlyT2 en membrana lo que indica que los resultados con las otras dos proteínas no se debían a alteraciones inespecíficas de las proteínas de la familia Rab, sino que existe una regulación específica de las dos vías específicamente controladas por Rab11 y Rab4.

Figura 14. Efecto de los mutantes dominantes negativos Rab4, Rab8 y Rab11 en la distribución subcelular de GlyT2



La forma silvestre de GlyT2 (primera fila, cont. GlyT2) se expresó de forma transitoria en células MDCK o bien se coexpresaron GlyT2 y los mutantes Rabdn que se indican fusionados con la proteína GFP. Se muestran imágenes de microscopía de fluorescencia representativas de estos ensayos. La fluorescencia para cada proteína individual se muestra en blanco en los paneles especificados y la fusión de canales de fluorescencia de GlyT2 (rojo) y el mutante indicado (verde) se muestra como GlyT2/Rabdn en los paneles inferiores de la derecha. Barra de escala, 5 μ m.

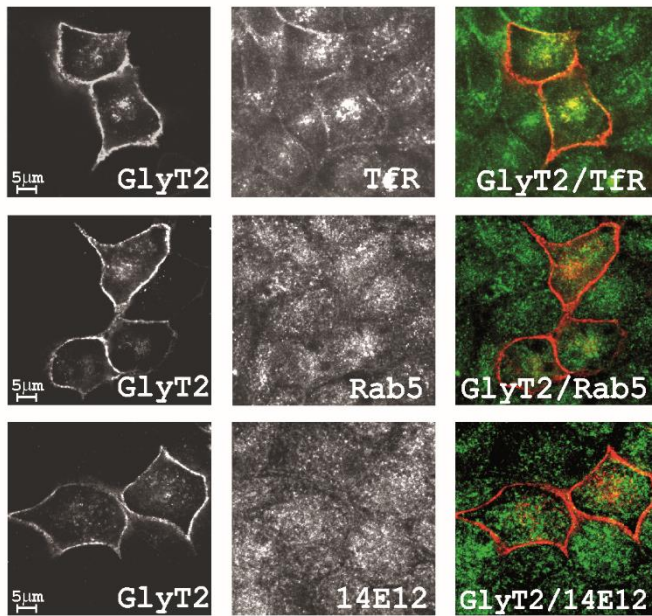
Para confirmar la especificidad del efecto del mutante Rab11dn sobre la distribución de GlyT2 se analizó la distribución de algunos marcadores endógenos en estudios de microscopía confocal.

- Receptor de transferrina (TFR): proteína de la membrana plasmática que retorna rápidamente a la membrana desde los endosomas tempranos controlada por Rab4 y que también puede reciclarse más lentamente desde endosomas perinucleares hacia la membrana plasmática en un proceso mediado por Rab11 (Uzan-Gafsou y col. 2007, Bonecchi y col. 2008, Henry y col. 2008).
- Rab5: marcador de endosoma temprano.
- 14E12: marcador de endosoma tardío/lisosoma.

Como se aprecia en la Figura 15B, en células MDCK transfectadas con mutantes Rab11dn la mayor parte del TFR estaba internalizada, no pudiéndose detectar el receptor en la superficie celular. También se detectó una clara superposición de la inmunofluorescencia correspondiente a TFR y a GlyT2 en el interior de las células. Estos resultados contrastan con la colocalización parcial de ambas proteínas observada en células control, no transfectadas con el mutante Rab11dn, donde GlyT2 está claramente presente en la superficie (Figura 15A).

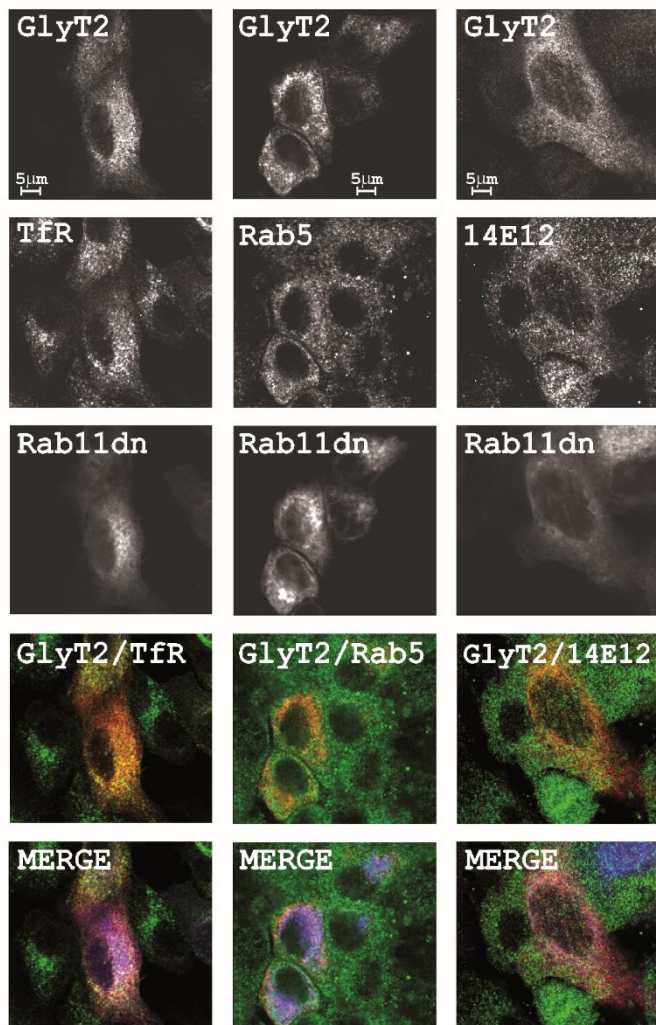
Figura 15. Colocalización intracelular de GlyT2 con el marcador de endosoma de reciclaje Rab11

A



La forma silvestre de GlyT2 se expresó de forma transitoria en células MDCK (A) o bien se coexpresó GlyT2 con los mutantes Rabdn que se indican, fusionados con la proteína GFP (B). Se utilizó marcaje con doble inmunofluorescencia para GlyT2 y las proteínas marcadoras endógenas TfR, Rab5 y 14E12. Se muestran imágenes de microscopía de fluorescencia representativas de estos ensayos. La fluorescencia para cada proteína individual se visualiza en blanco en los paneles especificados y la fusión de fluorescencia de GlyT2 (rojo) y la proteína marcadora indicada (verde) se muestra como GlyT2/marcador (rojo/verde). En la figura B, la superposición de los 3 canales se representa en la fila inferior (GlyT2 rojo, marcador verde, Rabdn azul). Barra de escala, 5 μm.

B

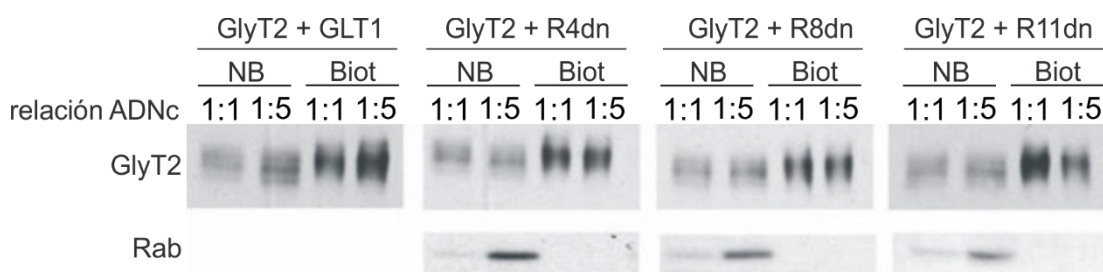


Por otro lado, como se aprecia en las imágenes de microscopía confocal, la presencia o ausencia del mutante Rab11dn no afectó al nivel de superposición de la inmunofluorescencia de GlyT2 y Rab5 o 14E12 (Figura 15).

Estudio del papel de Rab11 en la incorporación de GlyT2 a la membrana mediante experimentos de biotinilación y cinética

Tras determinar la importancia de Rab11 en la presencia de GlyT2 en membrana detectando las proteínas expresadas en células MDCK mediante inmunofluorescencia (Figura 15), se planteó confirmar este efecto sometiendo a estos mutantes a otro tipo de ensayos. El marcaje de superficie con NHS-SS-biotina (biotinilación) permite medir directamente los niveles de la proteína en la superficie. En la Figura 16 se muestra una inmunodetección correspondiente a fracciones de proteína GlyT2 biotinilada (localizada en superficie) y no biotinilada (no accesible) obtenidas de células MDCK que co-expresan los diferentes mutantes de las proteínas Rab estudiadas.

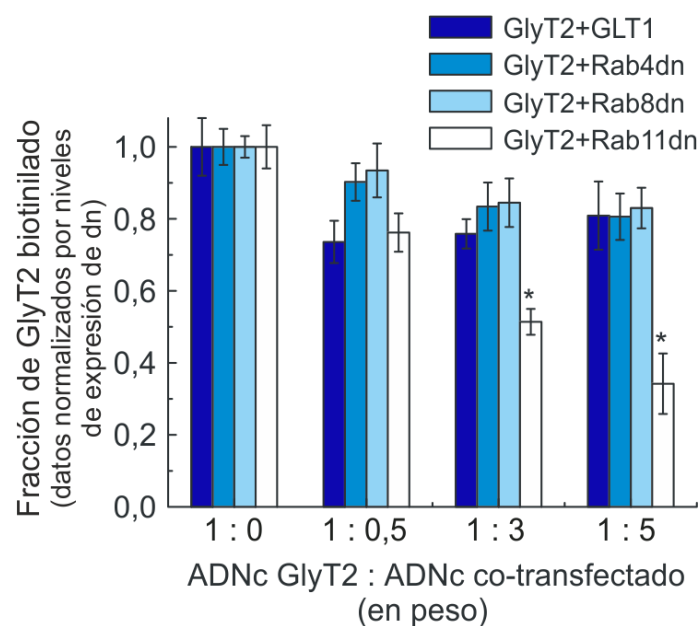
Figura 16. Efecto de los mutantes dominantes negativos de las proteínas Rab en la expresión de GlyT2 en superficie. Experimentos de biotinilación



La forma silvestre de GlyT2 se coexpresó en células MDCK con pEGFP-GLT1 (una proteína irrelevante), pEGFP-Rab4dn, pEGFP-Rab8dn o pEGFP-Rab11dn según la relación de ADN 1:1 y 1:5. Las muestras se sometieron a biotinilación de superficie a 4°C. Se muestra una imagen representativa de la inmunodetección donde se aprecian la fracción no biotinilada (NB, 10 µg de proteína) y la fracción biotinilada (Biot, 25 µg de proteína) de GlyT2, y los niveles alcanzados de sobreexpresión de los Rab.

La cuantificación densitométrica de las bandas de la inmunodetección indicó que la expresión de GlyT2 en la membrana plasmática se redujo significativamente y de forma selectiva en presencia del mutante Rab11dn, mientras que la coexpresión con el mutante Rab4dn disminuyó esta expresión en menor medida (Figura 17).

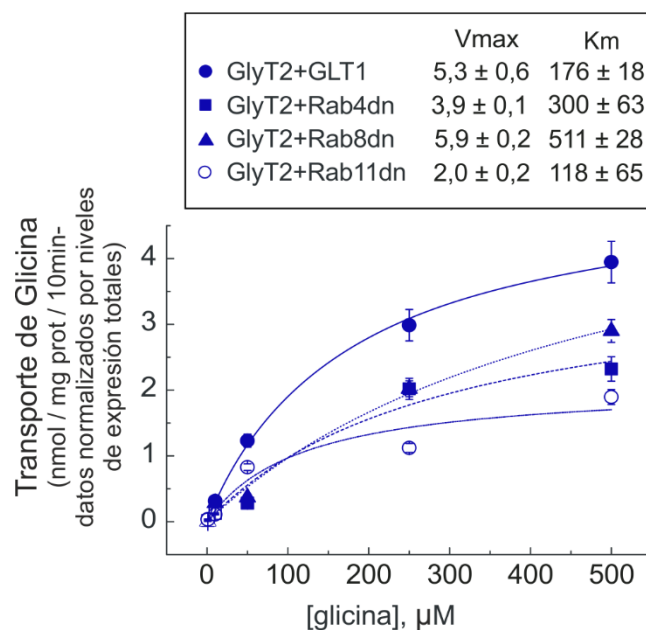
Figura 17. Análisis por densitometría de los niveles de GlyT2 biotinilado en función de la coexpresión con mutantes Rabdn



Análisis por densitometría del promedio de datos obtenidos de 3 experimentos diferentes de inmunodetección realizados en las mismas condiciones que la Figura 16 pero utilizando relaciones crecientes de ADNc cotransfectado de GlyT2 (1:0; 1:0,5; 1:3; 1:5). En el eje de ordenadas, se expresa el nivel de GlyT2 biotinilado como el porcentaje del total dividido por la relación Rabdn/Rab endógeno, medido por densitometría tras la inmunodetección con anticuerpos frente a las proteínas Rab. Las barras representan el error estándar de la media (SEM). El asterisco (*) indica que existen diferencias significativas entre GlyT2 + vector que contiene la proteína irrelevante (GLT1) según el análisis con el test ANOVA y Bonferroni; $p < 0,05$.

Por otro lado, se realizaron estudios cinéticos que permitieron estimar el número de transportadores GlyT2 funcionales en la membrana en presencia de los diferentes mutantes ensayados. Los resultados confirmaron la reducción en los niveles de expresión superficial de GlyT2 en ausencia de Rab11 y, en menor medida, de Rab4 (mutantes Rab11dn y Rab4dn, respectivamente) (Figura 18).

Figura 18. Cinética del transporte de glicina por GlyT2 en presencia de los mutantes dominantes negativos de las proteínas Rab



Cinética del transporte de glicina de células MDCK que coexpresan GlyT2 silvestre junto a cada uno de los diferentes mutantes dominantes negativos: Rab11dn, Rab4dn y Rab8dn o bien a la proteína control irrelevante (GLT1) a la relación de coexpresión de 1:3.

Los valores promedio de la constante K_m de GlyT2 obtenidos de tres experimentos independientes no fueron significativamente diferentes en todas las condiciones experimentales ensayadas (entre 100 y 500 μM). Sin embargo, se observaron variaciones significativas en los valores de V_{max} , en consonancia con los diferentes niveles de expresión de GlyT2 descritos en los experimentos de biotilación. El valor promedio de $V_{\text{máx}}$, expresado como nmol de glicina/mg de proteína/10 min fue de $5,3 \pm 0,6$ en condiciones control (GlyT2 + vector que contenía una proteína irrelevante); $5,9 \pm 0,2$ en presencia de GlyT2 + Rab8dn; $3,9 \pm 0,1$ en el caso de GlyT2 + Rab4dn y, el menor, de $2,0 \pm 0,2$ en presencia de GlyT2 + Rab11dn.

Los resultados obtenidos del análisis cinético confirman que existe una asociación específica entre GlyT2 y las vesículas que contienen Rab11 y sugieren que el transportador internalizado tras su función en la transmisión de la señal presináptica puede volver a la membrana plasmática mediante un mecanismo de reciclaje dependiente de Rab11.

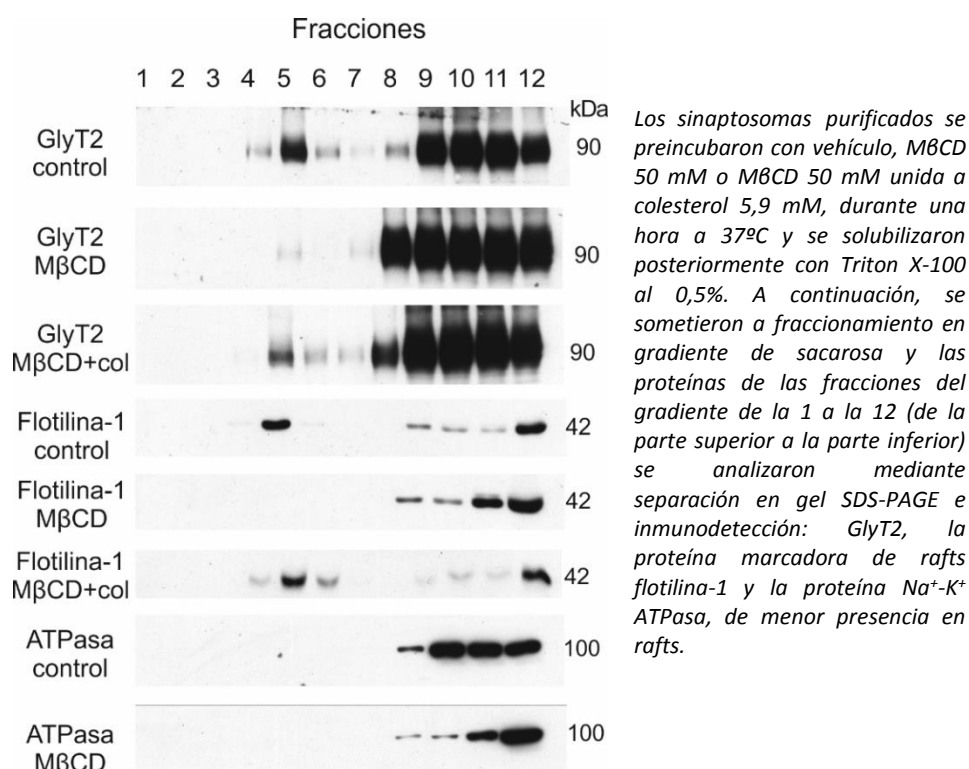
4.2 Localización de GlyT2 en microdominios lipídicos ricos en colesterol o lipid rafts

4.2.1 Distribución de GlyT2 en diferentes fracciones de membrana

Con el objetivo de determinar si GlyT2 se localiza en los *lipid rafts* de la membrana se solubilizaron sinaptosomas de tallo cerebral de rata utilizando el detergente Triton X-100 a 4°C y se fraccionó el material resultante mediante centrifugación en gradiente de densidad de sacarosa y se analizaron las distintas fracciones mediante inmunodetección. Este método separa por flotación los microdominios lipídicos ricos en colesterol y esfingolípidos (*lipid rafts*) más ligeros que el resto de los componentes de la membrana (Fortin y col. 2004).

La inmunorreactividad del transportador GlyT2 presentó una distribución bimodal, apreciándose tanto en las fracciones de baja densidad, correspondientes a los microdominios lipídicos (carriles 4 a 6 de la Figura 19 como en las fracciones de alta densidad (carriles 9 a 12 de la Figura 19).

Figura 19. Localización de GlyT2 en balsas lipídicas o membranas rafts insolubles en Triton X-100

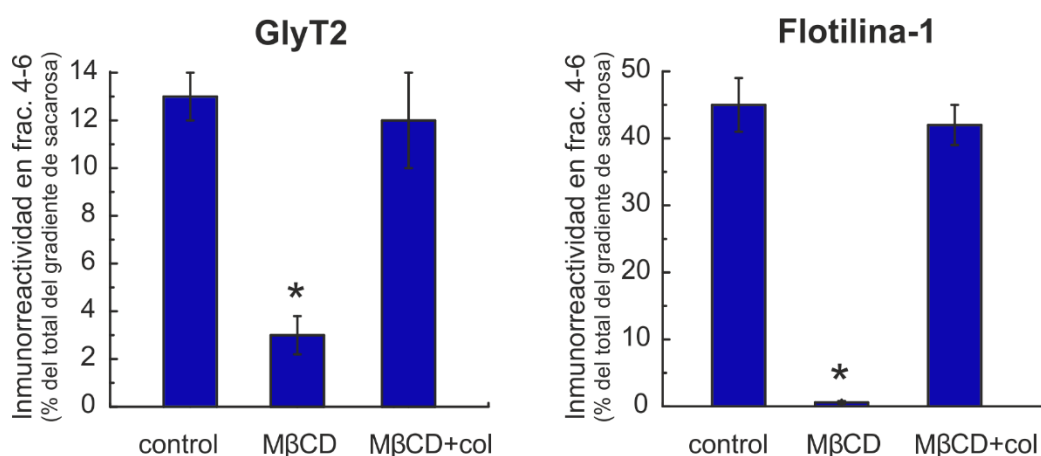


Para complementar el estudio de localización de GlyT2 se analizaron en paralelo dos proteínas, la flotilina-1 (típica de *lipid rafts*) (Bickel y col. 1997) y la bomba Na⁺/K⁺ ATP-asa, localizada en

este gradiente mayoritariamente en las fracciones de mayor densidad de las membranas (Radeva y col. 2005). El estudio se llevó a cabo en presencia de distintos niveles de colesterol utilizando la metil- β -ciclodextrina (M β CD), un hexasacárido cíclico que retira colesterol de las membranas y que permite evaluar el efecto sobre la distribución de las proteínas en el gradiente (Radeva y col. 2005). También se estudió el efecto de la M β CD previamente unida a colesterol, como control negativo ya que el complejo M β CD+colesterol es incapaz de retirar el colesterol de las membranas (Butchbach y col. 2004).

La cuantificación densitométrica de los resultados de la inmunodetección determinó que alrededor del $13 \pm 1\%$ de GlyT2 se localiza en las fracciones de menor densidad (n=5), junto con aproximadamente el $45 \pm 4\%$ de la flotilina-1 total (n=3) (Figura 20).

Figura 20. Cuantificación de la inmunorreactividad de GlyT2 y Flotilina-1 en las fracciones raft (4-6)

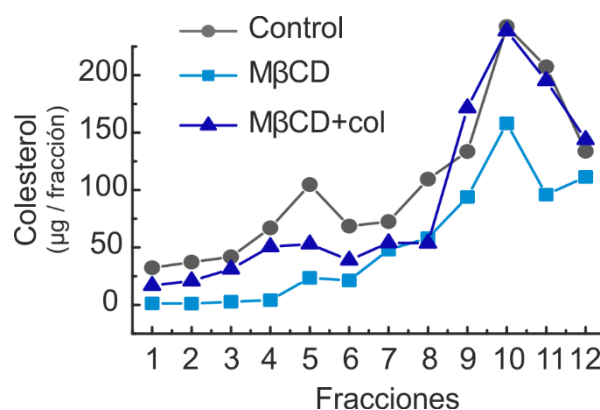


Promedio de inmunorreactividad analizada por densitometría correspondiente a GlyT2 y flotilina-1 en 3 ensayos independientes de inmunodetección (correspondientes a la Figura 19). La inmunorreactividad de cada proteína en las fracciones raft (4-6) se expresó como el porcentaje del total de la inmunorreactividad en el gradiente completo. El asterisco (*) indica que existe diferencia estadísticamente significativa con respecto al control, $p < 0,05$ según el test t de Student.

Por otra parte, la distribución del colesterol en las fracciones de membrana se localizó también en dos picos correspondientes a las fracciones de menor densidad (4-6) y de mayor densidad (9-12). Como era de esperar, la presencia de M β CD provocó la reducción del contenido en colesterol en las fracciones de menor densidad (Figura 21) y, en paralelo, disminuyó también el nivel de las proteínas de estudio en dichas fracciones, hasta valores de $3 \pm 0,8\%$ de GlyT2 y $0,6 \pm 0,2\%$ de flotilina-1 (Figura 20). Por el contrario, cuando se utilizó M β CD + colesterol no se observó esta reducción de los niveles de inmunorreactividad en las fracciones de menor densidad (4-6) ya que no se alteró la distribución de GlyT2, flotilina-1 y colesterol en el gradiente

(Figura 20 y Figura 21). Estos resultados sugieren que GlyT2 se asocia a los microdominios de membrana ricos en colesterol.

Figura 21 Determinación del nivel de colesterol de las fracciones obtenidas del gradiente de sacarosa (1-12)



Preincubación de los sinaptosomas purificados con vehículo, MβCD 50 mM o MβCD 50 mM unida a colesterol 5,9 mM, durante una hora a 37°C y solubilización posterior de las muestras con Triton X-100 al 0,5%. A continuación, se sometieron a fraccionamiento en gradiente de sacarosa y se cuantificó el nivel de colesterol de las fracciones del gradiente de la 1 a la 12 (de la parte superior a la parte inferior).

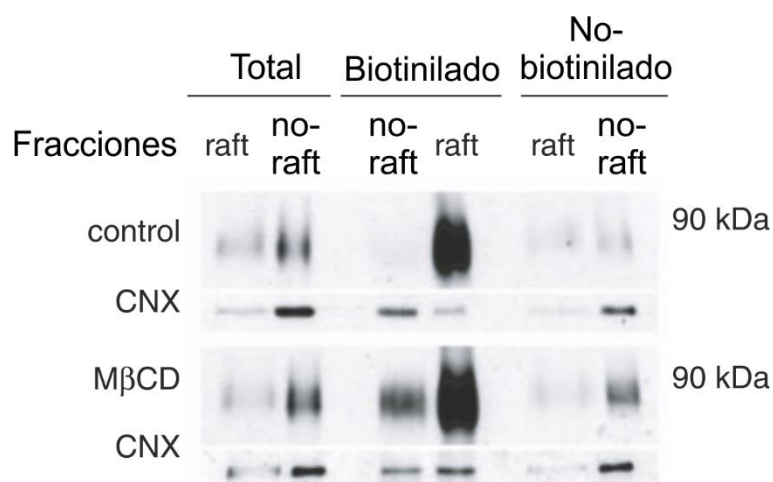
4.2.2 Localización de GlyT2 en la superficie de la membrana plasmática

Con el fin de determinar si la asociación de GlyT2 con los *lipid rafts* puede afectar a la actividad del transportador, se analizó si GlyT2 presente en las fracciones de menor densidad realmente se localizaba en la superficie celular que es el sitio donde el transportador ejerce su función. Para ello se utilizaron ensayos de biotinylación, marcando los sinaptosomas de tallo cerebral de rata antes de la solubilización con Triton X-100. Las diferentes fracciones obtenidas se separaron mediante gradiente de sacarosa y se diferenciaron dos grupos: de la fracción 4 a 6, identificadas como fracciones *rafts*, y de la 9 a la 12, consideradas como fracciones *no-rafts*. Posteriormente, las proteínas biotinyladas se recuperaron de cada grupo de fracciones mediante la incubación con una matriz de estreptavidina-agarosa y se analizaron por inmunodetección. También se analizaron las alícuotas de proteína total y proteína no unida a biotina (proteínas intracelulares).

Los ensayos de inmunodetección utilizando el anticuerpo frente a GlyT2 determinaron que, aunque la mayor parte de GlyT2 se encuentra en las fracciones *no-rafts*, la proteína GlyT2

localizada en la superficie de la membrana y por tanto marcada con biotina, se asocia a las fracciones *rafts* (Figura 22).

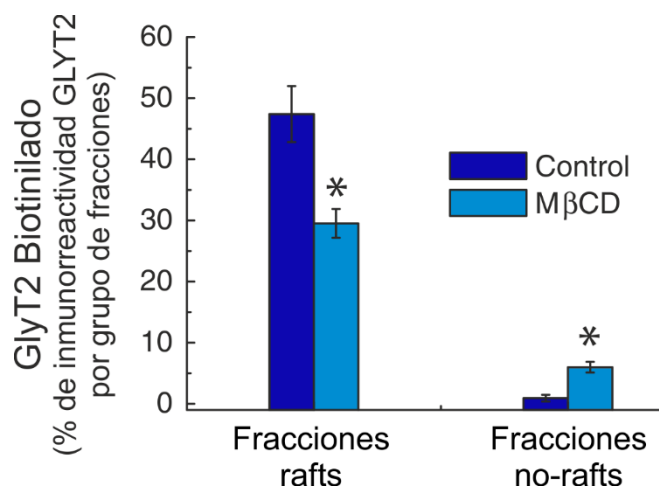
Figura 22. Efecto de M β CD sobre el transportador GlyT2 accesible en la superficie de las membranas *rafts*



Las membranas *rafts* se aislaron de sinaptosomas marcados con NHS-SS-biotina tras el tratamiento con vehículo (control) o M β CD 50 mM durante una hora a 37°C y posteriormente solubilizados con Triton X-100 al 0,5%. A continuación, se sometieron a fraccionamiento en gradiente de sacarosa y las fracciones 4-6 y 9-12 obtenidas se separaron y se identificaron como las fracciones *raft* y *no-raft*, respectivamente. Las proteínas de las fracciones *raft* y *no raft* se solubilizaron separadamente con RIPA y se reservó una alícuota con la que se calculó la cantidad de proteína total. Las proteínas totales, biotiniladas y no biotiniladas (0,5, 10 y 0,5 μ g, respectivamente) se analizaron mediante inmunodetección con el anticuerpo anti-GlyT2. Se utilizó como control la inmunorreactividad a calnexina (CNX).

La cuantificación por densitometría de la inmunorreactividad indicó que alrededor del 50% del contenido de GlyT2 en las fracciones *rafts* está biotinilado ($47 \pm 5\%$, n=5), mientras que solo un 1% de la porción de GlyT2 que permanece en las fracciones *no-rafts* se encuentra en la superficie celular y aparece marcado con biotina ($0,9 \pm 0,5\%$, n=5) (Figura 23). Esto sugiere que el transportador GlyT2 asociado a los *lipid rafts* está principalmente localizado en la superficie celular.

Figura 23. Cuantificación de la inmunorreactividad de las muestras analizadas en la Figura 22 por densitometría

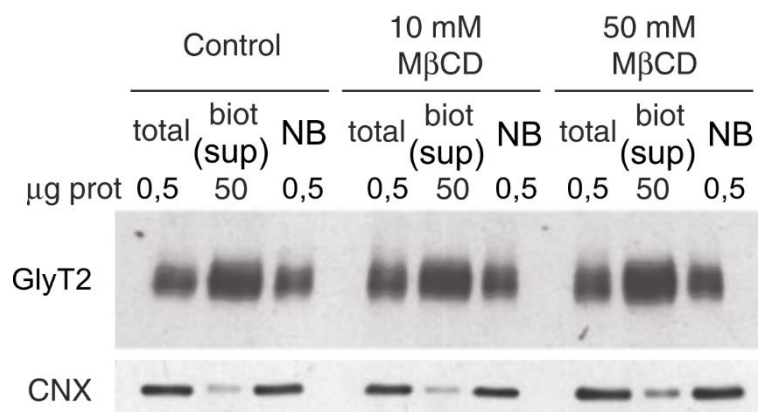


Promedio de 3-5 experimentos independientes. La cantidad de GlyT2 biotinilado en las fracciones raft y no-raft se normalizó según la señal de calnexina y se expresó como el porcentaje de inmunorreactividad a GlyT2 en las fracciones raft y no-raft correspondientes. El asterisco (*) indica que existe diferencia estadísticamente significativa con respecto al control, $p < 0,05$ según el test t de Student.

Posteriormente se estudió el efecto del tratamiento con MβCD que retira colesterol de la membrana y que redujo aproximadamente en el 20% la cantidad relativa de GlyT2 biotinilado en las fracciones raft (4-6) acompañado de un incremento del 5% en la porción biotinilada de las fracciones no-rafts (9-12) (Figura 22 y Figura 23). Estos resultados sugieren que la MβCD induce un desplazamiento lateral en el plano de la membrana del 3-4% de la porción de GlyT2 localizada en la superficie celular.

Para descartar que el efecto de desplazamiento de GlyT2 en la membrana por acción de la MβCD fuera debido a la internalización del transportador, se realizaron ensayos de biotinilación de sinaptosomas de tallo cerebral tras la incubación con MβCD y posteriormente se procedió a la inmunodetección de las proteínas biotiniladas y no biotiniladas con anticuerpo frente a GlyT2. Como se aprecia en la Figura 24, la cantidad de GlyT2 localizada en la superficie celular no se alteró tras el tratamiento con dos concentraciones diferentes de MβCD, 10 mM y 50 mM, lo que permitió descartar la internalización del transportador por la acción de MβCD.

Figura 24. Ensayos de biotinilación de sinaptosomas de tallo cerebral tras la incubación con M β CD



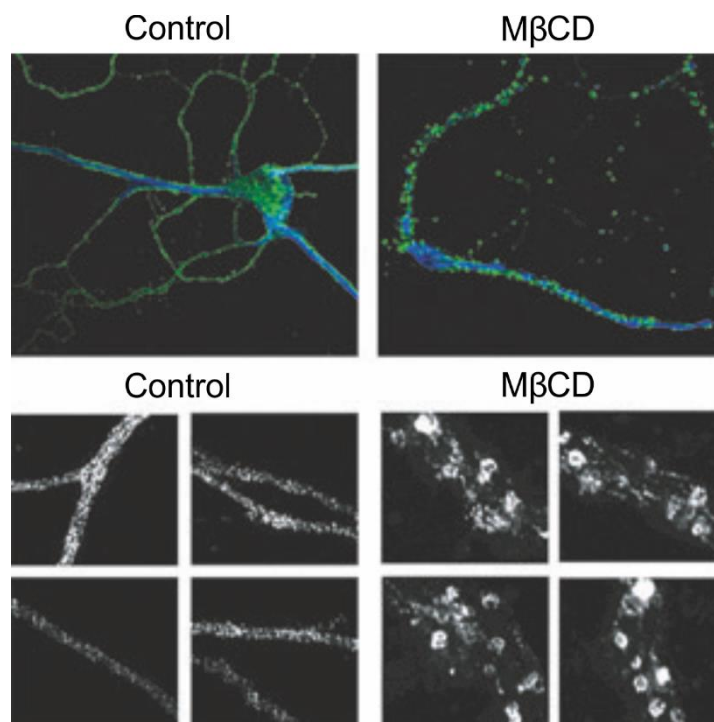
Los sinaptosomas de tallo cerebral se marcaron con NHS-SS-biotina tras el tratamiento con vehículo (control), M β CD 10 mM o M β CD 50 mM, durante una hora a 37°C. Tras el lisado y recuperación con estreptavidina-agarosa, se analizaron mediante inmunodetección con el anticuerpo anti-GlyT2. Biot (sup) indica la porción biotinilada, correspondiente a la superficie de la membrana, y NB hace referencia a la porción no biotinilada. Se utilizó como control la inmunorreactividad a calnexina (CNX).

4.2.3 Evaluación del desplazamiento lateral de GlyT2 en la membrana de balsas lipídicas por efecto del nivel de colesterol

Una vez realizados los estudios que apuntaban a que GlyT2 se puede mover por la membrana plasmática de los dominios *raft* a los *no-rafts* tras el tratamiento con M β CD, se planteó la posibilidad de que el cambio en la distribución del transportador en la superficie celular pudiera visualizarse por microscopía confocal, tras la depleción del colesterol de la membrana con M β CD.

Como se aprecia en la Figura 25, el tratamiento con M β CD no afectó a la integridad de la membrana de las neuronas. Aunque se ha demostrado que exposiciones prolongadas pueden provocar citotoxicidad, el control del marcaje somatodendrítico con MAP2 (fluorescencia azul) indicó integridad de los procesos neurales. En condiciones control, GlyT2 (marcado en verde fluorescente o gris) muestra un patrón de fluorescencia punteado en la superficie celular, quizá debido a la formación de agregados por oligomerización o interacción con otras proteínas adaptadoras (Rees y col. 2006).

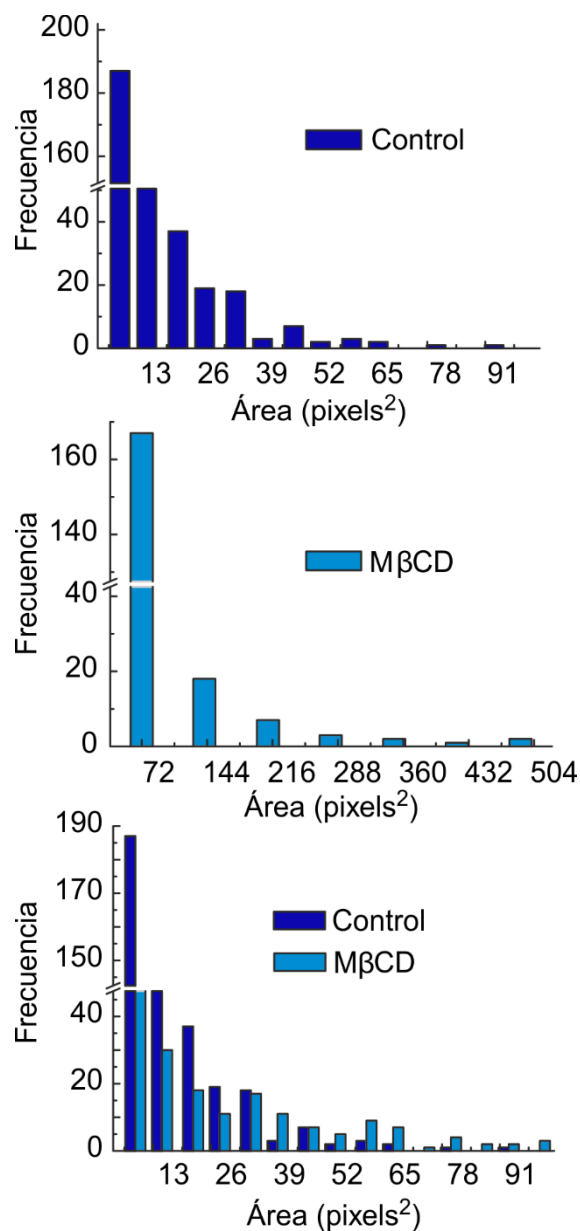
Figura 25. Localización de GlyT2 en membranas rafts mediante inmunofluorescencia en cultivos de neuronas de tallo cerebral



Las neuronas de tallo cerebral de rata se cultivaron durante 15 días *in vitro* y se pretrataron con M β CD 5 mM durante 1 hora. El doble marcaje con inmunofluorescencia corresponde a GlyT2 en verde y MAP2, marcador somatodendrítico, en azul. Los paneles superiores se corresponden con imágenes tomadas con un objetivo 63x. Los paneles inferiores muestran las imágenes obtenidas con mayor aumento (objetivo 63x con zoom 1,7 y 38 nm/píxel) donde se aprecian agrupaciones de GlyT2.

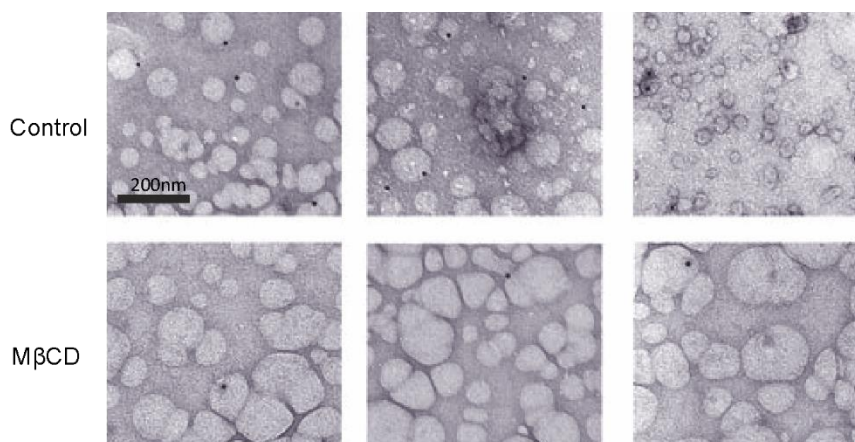
Tras el tratamiento con bajas concentraciones de M β CD (5 mM) la distribución de GlyT2 se desplazó hacia agrupaciones de mayor tamaño, con un incremento promedio del diámetro de aproximadamente el doble del control (de $134 \pm 7,2$ nm en condiciones control a $285 \pm 50,2$ nm en M β CD). Esta diferencia resultó estadísticamente significativa, asociada a un valor $p < 0,001$ al aplicar el test *t* de Student (Figura 26). De igual forma, la mediana del diámetro de los puntos se incrementó de 110 a 179 nm tras el tratamiento con M β CD.

Figura 26. Histogramas de distribución de tamaño de las diferentes áreas donde se localiza GlyT2 en los experimentos de la Figura 25



La asociación del transportador GlyT2 con los dominios *rafts* de membrana se estudió también mediante técnicas de microscopía electrónica utilizando inmunodetección con oro coloidal. Como se aprecia en la Figura 27, el transportador GlyT2 marcado con oro se localiza en los dominios *raft* de la membrana en condiciones control, pero apenas se observa en las membranas sometidas a tratamiento con MβCD y que por tanto contienen menos colesterol.

Figura 27. Micrografía electrónica de las membranas raft de sinaptosomas inmunomarcadas con anti-GlyT2 unido a oro coloidal



Las membranas raft de sinaptosomas tratados con vehículo (control) o M β CD (fracciones 5 del gradiente de sacarosa mostrado en la Figura 19) se marcaron con el anticuerpo anti-GlyT2 unido a oro coloidal. Barra de escala, 200 nm.

Por otro lado, se detectaron estructuras de gran tamaño entre los dominios *rafts* que contenían GlyT2 y que permanecieron en las fracciones de sacarosa tras el tratamiento con M β CD. Estas eran escasas en el caso de las muestras control y su tamaño era compatible con los resultados mostrados previamente.

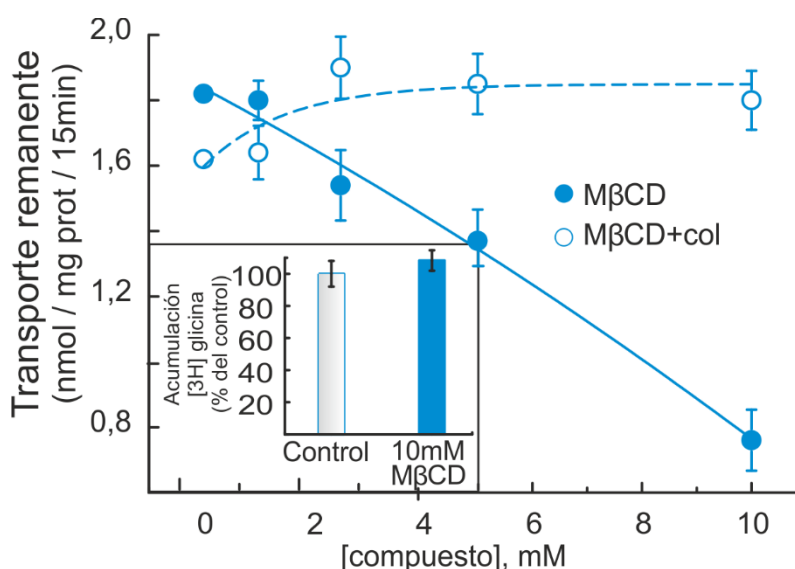
En resumen, los datos sugieren que GlyT2 podría agruparse mediante interacciones dependientes de colesterol o bien tiene reducida movilidad en los dominios ricos en colesterol. De este modo, al disminuir los niveles de colesterol las moléculas de GlyT2 pueden dispersarse en el plano de la membrana como se ha demostrado previamente para otras proteínas asociadas a *rafts* (Vereb y col. 2000, O'Connell y col. 2005, Chen y col. 2006, Pike 2006, Adkins y col. 2007). Estos resultados concuerdan en gran medida con la acción de M β CD sobre la distribución de GlyT2 en los gradientes de densidad y sugieren que las alteraciones en la movilidad del transportador y/o en las interacciones que tienen lugar responden a cambios en los niveles de colesterol.

4.2.4 Estudio de la relación de los componentes lipídicos de los dominios *raft* de membrana con la actividad de GlyT2 en la recaptación de glicina

La presencia de GlyT2 en los dominios *rafts* de la membrana plasmática y el efecto que sobre el transportador tiene la M β CD sugieren que el entorno lipídico de GlyT2 podría estar implicado en la regulación del transporte de glicina. Para establecer la posible relación entre los componentes de los dominios *rafts* y la actividad de GlyT2 se centró el estudio en el análisis del posible efecto de la depleción de colesterol y esfingolípidos, componentes principales de los *rafts*, utilizando muestras de neuronas primarias y sinaptosomas de tallo cerebral de rata.

Utilizando bajas concentraciones de M β CD que no alteran la integridad de la membrana (Figura 28, inserto), se demostró que la función de GlyT2 se inhibe de forma dependiente de la dosis de M β CD, (Figura 28), mientras que el complejo M β CD + colesterol que es incapaz de reducir los niveles de colesterol de la membrana, no consiguió inhibir el transporte de glicina de GlyT2.

Figura 28 Transporte de glicina en neuronas de tallo cerebral: inhibición por M β CD

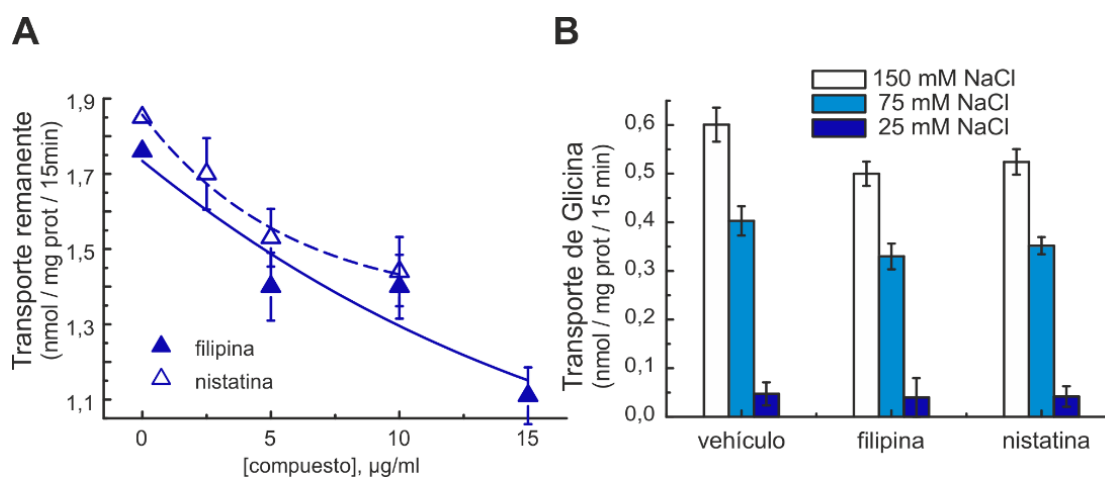


Las neuronas primarias de tallo cerebral se cultivaron durante 15 días *in vitro* antes del experimento. Se pretrataron durante 30 min a 37°C con las concentraciones indicadas en la figura de M β CD o el complejo M β CD + colesterol. Las neuronas se incubaron durante 15 min con una disolución que contenía glicina marcada con tritio (^3H -glicina), se lavaron y se trataron con vehículo (control) o M β CD 10 mM. El porcentaje de ^3H -glicina acumulada tras el tratamiento permaneció inalterado. Las barras representan el error estándar de la media (SEM) de 3 determinaciones.

Otros compuestos conocidos por alterar los niveles de colesterol de la membrana, como la filipina o la nistatina, también provocaron una inhibición del transporte de glicina a través de GlyT2, de forma dependiente de la dosis (Figura 29A). Aunque se ha descrito cierta actividad

como ionóforos de estos compuestos, se observó que la inhibición de la función de GlyT2 no era debida a una alteración de los gradientes iónicos de la célula, ya que la dependencia de sodio del transporte de glicina permaneció inalterada tras los tratamientos: la EC_{50} para el sodio fue de $59,2 \pm 3,8$ en la muestra vehículo; $59,0 \pm 3,7$ en la muestra tratada con nistatina y $60,0 \pm 3,9$ en la tratada con filipina (Figura 29B).

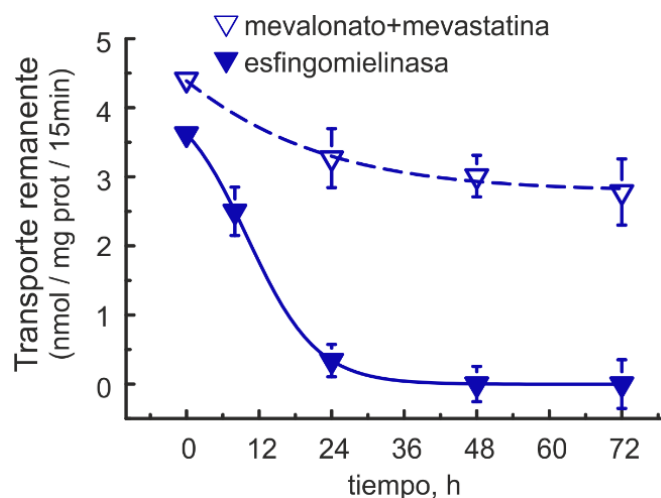
Figura 29. Transporte de glicina en neuronas de tallo cerebral: inhibición por filipina y nistatina



Las neuronas primarias de tallo cerebral se cultivaron durante 15 días *in vitro* antes del experimento. Se pretrataron durante 30 min a 37°C con las concentraciones indicadas en la figura de filipina y nistatina (A). El tratamiento con estos compuestos no alteró significativamente los gradientes iónicos celulares (B). Tras la incubación de las neuronas con vehículo, filipina ($15 \mu\text{g/ml}$) o nistatina ($10 \mu\text{g/ml}$) se midió el transporte de glicina en presencia de diferentes concentraciones de sodio extracelular (sustitución por colina). Los valores de $EC_{50} \text{Na}^+$ fueron (en mM): $59,2 \pm 3,8$; $60,0 \pm 3,9$ y $59,0 \pm 3,7$ para las condiciones de tratamiento con vehículo, filipina y nistatina, respectivamente. Las barras representan el error estándar de la media (SEM) de 3 determinaciones.

Por otro lado, se realizaron experimentos de inhibición crónica de la síntesis de colesterol utilizando mevastatina y mevalonato en neuronas de tallo cerebral. Los resultados de estos ensayos estuvieron en línea con los anteriores, demostrando una inhibición de la actividad de GlyT2 similar tras el tratamiento con estos agentes. La exposición de las neuronas a esfingomielinasa, una enzima que causa la depleción de la esfingomielina, el esfingolípido más abundante en la membrana plasmática de las neuronas, consiguió también una reducción muy marcada en el transporte de glicina a través de GlyT2 (Figura 30).

Figura 30. Transporte de glicina en neuronas de tallo cerebral: inhibición por mevalonato + mevastatina o esfingomielinasa

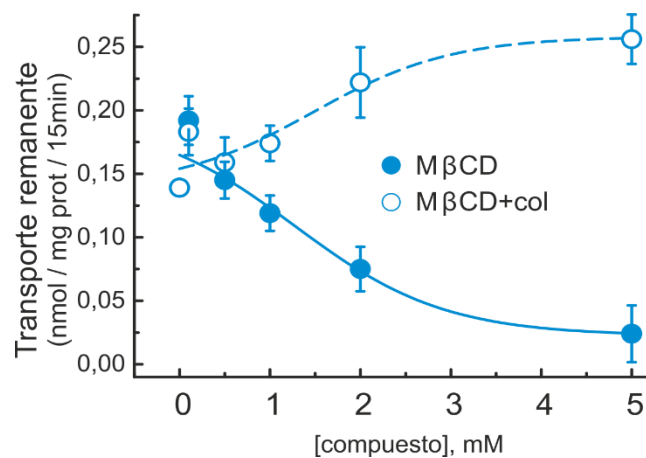


Las neuronas primarias de tallo cerebral se cultivaron durante 12 días *in vitro* antes del experimento. Se trataron durante 3 días con mevalonato 250 μM + mevastatina 4 μM o esfingomielinasa 2,5 U/mL y se midió el transporte de glicina en el día 15. Las barras representan el error estándar de la media (SEM) de 3 determinaciones.

Para confirmar la implicación del colesterol en la actividad de GlyT2 en un sistema procedente de rata adulta como son los terminales nerviosos, se realizaron experimentos tratando sinaptosomas con M β CD 2mM o bien con el complejo M β CD + colesterol (Figura 31). Los resultados mostraron que M β CD inhibió el transporte de glicina a través de GlyT2 de manera dependiente de la dosis pero no así la M β CD acomplejada con colesterol indicando que la regulación tiene lugar también en el estado adulto. Los datos cinéticos indicaron que M β CD redujo aproximadamente en un 45% la $V_{\text{máx}}$ del transporte de GlyT2 (225 ± 11 en la muestra control vs. $124 \pm 5,7$ nmol/mg proteína/15 min tras el tratamiento con M β CD) pero sin alterar el valor de K_m ($5,5 \pm 0,8$ vs. $5,1 \pm 0,6$ μM en la muestra control y tratada con M β CD, respectivamente) (Figura 32).

Curiosamente, la reducción de $V_{\text{máx}}$ inducida por M β CD pudo ser parcialmente restaurada por la adición posterior de M β CD + colesterol, lo que sugiere que el transporte de GlyT2 responde a las concentraciones de colesterol en la membrana ($235 \pm 6,4$ vs. $188 \pm 5,5$ nmol / mg prot / 15 min para el vehículo seguido de M β CD + colesterol, y M β CD seguido de M β CD + colesterol, respectivamente).

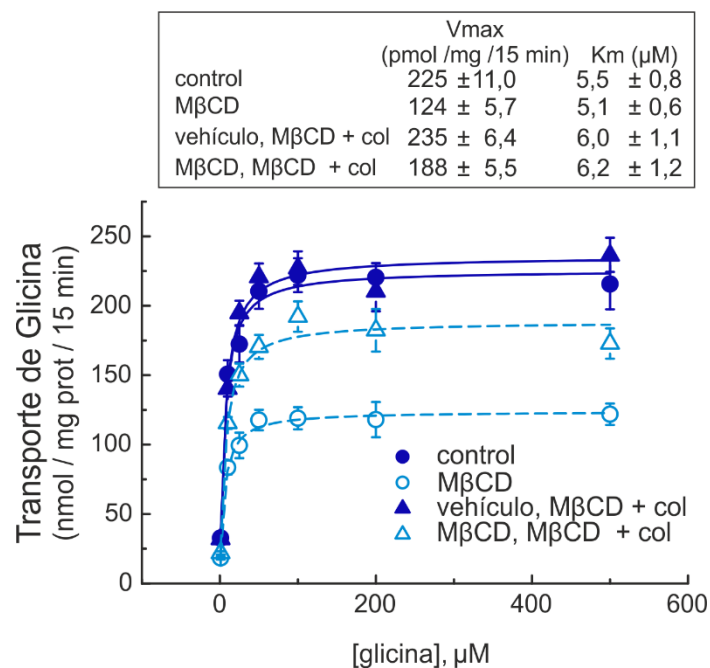
Figura 31. Inhibición por M β CD del transporte de glicina mediado por GlyT2 en sinaptosomas de tallo cerebral



Los sinaptosomas de tallo cerebral de rata purificados (40 μ g) se trataron con diferentes concentraciones de M β CD (M β CD) o con el complejo M β CD + colesterol (M β CD + col) durante 30 min a 37°C. Posteriormente se midió el transporte de glicina a través de GlyT2 en ambas condiciones experimentales.

La reducción de V_{max} inducida por M β CD se restableció de forma parcial al añadir posteriormente M β CD unido a colesterol, lo que sugiere que el transportador GlyT2 responde a las concentraciones de colesterol en la membrana (235 \pm 6,4 vs. 188 \pm 5,5 nmol/mg proteína/ 15 min en la muestra tratada con vehículo + M β CD y en la muestra tratada con M β CD + el complejo M β CD + colesterol, respectivamente).

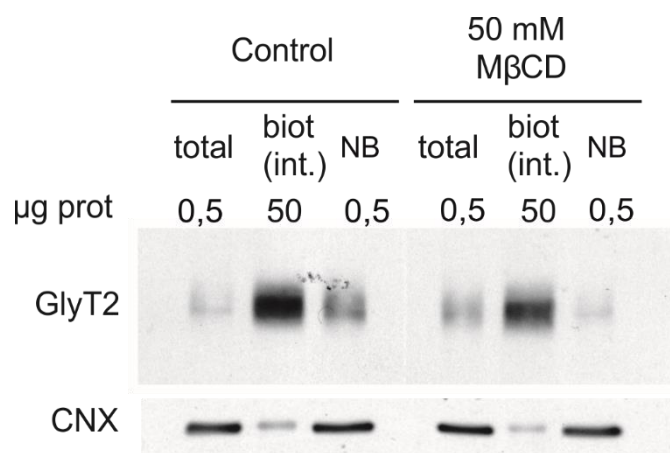
Figura 32. Cinética del transporte de glicina mediado por GlyT2 en sinaptosomas de tallo cerebral



Los sinaptosomas de tallo cerebral se trataron según se indica: sin tratamiento (control), tratados con MβCD 2 mM (MβCD), tratados con vehículo, lavados e incubados con el complejo MβCD 2mM + colesterol durante 30 min a 37°C (vehículo, MβCD+ col) o tratados con MβCD 2 mM, lavados e incubados con el complejo MβCD 2mM + colesterol durante 30 min a 37°C (MβCD, MβCD+ col). Finalmente, se lavaron y se midió el transporte de glicina de GlyT2.

En concordancia con una regulación de la actividad del transportador en membrana, se determinó que la reducción de $V_{\text{máx}}$ inducida por MβCD no era debida a la internalización del transportador, que resultó mínima incluso en presencia de concentraciones elevadas de MβCD (50 mM) (Figura 33).

Figura 33 La inhibición de GlyT2 con M β CD no causa la internalización del transportador



Las mismas cantidades de sinaptosomas biotinilados se incubaron con o sin M β CD 50 mM (M β CD o control) durante 1 h a 37°C. Posteriormente se trataron con MesNa a 4°C, se lisaron y se precipitaron mediante unión a estreptavidina-agarosa. Las muestras resultantes se analizaron por inmunodetección utilizando el anticuerpo anti-GlyT2 (biot int. indica la proteína biotinilada internalizada y NB la no biotinilada). Se utilizó la inmunorreactividad a calnexina (CNX) como control.

En resumen, estos resultados indican que el transportador GlyT2 responde al ambiente lipídico que lo rodea, de tal forma, que las concentraciones de colesterol o esfingolípidos alteran su actividad. En esta línea, la alteración de los dominios *rafts* de la membrana provoca la inhibición de la actividad de transporte de glicina del transportador.

4.3 Análisis de la biogénesis y la modificación por N-glicosilación de GlyT2

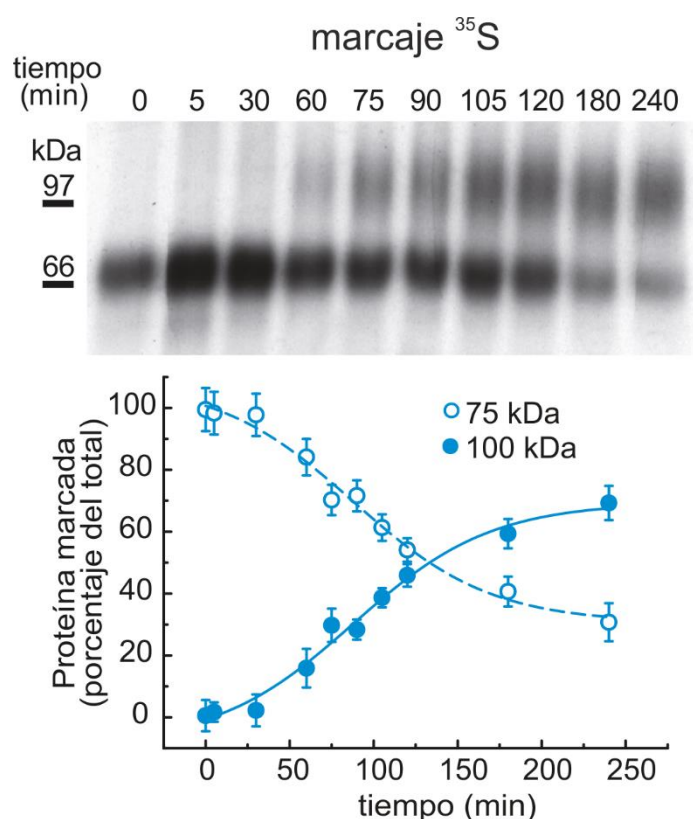
4.3.1 Caracterización de intermediarios de glicosilación de GlyT2: efecto de los inhibidores de la glicosilación sobre la actividad del transporte de GlyT2

Cinéticas de expresión de las diferentes formas de GlyT2

Con el objetivo de comprender mejor los requerimientos de la expresión en la membrana de las moléculas recién sintetizadas de GlyT2, se midió la cinética de expresión en cultivos de células COS7 previamente transfectadas con GlyT2 silvestre. Las células se incubaron en un medio deficiente en aminoácidos azufrados suplementado con [35 S] metionina/cisteína con el fin de marcar la proteína naciente e inmunoprecipitarla después a diferentes tiempos con un anticuerpo específico de GlyT2 (Zafra y col. 1995). Como cabría esperar, siendo GlyT2 una

proteína N-glicosilada (Martinez-Maza y col. 2001), la separación por electroforesis mostró un doblete compuesto por la proteína con glicosilación completa e intermediarios intracelulares (Lopez-Corcuera y col. 1998, Martinez-Maza y col. 2001). En las condiciones experimentales que se ensayaron, GlyT2 apareció inicialmente como un precursor de 75 kDa con una vida media de 1 hora aproximadamente, que posteriormente fue dando lugar al transportador maduro de 100 kDa (Figura 34).

Figura 34. Cinética de expresión de GlyT2 en células COS7 en cultivo

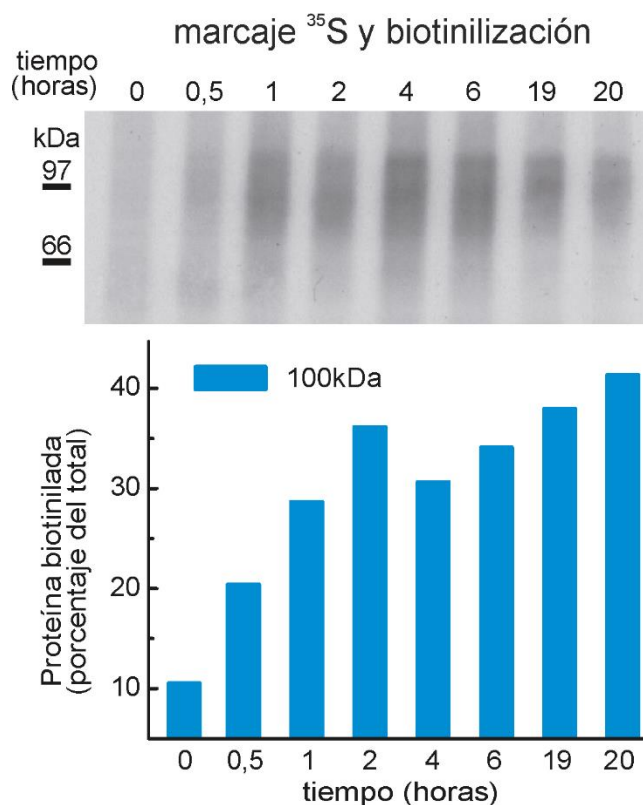


Las células COS7 que expresaban GlyT2 se sometieron a un pulso de 15 minutos con ^{35}S metionina/cisteína y se inmunoprecipitaron con el anticuerpo anti-GlyT2 a los tiempos indicados. El panel inferior representa la densitometría de las bandas de 75 y 100 kDa separadas en el gel SDS-PAGE y fluorometría. Las barras representan el error estándar de la media (SEM) de un total de 3 experimentos.

La forma de GlyT2 de 100 kDa se localizó en la membrana plasmática, pues se marca con el reactivo impermeable NHS-SS-biotina. La intensidad de la banda biotinilada de GlyT2 incrementó exponencialmente durante las 2 primeras horas hasta alcanzar una meseta que se mantuvo durante 20 horas, sugiriendo una vida media para la proteína madura de aproximadamente 24 horas (

Figura 35).

Figura 35. Cinética de expresión de GlyT2 en membrana de células COS7 en cultivo

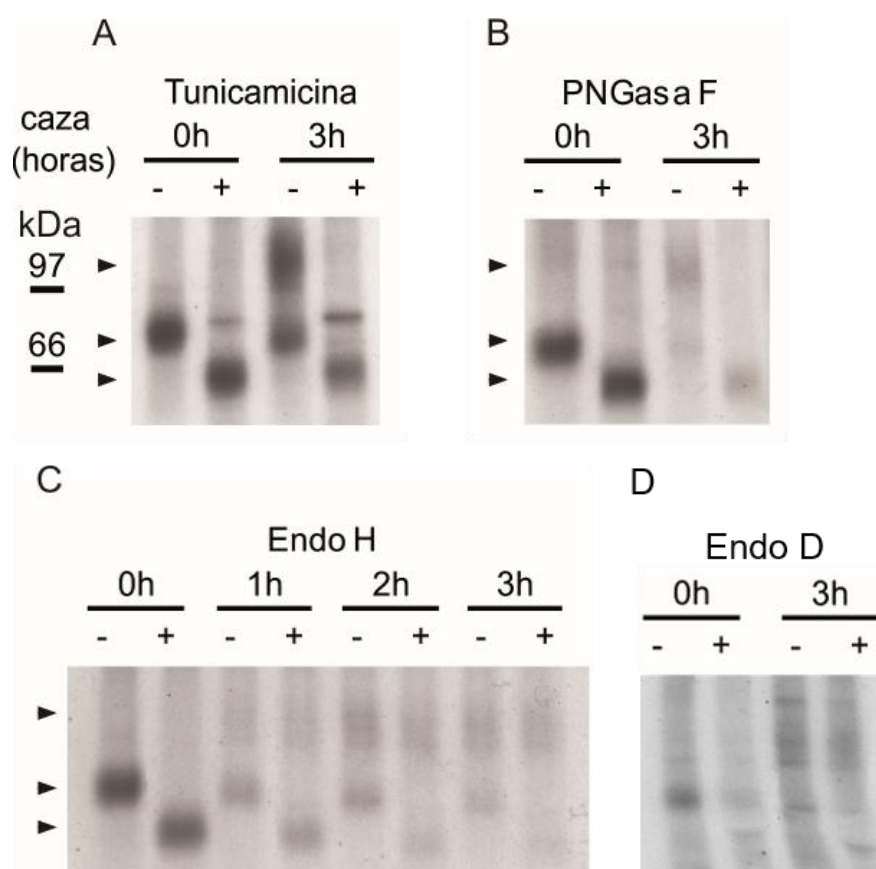


Las células COS7 que expresaban GlyT2 se sometieron a: pulso de 15 minutos con [^{35}S]metionina/cisteína, marcaje en superficie con NHS-SS-biotina, lisado, precipitación con estreptavidina-agarosa seguida de inmunoprecipitación con el anticuerpo anti-GlyT2 (fracción biotinilada). Los inmunoprecipitados se sometieron a electroforesis y fluorografía. El panel inferior representa el porcentaje de banda de 100 kDa biotinilada con respecto al total y la evolución de la localización en membrana durante las primeras 24 horas.

Caracterización de la glicosilación de GlyT2

Con el fin de conocer el estado de glicosilación del precursor de GlyT2 de 75 kDa y determinar su localización en la vía secretora se utilizaron enzimas cuya acción se sitúa en diferentes niveles de la misma vía. La retirada completa de todos los glicanos N-ligados mediante PNGasa F, tanto en la forma de 75 kDa como en la de 100 kDa, pulsada e inmunoprecipitada, mostró una banda de 60 kDa (Figura 36B). Las células marcadas incubadas con el agente bloqueante de la N-glicosilación tunicamicina, generaron una fracción proteica del mismo tamaño proveniente de ambas formas. Este hallazgo indica que la banda de 60 kDa corresponde al núcleo proteico de GlyT2 sin glicanos (Figura 36A).

Figura 36. Sensibilidad a endoglicosidasas de GlyT2 expresado en células COS7 en cultivo



Las células COS7 que expresaban GlyT2 se sometieron a: (A) preincubación con vehículo (DMSO) o tunicamicina 10 $\mu\text{g/ml}$ durante toda la noche, aplicación de un pulso de 15 minutos con [^{35}S]metionina/cisteína, lisado e inmunoprecipitación con el anticuerpo anti-GlyT2. (B, C y D) Los inmunoprecipitados se incubaron durante toda la noche con el vehículo (tampón de la endoglicosidasa) o con PNGasa F (B), endoglicosidasa H (C) o endoglicosidasa D (D) en condiciones desnaturalizantes. Las muestras se sometieron a electroforesis y fluorografía. Las puntas de flecha señalan las bandas de 100 kDa, 75 kDa y 60 kDa.

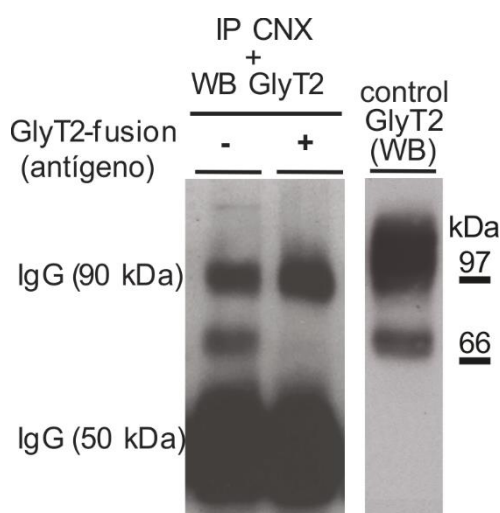
Al contrario que el transportador maduro, resistente a la digestión con endoglicosidasa H (EndoH), el precursor de 75 kDa resultó sensible a esta enzima a todos los tiempos ensayados. Este comportamiento es el que cabe esperar de una proteína que se encuentra en la vía secretora temprana (RE- o Cis Golgi). La proporción de proteína digerida por EndoH sugiere una sensibilidad completa del precursor, aunque se observó un descenso en el marcaje de GlyT2 total, probablemente debido a alguna contaminación de la enzima comercial por actividad de proteasas (Figura 36C). La sensibilidad a EndoD de la forma madura fue nula mientras que el precursor presentó una mínima sensibilidad, de acuerdo con la transitoriedad del sustrato específico de esta enzima en el Golgi cis-medio (Figura 36D).

Todos los resultados expuestos hasta este punto indican que la forma inmadura de 75 kDa de GlyT2 es un intermediario de glicosilación que se encuentra en el retículo endoplasmático o en la región *cis* del Golgi (Freeze y col. 2010).

Implicación de calnexina en la biogénesis de GlyT2

La localización del precursor de 75 kDa de GlyT2 en el RE, un orgánulo responsable de una buena parte del control de calidad en la vía secretora mediado por chaperonas como la calnexina, nos llevó a estudiar la posible interacción entre ambas proteínas. Para ello, se realizaron experimentos de co-inmunoprecipitación utilizando un anticuerpo frente a calnexina (CNX), en presencia de detergentes permisivos con el mantenimiento del interactoma (ver materiales y métodos). La inmunodetección del inmunoprecipitado con el anticuerpo específico de GlyT2 reveló la presencia de una banda de 75 kDa cuya inmunodetección pudo evitarse mediante la preadsorción del anticuerpo con un exceso de la proteína de fusión (GlyT2-GST) utilizada previamente como antígeno para generar el anticuerpo anti-GlyT2 utilizado (Zafra y col. 1995). Estas observaciones confirmaron que la banda de 75 kDa co-inmunoprecipitada con CNX correspondía al precursor del transportador y revelaron que ambas proteínas interaccionan (Figura 37).

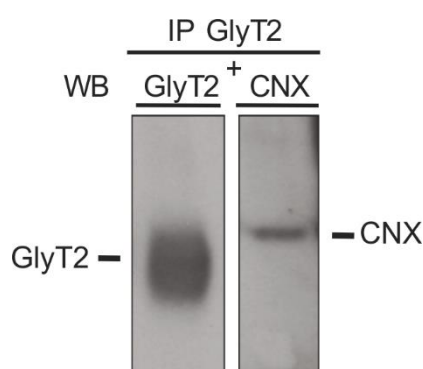
Figura 37. Co-inmunoprecipitación de GlyT2 y CNX



Inmunoprecipitación con anticuerpo anti-CN X en lisados de células COS7 que expresan GlyT2 e inmunodetección con el anticuerpo anti-GlyT2 en presencia o ausencia de 100 µg/ml de la proteína de fusión GlyT2-GST utilizada como antígeno para producir este anticuerpo en conejo.

La co-inmunoprecipitación de GlyT2 y CNX también se observó en cultivos primarios de neuronas, donde utilizando el anticuerpo anti-GlyT2 para la inmunoprecipitación, se pudo detectar la CNX mediante inmunodetección. Hay que destacar que este anticuerpo no permite detectar el precursor de 75 kDa en neuronas primarias y por eso GlyT2 aparece en este sistema como una única banda correspondiente a la proteína madura (Figura 38). Sin embargo, no se observó co-inmunoprecipitación de GlyT2 con la chaperona homóloga soluble de CNX, calreticulina, en ninguna de las condiciones ensayadas (no mostrado).

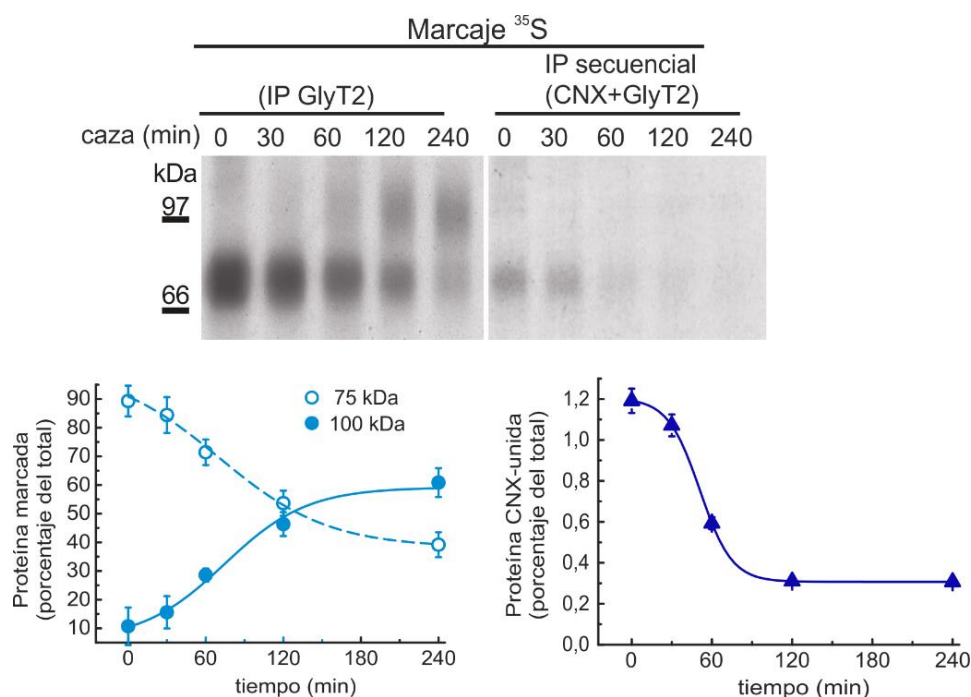
Figura 38. Co-inmunoprecipitación de GlyT2 y CNX en cultivos primarios de neuronas



Los cultivos primarios de neuronas de tallo cerebral de rata se inmunoprecipitaron con el anticuerpo frente a GlyT2 producido en rata y posteriormente se analizaron mediante inmunodetección con el fin de detectar la fracción de GlyT2 endógeno inmunoprecipitada o CNX utilizando anticuerpos producidos en conejo.

Con el fin de estudiar la cinética de la interacción entre GlyT2 y CNX, se marcaron células COS7 que expresaban el transportador con [³⁵S] metionina/cisteína y se realizaron experimentos de inmunoprecipitación secuencial, utilizando secuencialmente anticuerpos contra CNX y contra GlyT2 (Figura 39).

Figura 39. Cinética de la interacción de GlyT2 y CNX en cultivos celulares

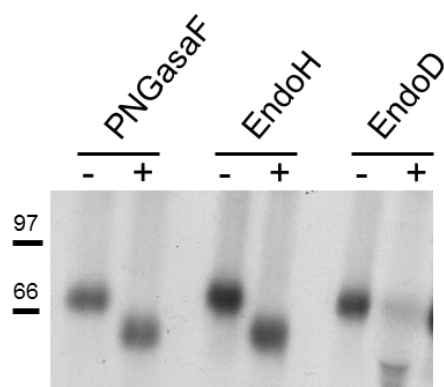


Las células COS7 que expresan GlyT2 sometidas a un pulso de 15 minutos con [³⁵S]metionina/cisteína y cazadas con medio rico en metionina y cisteína frías durante los tiempos indicados, se sometieron a inmunoprecipitación secuencial con anticuerpo anti-CN X y posteriormente con anticuerpo anti-GlyT2. Los inmunoprecipitados se sometieron a electroforesis y fluorografía. Las barras representan el error estándar de la media (SEM).

El precursor de 75 kDa se unió de forma transitoria a CNX para formar un complejo que presentaba una vida media de unos 60 minutos, tiempo coincidente con el momento de inicio de aparición de la banda de 100 kDa correspondiente con el transportador maduro. Estos resultados sugieren que CNX participa en la biogénesis de GlyT2.

La forma del transportador GlyT2 unido a CNX presentaba la misma sensibilidad a glicosidasas que el precursor de 75kDa: se deglicosiló completamente con PNGasa F, era buen sustrato de EndoH y parcialmente resistente a EndoD (hay también cierta proteólisis), como cabría esperar de un precursor de GlyT2 que se encuentra en el RE o en el cis Golgi (Figura 40).

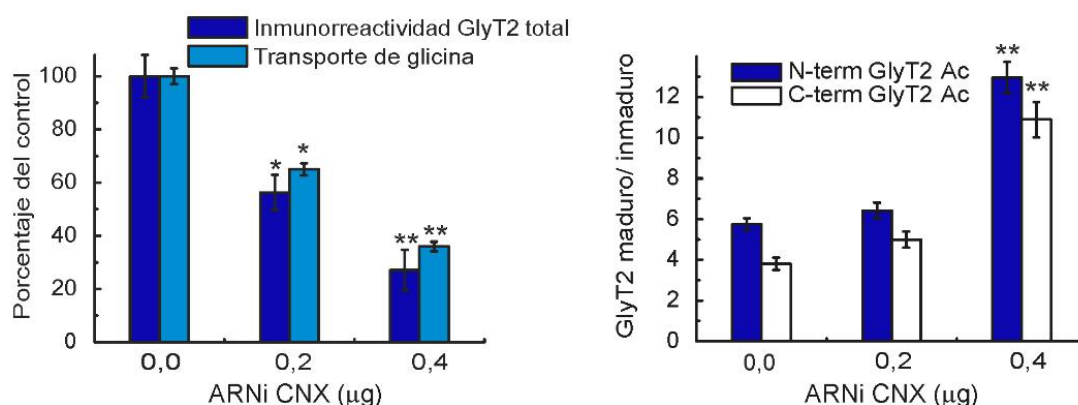
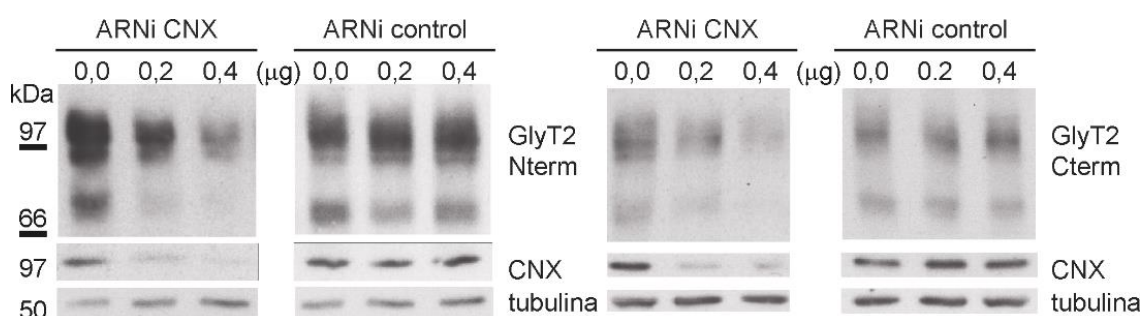
Figura 40. Sensibilidad a glicosidasas de GlyT2 unido a CNX



Las células COS7 que expresan GlyT2 sometidas a un pulso de 15 minutos con [³⁵S]metionina/cisteína y cazadas con medio rico en metionina y cisteína frías durante 30 min, se sometieron a inmunoprecipitación secuencial con anticuerpo anti-CNX y posteriormente con anticuerpo anti-GlyT2. Los inmunoprecipitados se incubaron durante toda la noche con el vehículo (tampón de la endoglicosidasa) o con la glicosidasa indicada en condiciones desnaturalizantes y se analizó mediante electroforesis y fluorografía.

De acuerdo con el papel facilitador de CNX en la biogénesis de glicoproteínas, la expresión total de GlyT2 resultó ser sensible a los niveles de expresión de la chaperona (Figura 41).

Figura 41. Expresión de GlyT2 tras la supresión de CNX mediante ARNi



Las células COS7 cotransfectadas con 0,5 μg de GlyT2 ADNc en el plásmido pCDNA3 y la cantidad indicada de control (HPRT) o ARNi de CNX, se analizaron mediante inmunodetección. El ARNi específico de CNX redujo los niveles de CNX en un 62% (0,2 μg) y un 85% (0,4 μg), respectivamente, en comparación con los niveles endógenos. El ARNi control incrementó los niveles totales de GlyT2 en un 10% y en un 15%, respectivamente. Las bandas se detectaron con anticuerpos frente a los epítomos N-terminal o C-terminal de GlyT2.

La eliminación de CNX en las células COS7 utilizando un ARNi específico redujo la expresión total del transportador (evidenciado en los experimentos de inmunodetección) y la actividad de transporte de glicina de forma dosis-dependiente (Figura 41), indicando así que los bajos niveles restantes de CNX limitan la síntesis de GlyT2. Consecuentemente, se observó una acumulación de la proteína madura que resultó del incremento progresivo en la relación forma madura (100 kDa) / forma inmadura (75 kDa) en condiciones estacionarias. Este incremento no se puede atribuir a un menor reconocimiento de la proteína inmadura por el anticuerpo contra el extremo N-terminal de GlyT2 utilizado ya que se obtuvo el mismo resultado con un anticuerpo contra el extremo C-terminal de GlyT2, que en células COS7 sí es capaz de reconocer la forma inmadura en contra de lo que sucede en tejido neural (o neuronas primarias).

De forma opuesta, experimentos llevados a cabo en el laboratorio utilizando un protocolo optimizado de co-transfección en células COS7, revelaron que la sobreexpresión de CNX aumentó dramáticamente la expresión de GlyT2 y el transporte de glicina (Arribas-Gonzalez y col. 2013). Además, coherentemente con el incremento en el número de sitios de unión para el precursor de GlyT2 sobre la CNX sobreexpresada, se detectó una mayor proporción de transportador inmaduro.

En resumen, todas estas observaciones permiten confirmar que CNX se encuentra implicada y asiste a la biogénesis de GlyT2.

4.3.2 Estudio de mutantes de N-glicosilación de GlyT2

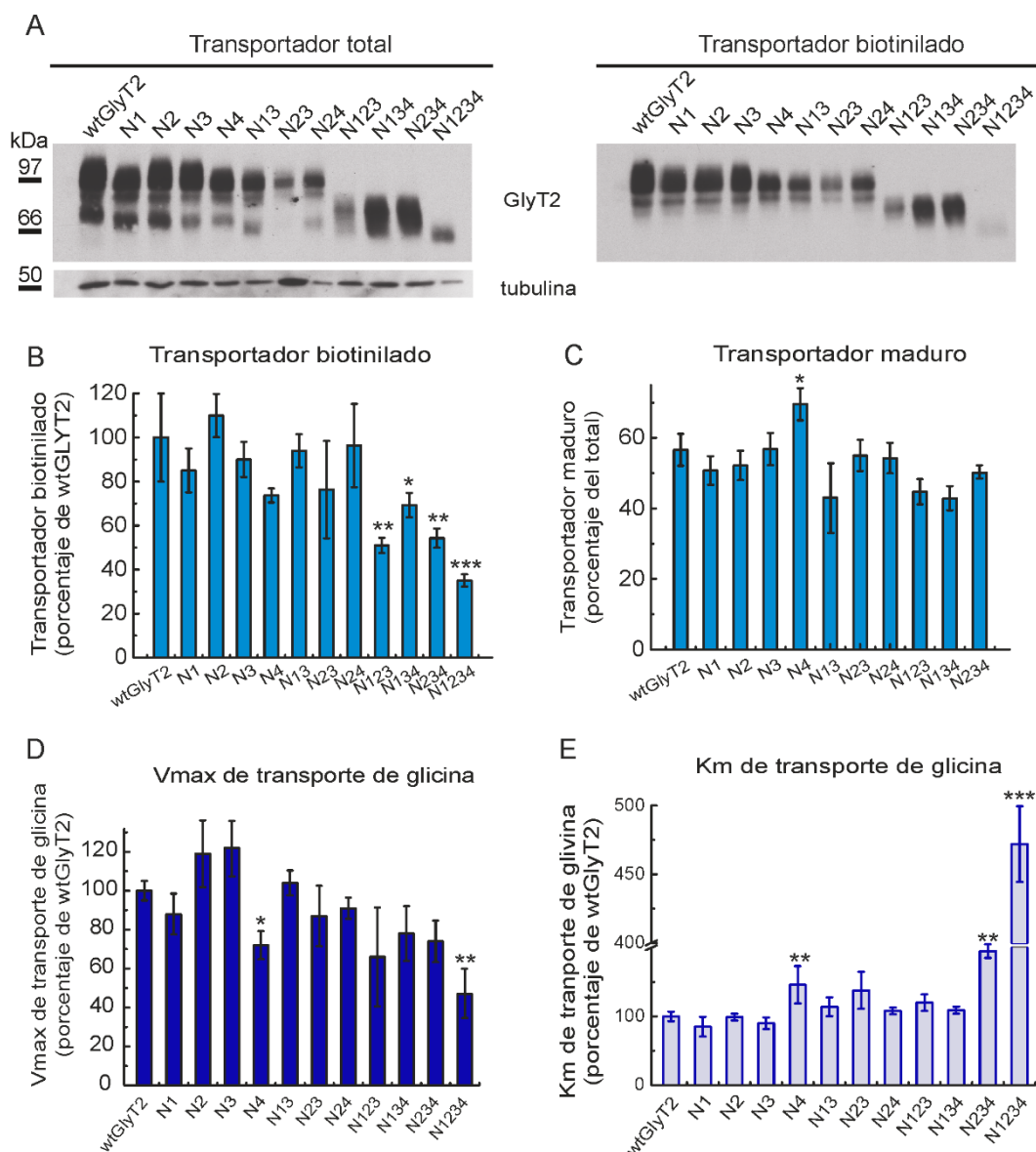
En trabajos previos del laboratorio, se había descrito que GlyT2 contiene 4 N-glicanos unidos a las asparraginas 345, 355, 360 o 366 en la proteína madura (Martinez-Maza y col. 2001). Como lectina monovalente que es, CNX tiene afinidad por intermediarios monoglucosilados aunque también puede unirse a través de interacciones proteína-proteína (Brockmeier y col. 2006, Lederkremer 2009).

Para conocer el papel de los azúcares en la interacción entre GlyT2 y CNX se construyeron varios mutantes simples o múltiples de N-glicosilación en los que se sustituyó la asparragina aceptora por aspartatos en las posiciones 345, 355, 360 o 366 (Martinez-Maza y col. 2001). Se comprobó que los mutantes simples N345D; N355D, N360D y N366D, a los que se llamó N1, N2, N3 y N4 y los dobles (N13, N23 y N24) mantenían una cinética de expresión parecida a GlyT2 silvestre en

experimentos de pulso-caza con [³⁵S] en células COS7 aunque el mutante N4 presentaba cierto retraso no significativo en la aparición de la proteína madura de 100kDa.

La cinética de expresión de los mutantes triples (N123, N134 y N234) que mantienen un solo sitio de glicosilación, no se pudo determinar de forma detallada debido a que la proteína madura con solo un glicano en una de las posiciones tiene un tamaño reducido, similar al del precursor inmaduro marcado con [³⁵S]. Sin embargo, se observó un descenso en la cantidad de transportador biotinilado en la membrana plasmática (Figura 42 A-C) coherente con una bajada también en la actividad de transporte (Figura 42 D,E).

Figura 42. Caracterización de los mutantes de N-glicosilación de GlyT2

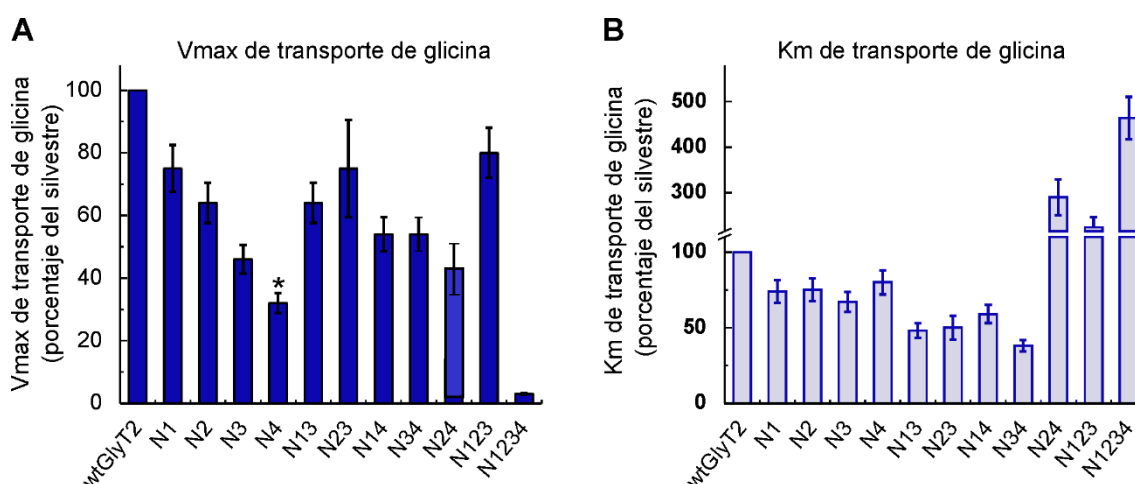


Expresión en la membrana (A-C) y actividad de transporte (D,E) de GlyT2 y mutantes de glicosilación. Las células COS7 que expresaban los diferentes mutantes de N-glicosilación de GlyT2 fueron biotiniladas y se analizaron los lisados correspondientes a la proteína total (6 μ g, panel de la izquierda) y a la proteína biotinilada (18 μ g, panel derecho) mediante inmunodetección empleando un anticuerpo frente a GlyT2. Se empleó la inmunorreactividad de la tubulina como control de carga. Las bandas de la inmunodetección se analizaron mediante densitometría. (B) Análisis densitométrico donde se representa la proporción de transportador biotinilado mutante como el porcentaje de la fracción biotinilada del transportador GlyT2 silvestre. (C) Densitometría de las bandas de inmunodetección donde se expresa la fracción del transportador maduro (banda superior) como el porcentaje del transportador total para cada mutante. (D,E) Las células COS7 que expresaban los diferentes mutantes de N-glicosilación de GlyT2 se sometieron a ensayos de transporte en presencia de concentraciones crecientes de glicina, desde 1 a 1000 μ M. Los datos cinéticos se ajustaron a una hipérbola y se calcularon los parámetros V_{max} y K_m para el mejor ajuste. Para el transportador GlyT2 silvestre, $V_{max} = 17 \pm 3,8$ nmol gly/mg prot/4 min y $K_m = 171 \pm 20$ μ M. Las barras representan el error estándar de la media (SEM) de 3 experimentos. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,0001$ con respecto a GlyT2 silvestre (test ANOVA + pruebas Post Hoc de Tukey).

En los experimentos de cinética realizados, la V_{max} de transporte de glicina disminuyó progresivamente y la K_m se incrementó de forma notable a medida que se eliminaron sitios de glicosilación, alcanzando niveles máximos en el mutante completamente deglicosilado (N1234) cuya K_m fue 5 veces mayor que la observada en el GlyT2 silvestre (Figura 42 D, E).

Para comprobar que el resultado obtenido no era debido a la carga negativa que aporta el aspartato a los mutantes se construyeron mutantes en los mismos residuos, pero sustituyendo la asparragina aceptora por glutamina, es decir, por un aminoácido sin carga y se realizaron experimentos paralelos. Los resultados fueron muy similares y determinaron un incremento en la K_m , descenso en la V_{max} y reducción de transportador en membrana a medida que se sustituyen más asparraginas, lo que reforzaría la idea de que es la propia presencia de los azúcares y no la retirada de la carga lo que provoca las alteraciones en actividad de transporte y distribución en la membrana (Figura 43).

Figura 43. Cinéticas de los mutantes de sustitución a glutamina



Las células COS7 que expresaban los diferentes mutantes de sustitución a glutamina de los sitios de N-glicosilación de GlyT2 se sometieron a ensayos de transporte de [3 H]-glicina en presencia de concentraciones crecientes de glicina, desde 1 a 1000 μ M. Los datos cinéticos se ajustaron a una hipérbola y se calcularon los parámetros V_{max} y K_m para el mejor ajuste. Para el transportador GlyT2 silvestre, $V_{max} = 17 \pm 3,8$ nmol gly/mg prot/4 min y $K_m = 171 \pm 20$ μ M. Las barras representan el error estándar de la media (SEM) de 3 experimentos.

Características particulares del mutante N366D GlyT2

Una excepción relevante en el grupo de mutantes estudiados son los mutantes de sustitución de N4 (N366). Aunque su cinética de expresión es comparable a la de GlyT2 silvestre, estos mutantes muestran una cantidad ligeramente menor de proteína madura, niveles reducidos de transportador biotinilado en la superficie (Figura 42 A, B), una mayor proporción de proteína

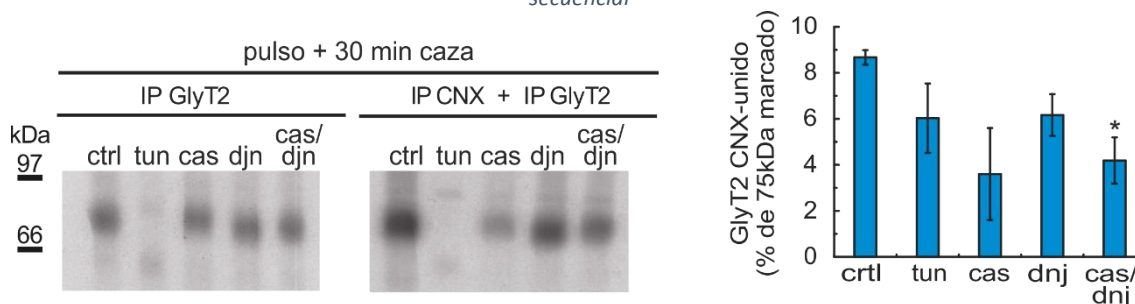
glicosilada frente al total (Figura 42C), menor Vmax (Figura 42D, Figura 43A) y una mayor Km que otros mutantes relacionados (Figura 42E, Figura 43B). Además, la banda correspondiente a la proteína glicosilada en N4 tiene un peso aparente menor que las de N2 y N3 (Figura 42 A), lo que sugiere que, o bien los N-glicanos unidos a N366 tienen una mayor masa molecular, o bien que su retirada afecta al plegamiento de GlyT2. La hipótesis que se maneja en esta tesis es que algunas de las diferencias que N4 presenta las provoca una menor unión a CNX. Por lo tanto, para profundizar en este estudio se investigaron los factores que pueden influir en la unión de GlyT2 a la chaperona.

Aunque estos mismos hallazgos se describieron en el caso del mutante N4Q: N366Q, en la misma posición a glutamina, se eligieron los mutantes a aspartato para la caracterización posterior de su unión a CNX.

Caracterización de la unión de GlyT2 con CNX en los mutantes ensayados

Las glucosidasas I y II (GI y GII) dan lugar a los substratos monoglicosilados de CNX (Deprez y col. 2005). El tratamiento de las células COS7 que expresaban GlyT2 con los inhibidores de glucosidasas castanospermina y deoxinojirimicina resultó en una reducción parcial, aunque consistente, de los niveles de transportador unido a CNX recuperados por inmunoprecipitación secuencial (Figura 44).

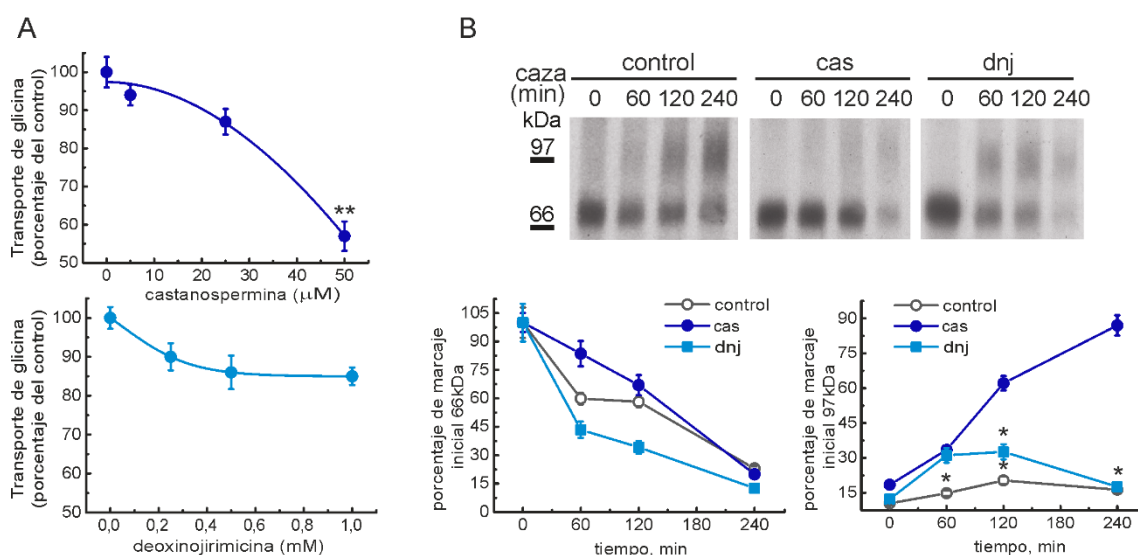
Figura 44. Efectos de los inhibidores de glucosidasas en la unión de CNX en experimentos de inmunoprecipitación secuencial



Las células COS7 que expresaban GlyT2 se trataron durante 2 h con vehículo (DMSO), tunicamicina 1 µg/ml (tun), castanospermina 1 mM (cas), deoxinojirimicina 1 mM (djn) o castanospermina 1 mM + deoxinojirimicina 1 mM (cas+djn). Tras el tratamiento, las células se sometieron a un pulso de 15 minutos con [³⁵S]metionina/cisteína y una caza de 30 min. Los lisados celulares se inmunoprecipitaron con el anticuerpo anti-GlyT2 (IP GlyT2) o se realizó una inmunoprecipitación secuencial con los anticuerpos frente a CNX primero y seguidamente anti-GlyT2 (IP CNX + IP GlyT2). Las muestras se sometieron a electroforesis y fluorografía. El panel derecho muestra el análisis por densitometría de 3 experimentos y representa el porcentaje del precursor de GlyT2 total unido a CNX en cada condición (± error estándar de la media (SEM)). *p<0,05 con respecto al control (test t-Student).

La unión a CNX también resultó ser sensible a bajas concentraciones de tunicamicina, un inhibidor de la N-glicosilación. Además, la inhibición de las glucosidasas redujo la actividad de transporte de glicina (Figura 45A) como consecuencia de un descenso en la maduración del transportador (Figura 45B).

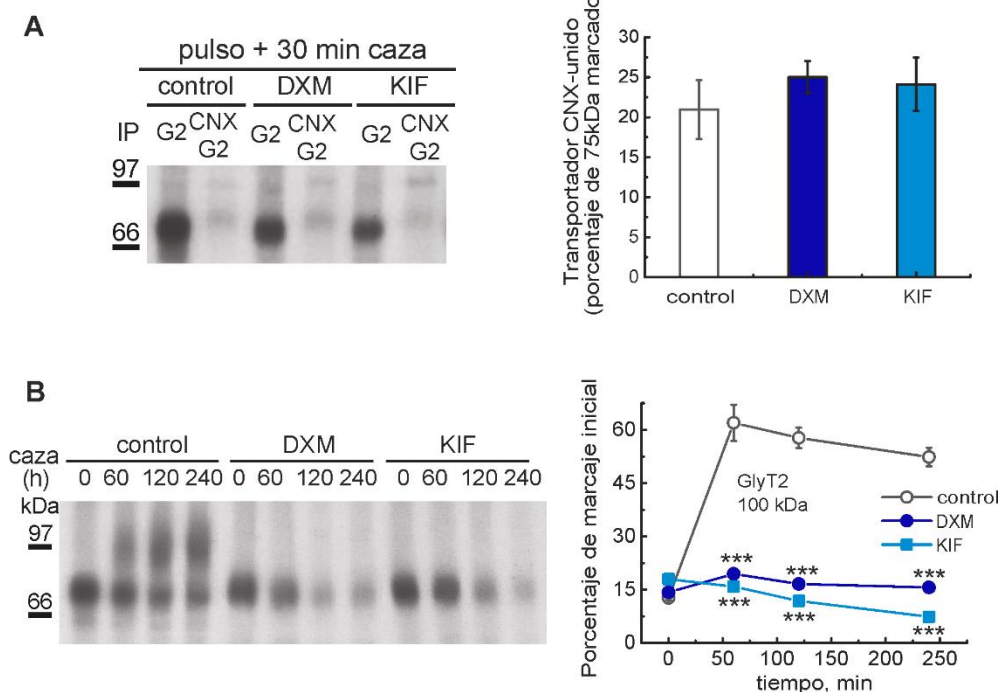
Figura 45. Efectos de los inhibidores de glucosidasas en el transporte de glicina y maduración de GlyT2



Las células COS7 que expresaban GlyT2 se trataron durante 2 h con vehículo (agua), castanospermina 1-50 μM (panel A superior) ó 1mM (B); deoxinojirimicina 0,2-1 mM (panel A inferior) ó 2mM (B) y se sometieron a ensayo de transporte de $[^3\text{H}]$ -glicina (A) o a un pulso de 15 minutos con $[^{35}\text{S}]$ metionina/cisteína y una caza según los tiempos indicados, lisis e inmunoprecipitación con un anticuerpo anti-GlyT2, electroforesis y fluorografía (B). Las gráficas del panel B inferior muestran los resultados de la densitometría de las bandas. Las barras representan el error estándar de la media (SEM). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, con respecto al control (test t-Student).

De forma opuesta, la inhibición de la manosidasa no disminuyó la cantidad de GlyT2 unido a CNX, aunque impidió por completo que se generara el transportador maduro de 100 kDa (Figura 46). Este hecho era esperable dado que la escisión de manosas no se requiere para generar los substratos de la CNX, pero sí es necesaria para continuar el procesamiento de los glicanos en el aparato de Golgi (Lederkremer 2009).

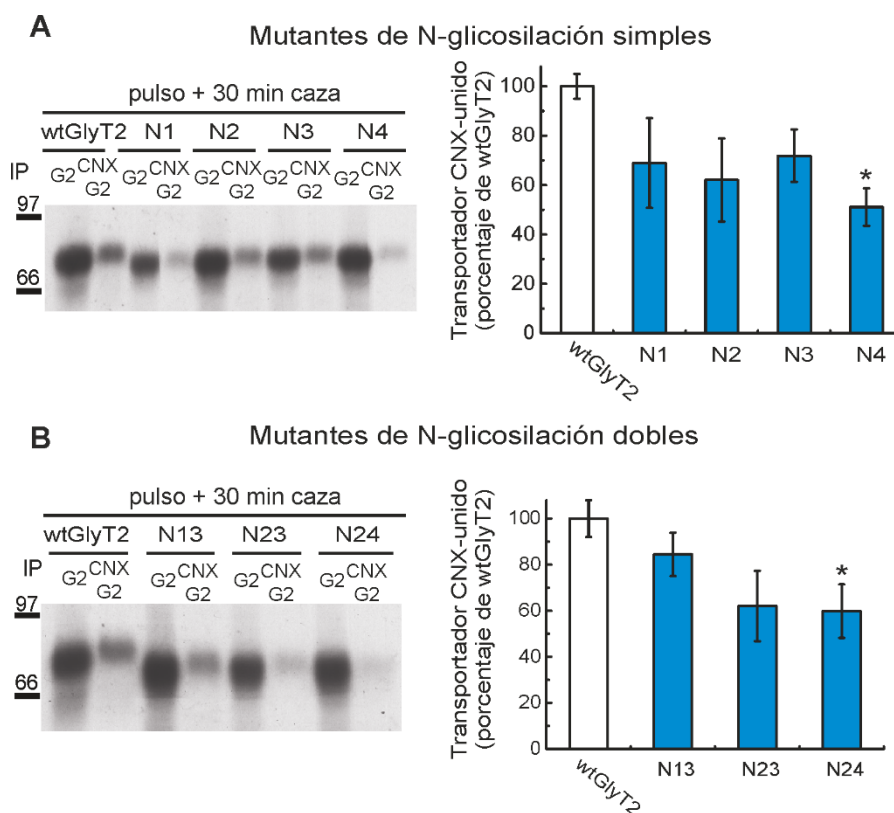
Figura 46. Efecto de la inhibición de manosidasas en la unión de GlyT2 a CNX



Las células COS7 que expresaban GlyT2 se trataron durante 2 h con vehículo (DMSO), deoximanojirimicina (DXM) 1 mM ó kifunensina (KIF) 1 μ M y se sometieron a un pulso de 15 minutos con [35 S]metionina/cisteína y una caza de 30 min. Los lisados celulares se inmunoprecipitaron con el anticuerpo anti-GlyT2 (G2) o se realizó una inmunoprecipitación secuencial con los anticuerpos frente a CNX y GlyT2 (CNX G2). Las muestras se sometieron a electroforesis y fluorografía. El panel derecho muestra el análisis por densitometría de las bandas de 3 experimentos y representa el porcentaje del precursor de GlyT2 total unido a CNX en cada condición (\pm error estándar de la media (SEM)). *** $p < 0,0001$ con respecto al control (test t-Student).

La mayor especificidad y permeabilidad a través de membrana de los inhibidores de manosidasa frente a los inhibidores de glucosidasas podría explicar su mayor eficiencia en la reducción de la expresión del transportador maduro (Compain y col. 2007). La eliminación de azúcares en los mutantes desarrollados también obstaculizó la interacción con CNX medida después de un pulso de 15 minutos y una caza de 30 minutos. Sin embargo, estos experimentos revelaron que no existía correlación entre la eliminación de los glicanos y la interacción con CNX. De hecho, dependiendo del mutante sencillo o múltiple analizado, se observó un 60-80% de la cantidad unida a CNX del transportador silvestre (Figura 47A,B)

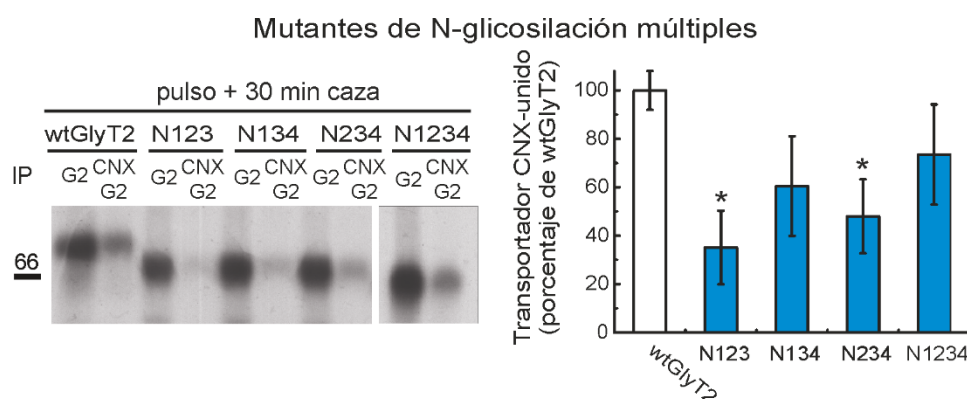
Figura 47. Co-inmunoprecipitación de mutantes de N-glicosilación de GlyT2 con CNX



Las células COS7 que expresaban los mutantes simples o dobles de N-glicosilación indicados se sometieron a un pulso de 15 minutos con [³⁵S]metionina/cisteína y una caza de 30 min. Los lisados celulares se inmunoprecipitaron con el anticuerpo anti-GlyT2 (G2) o se realizó una inmunoprecipitación secuencial con los anticuerpos frente a CNX y GlyT2 (CNX G2). Las muestras se sometieron a electroforesis y fluorografía. El panel derecho muestra en cada caso el análisis por densitometría de las bandas de 3 experimentos y representa el porcentaje del precursor de GlyT2 total unido a CNX en cada condición (\pm error estándar de la media (SEM)). * $p < 0,05$ con respecto a GlyT2 silvestre (test ANOVA + pruebas Post Hoc de Tukey).

Además, la retirada de 3 ó 4 sitios de N-glicosilación no impidió la unión a CNX. Se determinó que una cantidad considerable del mutante deficiente en N-glicosilación se unió a CNX y se recuperó por inmunoprecipitación secuencial (Figura 48), lo que puede sugerir que la asociación con CNX se produzca a través tanto de azúcares como de polipéptidos. En consecuencia, la reducida interacción con CNX que presentó el mutante N4 se debió posiblemente a la participación de N366 en la interacción con CNX o a una alteración conformacional de GlyT2 como consecuencia de la retirada del N-glicano.

Figura 48. Co-inmunoprecipitación de mutantes múltiples de N-glicosilación de GlyT2 con CNX

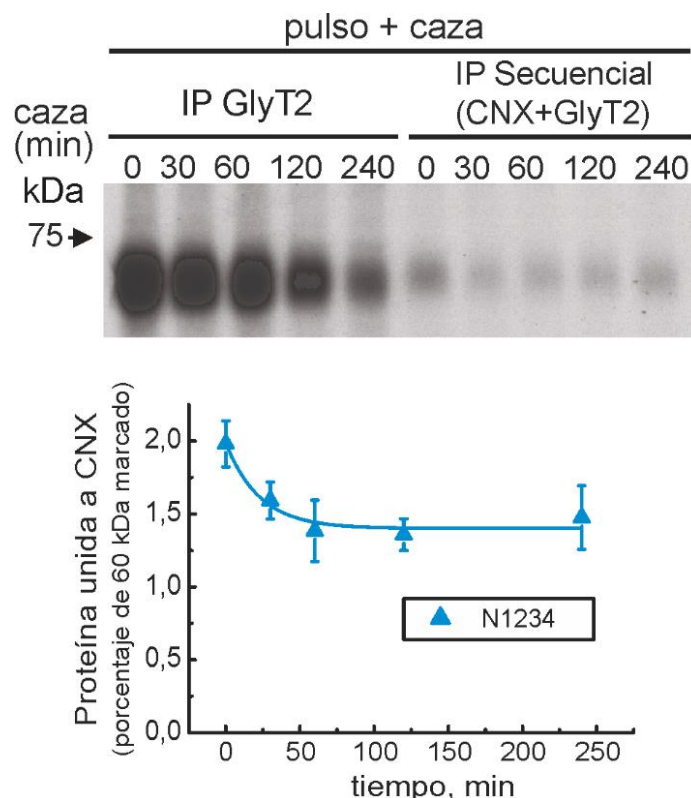


Las células COS7 que expresaban los mutantes múltiples de N-glicosilación indicados se sometieron a un pulso de 15 minutos con [³⁵S]metionina/cisteína y una carga de 30 min. Los lisados celulares se inmunoprecipitaron con el anticuerpo anti-GlyT2 (G2) o se realizó una inmunoprecipitación secuencial con los anticuerpos frente a CNX y GlyT2 (CNX G2). Las muestras se sometieron a electroforesis y fluorografía. El panel derecho muestra en cada caso el análisis por densitometría de las bandas de 3 experimentos y representa el porcentaje del precursor de GlyT2 total unido a CNX en cada condición (\pm error estándar de la media (SEM)). * $p < 0,05$ con respecto a GlyT2 silvestre (test ANOVA + pruebas Post Hoc de Tukey).

4.3.3 Propiedades del mutante completamente deglicosilado de GlyT2 (N1234)

El estudio del comportamiento del mutante N1234, que carece de sitios aceptores de N-glicanos, proporcionó una mayor evidencia sobre la implicación de las interacciones proteína-proteína en la unión de GlyT2 a CNX. En contra de lo descrito para GlyT2 silvestre, que tal y como se ha apuntado previamente se asociaba de forma transitoria a CNX (Figura 39), el mutante se acopla a la chaperona de forma más persistente, tal y como revelaron los experimentos de inmunoprecipitación secuencial y pulso-caza con anticuerpos frente a CNX y GlyT2 (Figura 49).

Figura 49. Propiedades de unión del mutante deficiente de N-glicosilación de GlyT2 a CNX mediante experimentos pulso-caza e inmunoprecipitación secuencial con anticuerpos frente a CNX y GlyT2



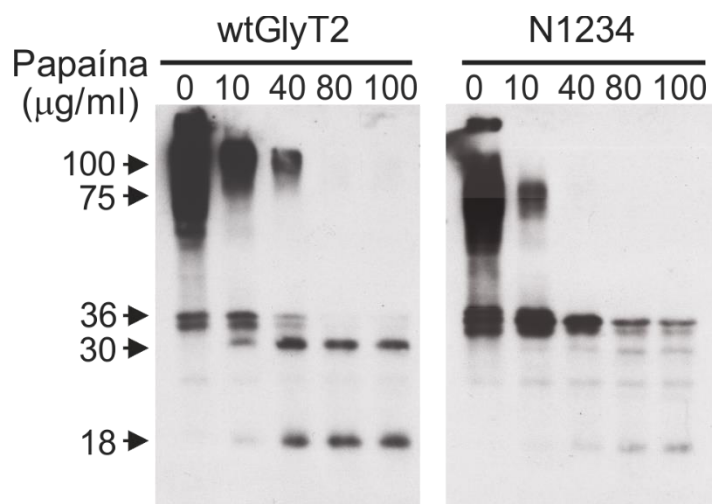
Las células COS7 que expresaban el mutante N1234 se sometieron a un pulso de 15 minutos con [35 S]metionina/cisteína seguido de caza según el tiempo indicado. Los lisados celulares se inmunoprecipitaron con el anticuerpo anti-GlyT2 (IP GlyT2) o se realizó una inmunoprecipitación secuencial con los anticuerpos frente a CNX y GlyT2 (CNX+GlyT2). Las muestras se sometieron a electroforesis y fluorografía. El panel inferior muestra el análisis por densitometría de las bandas de 2 experimentos y representa el porcentaje del mutante N1234 unido a CNX en cada condición (\pm error estándar de la media (SEM)).

Este hallazgo se correspondió con una reducción en la expresión en la superficie y menor V_{\max} del transporte de glicina en este mutante (Figura 42A-C) y sugiere que si el transportador no está glicosilado no es capaz de pasar el control de calidad de CNX fácilmente, un chequeo que deben superar las glicoproteínas de nueva síntesis en el RE (Korkhov y col. 2008).

La unión de larga duración del mutante deglicosilado de GlyT2 y la chaperona podría estar reflejando una alteración en la estructura tridimensional del mutante que es detectada por CNX. De hecho, el mutante mostró una mayor sensibilidad proteolítica en una serie de experimentos que se realizaron utilizando GlyT2 silvestre y el mutante N1234 sometidos a proteólisis con concentraciones crecientes de papaína, y que dieron lugar a fragmentos proteolíticos de bajo peso molecular (36, 34, 30 y 18 kDa) que se pudieron detectar con un anticuerpo frente a la región N-terminal de GlyT2 a concentraciones inferiores de la proteasa (Figura 50). Estos

resultados podrían estar indicando un mal plegamiento de la proteína mutante, aunque también podrían relacionarse con una protección frente a proteólisis mediada por glicanos.

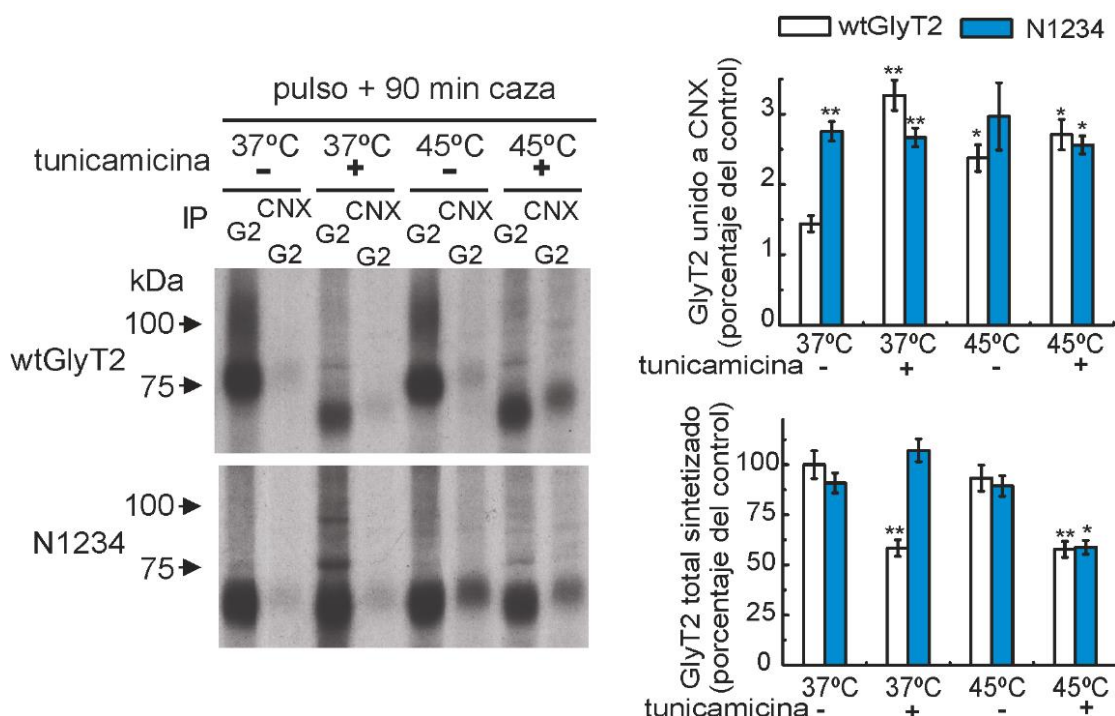
Figura 50. Proteólisis limitada con papaína de GlyT2 y el mutante deficiente de N-glicosilación



Las fracciones enriquecidas en membranas de células COS7 que expresaban GlyT2 silvestre o el mutante N1234 (12,5 µg) se digirieron durante 15 min a 22°C con concentraciones crecientes de papaína y se analizaron mediante inmunodetección utilizando anticuerpos frente al dominio N-terminal de GlyT2.

Además del efecto inhibitor de la N-glicosilación, la tunicamicina puede mediar la respuesta a proteínas desplegadas (UPR), una respuesta al estrés celular del RE, y actuar por lo tanto como un agente que provoca el mal plegamiento del transportador cuando se usa a altas concentraciones o bien durante periodos de incubación prolongados (Kaufman 1999). Se plantearon experimentos de pulso-caza en presencia de este inhibidor con periodos de carga más prolongados (90 min) y a diferentes temperaturas (Figura 51).

Figura 51. Pulso-caza en presencia de tunicamicina de células COS7 que expresan GlyT2 o el mutante deficiente de N-glicosilación a diferentes temperaturas



Las células COS7 que expresaban GlyT2 silvestre o el mutante N1234 se trataron con vehículo (-) o tunicamicina 10 µg/ml (+) durante 3 h a 37°C, y tras ello se sometieron a un pulso de 15 minutos con [³⁵S]metionina/cisteína y una caza de 90 min a la temperatura indicada en cada caso. Los lisados celulares se inmunoprecipitaron con el anticuerpo anti-GlyT2 (G2) o se realizó una inmunoprecipitación secuencial con los anticuerpos frente a CNX y GlyT2 (CNX G2). Las muestras se sometieron a electroforesis y fluorografía. Los paneles de la derecha indican el análisis por densitometría de las bandas de 3 experimentos y representa el porcentaje del precursor de GlyT2 total unido a CNX en cada condición (panel superior) y del transportador total sintetizado (panel inferior). Las barras representan el error estándar de la media (SEM). *p<0,05; **p<0,01 con respecto al control del GlyT2 silvestre (test t-Student).

En presencia de altas concentraciones de tunicamicina, la unión del GlyT2 silvestre a CNX se potenció a 37°C y en menor medida a 45°C, lo que sugiere que esta asociación se ve incrementada como consecuencia del desplegamiento del transportador debido a tunicamicina. El efecto fue menos evidente a 45°C debido a que tanto la presencia de tunicamicina como la temperatura elevada provocan un desplegamiento general de las proteínas (Figura 51 panel superior derecho). Por el contrario, el mutante de GlyT2 N1234 mostró una mayor unión a CNX en todas las condiciones ensayadas, y esta asociación no se vio afectada por la presencia de tunicamicina o por el incremento gradual de la temperatura del ensayo.

Aunque los resultados no se muestran en esta tesis, este mismo patrón se observó también en experimentos realizados con taspargina, otro inductor de UPR (Arribas-Gonzalez y col. 2013).

Por otro lado, la cantidad total de GlyT2 silvestre sintetizado a 37°C se redujo en presencia de tunicamicina, mientras que en el caso del mutante no se vio alterada. Tal y como cabía esperar, se detectó una reducción general en la síntesis de proteína global a 45°C (Figura 51 panel inferior derecho). Estos resultados sugieren que la estructura tridimensional del mutante N1234, que no contiene cadenas de azúcares, está alterada con respecto al transportador silvestre, lo que se correspondería con su patrón de proteólisis y con el considerable incremento en la K_m del transporte de glicina que se ha descrito para este mutante (Figura 50 y Figura 42E).

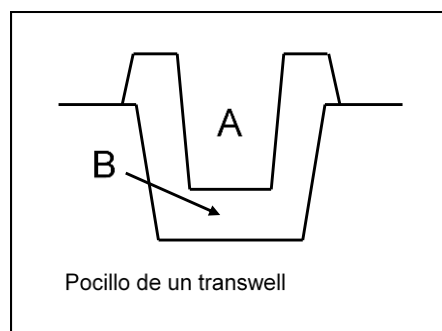
Otros experimentos realizados por el grupo de investigación y que no se han incluido en esta tesis indicaron que el transportador mutante N1234 responde a la sobreexpresión de CNX con un incremento en la expresión menor que el transportador silvestre, aunque con un aumento en la actividad de transporte comparable, lo que sugiere que la poca proteína que llega a membrana se encuentra plegada más eficientemente. Estos resultados apuntan a que CNX es capaz de discriminar entre diferentes estados conformacionales de GlyT2 de forma independiente de la presencia de glicanos y puede seleccionar la estructura más competente y funcional del transportador (Arribas-Gonzalez y col. 2013).

4.3.4 Determinación de la actividad de transporte de los mutantes, expresión en superficie y distribución asimétrica en células polarizadas

Distribución asimétrica de GlyT2 en células polarizadas (MDCK)

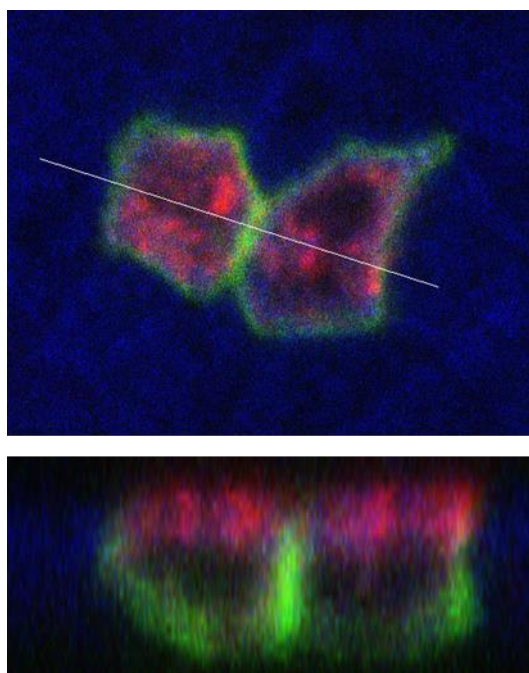
En trabajos previos del laboratorio se había observado que GlyT2 presenta una distribución polarizada tanto en neuronas, principalmente en los axones (Martinez-Maza y col. 2001) como en células MDCK, principalmente en la zona apical (Poyatos y col. 2000). Las células MDCK cultivadas en pocillos tipo *transwell* (Figura 52) se polarizan presentando una zona apical y una basolateral, de forma que la zona apical (A) tiene características comunes al compartimento axonal de una neurona y la basolateral (B) a la región somato-dendrítica neuronal. Muchas proteínas neuronales mantienen la distribución asimétrica en células MDCK (Poyatos y col. 2000).

Figura 52. Esquema del pocillo tipo transwell utilizado para cultivos celulares polarizados



En la Figura 53 se puede apreciar como GlyT2 (rojo) se distribuye principalmente en la membrana apical, GLYT1 (verde) en la membrana basolateral y CNX (azul) en el citoplasma.

Figura 53. Distribución celular de GlyT2 en células MDCK polarizadas

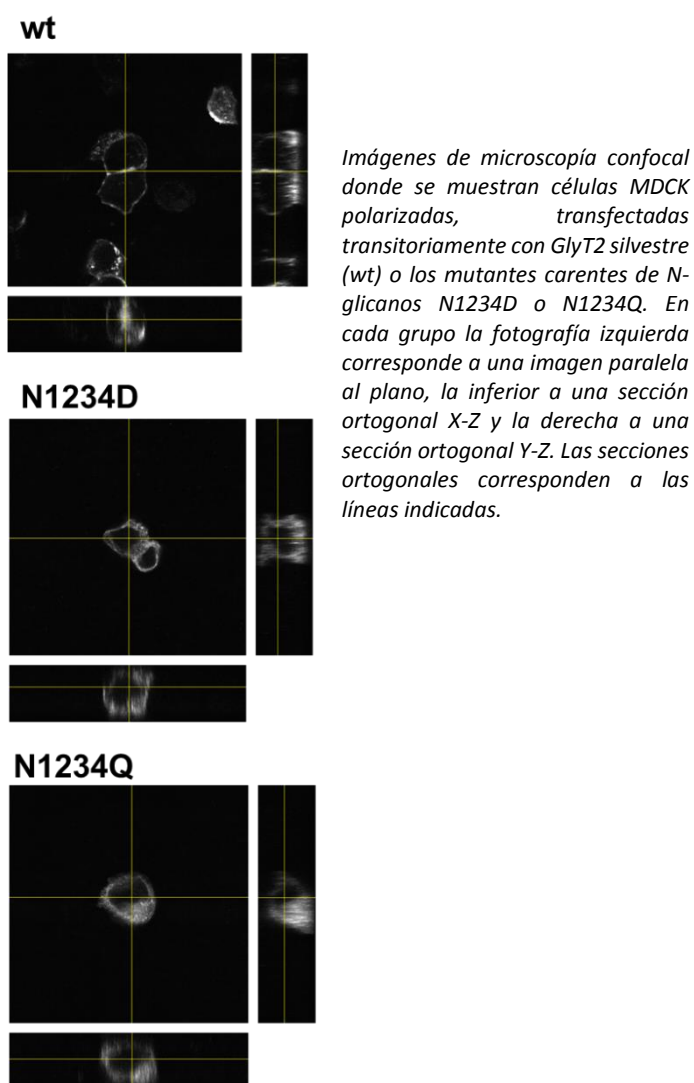


Imágenes de microscopía confocal donde se muestran células MDCK polarizadas, transfectadas transitoriamente con GlyT2 y GLYT1-GFP (verde), fijadas y teñidas con anticuerpos contra GlyT2 (rojo) y CNX (azul). Se examinaron las células mediante microscopía confocal. La fotografía superior corresponde a una imagen paralela al plano y la inferior a una sección ortogonal (eje X-Z). La sección X-Z corresponde a la línea indicada.

En el presente trabajo, se planteó la hipótesis de que los distintos sitios de N-glicosilación de GlyT2 también tuvieran papeles diferenciales en esta distribución polarizada del transportador. Para investigar esta posibilidad, se transfectaron células MDCK con los distintos mutantes de N-glicosilación caracterizados en esta tesis.

En la Figura 54 se observa que el mutante de GlyT2 carente de N-glicanos con las asparaginas sustituidas ya sea por aspartatos (N1234D) o por glutaminas (N1234Q), pierde la capacidad de situarse específicamente en la zona apical de la célula MDCK y, aparentemente, queda distribuido por todo el citoplasma, lo que sería coherente con las observaciones previamente descritas sobre la llegada a membrana y la actividad de transporte (Poyatos y col. 2000, Martínez-Maza y col. 2001).

Figura 54. Distribución celular de GlyT2 silvestre y diferentes mutantes en células MDCK polarizadas



Se realizaron varias preparaciones con los diferentes mutantes que se observaron con el microscopio confocal y cuyos resultados se recogen en la Tabla 2.

Tabla 2. Distribución apical de GlyT2 silvestre y diferentes mutantes en células MDCK polarizadas

	Nº preparaciones	GlyT2 Apical	Distribución apical
silvestre	5	5	+++
N1D	2	2	+++
N2D	2	2	+++
N3D	2	2	+++
N4D	5	3	++
N13D	2	1	++
N14D	3	1	+
N23D	2	2	+++
N24D	4	3	+++
N123D	2	0	-
N134D	4	0	-
N234D	6	2	+
N1234D	3	3	-
N1Q	2	2	+++
N2Q	5	5	+++
N3Q	2	2	+++
N4Q	4	4	+++
N13Q	7	3	+
N14Q	2	2	+++
N23Q	4	4	+++
N24Q	3	3	+++
N34Q	3	3	+++
N123Q	4	1	+
N234Q	3	0	-
N1234Q	1	0	-

Se representa la evaluación cualitativa de los experimentos de inmunofluorescencia y microscopía en células MDCK polarizadas realizados con GlyT2 silvestre o los diferentes mutantes. La columna "distribución apical" representa de forma cualitativa una distribución predominantemente apical (+++) o ausencia de polarización (-).

La distribución de los mutantes confirma que la ausencia de 4 ó 3 de los azúcares impide la distribución polarizada (Poyatos y col. 2000). En general, estos resultados revelan que la sustitución a D o Q sí parece tener un efecto diferencial. Entre los mutantes a D, los datos preliminares sugieren que la ausencia de los glicanos en 1 y 4 produce la mayor pérdida de distribución apical. Sin embargo, los mutantes a Q podrían implicar adicionalmente a la posición 3.

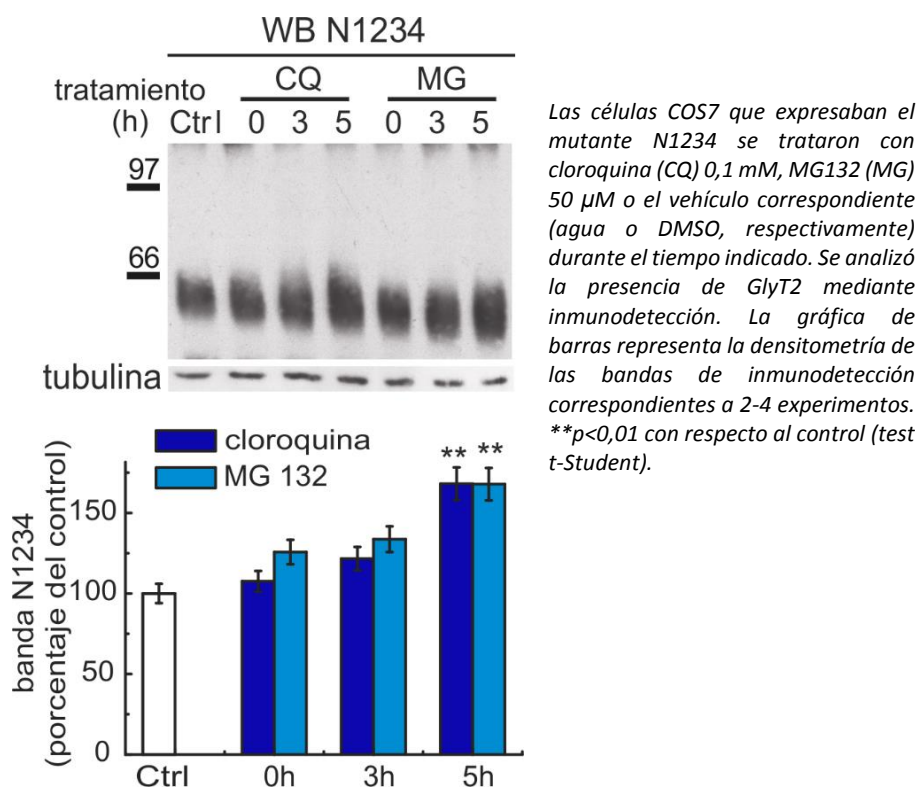
4.3.5 Mecanismos de degradación de GlyT2: inhibición del lisosoma o del proteasoma

Rutas de degradación de GlyT2 silvestre y mutante N1234

La unión duradera del mutante de GlyT2 carente de N-glicanos con CNX sugiere su incapacidad para superar un control de calidad adecuado. Esto puede suponer que el transportador mutante sea dirigido a su degradación en el proteasoma, el destino final de las proteínas de membrana que no se han plegado correctamente durante su procesamiento (Morello y col. 2001, Molinari y col. 2003, Esapa y col. 2005).

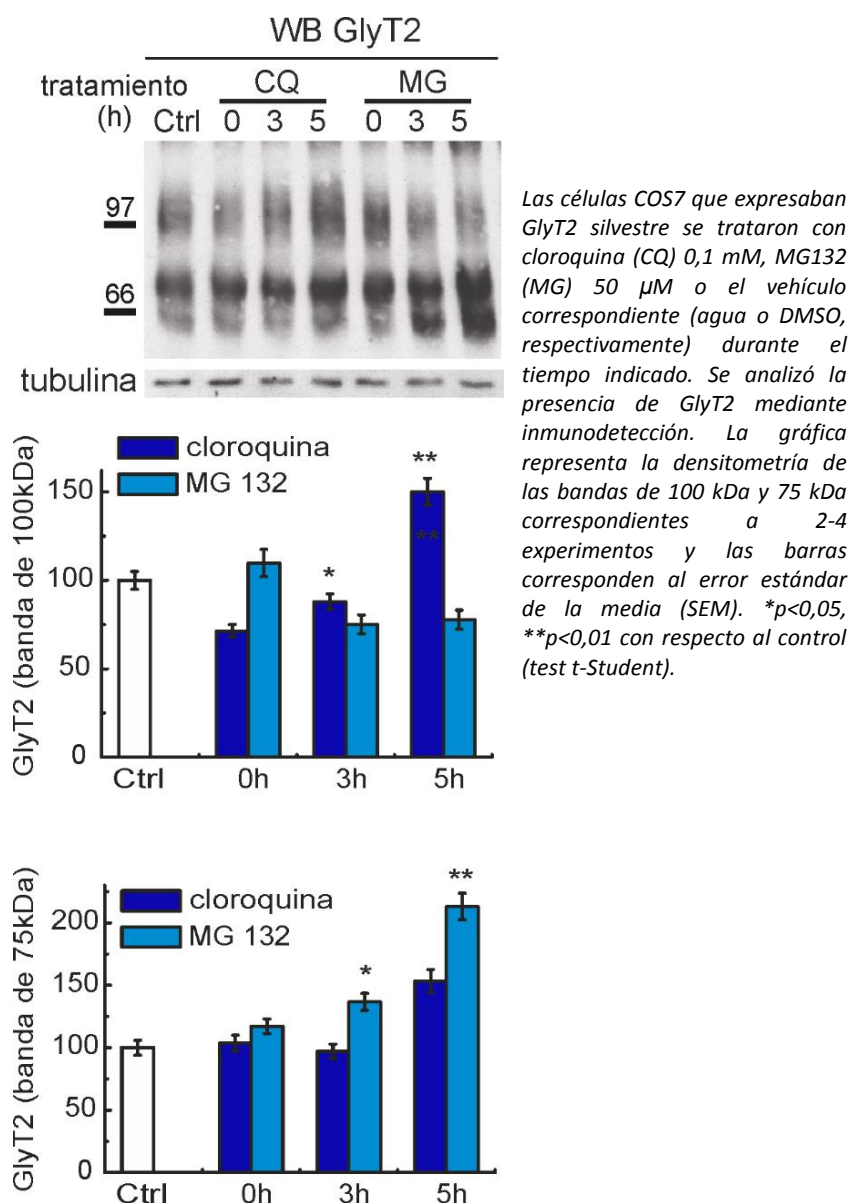
Para profundizar en este estudio, se plantearon experimentos donde las células COS7 que expresaban N1234 se sometían a tratamiento con el inhibidor del lisosoma cloroquina, o los inhibidores del proteasoma MG132 y lactacistina. Este tratamiento originó un aumento en los niveles de transportador mutado, tal y como se aprecia en la Figura 55. Estos resultados pueden indicar que el mutante utiliza tanto la vía del lisosoma como del proteasoma para su degradación.

Figura 55. Degradación de GlyT2 en el mutante carente de N-glicanos N1234



Sin embargo, cuando los mismos experimentos se realizaron utilizando células COS7 que expresaban el transportador GlyT2 silvestre, se comprobó que el efecto era precisamente el contrario: mientras que el tratamiento con el inhibidor del lisosoma cloroquina aumentó los niveles de transportador maduro (100 kDa), la inhibición del proteasoma los redujo (Figura 56).

Figura 56. Degradación de GlyT2 en células que expresan GlyT2 silvestre



Además, la banda de aproximadamente 60 kDa aumentó visiblemente en los inmunoprecipitados de células tratadas con inhibidores de proteasoma. El peso molecular aparente de esta banda coincide con el núcleo de la proteína deglicosilada, lo que sugiere que representa una forma temprana del transportador o bien una forma deglicosilada y retrotranslocada para ERAD. No obstante, la inhibición del proteasoma en las condiciones

experimentales ensayadas podría inducir estrés en el RE y afectar de manera global al plegamiento de proteínas en el RE. De hecho, datos complementarios obtenidos por el grupo de investigación indicaron que el tratamiento de 3 horas con concentraciones de MG132 inferiores a las utilizadas en este estudio generaba la activación la proteína-kinasa PERK mediante fosforilación si bien no se producía sobreexpresión de BiP, lo que sugiere que el bloqueo del proteasoma produce una forma moderada de UPR. Por ello, aunque se ha descrito claramente la degradación mediada por lisosoma tanto en el caso de GlyT2 silvestre como en el mutante N1234, ya que ambos se acumulan en presencia de inhibidores de la actividad lisosomal, este efecto es más evidente en el caso del transportador silvestre. La contribución del proteasoma en la degradación del mutante, requerirá datos adicionales debido a las alteraciones de la proteostasis que genera la inhibición del proteasoma.

5. DISCUSIÓN

5.1 Localización celular y subcelular de GlyT2 en neuronas del tallo cerebral y médula espinal

5.1.1 GlyT2 está presente en la membrana plasmática de neuronas inhibitoras, pero en mayor medida se encuentra en vesículas intracelulares

En esta tesis se ha estudiado la localización celular y subcelular de GlyT2 en neuronas del tallo cerebral y médula espinal. Mediante el uso de técnicas bioquímicas e inmunológicas en combinación con microscopía electrónica y confocal, hemos identificado una fracción intracelular de GlyT2 presente en estructuras vesiculares heterogéneas que contienen sinaptofisina, Rab11 y, en algunos casos, VIAAT. Mediante el silenciamiento de Rab11 utilizando mutantes dominantes negativos (dn), hemos obtenido una evidencia funcional de que esta GTPasa está implicada en la regulación del tráfico de GlyT2, lo que a su vez concuerda con su presencia en vesículas que contienen el transportador.

Hemos confirmado que GlyT2 está presente exclusivamente en neuronas inhibitoras ya que su localización celular se solapa con VIAAT, pero no con VGLUT (Dumoulin y col. 1999). Estudios anteriores y posteriores a este trabajo han confirmado esta conclusión. Recientemente ha sido generada una cepa de ratones transgénicos que expresan la proteína fluorescente EGFP bajo el control de un fragmento del promotor de GlyT2. En estos ratones, la expresión de EGFP se superpone en gran medida con la inmunoreactividad a GlyT2 en terminales axónicos, así como con la inmunoreactividad al neurotransmisor glicina en los somas neuronales. Este trabajo y algunos adicionales confirman nuestros datos, pues las neuronas con gran contenido en glicina (presumiblemente incluida en vesículas sinápticas por VIAAT), contienen GlyT2 (Poyatos y col. 1997, Zeilhofer y col. 2005).

Mediante microscopía inmunomicroelectrónica del tejido de tallo cerebral y de sinaptosomas y marcaje de superficie por biotilación, hemos demostrado que en los terminales que contienen GlyT2, el transportador se distribuye entre un *pool* pequeño localizado en la superficie y otro *pool* intracelular. Este aspecto ha sido posteriormente confirmado mediante cuantificación de la proporción de GlyT2 que se encuentra asociado a *lipid rafts* en superficie (ver punto 4.2.1), que también conduce a la conclusión de que el pool de membrana es cuantitativamente menor que el intracelular. La fracción intracelular podría constituir un reservorio de GlyT2 exportable a la superficie de manera regulada, un comportamiento del transportador que ya ha sido

demostrado en respuesta a distintos estímulos reguladores (Geerlings y col. 2001, Jimenez y col. 2015, Villarejo 2017).

5.1.2 GlyT2 está presente en varios tipos de vesículas presinápticas

El fraccionamiento subcelular de tallo cerebral a partir de sinaptosomas lisados por choque osmótico facilitó la obtención de una fracción vesicular LP2 cuya centrifugación en gradiente de glicerol permitió separar claramente dos fracciones vesiculares: una enriquecida en proteínas de membrana plasmática GlyT2, GAT1, Na⁺/K⁺ ATPasa, y otra que contenía marcadores vesiculares como sinaptofisina, VAMP2, sinaptotagmina 2, VIAAT y Rab3A (Navone y col. 1986, McIntire y col. 1997, Sagne y col. 1997, Takamori y col. 2000, Fremeau y col. 2001, Takamori y col. 2006). Mediante esta purificación hemos obtenido una fracción de vesículas presinápticas que contienen GlyT2 en las que la distribución del transportador se solapa con la de proteínas sinápticas. Esta fracción vesicular ha sido analizada mediante microscopía electrónica de doble marcaje con peroxidasa y oro coloidal revelando que el transportador es abundante en las vesículas más grandes de unos 100-200 nm y colocaliza en ellas con sinaptofisina, Rab11 y VIAAT, aunque no con Rab5A, VAMP2, sinaptotagmina2 o GAT1. Cabe la posibilidad de que estos elementos sean de **origen endosomal**, tal y como se ha descrito para otros transportadores de neurotransmisores (Deken y col. 2003, Fornes y col. 2004), aunque la presencia de VIAAT sugiere una composición más heterogénea. En las vesículas pequeñas de alrededor de 50 nm hemos detectado también sinaptofisina y una cantidad considerable de Rab11, pero no VIAAT. Esta fracción puede corresponder con **vesículas de tráfico y/o intermediarios endosomales**.

La especificidad del inmunomarcaje con oro coloidal visualizado por microscopía electrónica en este trabajo ha sido alta pues el antígeno utilizado para la generación del anticuerpo (Nt-GlyT2-GST) siempre desplazó el marcaje, y no se detectó inmunodecoración en vesículas obtenidas de áreas cerebrales que no contienen neuronas glicinérgicas inhibitoras que, por lo tanto, no contienen GlyT2. Por otro lado, la ausencia de colocalización de GlyT2 con proteínas como Rab5A, sinaptotagmina 2, VAMP2, o GAT1 es otra prueba de especificidad y refuerza la validez del marcaje. Adicionalmente, los datos de colocalización mediante microscopía electrónica se han corroborado con los experimentos de inmunoadsorción utilizando un anticuerpo específico de GlyT2 para aislar las vesículas de LP2 que contienen el transportador. Este sistema consigue precipitar a GlyT2 incluido en su vesícula en ausencia de detergente. Las vesículas de GlyT2 inmunoadsorbidas contenían las mismas proteínas que se detectaron mediante

inmunomarcaje (sinaptofisina, VIAAT y Rab11), pero no presentaron Na⁺/K⁺ ATPasa ni Rab5A, sinaptotagmina 2, VAMP2 o GAT1, en concordancia con los datos de microscopía electrónica. Aunque el inmunoaislamiento de vesículas de GlyT2 ya había sido utilizado y validado previamente en el laboratorio (Geerlings y col. 2002), en esta tesis se ha confirmado que este procedimiento aísla vesículas a no ser que se incluya detergente en el medio, en cuyo caso las vesículas se solubilizan y GlyT2 aparece inmunoprecipitado en solitario en ausencia de proteínas asociadas.

En resumen, los datos recogidos de varios experimentos de diferente naturaleza apuntan a que los tres marcadores sinaptofisina, VIAAT y Rab11 están presentes en las vesículas que contienen GlyT2.

5.1.3 Rab11 está implicada en el tráfico intracelular de GlyT2 a través de endosomas de reciclaje

Hemos determinado la evidencia inequívoca de la especificidad de la asociación de Rab11 con las vesículas que contienen GlyT2 mediante una aproximación funcional alternativa basada en la coexpresión de GlyT2 recombinante con mutantes dominantes negativos (dn) de algunos miembros de la familia de GTPasas Rab, proteínas reconocidas como organizadoras del tráfico intracelular de proteínas en células eucariotas (Zerial y col. 2001). La coexpresión con Rab11dn y en menor medida con Rab4dn, pero no con Rab8dn, reduce de forma significativa los niveles de GlyT2 en membrana en estado estacionario, así como la velocidad de transporte de glicina de GlyT2. Concomitantemente se produce un incremento en la cantidad del transportador presente en el interior celular en colocalización con el marcador endosomal TfR. Puesto que Rab11 y Rab4 regulan el reciclaje lento y rápido hacia la membrana plasmática, respectivamente (Jordens y col. 2005, Jones y col. 2006), y Rab8 está implicada en el tráfico de proteínas desde el aparato de Golgi hacia la membrana plasmática (Huber y col. 1993, Zerial y col. 2001, Jordens y col. 2005), estos resultados indican que en estado estacionario son las GTPasas rabs presentes en endosomas de reciclaje las que se encuentran asociadas específicamente con las vesículas de GlyT2.

Los experimentos de doble marcaje en sinaptosomas de tallo cerebral muestran gran proximidad entre GlyT2 y Rab11, lo que es compatible con la presencia de ambas proteínas en el mismo compartimento endosomal y refuerza las evidencias funcionales. La asociación de

Rab11 con vesículas de GlyT2 concuerda con los datos conocidos de tráfico, ya que el transportador se recicla entre el interior celular y la superficie tanto constitutivamente como de forma regulada por distintas rutas de señalización (Fornes y col. 2008, de Juan-Sanz y col. 2013, Jimenez y col. 2015, Villarejo 2017). Estos resultados están en línea con experimentos de sobreexpresión del doble mutante Rab11dn que también provoca redistribución en la superficie celular de otras proteínas de membrana plasmática como TfR (Ren y col. 1998, Sheff y col. 1999, Uzan-Gafsou y col. 2007) o GLUT4 (Kessler y col. 2000, Uhlig y col. 2005). De hecho, Rab11 se ha identificado como un componente de las vesículas de GLUT4 aisladas de células de músculo cardíaco de rata (Kessler y col. 2000) y de las vesículas de GAT1 del tejido nervioso (Deken y col. 2003), lo que sugiere un papel más general de Rab11 en la composición de las vesículas que contienen transportadores como GlyT2. Sin embargo, el tráfico de GlyT2 y GAT1 debe realizarse a través de *pools* vesiculares distintos en los terminales inhibidores ya que, además de la ausencia de colocalización mostrada en esta tesis, las vesículas de GAT1 contienen Rab11 pero no sinaptofisina y VIAAT (Deken y col. 2003). Por el contrario, hay otros transportadores neuronales de membrana plasmática que sí contienen sinaptofisina en sus vesículas, como GLUT3 (Thoidis y col. 1999) o CHT (Ferguson y col. 2003). Aunque la sinaptofisina es una proteína muy abundante en vesículas sinápticas, su función no está completamente esclarecida. Recientemente se ha demostrado que puede regular la endocitosis de vesículas durante y después de la actividad neuronal sostenida (Kwon y col. 2011), por lo que la colocalización con sinaptofisina de las vesículas de GlyT2 podría estar relacionada con la regulación del tráfico del transportador en respuesta a la actividad neuronal (Geerlings y col. 2001, Villarejo 2017). También se ha demostrado la participación del Rab11 presente en vesículas sinápticas (Takamori y col. 2006) en la exocitosis de vesículas mediada por calcio (Khvotchev y col. 2003), papel que podría igualmente estar relacionado con la exocitosis mediada por despolarización inducida por calcio de GlyT2 en los sinaptosomas, previamente descrita por nuestro grupo (Geerlings y col. 2001). De hecho, un estudio demostró en neuronas colinérgicas que las vesículas que contienen el neurotransmisor también presentan tanto proteínas de membrana como transportadores vesiculares de acetilcolina, cuyo tráfico conjunto se lleva a cabo de forma dependiente de calcio (Ferguson y col. 2003).

En el contexto del sistema nervioso, un estudio llevado a cabo por el grupo de Reinhard Jahn definió la composición cualitativa y cuantitativa de una vesícula sináptica (Takamori y col. 2006) y, sorprendentemente, se determinó que el proteoma de la vesícula sináptica contiene, además de proteínas sinápticas, una elevada cantidad de proteínas SNARE, proteínas Rab (Rab11), y

proteínas de membrana plasmática como pueden ser canales y transportadores que se asocian de forma transitoria a la vesícula. Los autores de este estudio postularon la hipótesis de que los terminales utilizan las vesículas sinápticas no solo para liberar neurotransmisores a la hendidura sináptica, sino también para el tráfico de proteínas de membrana plasmática mediante endo y exocitosis. Aunque las vesículas de GlyT2 no contienen VIAAT y VAMP2, los datos recogidos en esta tesis son compatibles con la posibilidad de que, en los terminales glicinérgicos, GlyT2 sea una de las proteínas que se asocia con las vesículas sinápticas en algunos pasos de la ruta de reciclaje. Esta hipótesis concuerda con el hecho de que los marcadores presinápticos glicinérgicos y GABAérgicos no se segreguen en las células de Golgi que coliberan ambos neurotransmisores (Dugue y col. 2005) y con los datos de delección del gen de VIAAT que muestran la pérdida conjunta de la neurotransmisión glicinérgica y GABAérgica (Wojcik y col. 2006).

5.2 Localización de GlyT2 en microdominios lipídicos ricos en colesterol o lipid rafts

Los resultados obtenidos en esta tesis muestran evidencias bioquímicas, morfológicas y farmacológicas de la asociación de GlyT2 a los dominios *rafts* en la membrana plasmática de células de tallo cerebral. Esta asociación afecta tanto a los niveles de GlyT2 en membrana como a su actividad en el transporte de glicina.

5.2.1 GlyT2 se asocia a los microdominios *rafts* de membrana plasmática y membranas intracelulares

La asociación de GlyT2 con lipid rafts se ha sustentado en varias evidencias: 1) GlyT2 procedente de sinaptosomas y de neuronas primarias de tallo cerebral se localiza en las membranas de baja densidad insolubles en Triton X-100 junto a flotilina, una proteína marcadora de dominios *rafts*, y esta asociación es sensible a la presencia de M β CD. 2) La presencia de GlyT2 en dominios ricos en colesterol de la membrana plasmática ha sido visualizada en experimentos de microscopía confocal. GlyT2 se distribuye siguiendo un patrón punteado en la superficie de las neuronas de tallo cerebral y este patrón se ve modificado cuando se elimina el colesterol de la membrana con M β CD a concentraciones que aún preservan la integridad neuronal pues no se altera el marcaje de MAP2. 3) Las balsas lipídicas purificadas en gradiente de sacarosa a partir de sinaptosomas de tallo cerebral se marcan con partículas de oro coloidal asociadas a GlyT2 y

pueden observarse por microscopía electrónica. 4) La reducción de los niveles de componentes de los rafts: colesterol y esfingolípidos reducen el transporte de glicina de GlyT2.

Aunque en las membranas de tallo cerebral la mayor parte de GlyT2 se encuentra en las fracciones *no-rafts*, la proporción de GlyT2 localizada en la superficie de la membrana se asocia a las fracciones *rafts*. En concreto, mediante experimentos de marcaje de superficie de GlyT2 en fracciones *rafts* y *no-raft* hemos demostrado que cerca del 13% del GlyT2 total se asocia con *rafts*. Teniendo en cuenta que aproximadamente la mitad de esta cantidad está biotilada en la superficie, podemos decir que alrededor del 7% del GlyT2 total está localizado en microdominios *rafts* en la membrana plasmática mientras que otro 7% está asociado a dominios *rafts* intracelulares. Además, ya que el 5-10% del total de GlyT2 está biotilado en la superficie de sinaptosomas de tallo cerebral de rata, podemos concluir que prácticamente todo el GlyT2 que aparece en membrana plasmática está asociado a dominios *rafts*. Estos resultados se han confirmado en experimentos de microscopía electrónica donde las fracciones *rafts* purificadas mediante gradiente de sacarosa de sinaptosomas de tallo cerebral se marcan con oro coloidal asociado a GlyT2.

La presencia de GlyT2 tanto en dominios *rafts* de membranas intracelulares como en membrana plasmática sugirió a partir de este trabajo que GlyT2 podía estar implicado en todos los procesos mediados por *rafts*, incluyendo el tráfico hacia y desde la membrana plasmática. Un estudio posterior ha estudiado el papel de los rafts en la endocitosis constitutiva y regulada de GlyT2 y ha demostrado que GlyT2 localizado en balsas lipídicas de la membrana plasmática permanece asociado a *rafts* durante la endocitosis constitutiva mediada por clatrina, aunque en la endocitosis regulada por PKC se desplaza lateralmente de los *rafts* en superficie y luego es internalizado por la vía de clatrina (de Juan-Sanz y col. 2011).

5.2.2 El funcionamiento óptimo de GlyT2 depende de su asociación a microdominios de membrana ricos en colesterol

La presencia de GlyT2 en los dominios *rafts* de la membrana plasmática y el efecto que tiene M β CD sobre el transportador indican que el ambiente lipídico regula el transporte de glicina. De hecho, hemos demostrado que el transporte de glicina mediado por GlyT2 se ve alterado, tanto en sinaptosomas como en neuronas, cuando se disminuyen los niveles de colesterol y esfingomielinina en los dominios *rafts* de la membrana mediante el uso de fármacos como M β CD,

filipina, nistatina, mevastatina y mevalonato y esfingomielinasa. No se conocen con exactitud cuáles de los efectos de la esfingomielinasa se deben a la depleción de esfingomielina o a la formación de ceramidas, que se ha demostrado desplazan al colesterol de los dominios *rafts* de la membrana (Yu y col. 2005). Sin embargo, el rescate de la actividad de GlyT2 cuando se utiliza M β CD unido a colesterol sugiere que son los propios niveles de colesterol los que modulan el transporte de glicina. De hecho, para que GlyT2 funcione adecuadamente requiere su presencia en los dominios *rafts* de membrana. Hemos demostrado la reducción en la V_{max} del transporte de glicina tras el tratamiento con M β CD, lo que puede deberse tanto a la disminución del número de moléculas activas del transportador en la membrana como a la reducción de la eficiencia en la recaptación del mismo. Nuestros resultados son compatibles con la primera opción, aunque no podemos descartar que la segunda también ocurra. Si el transportador estuviera inactivo cuando se localizara en los dominios *no-raft*, el tratamiento con M β CD podría reducir la V_{max} al provocar el desplazamiento de los transportadores desde los dominios *rafts*, donde están activos, a los *no-raft*, donde se encuentran inactivos.

La retirada de colesterol de la membrana produce el desplazamiento lateral de aproximadamente el 3-4% del total de GlyT2 de superficie desde los dominios *rafts* a los dominios *no-rafts*, pero no su internación. Este comportamiento del transportador sugiere que el colesterol afecta a la movilidad y localización de GlyT2 en la membrana. Cuando se reducen los niveles de colesterol, se pueden dispersar las moléculas de GlyT2 dentro de la membrana, tal y como se ha demostrado previamente para otras proteínas (Vereb y col. 2000, O'Connell y col. 2005, Chen y col. 2006, Pike 2006, Adkins y col. 2007).

Otra cuestión podría ser cómo puede el desplazamiento del transportador desde los dominios *rafts* a los *no-raft* inactivar el transporte de glicina por GlyT2. Por un lado, podría tratarse de una inactivación indirecta, afectando a las interacciones dependientes de colesterol de GlyT2 con otras proteínas reguladoras. De hecho, varios estudios recientes han demostrado en el laboratorio que GlyT2 se asocia con distintas proteínas de membrana como la Na⁺/K⁺ATPasa o la unidad funcional PMCA/NCX y que estas interacciones ocurren específicamente en *rafts* (de Juan-Sanz y col. 2013, de Juan-Sanz y col. 2014). Teniendo en cuenta que la inhibición de estas proteínas del interactoma de GlyT2 inhibe específicamente al transportador, la ausencia de asociación de GlyT2 con estas proteínas que sucedería si GlyT2 sale de *rafts*, podría ser la causa de su inactivación. Por otro lado, puede producirse una inactivación directa, mediante la modulación lipídica del sitio activo del propio transportador. Esto estaría en consonancia con otros estudios que han demostrado previamente la relevancia del colesterol para el transporte

óptimo de GABA dependiente de sodio reconstituido en proteoliposomas (Shouffani y col. 1990) y para el transporte de serotonina en células estables (Scanlon y col. 2001, Magnani y col. 2004). En los últimos años se ha publicado un modelo estructural específico de GlyT2 que ha reforzado esta idea. Se trata de un bolsillo de unión a lípidos cerca del sitio de unión del sustrato en el transportador de glutamato dependiente de sodio (Boudker y col. 2007) que contiene un motivo de unión a sodio relacionado con los transportadores SLC6 (Yamashita y col. 2005). Asimismo, se han cocristalizado moléculas de colesterol junto con los transportadores eucariotas SLC6 DAT de *Drosophila* (Penmatsa y col. 2013) y SERT humano, si bien la localización de las mismas no coincide en ambos transportadores (Coleman y col. 2016).

Otra hipótesis que podría justificar el efecto del ambiente lipídico sobre la actividad de GlyT2 es que las modificaciones en la composición de la membrana puedan estar alterando la estructura cuaternaria de la proteína y, de este modo, afectando a la función de la misma. Se ha demostrado en los últimos años que los transportadores SLC6 forman oligómeros necesarios para la exportación desde el RE (Kilic y col. 2000, Farhan y col. 2006). En el caso de GlyT2, aunque se ha descrito la existencia de dímeros tras tratamiento con agentes entrecruzantes (Bartholomaeus y col. 2008), probablemente no relevantes fisiológicamente, el análisis de diferentes mutantes de hiperplexia dominantes sí que ha evidenciado la existencia de formas oligoméricas. No obstante, la interfase de oligomerización no está establecida. Un estudio en curso en el laboratorio utilizando la electroforesis en condiciones nativas (*blue native*) ha encontrado que el transportador se organiza en dímeros y terámeros estabilizados mediante puentes disulfuro e interacciones hidrofóbicas y se encuentra en camino de elucidar los residuos implicados en la interfase de oligomerización (Arribas-González y col. manuscrito en preparación). Por lo tanto, aquellas perturbaciones en la estructura de la membrana que pudieran afectar de manera indirecta a la oligomerización de GlyT2 podrían alterar también su tráfico, reteniendo a la proteína en compartimentos intracelulares, y afectar a su vez a la función del transportador en la membrana (Bartholomaeus y col. 2008). Asimismo, la actividad de GlyT2 podría ser directamente sensible a la presencia de ciertos lípidos, lo que parece desprenderse de su inhibición por ciertos inhibidores alostéricos de naturaleza lipídica como ciertos endocannabinoides (N-araquidonil glicina) (Vandenberg y col. 2016).

5.3 Análisis de la biogénesis y la modificación por N-glicosilación de GlyT2

5.3.1 GlyT2 se sintetiza en el RE como un precursor inmaduro glicosilado

Se ha abordado el estudio de la biogénesis de GlyT2 investigando el papel de su N-glicosilación, así como la implicación de algunas chaperonas en el procesamiento. El sistema de células COS7 utilizado donde el transportador puede expresarse sin interferencias ha sido muy útil para poder marcar metabólicamente las células y tras caza e inmunoprecipitación del transportador, poder determinar su cinética de expresión en tiempo real. Esta técnica no puede aplicarse en neuronas debido a que requiere células creciendo en fase exponencial con una elevada tasa de síntesis por lo que este trabajo requerirá confirmación mediante otros abordajes en sistemas nativos. No obstante, los datos aportados son relevantes para conocer los requerimientos de la expresión en superficie de GlyT2 y constituye un marco adecuado para el estudio de la biogénesis de transportadores con mutaciones asociadas a hiperplexia.

En este sistema el transportador se detecta como un precursor inmaduro con N-glicosilación incompleta que da lugar a la forma de mayor tamaño presente en superficie (Martinez-Maza y col. 2001). La digestión con distintas endoglicosidasas, ha permitido asignar una localización subcelular al precursor de GlyT2 (Freeze y col. 2010), revelando que corresponde a una forma de RE o cis Golgi con glicosilación parcial. La retirada completa de todos los glicanos N-ligados mediante PNGasa F o el tratamiento con el agente bloqueante de la N-glicosilación tunicamicina da lugar a un núcleo proteico de GlyT2 sin glicosilar de 60 kDa. Esta proteína es más pequeña que la que se esperaría al sumar los tamaños moleculares de los residuos de aminoácidos individuales (78,9 kDa), pero puede ser debido al empaquetamiento de la proteína, al igual que se ha descrito previamente para otros transportadores similares (Olivares y col. 1994).

5.3.2 La calnexina participa activamente en la biogénesis de GlyT2

En la presente tesis se ha estudiado la implicación de la calnexina (CNX), una chaperona del RE, en la biogénesis de GlyT2. Mediante experimentos de inmunoprecipitación secuencial con anticuerpos frente a CNX y GlyT2, hemos confirmado que CNX se une transitoriamente al precursor de GlyT2. El precursor unido a CNX alcanza niveles máximos inmediatamente tras la aplicación del pulso, antes de la aparición del transportador maduro y después decae hasta los niveles basales. La expresión de GlyT2 y su actividad de transporte se atenúan al reducir la expresión de CNX mediante un ARNsi específico de la chaperona, tal y como cabría esperar de

una proteína cuya biogénesis depende de CNX. Estos resultados concuerdan con el fenotipo de los ratones *knockout* de CNX, que mueren a las 4 semanas debido a la incapacidad de CRT de sustituir la actividad de la CNX (Denzel y col. 2002). De hecho, CRT no se une a GlyT2 en ninguna de las condiciones de experimentación ensayadas en esta tesis, incluyendo varios tipos de detergentes y tiempos de caza. Sin embargo, hemos detectado una interacción rápida y lábil de GlyT2 con la chaperona BiP (GRP78) pero no con CRT, GRP94, PDI o ERP57, al menos en nuestras condiciones experimentales.

Por otro lado, en el laboratorio se ha demostrado que la sobreexpresión de CNX facilita enormemente el acceso de GlyT2 a la membrana plasmática facilitando el procesamiento de la forma inmadura de GlyT2 e incrementando los niveles del transportador en la superficie celular. Algunos estudios previos realizados con otros transportadores de la familia SLC6 (Tate y col. 1999) están en consonancia con estos resultados y apoyan de forma evidente el papel de la chaperona CNX en la biogénesis de GlyT2 (Arribas-Gonzalez y col. 2013).

Hemos demostrado que la unión de GlyT2 a CNX está mediada por glicanos e interacciones proteína-proteína, tal y como revelan los experimentos donde se interrumpe la unión del transportador mediante tratamientos farmacológicos y el uso de mutantes de GlyT2 que no contienen los sitios aceptores de N-glicanos. Estos resultados confirman la hipótesis de que la unión inicial de CNX se produce con las FMG hasta que se adquiere la conformación de la proteína madura, mientras que la retención de proteínas unidas no está mediada por glicanos sino por motivos polipeptídicos (Hammond y col. 1994, Solda y col. 2007).

La unión de GlyT2 a CNX es sensible a los inhibidores de glicosidasas I y II (GI y GII), como también lo es la actividad de transporte de glicina. Deoxinojirimicina es un inhibidor más potente de GII que castanospermina, aunque castanospermina inhibe GI y GII. El diferente efecto de estos inhibidores en la biosíntesis de GlyT2 podría estar relacionado con el papel relevante de GI en el rápido recorte de azúcares tras la glicosilación o con la modulación de la actividad de GII por los N-glicanos vecinos, que podrían atenuar la inhibición de GlyT2 (Deprez y col. 2005, Rutkevich y col. 2011). Sin embargo, la permeabilidad celular a estos dos componentes es muy baja, y aunque se han referenciado valores de IC_{50} en el rango micromolar bajo en sistemas libres de células, estos parámetros aumentan de manera muy considerable en varios órdenes de magnitud, en cultivos celulares (Compain y col. 2007). Esto podría explicar por qué obtuvimos efectos tan variables con estos inhibidores de glicosidasa y por qué se necesitaron concentraciones altas para bloquear la maduración de GlyT2. Sin embargo, incluso utilizando concentraciones de inhibidor en el rango mM alto, no hemos sido capaces de evitar

completamente la unión de GlyT2 a CNX, lo que indica que la unión GlyT2-CNX requiere interacciones tanto polipeptídicas como basadas en la actividad lectina (Korkhov y col. 2008, Rutkevich y col. 2011).

La unión de GlyT2 a CNX es sensible también a la eliminación de glicanos mediante mutaciones simples o múltiples de los sitios de N-glicosilación. Se ha sugerido que la unión inicial a CNX requiere oligosacáridos N-monoglicosilados hasta que se alcanza la conformación de la proteína madura, si bien la retención de las proteínas unidas a CNX no está mediada por glicanos sino por dominios polipeptídicos (Hammond y col. 1994, Solda y col. 2007). Además, para que GII genere el oligosacárido monoglicosilado en células de mamífero se requieren al menos dos cadenas de oligosacáridos en la glicoproteína sustrato (Deprez y col. 2005). Esta circunstancia podría explicar nuestros resultados pues la eliminación de múltiples sitios de glicosilación podría alterar la conformación de la proteína y exponer regiones peptídicas no plegadas que puede detectar la CNX, incrementando así su unión. Esto explicaría también la unión duradera del mutante que carece de N-glicosilación (N1234). De hecho, la N-glicosilación puede también tener un efecto facilitador del plegamiento independiente de chaperona, tal y como se ha descrito previamente para el regulador transmembrana de la fibrosis quística (Glozman y col. 2009). Este efecto facilitador podría explicar la observación hecha con anterioridad de que el tratamiento con PNGasa F de GlyT2 purificado y reconstituido afecta al transporte de glicina y esto es diferencial con GlyT1, probablemente debido a la conformación anómala de la proteína deglicosilada (Martinez-Maza y col. 2001).

No obstante, en el laboratorio se ha comprobado que la sobreexpresión de CNX no solo puede facilitar la expresión de GlyT2 a la membrana plasmática, sino también la del mutante N1234 consiguiendo aumentar su actividad en mayor medida que su expresión, lo que sugiere que CNX puede ejercer su función chaperona de modo independiente de su capacidad lectina y que la N-glicosilación es necesaria para la función óptima del transportador, pero no imprescindible para su función (Arribas-Gonzalez y col. 2013).

5.3.3 La glicosilación estabiliza la conformación y la actividad de transporte

En esta tesis se ha confirmado que el mutante N1234 de GlyT2, que carece de los 4 sitios aceptores de N-glicanos, presenta alteraciones en su plegamiento, tal y como se desprende de los patrones de proteólisis con papaína y pronasa. Según estos datos, este mutante muestra una actividad deficiente en el transporte de glicina en ensayos funcionales, tal y como revela un valor

alto de K_m y bajo de V_{max} . Además, la expresión del mutante N1234 en la superficie de la membrana también se ve alterada, mientras que su capacidad de unión a CNX es mayor, más duradera e independiente de la temperatura. El glicano unido al residuo N366 puede contribuir de manera relevante al fenotipo del mutante N1234, ya que el mutante N4, que carece del glicano unido a N366, presenta un fenotipo que comparte muchas características con el mutante completamente deglicosilado. Quizá el glicano sustituido en N366 es de mayor tamaño o su eliminación produce una alteración más importante de la conformación proteica. La alteración funcional de GlyT2 al eliminar los azúcares tiene su máximo exponente en el mutante que pierde completamente la capacidad de ser glicosilado (N1234) pero la pérdida progresiva de azúcares produce una alteración gradual en los parámetros cinéticos que no es dependiente del amino ácido sustituyente, lo que confirma el papel de los glicanos en la biogénesis y función de GlyT2 (Martinez-Maza y col. 2001).

Finalmente, los resultados de este trabajo podrían sugerir que la glicosilación del transportador contribuye a la elección de la vía de degradación del transportador. La degradación final de GlyT2 y del transportador mutante N1234 ocurre a través de la vía lisosomal, como indica el aumento de la vida media del transportador maduro tras inhibición del lisosoma. Esto está en consonancia con estudios posteriores en el laboratorio que han demostrado el uso de esta vía degradativa por el transportador tras endocitosis dependiente de clatrina (de Juan-Sanz y col. 2011, de Juan-Sanz y col. 2013). Sin embargo, los datos recogidos en esta tesis sugieren la existencia de más de una ruta de degradación para el transportador mutante, aunque la demostración de este aspecto requerirá un abordaje experimental alternativo debido a los efectos secundarios producidos por la inhibición del proteasoma.

5.4 Distribución asimétrica de GlyT2 en células polarizadas (MDCK)

La membrana plasmática de las neuronas se puede dividir de forma conceptual en dos dominios, el somatodendrítico y el axonal. Cada dominio presenta sus funciones características, gracias en parte a la distribución asimétrica de proteínas de membrana específicas, y es fundamental mantener esta distribución espacial para garantizar el funcionamiento y la especialización de cada neurona (Bradke y col. 1998). En el caso concreto de los transportadores, la localización subcelular parece ser determinante en su actividad y, en definitiva, en la función sináptica. En este sentido, son varios los transportadores que muestran una distribución diferencial en los dominios de membrana de las células en las que se expresan. Por ejemplo, se ha demostrado que las proteínas neuronales somatodendríticas suelen localizarse en la membrana basolateral

mientras que las proteínas axonales están en la membrana apical (Dotti y col. 1990). De hecho, algunos de los miembros de la familia SLC6 muestran una distribución asimétrica en la superficie de las células donde se expresan, lo que determina su función biológica.

El estudio de la distribución asimétrica de las proteínas en la membrana se ha realizado en esta tesis mediante experimentos con cultivos de células epiteliales polarizadas MDCK. Las proteínas que se sitúan en el dominio basolateral de las células MDCK se corresponden, en general, con una polarización en el dominio somatodendrítico de las neuronas de hipocampo, mientras que las proteínas que se localizan en el dominio apical aparecen en los axones (Dotti y col. 1990). En la presente tesis se verifica que GlyT2 se distribuye principalmente en la membrana apical de células MDCK, mientras que GlyT1 aparece en mayor medida en la membrana basolateral. Estos resultados están en línea con trabajos previos del laboratorio, donde se determinó que GlyT2 se localiza en la superficie apical de células MDCK polarizadas, aunque está distribuido de forma uniforme en neuronas (Poyatos y col. 2000, Martínez-Maza y col. 2001).

Mediante visualización por microscopía confocal de la distribución de mutantes simples o múltiples de los diferentes sitios de N-glicosilación de GlyT2 en células MDCK confluentes hemos confirmado que la ausencia de 3 ó 4 de los azúcares impide la distribución polarizada (Poyatos y col. 2000), aunque no parece haber una contribución diferencial de los glicanos unidos en las distintas asparaginas (N345, N355, N360 and N366). Sin embargo, se aprecia que la sustitución a aspartato o a glutamina sí parece tener un efecto diferencial pues entre los mutantes a D, los datos preliminares sugieren que la ausencia de los glicanos en 1 y 4 produce la mayor pérdida de distribución apical. Sin embargo, los mutantes a Q podrían implicar adicionalmente a la posición 3.

Los mecanismos por los cuales las proteínas se distribuyen de forma asimétrica en la membrana son diversos y las señales mediante las cuales se llevan a cabo pueden producirse tanto en los dominios extracelulares (Scheiffele y col. 1995), transmembrana (Scheiffele y col. 1997) o intracelulares (Alonso y col. 1997, Muth y col. 1998). Por lo tanto, no es descabellado pensar que la carga negativa proporcionada por los aspartatos podría prevenir la unión a proteínas adaptadoras implicadas en la transición apical, de modo que las sutiles diferencias observadas en los mutantes a glutamina, no sean apreciadas. La ausencia de implicación de los *lipids rafts* en la distribución asimétrica de GlyT2, que había sido demostrada previamente por nuestro grupo (Martínez-Maza y col. 2001), sugiere que la presencia de los distintos glicanos no condiciona la inclusión de GlyT2 en rafts, como por otro lado parece lógico. Sin embargo, otras

proteínas de distribución apical sí están asociadas con dominios especializados de la membrana ricos en glicoesfingolípidos (Simons y col. 1997). La localización apical de GlyT2 mediada por sus glicanos debe requerir lectinas de reconocimiento que podrían verse afectadas por la carga de los residuos adyacentes (Rodríguez-Boulan y col. 1999). La glicosilación juega un papel funcional relevante en el caso de otros transportadores miembros de la familia SLC6 (Olivares y col. 1995, Nguyen y col. 1996). El hecho de que la región de EL2 donde se encuentran los sitios de glicosilación en la familia presente la máxima heterogeneidad de secuencia entre transportadores eucariotas y que sea mínima y no glicosilada en los procariotas no ha permitido modelar esta región en la familia y conocer sus requerimientos estructurales. Los recientes cristales de dDAT y hSERT han aportado nueva información que permitirá profundizar en este estudio en un futuro (Penmatsa y col. 2013, Coleman y col. 2016).

6. CONCLUSIONES

1. El análisis inmunquímico de la distribución subcelular de GlyT2 a partir de tallo cerebral de rata ha revelado que gran proporción del transportador se encuentra en vesículas intracelulares de entre 50 y 200 nM de diámetro inmunopositivas a sinaptofisina, Rab11 y, en las más grandes, también a VIAAT. Rab5A, GAT1, sinaptotagmina2 y VAMP2 no se asocian a vesículas de GlyT2.
2. Las vesículas que contienen GlyT2 constituyen un subgrupo de vesículas endosomales inmunorreactivas a Rab11. Los estudios funcionales indican que la GTPasa Rab11, y en menor medida Rab4, regulan el reciclado de las vesículas que contienen GlyT2.
3. GlyT2 está asociado con microdominios lipídicos enriquecidos en colesterol y esfingolípidos (*lipid rafts*) en la membrana plasmática de neuronas de tallo cerebral. La alteración farmacológica de los niveles de colesterol y esfingomielina altera paralelamente la actividad de GlyT2 así como su asociación con *lipid rafts* revelando que la actividad de GlyT2 es máxima en asociación con balsas lipídicas.
4. El marcaje metabólico de GlyT2 en células en cultivo permite detectar un precursor inmaduro con N-glicosilación incompleta que da lugar a la forma de mayor tamaño presente en superficie que contiene glicanos en cuatro asparaginas de EL2. La N-glicosilación estabiliza el plegamiento de GlyT2 y condiciona la distribución asimétrica en células MDCK.
5. La chaperona de RE CNX facilita el procesamiento de la forma inmadura de GlyT2. La unión a CNX depende del número y posición de los azúcares del transportador, así como de interacciones proteína-proteína. La expresión de GlyT2 y su actividad de transporte se atenúan al reducir la expresión de CNX mediante un ARNi específico de la chaperona.
6. La biogénesis de GlyT2 requiere la actividad del proteasoma, posiblemente vía control de calidad mediado por ERAD. La degradación a largo plazo del transportador de membrana es mayoritariamente lisosomal.

7. BIBLIOGRAFÍA

Adams, R. H., K. Sato, S. Shimada, M. Tohyama, A. W. Puschel and H. Betz (1995). "Gene structure and glial expression of the glycine transporter GlyT1 in embryonic and adult rodents." *J Neurosci* **15**(3 Pt 2): 2524-2532.

Adkins, E. M., D. J. Samuvel, J. U. Fog, J. Eriksen, L. D. Jayanthi, C. B. Vaegter, S. Ramamoorthy and U. Gether (2007). "Membrane mobility and microdomain association of the dopamine transporter studied with fluorescence correlation spectroscopy and fluorescence recovery after photobleaching." *Biochemistry* **46**(37): 10484-10497.

Aicart-Ramos, C., R. A. Valero and I. Rodriguez-Crespo (2011). "Protein palmitoylation and subcellular trafficking." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1808**(12): 2981-2994.

Alonso, M. A., L. Fan and B. Alarcon (1997). "Multiple sorting signals determine apical localization of a nonglycosylated integral membrane protein." *J Biol Chem* **272**(49): 30748-30752.

Allen, J. A., R. A. Halverson-Tamboli and M. M. Rasenick (2007). "Lipid raft microdomains and neurotransmitter signalling." *Nat Rev Neurosci* **8**(2): 128-140.

Aragon, C. and B. Lopez-Corcuera (2003). "Structure, function and regulation of glycine neurotransmitters." *Eur J Pharmacol* **479**(1-3): 249-262.

Aragon, C. and B. Lopez-Corcuera (2005). "Glycine transporters: crucial roles of pharmacological interest revealed by gene deletion." *Trends Pharmacol Sci* **26**(6): 283-286.

Arribas-González, E. (2017). "Biogénesis y regulación del transportador neuronal de glicina GlyT2 y mutantes responsables de hiperplexia humana." *Tesis doctoral*.

Arribas-Gonzalez, E., P. Alonso-Torres, C. Aragon and B. Lopez-Corcuera (2013). "Calnexin-assisted biogenesis of the neuronal glycine transporter 2 (GlyT2)." *PLoS One* **8**(5): e63230.

Arribas-Gonzalez, E., J. de Juan-Sanz, C. Aragon and B. Lopez-Corcuera (2015). "Molecular basis of the dominant negative effect of a glycine transporter 2 mutation associated with hyperekplexia." *J Biol Chem* **290**(4): 2150-2165.

Arribas-González, E., J. de Juan-Sanz, C. Aragón and B. López-Corcuera (2015). "Molecular Basis of the Dominant Negative Effect of a Glycine Transporter 2 Mutation Associated with Hyperekplexia." *Journal of Biological Chemistry* **290**(4): 2150-2165.

Barlowe, C., L. Orci, T. Yeung, M. Hosobuchi, S. Hamamoto, N. Salama, M. F. Rexach, M. Ravazzola, M. Amherdt and R. Schekman (1994). "COPII: a membrane coat formed by Sec proteins that drive vesicle budding from the endoplasmic reticulum." *Cell* **77**(6): 895-907.

Bartholomaeus, I., L. Milan-Lobo, A. Nicke, S. Dutertre, H. Hastrup, A. Jha, U. Gether, H. H. Sitte, H. Betz and V. Eulenburg (2008). "Glycine transporter dimers: evidence for occurrence in the plasma membrane." *J Biol Chem* **283**(16): 10978-10991.

- Benveniste, M. and M. L. Mayer (1991). "Structure-activity analysis of binding kinetics for NMDA receptor competitive antagonists: the influence of conformational restriction." Br J Pharmacol **104**(1): 207-221.
- Bergeron, R., T. M. Meyer, J. T. Coyle and R. W. Greene (1998). "Modulation of N-methyl-D-aspartate receptor function by glycine transport." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(26): 15730-15734.
- Betz, H., J. Gomeza, W. Arnsen, P. Scholze and V. Eulenburg (2006). "Glycine transporters: essential regulators of synaptic transmission." Biochem Soc Trans **34**(Pt 1): 55-58.
- Bickel, P. E., P. E. Scherer, J. E. Schnitzer, P. Oh, M. P. Lisanti and H. F. Lodish (1997). "Flotillin and epidermal surface antigen define a new family of caveolae-associated integral membrane proteins." J Biol Chem **272**(21): 13793-13802.
- Blakely, R. D. and A. L. Bauman (2000). "Biogenic amine transporters: regulation in flux." Curr Opin Neurobiol **10**(3): 328-336.
- Blakely, R. D. and R. H. Edwards (2012). "Vesicular and plasma membrane transporters for neurotransmitters." Cold Spring Harb Perspect Biol **4**(2).
- Bonecchi, R., E. M. Borroni, A. Anselmo, A. Doni, B. Savino, M. Mirolo, M. Fabbri, V. R. Jala, B. Haribabu, A. Mantovani and M. Locati (2008). "Regulation of D6 chemokine scavenging activity by ligand- and Rab11-dependent surface up-regulation." Blood **112**(3): 493-503.
- Boudker, O., R. M. Ryan, D. Yernool, K. Shimamoto and E. Gouaux (2007). "Coupling substrate and ion binding to extracellular gate of a sodium-dependent aspartate transporter." Nature **445**(7126): 387-393.
- Bradke, F. and C. G. Dotti (1998). "Membrane traffic in polarized neurons." Biochim Biophys Acta **1404**(1-2): 245-258.
- Brockmeier, A. and D. B. Williams (2006). "Potent lectin-independent chaperone function of calnexin under conditions prevalent within the lumen of the endoplasmic reticulum." Biochemistry **45**(42): 12906-12916.
- Bröer, S. and U. Gether (2012). "The solute carrier 6 family of transporters." British Journal of Pharmacology **167**(2): 256-278.
- Broer, S. and M. Palacin (2011). "The role of amino acid transporters in inherited and acquired diseases." Biochem J **436**(2): 193-211.
- Brown, M. F. (2017). "Soft Matter in Lipid-Protein Interactions." Annu Rev Biophys **46**: 379-410.
- Butchbach, M. E., G. Tian, H. Guo and C. L. Lin (2004). "Association of excitatory amino acid transporters, especially EAAT2, with cholesterol-rich lipid raft microdomains: importance for excitatory amino acid transporter localization and function." J Biol Chem **279**(33): 34388-34396.
- Carta, E., S. K. Chung, V. M. James, A. Robinson, J. L. Gill, N. Remy, J. F. Vanbellighen, C. J. Drew, S. Cagdas, D. Cameron, F. M. Cowan, M. Del Toro, G. E. Graham, A. Y. Manzur, A. Masri, S. Rivera, E. Scalais, R. Shiang, K. Sinclair, C. A. Stuart, M. A. Tijssen, G. Wise, S. M. Zuberi, K. Harvey, B. R. Pearce, M. Topf, R. H. Thomas, S. Supplisson, M. I. Rees and R. J. Harvey (2012). "Mutations in

the GlyT2 Gene (SLC6A5) Are a Second Major Cause of Startle Disease." *J Biol Chem* **287**(34): 28975-28985.

Clements, J. D. and G. L. Westbrook (1991). "Activation kinetics reveal the number of glutamate and glycine binding sites on the N-methyl-D-aspartate receptor." *Neuron* **7**(4): 605-613.

Coleman, J. A., E. M. Green and E. Gouaux (2016). "X-ray structures and mechanism of the human serotonin transporter." *Nature* **532**(7599): 334-339.

Colin, J., L. Gregory-Pauron, M. C. Lanhers, T. Claudepierre, C. Corbier, F. T. Yen, C. Malaplate-Armand and T. Oster (2016). "Membrane raft domains and remodeling in aging brain." *Biochimie* **130**: 178-187.

Compain, P. and O. R. Martin (2007). *Iminosugars: From synthesis to therapeutic applications*, John Wiley and Sons Ltd, Chichester, West Sussex, England.

Cubelos, B., C. Gimenez and F. Zafra (2005). "Localization of the GLYT1 glycine transporter at glutamatergic synapses in the rat brain." *Cereb Cortex* **15**(4): 448-459.

Cull-Candy, S., S. Brickley and M. Farrant (2001). "NMDA receptor subunits: diversity, development and disease." *Curr Opin Neurobiol* **11**(3): 327-335.

Chaudhry, F. A., R. J. Reimer, E. E. Bellocchio, N. C. Danbolt, K. K. Osen, R. H. Edwards and J. Storm-Mathisen (1998). "The vesicular GABA transporter, VGAT, localizes to synaptic vesicles in sets of glycinergic as well as GABAergic neurons." *J Neurosci* **18**(23): 9733-9750.

Chen, Y., W. R. Thelin, B. Yang, S. L. Milgram and K. Jacobson (2006). "Transient anchorage of cross-linked glycosyl-phosphatidylinositol-anchored proteins depends on cholesterol, Src family kinases, caveolin, and phosphoinositides." *J Cell Biol* **175**(1): 169-178.

Churchward, M. A., T. Rogasevskaia, J. Hofgen, J. Bau and J. R. Coorssen (2005). "Cholesterol facilitates the native mechanism of Ca²⁺-triggered membrane fusion." *J Cell Sci* **118**(Pt 20): 4833-4848.

Dalskov, S. M., L. Immerdal, L. L. Niels-Christiansen, G. H. Hansen, A. Schousboe and E. M. Danielsen (2005). "Lipid raft localization of GABA A receptor and Na⁺, K⁺-ATPase in discrete microdomain clusters in rat cerebellar granule cells." *Neurochem Int* **46**(6): 489-499.

Dancourt, J. and C. Barlowe (2010). "Protein sorting receptors in the early secretory pathway." *Annu Rev Biochem* **79**: 777-802.

Dani, N. and K. Broadie (2012). "Glycosylated synaptomatrix regulation of trans-synaptic signaling." *Dev Neurobiol* **72**(1): 2-21.

De Felipe, R. (2017). "The role of cysteine modification in the regulation of the glycine transporter GlyT2." *Trabajo fin de Master*.

de Juan-Sanz, J., E. Nunez, B. Lopez-Corcuera and C. Aragon (2013). "Constitutive endocytosis and turnover of the neuronal glycine transporter GlyT2 is dependent on ubiquitination of a C-terminal lysine cluster." *PLoS One* **8**(3): e58863.

de Juan-Sanz, J., E. Nunez, L. Villarejo-Lopez, D. Perez-Hernandez, A. E. Rodriguez-Fraticelli, B. Lopez-Corcuera, J. Vazquez and C. Aragon (2013). "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* **33**(35): 14269-14281.

de Juan-Sanz, J., E. Nunez, F. Zafra, M. Berrocal, I. Corbacho, I. Ibanez, E. Arribas-Gonzalez, D. Marcos, B. Lopez-Corcuera, A. M. Mata and C. Aragon (2014). "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* **289**(49): 34308-34324.

de Juan-Sanz, J., F. Zafra, B. Lopez-Corcuera and C. Aragon (2011). "Endocytosis of the neuronal glycine transporter GLYT2: role of membrane rafts and protein kinase C-dependent ubiquitination." *Traffic* **12**(12): 1850-1867.

Deken, S. L., D. Wang and M. W. Quick (2003). "Plasma membrane GABA transporters reside on distinct vesicles and undergo rapid regulated recycling." *J Neurosci* **23**(5): 1563-1568.

Denzel, A., M. Molinari, C. Trigueros, J. E. Martin, S. Velmurgan, S. Brown, G. Stamp and M. J. Owen (2002). "Early postnatal death and motor disorders in mice congenitally deficient in calnexin expression." *Mol Cell Biol* **22**(21): 7398-7404.

Deprez, P., M. Gautschi and A. Helenius (2005). "More than one glycan is needed for ER glucosidase II to allow entry of glycoproteins into the calnexin/calreticulin cycle." *Mol Cell* **19**(2): 183-195.

Dityatev, A., M. Schachner and P. Sonderegger (2010). "The dual role of the extracellular matrix in synaptic plasticity and homeostasis." *Nat Rev Neurosci* **11**(11): 735-746.

Dohi, T., K. Morita, T. Kitayama, N. Motoyama and N. Morioka (2009). "Glycine transporter inhibitors as a novel drug discovery strategy for neuropathic pain." *Pharmacol Ther* **123**(1): 54-79.

Dotti, C. G. and K. Simons (1990). "Polarized sorting of viral glycoproteins to the axon and dendrites of hippocampal neurons in culture." *Cell* **62**(1): 63-72.

Drew, D. and O. Boudker (2016). "Shared Molecular Mechanisms of Membrane Transporters." *Annu Rev Biochem* **85**: 543-572.

Dugue, G. P., A. Dumoulin, A. Triller and S. Dieudonne (2005). "Target-dependent use of co-released inhibitory transmitters at central synapses." *J Neurosci* **25**(28): 6490-6498.

Dumoulin, A., P. Rostaing, C. Bedet, S. Levi, M. F. Isambert, J. P. Henry, A. Triller and B. Gasnier (1999). "Presence of the vesicular inhibitory amino acid transporter in GABAergic and glycinergic synaptic terminal boutons." *J Cell Sci* **112** (Pt 6): 811-823.

Esapa, C. T., R. A. McIlhinney and D. J. Blake (2005). "Fukutin-related protein mutations that cause congenital muscular dystrophy result in ER-retention of the mutant protein in cultured cells." *Hum Mol Genet* **14**(2): 295-305.

Eulenburg, V., W. Armsen, H. Betz and J. Gomeza (2005). "Glycine transporters: essential regulators of neurotransmission." *Trends Biochem Sci* **30**(6): 325-333.

- Eulenburg, V., K. Becker, J. Gomeza, B. Schmitt, C. M. Becker and H. Betz (2006). "Mutations within the human GLYT2 (SLC6A5) gene associated with hyperekplexia." Biochem Biophys Res Commun **348**(2): 400-405.
- Farhan, H., M. Freissmuth and H. H. Sitte (2006). "Oligomerization of neurotransmitter transporters: a ticket from the endoplasmic reticulum to the plasma membrane." Handb Exp Pharmacol(175): 233-249.
- Farhan, H., V. Reiterer, V. M. Korkhov, J. A. Schmid, M. Freissmuth and H. H. Sitte (2007). "Concentrative export from the endoplasmic reticulum of the gamma-aminobutyric acid transporter 1 requires binding to SEC24D." J Biol Chem **282**(10): 7679-7689.
- Ferguson, S. M., V. Savchenko, S. Apparsundaram, M. Zwick, J. Wright, C. J. Heilman, H. Yi, A. I. Levey and R. D. Blakely (2003). "Vesicular localization and activity-dependent trafficking of presynaptic choline transporters." J Neurosci **23**(30): 9697-9709.
- Fernandez-Sanchez, E., F. J. Diez-Guerra, B. Cubelos, C. Gimenez and F. Zafra (2008). "Mechanisms of endoplasmic-reticulum export of glycine transporter-1 (GLYT1)." Biochem J **409**(3): 669-681.
- Fernandez-Sanchez, E., J. Martinez-Villarreal, C. Gimenez and F. Zafra (2009). "Constitutive and regulated endocytosis of the glycine transporter GLYT1b is controlled by ubiquitination." J Biol Chem **284**(29): 19482-19492.
- Foot, N., T. Henshall and S. Kumar (2017). "Ubiquitination and the Regulation of Membrane Proteins." Physiol Rev **97**(1): 253-281.
- Fornes, A., E. Nunez, P. Alonso-Torres, C. Aragon and B. Lopez-Corcuera (2008). "Trafficking properties and activity regulation of the neuronal glycine transporter GLYT2 by protein kinase C." Biochem J **412**(3): 495-506.
- Fornes, A., E. Nunez, C. Aragon and B. Lopez-Corcuera (2004). "The second intracellular loop of the glycine transporter 2 contains crucial residues for glycine transport and phorbol ester-induced regulation." J Biol Chem **279**(22): 22934-22943.
- Fortin, D. L., M. D. Troyer, K. Nakamura, S. Kubo, M. D. Anthony and R. H. Edwards (2004). "Lipid rafts mediate the synaptic localization of alpha-synuclein." J Neurosci **24**(30): 6715-6723.
- Foster, E., H. Wildner, L. Tudeau, S. Haueter, W. T. Ralvenius, M. Jegen, H. Johannssen, L. Hosli, K. Haenraets, A. Ghanem, K. K. Conzelmann, M. Bosl and H. U. Zeilhofer (2015). "Targeted ablation, silencing, and activation establish glycinergic dorsal horn neurons as key components of a spinal gate for pain and itch." Neuron **85**(6): 1289-1304.
- Frank, C., A. M. Giammarioli, R. Pepponi, C. Fiorentini and S. Rufini (2004). "Cholesterol perturbing agents inhibit NMDA-dependent calcium influx in rat hippocampal primary culture." FEBS Lett **566**(1-3): 25-29.
- Freeze, H. H. and C. Kranz (2010). "Endoglycosidase and glycoamidase release of N-linked glycans." Curr Protoc Immunol **Chapter 8**: Unit 8 15 11-25.

Freneau, R. T., Jr., M. D. Troyer, I. Pahner, G. O. Nygaard, C. H. Tran, R. J. Reimer, E. E. Bellocchio, D. Fortin, J. Storm-Mathisen and R. H. Edwards (2001). "The expression of vesicular glutamate transporters defines two classes of excitatory synapse." Neuron **31**(2): 247-260.

Gasnier, B. (2004). "The SLC32 transporter, a key protein for the synaptic release of inhibitory amino acids." Pflugers Arch **447**(5): 756-759.

Geerlings, A., B. Lopez-Corcuera and C. Aragon (2000). "Characterization of the interactions between the glycine transporters GLYT1 and GLYT2 and the SNARE protein syntaxin 1A." FEBS Lett **470**(1): 51-54.

Geerlings, A., E. Nunez, B. Lopez-Corcuera and C. Aragon (2001). "Calcium- and syntaxin 1-mediated trafficking of the neuronal glycine transporter GLYT2." J Biol Chem **276**(20): 17584-17590.

Geerlings, A., E. Nunez, L. Rodenstein, B. Lopez-Corcuera and C. Aragon (2002). "Glycine transporter isoforms show differential subcellular localization in PC12 cells." J Neurochem **82**(1): 58-65.

Gil, C., A. Soler-Jover, J. Blasi and J. Aguilera (2005). "Synaptic proteins and SNARE complexes are localized in lipid rafts from rat brain synaptosomes." Biochem Biophys Res Commun **329**(1): 117-124.

Gimenez, C., G. Perez-Siles, J. Martinez-Villarreal, E. Arribas-Gonzalez, E. Jimenez, E. Nunez, J. de Juan-Sanz, E. Fernandez-Sanchez, N. Garcia-Tardon, I. Ibanez, V. Romanelli, J. Nevado, V. M. James, M. Topf, S. K. Chung, R. H. Thomas, L. R. Desviat, C. Aragon, F. Zafra, M. I. Rees, P. Lapunzina, R. J. Harvey and B. Lopez-Corcuera (2012). "A novel dominant hyperekplexia mutation Y705C alters trafficking and biochemical properties of the presynaptic glycine transporter GlyT2." J Biol Chem **287**(34): 28986-29002.

Gimenez, C., F. Zafra, B. Lopez-Corcuera and C. Aragon (2008). "[Molecular bases of hereditary hyperekplexia]." Rev Neurol **47**(12): 648-652.

Gluzman, R., T. Okiyonedo, C. M. Mulvihill, J. M. Rini, H. Barriere and G. L. Lukacs (2009). "N-glycans are direct determinants of CFTR folding and stability in secretory and endocytic membrane traffic." J Cell Biol **184**(6): 847-862.

Gomes, A. Q., B. R. Ali, J. S. Ramalho, R. F. Godfrey, D. C. Barral, A. N. Hume and M. C. Seabra (2003). "Membrane targeting of Rab GTPases is influenced by the prenylation motif." Mol Biol Cell **14**(5): 1882-1899.

Gomez, J., S. Hulsmann, K. Ohno, V. Eulenburg, K. Szoke, D. Richter and H. Betz (2003). "Inactivation of the glycine transporter 1 gene discloses vital role of glial glycine uptake in glycinergic inhibition." Neuron **40**(4): 785-796.

Gomez, J., K. Ohno, S. Hulsmann, W. Armsen, V. Eulenburg, D. W. Richter, B. Laube and H. Betz (2003). "Deletion of the mouse glycine transporter 2 results in a hyperekplexia phenotype and postnatal lethality." Neuron **40**(4): 797-806.

Gonzalez-Gonzalez, I. M., N. Garcia-Tardon, C. Gimenez and F. Zafra (2008). "PKC-dependent endocytosis of the GLT1 glutamate transporter depends on ubiquitylation of lysines located in a C-terminal cluster." Glia **56**(9): 963-974.

- Haas, K. F. and K. Broadie (2008). "Roles of ubiquitination at the synapse." Biochim Biophys Acta **1779**(8): 495-506.
- Hammond, C., I. Braakman and A. Helenius (1994). "Role of N-linked oligosaccharide recognition, glucose trimming, and calnexin in glycoprotein folding and quality control." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(3): 913-917.
- Harvey, R. J., U. B. Depner, H. Wassle, S. Ahmadi, C. Heindl, H. Reinold, T. G. Smart, K. Harvey, B. Schutz, O. M. Abo-Salem, A. Zimmer, P. Poisbeau, H. Welzl, D. P. Wolfer, H. Betz, H. U. Zeilhofer and U. Muller (2004). "GlyR alpha3: an essential target for spinal PGE2-mediated inflammatory pain sensitization." Science **304**(5672): 884-887.
- Harvey, R. J., M. Topf, K. Harvey and M. I. Rees (2008). "The genetics of hyperekplexia: more than startle!" Trends Genet **24**(9): 439-447.
- Harvey, R. J. and B. K. Yee (2013). "Glycine transporters as novel therapeutic targets in schizophrenia, alcohol dependence and pain." Nat Rev Drug Discov **12**(11): 866-885.
- Hebert, D. N. and M. Molinari (2007). "In and out of the ER: protein folding, quality control, degradation, and related human diseases." Physiol Rev **87**(4): 1377-1408.
- Helenius, A. and M. Aebi (2001). "Intracellular functions of N-linked glycans." Science **291**(5512): 2364-2369.
- Helenius, A. and M. Aebi (2004). "Roles of N-linked glycans in the endoplasmic reticulum." Annu Rev Biochem **73**: 1019-1049.
- Henry, L. and D. R. Sheff (2008). "Rab8 regulates basolateral secretory, but not recycling, traffic at the recycling endosome." Mol Biol Cell **19**(5): 2059-2068.
- Hering, H., C. C. Lin and M. Sheng (2003). "Lipid rafts in the maintenance of synapses, dendritic spines, and surface AMPA receptor stability." J Neurosci **23**(8): 3262-3271.
- Hetz, C. and B. Mollereau (2014). "Disturbance of endoplasmic reticulum proteostasis in neurodegenerative diseases." Nat Rev Neurosci **15**(4): 233-249.
- Horiuchi, M., S. Loeblich, J. H. Brandstaetter, M. Kneussel and H. Betz (2005). "Cellular localization and subcellular distribution of Unc-33-like protein 6, a brain-specific protein of the collapsin response mediator protein family that interacts with the neuronal glycine transporter 2." J Neurochem **94**(2): 307-315.
- Huber, L. A., S. Pimplikar, R. G. Parton, H. Virta, M. Zerial and K. Simons (1993). "Rab8, a small GTPase involved in vesicular traffic between the TGN and the basolateral plasma membrane." J Cell Biol **123**(1): 35-45.
- Huttner, W. B., W. Schiebler, P. Greengard and P. De Camilli (1983). "Synapsin I (protein I), a nerve terminal-specific phosphoprotein. III. Its association with synaptic vesicles studied in a highly purified synaptic vesicle preparation." J Cell Biol **96**(5): 1374-1388.
- Jayanthi, L. D., D. J. Samuvel and S. Ramamoorthy (2004). "Regulated internalization and phosphorylation of the native norepinephrine transporter in response to phorbol esters.

Evidence for localization in lipid rafts and lipid raft-mediated internalization." J Biol Chem **279**(18): 19315-19326.

Jiang, L., M. D. Bechtel, N. A. Galeva, T. D. Williams, E. K. Michaelis and M. L. Michaelis (2012). "Decreases in plasma membrane Ca²(+)-ATPase in brain synaptic membrane rafts from aged rats." J Neurochem **123**(5): 689-699.

Jiang, Z., B. Li, F. Jursky and W. Shen (2007). "Differential distribution of glycine transporters in Muller cells and neurons in amphibian retinas." Vis Neurosci **24**(2): 157-168.

Jimenez, E., E. Nunez, I. Ibanez, F. Zafra, C. Aragon and C. Gimenez (2015). "Glycine transporters GlyT1 and GlyT2 are differentially modulated by glycogen synthase kinase 3beta." Neuropharmacology **89**: 245-254.

Jimenez, E., F. Zafra, R. Perez-Sen, E. G. Delicado, M. T. Miras-Portugal, C. Aragon and B. Lopez-Corcuera (2011). "P2Y purinergic regulation of the glycine neurotransmitter transporters." J Biol Chem **286**(12): 10712-10724.

Johnson, J. W. and P. Ascher (1987). "Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons." Nature **325**(6104): 529-531.

Jones, M. C., P. T. Caswell and J. C. Norman (2006). "Endocytic recycling pathways: emerging regulators of cell migration." Curr Opin Cell Biol **18**(5): 549-557.

Jordens, I., M. Marsman, C. Kuijl and J. Neefjes (2005). "Rab proteins, connecting transport and vesicle fusion." Traffic **6**(12): 1070-1077.

Juge, N., A. Muroyama, M. Hiasa, H. Omote and Y. Moriyama (2009). "Vesicular inhibitory amino acid transporter is a Cl⁻/gamma-aminobutyrate Co-transporter." J Biol Chem **284**(50): 35073-35078.

Jung, N. and V. Haucke (2007). "Clathrin-mediated endocytosis at synapses." Traffic **8**(9): 1129-1136.

Jursky, F. and N. Nelson (1995). "Localization of glycine neurotransmitter transporter (GLYT2) reveals correlation with the distribution of glycine receptor." J Neurochem **64**(3): 1026-1033.

Kaufman, R. J. (1999). "Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: coordination of gene transcriptional and translational controls." Genes Dev **13**(10): 1211-1233.

Kemp, J. A. and P. D. Leeson (1993). "The glycine site of the NMDA receptor--five years on." Trends Pharmacol Sci **14**(1): 20-25.

Kessels, H. W. and R. Malinow (2009). "Synaptic AMPA receptor plasticity and behavior." Neuron **61**(3): 340-350.

Kessler, A., E. Tomas, D. Immler, H. E. Meyer, A. Zorzano and J. Eckel (2000). "Rab11 is associated with GLUT4-containing vesicles and redistributes in response to insulin." Diabetologia **43**(12): 1518-1527.

Khvotchev, M. V., M. Ren, S. Takamori, R. Jahn and T. C. Sudhof (2003). "Divergent functions of neuronal Rab11b in Ca²⁺-regulated versus constitutive exocytosis." J Neurosci **23**(33): 10531-10539.

- Kilic, F. and G. Rudnick (2000). "Oligomerization of serotonin transporter and its functional consequences." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(7): 3106-3111.
- Kim, Y. E., M. S. Hipp, A. Bracher, M. Hayer-Hartl and F. U. Hartl (2013). "Molecular chaperone functions in protein folding and proteostasis." Annu Rev Biochem **82**: 323-355.
- Kleene, R. and M. Schachner (2004). "Glycans and neural cell interactions." Nat Rev Neurosci **5**(3): 195-208.
- Korkhov, V. M., L. Milan-Lobo, B. Zuber, H. Farhan, J. A. Schmid, M. Freissmuth and H. H. Sitte (2008). "Peptide-based interactions with calnexin target misassembled membrane proteins into endoplasmic reticulum-derived multilamellar bodies." J Mol Biol **378**(2): 337-352.
- Kristensen, A. S., J. Andersen, T. N. Jorgensen, L. Sorensen, J. Eriksen, C. J. Loland, K. Stromgaard and U. Gether (2011). "SLC6 neurotransmitter transporters: structure, function, and regulation." Pharmacol Rev **63**(3): 585-640.
- Kumar, A., D. Baycin-Hizal, Y. Zhang, M. A. Bowen and M. J. Betenbaugh (2015). "Cellular traffic cops: the interplay between lipids and proteins regulates vesicular formation, trafficking, and signaling in mammalian cells." Curr Opin Biotechnol **36**: 215-221.
- Kwon, S. E. and E. R. Chapman (2011). "Synaptophysin regulates the kinetics of synaptic vesicle endocytosis in central neurons." Neuron **70**(5): 847-854.
- Lang, T., D. Bruns, D. Wenzel, D. Riedel, P. Holroyd, C. Thiele and R. Jahn (2001). "SNAREs are concentrated in cholesterol-dependent clusters that define docking and fusion sites for exocytosis." EMBO J **20**(9): 2202-2213.
- Lederkremer, G. Z. (2009). "Glycoprotein folding, quality control and ER-associated degradation." Curr Opin Struct Biol **19**(5): 515-523.
- Ledesma, M. D., M. G. Martin and C. G. Dotti (2012). "Lipid changes in the aged brain: effect on synaptic function and neuronal survival." Prog Lipid Res **51**(1): 23-35.
- Legendre, P. (2001). "The glycinergic inhibitory synapse." Cell Mol Life Sci **58**(5-6): 760-793.
- Lerma, J. (2010). Cómo se comunican las neuronas.
- Liang, K., L. Wei and L. Chen (2017). "Exocytosis, Endocytosis, and Their Coupling in Excitable Cells." Front Mol Neurosci **10**: 109.
- Lingwood, D. and K. Simons (2010). "Lipid rafts as a membrane-organizing principle." Science **327**(5961): 46-50.
- Loder, M. K. and H. E. Melikian (2003). "The dopamine transporter constitutively internalizes and recycles in a protein kinase C-regulated manner in stably transfected PC12 cell lines." J Biol Chem **278**(24): 22168-22174.
- Lopez-Corcuera, B., A. Geerlings and C. Aragon (2001). "Glycine neurotransmitter transporters: an update." Mol Membr Biol **18**(1): 13-20.

- Lopez-Corcuera, B., R. Martinez-Maza, E. Nunez, M. Roux, S. Supplisson and C. Aragon (1998). "Differential properties of two stably expressed brain-specific glycine transporters." J Neurochem **71**(5): 2211-2219.
- Lopez-Corcuera, B., E. Nunez, R. Martinez-Maza, A. Geerlings and C. Aragon (2001). "Substrate-induced conformational changes of extracellular loop 1 in the glycine transporter GLYT2." J Biol Chem **276**(46): 43463-43470.
- Magnani, F., C. G. Tate, S. Wynne, C. Williams and J. Haase (2004). "Partitioning of the serotonin transporter into lipid microdomains modulates transport of serotonin." J Biol Chem **279**(37): 38770-38778.
- Mahapatra, S., F. Fan and X. Lou (2016). "Tissue-specific dynamin-1 deletion at the calyx of Held decreases short-term depression through a mechanism distinct from vesicle resupply." Proc Natl Acad Sci U S A **113**(22): E3150-3158.
- Mahley, R. W. (2016). "Central Nervous System Lipoproteins: ApoE and Regulation of Cholesterol Metabolism." Arterioscler Thromb Vasc Biol **36**(7): 1305-1315.
- Martinez-Maza, R., I. Poyatos, B. Lopez-Corcuera, N. u. E, C. Gimenez, F. Zafra and C. Aragon (2001). "The role of N-glycosylation in transport to the plasma membrane and sorting of the neuronal glycine transporter GLYT2." J Biol Chem **276**(3): 2168-2173.
- Mayer, M. L. and G. L. Westbrook (1987). "Permeation and block of N-methyl-D-aspartic acid receptor channels by divalent cations in mouse cultured central neurones." J Physiol **394**: 501-527.
- Mayor, S. and R. E. Pagano (2007). "Pathways of clathrin-independent endocytosis." Nat Rev Mol Cell Biol **8**(8): 603-612.
- McIntire, S. L., R. J. Reimer, K. Schuske, R. H. Edwards and E. M. Jorgensen (1997). "Identification and characterization of the vesicular GABA transporter." Nature **389**(6653): 870-876.
- Melikian, H. E. (2004). "Neurotransmitter transporter trafficking: endocytosis, recycling, and regulation." Pharmacology & Therapeutics **104**(1): 17-27.
- Melikian, H. E. (2004). "Neurotransmitter transporter trafficking: endocytosis, recycling, and regulation." Pharmacol Ther **104**(1): 17-27.
- Melzack, R. and P. D. Wall (1965). "Pain mechanisms: a new theory." Science **150**(3699): 971-979.
- Merrifield, C. J. and M. Kaksonen (2014). "Endocytic accessory factors and regulation of clathrin-mediated endocytosis." Cold Spring Harb Perspect Biol **6**(11): a016733.
- Miranda, M., C. C. Wu, T. Sorkina, D. R. Korstjens and A. Sorkin (2005). "Enhanced ubiquitylation and accelerated degradation of the dopamine transporter mediated by protein kinase C." J Biol Chem **280**(42): 35617-35624.
- Molinari, M., V. Calanca, C. Galli, P. Lucca and P. Paganetti (2003). "Role of EDEM in the release of misfolded glycoproteins from the calnexin cycle." Science **299**(5611): 1397-1400.

- Morciano, M., J. Burre, C. Corvey, M. Karas, H. Zimmermann and W. Volkandt (2005). "Immunoisolation of two synaptic vesicle pools from synaptosomes: a proteomics analysis." J Neurochem **95**(6): 1732-1745.
- Morello, J. P., A. Salahpour, U. E. Petaja-Repo, A. Laperriere, M. Lonergan, M. F. Arthus, I. R. Nabi, D. G. Bichet and M. Bouvier (2001). "Association of calnexin with wild type and mutant AVPR2 that causes nephrogenic diabetes insipidus." Biochemistry **40**(23): 6766-6775.
- Mulder, A. H. and S. H. Snyder (1974). "Potassium-induced release of amino acids from cerebral cortex and spinal cord slices of the rat." Brain Res **76**(2): 297-308.
- Murphy, J. E., B. E. Padilla, B. Hasdemir, G. S. Cottrell and N. W. Bunnett (2009). "Endosomes: a legitimate platform for the signaling train." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(42): 17615-17622.
- Muth, T. R., J. Ahn and M. J. Caplan (1998). "Identification of sorting determinants in the C-terminal cytoplasmic tails of the gamma-aminobutyric acid transporters GAT-2 and GAT-3." J Biol Chem **273**(40): 25616-25627.
- Navone, F., R. Jahn, G. Di Gioia, H. Stukenbrok, P. Greengard and P. De Camilli (1986). "Protein p38: an integral membrane protein specific for small vesicles of neurons and neuroendocrine cells." J Cell Biol **103**(6 Pt 1): 2511-2527.
- Nguyen, T. T. and S. G. Amara (1996). "N-linked oligosaccharides are required for cell surface expression of the norepinephrine transporter but do not influence substrate or inhibitor recognition." J Neurochem **67**(2): 645-655.
- Nong, Y., Y. Q. Huang, W. Ju, L. V. Kalia, G. Ahmadian, Y. T. Wang and M. W. Salter (2003). "Glycine binding primes NMDA receptor internalization." Nature **422**(6929): 302-307.
- Nunez, E., P. Alonso-Torres, A. Fornes, C. Aragon and B. Lopez-Corcuera (2008). "The neuronal glycine transporter GLYT2 associates with membrane rafts: functional modulation by lipid environment." J Neurochem **105**(6): 2080-2090.
- Nunez, E., G. Perez-Siles, L. Rodenstein, P. Alonso-Torres, F. Zafra, E. Jimenez, C. Aragon and B. Lopez-Corcuera (2009). "Subcellular localization of the neuronal glycine transporter GLYT2 in brainstem." Traffic **10**(7): 829-843.
- O'Connell, K. M. and M. M. Tamkun (2005). "Targeting of voltage-gated potassium channel isoforms to distinct cell surface microdomains." J Cell Sci **118**(Pt 10): 2155-2166.
- Ohno, K., M. Koroll, O. El Far, P. Scholze, J. Gomeza and H. Betz (2004). "The neuronal glycine transporter 2 interacts with the PDZ domain protein syntenin-1." Mol Cell Neurosci **26**(4): 518-529.
- Olivares, L., C. Aragon, C. Gimenez and F. Zafra (1994). "Carboxyl terminus of the glycine transporter GLYT1 is necessary for correct processing of the protein." J Biol Chem **269**(45): 28400-28404.
- Olivares, L., C. Aragon, C. Gimenez and F. Zafra (1995). "The role of N-glycosylation in the targeting and activity of the GLYT1 glycine transporter." J Biol Chem **270**(16): 9437-9442.

- Parodi, A. J. (2000). "Protein glycosylation and its role in protein folding." Annu Rev Biochem **69**: 69-93.
- Penmatsa, A., K. H. Wang and E. Gouaux (2013). "X-ray structure of dopamine transporter elucidates antidepressant mechanism." Nature **503**(7474): 85-90.
- Perez-Siles, G., A. Morreale, A. Leo-Macias, G. Pita, A. R. Ortiz, C. Aragon and B. Lopez-Corcuera (2011). "Molecular basis of the differential interaction with lithium of glycine transporters GLYT1 and GLYT2." J Neurochem **118**(2): 195-204.
- Perez-Siles, G., E. Nunez, A. Morreale, E. Jimenez, A. Leo-Macias, G. Pita, F. Cherubino, R. Sangaletti, E. Bossi, A. R. Ortiz, C. Aragon and B. Lopez-Corcuera (2012). "An aspartate residue in the external vestibule of GLYT2 (glycine transporter 2) controls cation access and transport coupling." Biochem J **442**(2): 323-334.
- Perri, E. R., C. J. Thomas, S. Parakh, D. M. Spencer and J. D. Atkin (2015). "The Unfolded Protein Response and the Role of Protein Disulfide Isomerase in Neurodegeneration." Frontiers in Cell and Developmental Biology **3**: 80.
- Perri, E. R., C. J. Thomas, S. Parakh, D. M. Spencer and J. D. Atkin (2015). "The Unfolded Protein Response and the Role of Protein Disulfide Isomerase in Neurodegeneration." Front Cell Dev Biol **3**: 80.
- Pfriege, F. W. (2003). "Role of cholesterol in synapse formation and function." Biochim Biophys Acta **1610**(2): 271-280.
- Pike, L. J. (2006). "Rafts defined: a report on the Keystone Symposium on Lipid Rafts and Cell Function." J Lipid Res **47**(7): 1597-1598.
- PL, C. (2010). "How do proteins move through the Golgi Apparatus?" Nature Education **3**(9): 60.
- Pourcho RG, G. D. (1990). Autoradiographic and immunocytochemical studies of glycine containing neurons in the retina. Glycine neurotransmission. S.-M. J. e. Ottersen OP, John Wiley, Chichester: 355-389.
- Poyatos, I., J. Ponce, C. Aragon, C. Gimenez and F. Zafra (1997). "The glycine transporter GLYT2 is a reliable marker for glycine-immunoreactive neurons." Brain Res Mol Brain Res **49**(1-2): 63-70.
- Poyatos, I., F. Ruberti, R. Martinez-Maza, C. Gimenez, C. G. Dotti and F. Zafra (2000). "Polarized distribution of glycine transporter isoforms in epithelial and neuronal cells." Mol Cell Neurosci **15**(1): 99-111.
- Praveen, V., S. K. Patole and J. S. Whitehall (2001). "Hyperekplexia in neonates." Postgrad Med J **77**(911): 570-572.
- Radeva, G., J. Perabo and F. J. Sharom (2005). "P-Glycoprotein is localized in intermediate-density membrane microdomains distinct from classical lipid rafts and caveolar domains." FEBS J **272**(19): 4924-4937.

Rees, M. I., M. Andrew, S. Jawad and M. J. Owen (1994). "Evidence for recessive as well as dominant forms of startle disease (hyperekplexia) caused by mutations in the alpha 1 subunit of the inhibitory glycine receptor." *Hum Mol Genet* **3**(12): 2175-2179.

Rees, M. I., K. Harvey, B. R. Pearce, S. K. Chung, I. C. Duguid, P. Thomas, S. Beatty, G. E. Graham, L. Armstrong, R. Shiang, K. J. Abbott, S. M. Zuberi, J. B. Stephenson, M. J. Owen, M. A. Tijssen, A. M. van den Maagdenberg, T. G. Smart, S. Supplisson and R. J. Harvey (2006). "Mutations in the gene encoding GlyT2 (SLC6A5) define a presynaptic component of human startle disease." *Nat Genet* **38**(7): 801-806.

Ren, M., G. Xu, J. Zeng, C. De Lemos-Chiarandini, M. Adesnik and D. D. Sabatini (1998). "Hydrolysis of GTP on rab11 is required for the direct delivery of transferrin from the pericentriolar recycling compartment to the cell surface but not from sorting endosomes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(11): 6187-6192.

Rizzoli, S. O. (2014). "Synaptic vesicle recycling: steps and principles." *EMBO J* **33**(8): 788-822.

Rodriguez-Boulan, E. and A. Gonzalez (1999). "Glycans in post-Golgi apical targeting: sorting signals or structural props?" *Trends Cell Biol* **9**(8): 291-294.

Rousseau, F., K. R. Aubrey and S. Supplisson (2008). "The glycine transporter GlyT2 controls the dynamics of synaptic vesicle refilling in inhibitory spinal cord neurons." *J Neurosci* **28**(39): 9755-9768.

Roux, M. J. and S. Supplisson (2000). "Neuronal and glial glycine transporters have different stoichiometries." *Neuron* **25**(2): 373-383.

Royle, S. J. and L. Lagnado (2010). "Clathrin-mediated endocytosis at the synaptic terminal: bridging the gap between physiology and molecules." *Traffic* **11**(12): 1489-1497.

Rudnick, G., R. Kramer, R. D. Blakely, D. L. Murphy and F. Verrey (2014). "The SLC6 transporters: perspectives on structure, functions, regulation, and models for transporter dysfunction." *Pflugers Arch* **466**(1): 25-42.

Rutkevich, L. A. and D. B. Williams (2011). "Participation of lectin chaperones and thiol oxidoreductases in protein folding within the endoplasmic reticulum." *Curr Opin Cell Biol* **23**(2): 157-166.

Saenz-Lope, E., F. J. Herranz-Tanarro, J. C. Masdeu and J. R. Chacon Pena (1984). "Hyperekplexia: a syndrome of pathological startle responses." *Ann Neurol* **15**(1): 36-41.

Sagne, C., S. El Mestikawy, M. F. Isambert, M. Hamon, J. P. Henry, B. Giros and B. Gasnier (1997). "Cloning of a functional vesicular GABA and glycine transporter by screening of genome databases." *FEBS Lett* **417**(2): 177-183.

Salaun, C., G. W. Gould and L. H. Chamberlain (2005). "Lipid raft association of SNARE proteins regulates exocytosis in PC12 cells." *J Biol Chem* **280**(20): 19449-19453.

Salaun, C., D. J. James and L. H. Chamberlain (2004). "Lipid rafts and the regulation of exocytosis." *Traffic* **5**(4): 255-264.

- Samuvel, D. J., L. D. Jayanthi, N. R. Bhat and S. Ramamoorthy (2005). "A role for p38 mitogen-activated protein kinase in the regulation of the serotonin transporter: evidence for distinct cellular mechanisms involved in transporter surface expression." J Neurosci **25**(1): 29-41.
- Scanlon, S. M., D. C. Williams and P. Schloss (2001). "Membrane cholesterol modulates serotonin transporter activity." Biochemistry **40**(35): 10507-10513.
- Scott, H. and V. M. Panin (2014). "N-glycosylation in regulation of the nervous system." Adv Neurobiol **9**: 367-394.
- Scheiffele, P., J. Peranen and K. Simons (1995). "N-glycans as apical sorting signals in epithelial cells." Nature **378**(6552): 96-98.
- Scheiffele, P., M. G. Roth and K. Simons (1997). "Interaction of influenza virus haemagglutinin with sphingolipid-cholesterol membrane domains via its transmembrane domain." EMBO J **16**(18): 5501-5508.
- Schwarz, L. A. and G. N. Patrick (2012). "Ubiquitin-dependent endocytosis, trafficking and turnover of neuronal membrane proteins." Mol Cell Neurosci **49**(3): 387-393.
- Sepulveda, M. R., M. Berrocal-Carrillo, M. Gasset and A. M. Mata (2006). "The plasma membrane Ca²⁺-ATPase isoform 4 is localized in lipid rafts of cerebellum synaptic plasma membranes." J Biol Chem **281**(1): 447-453.
- Sheff, D. R., E. A. Daro, M. Hull and I. Mellman (1999). "The receptor recycling pathway contains two distinct populations of early endosomes with different sorting functions." J Cell Biol **145**(1): 123-139.
- Shiang, R., S. G. Ryan, Y. Z. Zhu, A. F. Hahn, P. O'Connell and J. J. Wasmuth (1993). "Mutations in the alpha 1 subunit of the inhibitory glycine receptor cause the dominant neurologic disorder, hyperekplexia." Nat Genet **5**(4): 351-358.
- Shouffani, A. and B. I. Kanner (1990). "Cholesterol is required for the reconstruction of the sodium- and chloride-coupled, gamma-aminobutyric acid transporter from rat brain." J Biol Chem **265**(11): 6002-6008.
- Simons, K. and E. Ikonen (1997). "Functional rafts in cell membranes." Nature **387**(6633): 569-572.
- Smicun, Y., S. D. Campbell, M. A. Chen, H. Gu and G. Rudnick (1999). "The role of external loop regions in serotonin transport. Loop scanning mutagenesis of the serotonin transporter external domain." J Biol Chem **274**(51): 36058-36064.
- Solda, T., C. Galli, R. J. Kaufman and M. Molinari (2007). "Substrate-specific requirements for UGT1-dependent release from calnexin." Mol Cell **27**(2): 238-249.
- Sonnino, S., M. Aureli, S. Grassi, L. Mauri, S. Prioni and A. Prinetti (2014). "Lipid rafts in neurodegeneration and neuroprotection." Mol Neurobiol **50**(1): 130-148.
- Sonnino, S., M. Aureli, L. Mauri, M. G. Ciampa and A. Prinetti (2015). "Membrane lipid domains in the nervous system." Front Biosci (Landmark Ed) **20**: 280-302.

- Sorkina, T., M. Miranda, K. R. Dionne, B. R. Hoover, N. R. Zahniser and A. Sorkin (2006). "RNA interference screen reveals an essential role of Nedd4-2 in dopamine transporter ubiquitination and endocytosis." J Neurosci **26**(31): 8195-8205.
- Sudhof, T. C. and J. E. Rothman (2009). "Membrane fusion: grappling with SNARE and SM proteins." Science **323**(5913): 474-477.
- Suhren O, B. G., Tuymann JA (1966). "Hyperexplexia: A hereditary startle syndrome." J Neurol Sci **3**: 577-605.
- Supplisson, S. and M. J. Roux (2002). "Why glycine transporters have different stoichiometries." FEBS Lett **529**(1): 93-101.
- Takamori, S., M. Holt, K. Stenius, E. A. Lemke, M. Gronborg, D. Riedel, H. Urlaub, S. Schenck, B. Brugger, P. Ringler, S. A. Muller, B. Rammner, F. Gräter, J. S. Hub, B. L. De Groot, G. Mieskes, Y. Moriyama, J. Klingauf, H. Grubmüller, J. Heuser, F. Wieland and R. Jahn (2006). "Molecular anatomy of a trafficking organelle." Cell **127**(4): 831-846.
- Takamori, S., D. Riedel and R. Jahn (2000). "Immunoisolation of GABA-specific synaptic vesicles defines a functionally distinct subset of synaptic vesicles." J Neurosci **20**(13): 4904-4911.
- Tate, C. G., E. Whiteley and M. J. Betenbaugh (1999). "Molecular chaperones improve functional expression of the serotonin (5-hydroxytryptamine) transporter in insect cells." Biochem Soc Trans **27**(6): 932-936.
- Thoidis, G., T. Kupriyanova, J. M. Cunningham, P. Chen, S. Cadel, T. Foulon, P. Cohen, R. E. Fine and K. V. Kandror (1999). "Glucose transporter Glut3 is targeted to secretory vesicles in neurons and PC12 cells." J Biol Chem **274**(20): 14062-14066.
- Todd, A. J., D. I. Hughes, E. Polgar, G. G. Nagy, M. Mackie, O. P. Ottersen and D. J. Maxwell (2003). "The expression of vesicular glutamate transporters VGLUT1 and VGLUT2 in neurochemically defined axonal populations in the rat spinal cord with emphasis on the dorsal horn." Eur J Neurosci **17**(1): 13-27.
- Tortelote, G. G., R. H. Valverde, T. Lemos, A. Guilherme, M. Einicker-Lamas and A. Vieyra (2004). "The plasma membrane Ca²⁺ pump from proximal kidney tubules is exclusively localized and active in caveolae." FEBS Lett **576**(1-2): 31-35.
- Traub, L. M. and G. L. Lukacs (2007). "Decoding ubiquitin sorting signals for clathrin-dependent endocytosis by CLASPs." J Cell Sci **120**(Pt 4): 543-553.
- Tsui-Pierchala, B. A., M. Encinas, J. Milbrandt and E. M. Johnson, Jr. (2002). "Lipid rafts in neuronal signaling and function." Trends Neurosci **25**(8): 412-417.
- Uhlig, M., W. Passlack and J. Eckel (2005). "Functional role of Rab11 in GLUT4 trafficking in cardiomyocytes." Mol Cell Endocrinol **235**(1-2): 1-9.
- Ungewickell, E. J. and L. Hinrichsen (2007). "Endocytosis: clathrin-mediated membrane budding." Curr Opin Cell Biol **19**(4): 417-425.
- Urbe, S. (2005). "Ubiquitin and endocytic protein sorting." Essays Biochem **41**: 81-98.

- Uzan-Gafsou, S., H. Bausinger, F. Proamer, S. Monier, D. Lipsker, J. P. Cazenave, B. Goud, H. de la Salle, D. Hanau and J. Salamero (2007). "Rab11A controls the biogenesis of Birbeck granules by regulating Langerin recycling and stability." *Mol Biol Cell* **18**(8): 3169-3179.
- Vagin, O., J. A. Kraut and G. Sachs (2009). "Role of N-glycosylation in trafficking of apical membrane proteins in epithelia." *Am J Physiol Renal Physiol* **296**(3): F459-469.
- Vandenberg, R. J., S. N. Mostyn, J. E. Carland and R. M. Ryan (2016). "Glycine transporter2 inhibitors: Getting the balance right." *Neurochem Int* **98**: 89-93.
- Vandenberg, R. J., R. M. Ryan, J. E. Carland, W. L. Imlach and M. J. Christie (2014). "Glycine transport inhibitors for the treatment of pain." *Trends Pharmacol Sci* **35**(8): 423-430.
- Vandenberg, R. J., K. Shaddick and P. Ju (2007). "Molecular basis for substrate discrimination by glycine transporters." *J Biol Chem* **282**(19): 14447-14453.
- Vembar, S. S. and J. L. Brodsky (2008). "One step at a time: endoplasmic reticulum-associated degradation." *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**(12): 944-957.
- Vereb, G., J. Matko, G. Vamosi, S. M. Ibrahim, E. Magyar, S. Varga, J. Szollosi, A. Jenei, R. Gaspar, Jr., T. A. Waldmann and S. Damjanovich (2000). "Cholesterol-dependent clustering of IL-2Ralpha and its colocalization with HLA and CD48 on T lymphoma cells suggest their functional association with lipid rafts." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(11): 6013-6018.
- Villarejo-López, L. (2017). "Regulation of the neuronal glycine transporter GlyT2 by P2X purinergic receptors." *Doctoral Thesis*.
- Villarejo, L. (2017). *Tesis Doctoral. Regulación del transportador neuronal de glicina GlyT2 por el receptor P2X3. Papel en dolor.*, Universidad Autónoma de Madrid.
- Walter, P. and A. E. Johnson (1994). "Signal sequence recognition and protein targeting to the endoplasmic reticulum membrane." *Annu Rev Cell Biol* **10**: 87-119.
- Wenthold, R. J., C. Hunter, K. Wada and C. J. Dechesne (1990). "Antibodies to a C-terminal peptide of the rat brain glutamate receptor subunit, GluR-A, recognize a subpopulation of AMPA binding sites but not kainate sites." *FEBS Lett* **276**(1-2): 147-150.
- Werman, R., R. A. Davidoff and M. H. Aprison (1967). "Inhibition of motoneurons by iontophoresis of glycine." *Nature* **214**(5089): 681-683.
- Wojcik, S. M., S. Katsurabayashi, I. Guillemín, E. Friauf, C. Rosenmund, N. Brose and J. S. Rhee (2006). "A shared vesicular carrier allows synaptic corelease of GABA and glycine." *Neuron* **50**(4): 575-587.
- Wojnacki, J. and T. Galli (2016). "Membrane traffic during axon development." *Developmental Neurobiology* **76**(11): 1185-1200.
- Yamashita, A., S. K. Singh, T. Kawate, Y. Jin and E. Gouaux (2005). "Crystal structure of a bacterial homologue of Na⁺/Cl⁻-dependent neurotransmitter transporters." *Nature* **437**(7056): 215-223.
- Yu, C., M. Alterman and R. T. Dobrowsky (2005). "Ceramide displaces cholesterol from lipid rafts and decreases the association of the cholesterol binding protein caveolin-1." *J Lipid Res* **46**(8): 1678-1691.

- Zafra, F., C. Aragon and C. Gimenez (1997). "Molecular biology of glycinergic neurotransmission." Mol Neurobiol **14**(3): 117-142.
- Zafra, F., C. Aragon, L. Olivares, N. C. Danbolt, C. Gimenez and J. Storm-Mathisen (1995). "Glycine transporters are differentially expressed among CNS cells." J Neurosci **15**(5 Pt 2): 3952-3969.
- Zafra, F., J. Gomeza, L. Olivares, C. Aragon and C. Gimenez (1995). "Regional distribution and developmental variation of the glycine transporters GLYT1 and GLYT2 in the rat CNS." Eur J Neurosci **7**(6): 1342-1352.
- Zafra, F., I. Poyatos and C. Gimenez (1997). "Neuronal dependency of the glycine transporter GLYT1 expression in glial cells." Glia **20**(2): 155-162.
- Zeilhofer, H. U. (2008). "Loss of glycinergic and GABAergic inhibition in chronic pain--contributions of inflammation and microglia." Int Immunopharmacol **8**(2): 182-187.
- Zeilhofer, H. U., B. Studler, D. Arabadzisz, C. Schweizer, S. Ahmadi, B. Layh, M. R. Bosl and J. M. Fritschy (2005). "Glycinergic neurons expressing enhanced green fluorescent protein in bacterial artificial chromosome transgenic mice." J Comp Neurol **482**(2): 123-141.
- Zerial, M. and H. McBride (2001). "Rab proteins as membrane organizers." Nat Rev Mol Cell Biol **2**(2): 107-117.
- Zhang, J., P. Xiao and X. Zhang (2009). "Phosphatidylserine externalization in caveolae inhibits Ca²⁺ efflux through plasma membrane Ca²⁺-ATPase in ECV304." Cell Calcium **45**(2): 177-184.
- Zhen, Y. and H. Stenmark (2015). "Cellular functions of Rab GTPases at a glance." J Cell Sci **128**(17): 3171-3176.
- Zhu, D., W. C. Xiong and L. Mei (2006). "Lipid rafts serve as a signaling platform for nicotinic acetylcholine receptor clustering." J Neurosci **26**(18): 4841-4851.

8. ANEXO, PUBLICACIONES

The neuronal glycine transporter GLYT2 associates with membrane rafts: functional modulation by lipid environment

Nunez E, Alonso-Torres P, Fornes A, Aragon C, Lopez-Corcuera B. J Neurochem. 2008;105(6):2080-90

Subcellular localization of the neuronal glycine transporter GLYT2 in brainstem

Nunez E, Perez-Siles G, Rodenstein L, Alonso-Torres P, Zafra F, Jimenez E, et al. Traffic. 2009;10(7):829-43

Calnexin-assisted biogenesis of the neuronal glycine transporter 2 (GlyT2)

Arribas-Gonzalez E, Alonso-Torres P, Aragon C, Lopez-Corcuera B. PLoS One. 2013;8(5)