

CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL INSTITUTO  
POLITÉCNICO NACIONAL  
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA  
INSTITUT DE NEUROCIÈNCIES  
DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I DE BIOLOGIA MOLECULAR

Regulación del Sistema Glutamatérgico Glial (Glutamina Sintetasa y GLAST) por  
la Activación de los Transportadores de Glutamato de Alta Afinidad

Presenta

M. en C. Daniel Alejandro Martínez Quintero

Dirigida por:

Dr. Arturo Ortega Soto

Dr. José Aguilera Ávila

**UAB**  
Universitat Autònoma  
de Barcelona



## ÍNDICE

### 1. INTRODUCCIÓN

1.1. El Sistema Nervioso Central (SNC) y su Participación en Procesos Cognitivos	1
1.2. Las Células Gliales una Visión General	2
1.3. Glutamato Como Neurotransmisor	3
1.4. Participación de los Astrocitos en las Sinapsis Glutamatérgicas	5
1.4.1. Participación Directa en la Neurotransmisión (Sinapsis Tripartita)	5
1.4.2. Participación Bioquímica	6
1.4.2.1. El Ciclo Glutamato-Glutamina	8
1.4.2.1.1. Transportadores de Glutamina	8
1.4.2.1.1.1. Transportadores de Glutamina Gliales (Sistema de Transporte N)	9
1.4.2.1.1.2. Transportadores de Glutamina Neuronales (Sistema de transporte A)	9
1.4.2.1.2. Glutaminasa	10
1.4.2.1.3. Transportadores de Glutamato Vesiculares	11
1.4.2.1.4. Transportadores de Glutamato de Alta Afinidad	12
1.4.2.1.4.1. Transportador de Glutamato GLT1/EAAT2	13
1.4.2.1.4.2. Transportador de Glutamato GLAST/EAAT1	16
1.4.2.1.5. Glutamina Sintetasa	18
1.5. Transducción de Señal Mediada por Glutamato	21
1.5.1. Receptores de Glutamato	21
1.5.1.1. Receptores Metabotrópicos	22
1.5.1.2. Receptores Ionotrópicos	23
1.5.2. Transportadores de Aminoácidos como Moléculas Transductoras de Señal	24
1.6. Modelos del Sistema Glutamatérgico	25
1.6.1. Circuito Cerebelar	25
1.6.1.1. Células Gliales de Bergmann	27
1.6.2. Médula Espinal	28

2. ANTECEDENTES	31
3. OBJETIVO GENERAL	33
4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
5. MATERIALES Y MÉTODOS	34
6. RESULTADOS	
6.1. Efecto de la Activación del Sistema Glutamatérgico Sobre la GS	39
6.2. Efecto de la Activación del Sistema Glutamatérgico Sobre GLAST	45
7. DISCUSIÓN	52
8. REFERENCIAS	58

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Autorradiografía de [ <sup>3</sup> H]glutamato en el encéfalo de rata	4
Figura 2. Micrografía y esquema de una sinapsis glutamatérgica	5
Figura 3. Esquema del ciclo glutamato/glutamina	8
Figura 4. Topología de SNAT3	9
Figura 5. Topología de los transportadores SNAT1y SNAT2	10
Figura 6. Variantes de mRNA y proteína del transportador GLT1	14
Figura 7. Vías de señalización las cuales inducen la transcripción de GLT1	15
Figura 8 . Variantes de mRNA del transportador GLAST	17
Figura 9. Esquema de la regulación de la GS	20
Figura 10. Estructura cristalina del receptor metabotrópico de glutamato subtipo 1 (mGluR1)	22
Figura 11. Esquema de la topología de los iGluRs	24
Figura 12. Circuito cerebelar	26
Figura 13. Esquema de la arquitectura cerebelar y las CGB	28
Figura 14. Esquema de las aferencias presentadas en médula espinal	30
Figura 15. Efecto de glutamato sobre los niveles y actividad de GS en CGB expuestas a glutamato	39
Figura 16. Efecto de glutamato sobre los niveles y actividad de GS en células C-6 expuestas a glutamato	40
Figura 17. GS en miniprismas y cultivos organotípicos de cerebelo de rata expuestos a glutamato o inducidos a despolarización	41
Figura 18. Expresión de GS en cultivos organotípicos de médula de rata	43
Figura 19. Efecto de la activación del sistema glutamatérgico sobre los niveles y la actividad de GS en cultivos organotípicos de médula espinal de rata	44
Figura 20. Dependencia de la dosis de THA sobre la actividad y los niveles de GS en cultivos organotípicos de médula espinal de rata	45
Figura 21. Efecto agudo de glutamato sobre la captura de [ <sup>3</sup> H]-D-Aspartato a largo plazo	46
Figura 22. Análisis de la activación aguda de los receptores o los transportadores de glutamato sobre la captura de [ <sup>3</sup> H]-D-Aspartato a largo plazo	48
Figura 23. La exposición aguda a glutamato cambia la capacidad máxima de unión de [ <sup>3</sup> H]-D-Aspartato	49

Figura 24. Efecto de la exposición aguda de glutamato sobre los niveles de mRNA y proteína GLAST a largo plazo en CGB\_\_\_\_\_50

Figura 25. Modelo propuesto en la exposición aguda a glutamato en CGB\_\_\_\_\_57

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.- Clasificación de los mGluR_____	23
Tabla 2. Receptores de glutamato ionotrópicos y las subunidades que los conforman_____	24

## ABREVIATURAS

3'UTR	Extremo 3' no traducible
5'UTR	Extremo 5' no traducible
AMPA	Ácido $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-isoazolepropionico
ADP	Adenosindifosfato
ALS	Esclerosis Lateral Amiotrófica
ATP	Adenosintrifosfato
BGC	Células gliales de Bergmann
Bmax	Capacidad máxima de unión
cGRE	Elemento compuesto de respuesta a glucocorticoides
DHPG	Dihidroxifenilglicina
DIV	Días <i>in-vitro</i>
EAAT	Transportador de aminoácidos excitadores
GABA	Ácido- $\gamma$ -aminobutírico
GLAST	Transportador de glutamato-aspartato
GLT1	Transportador de glutramato 1
GR	Receptor de glucocorticoides
GRE	Elemento de respuesta a glucocorticoides
GS	Glutamina sintetasa
IGF	Factor de crecimiento insulínico
iGluR	Receptores ionotrópicos
KA	Ácido kaínico
Kd	Constante de disociación
Km	Constante de Michaelis-Menten
MAPK	Cinasas activadas por mitógenos
MEM	Medio mínimo de Eagles
mGluR	Receptores metabotrópicos
NMDA	N-Metil-D-Aspartato
NO	Óxido nítrico

NOS	Óxido nítrico sintasa
PBS	Solución reguladora de fosfatos
PKA	Proteína cinasa A
PKC	Proteína cinasa C
RIPA	Solución reguladora para ensayos de radioinmunoprecipitación
SLC38	Familia transportadora de solutos 38
SNAT	Transportadores de aminoácidos acoplados a sodio
SNC	Sistema nervioso central
TBOA	Threo- $\beta$ -hidroxiaspartato
TBS	Solución reguladora TRIS
TCA	Ácido tricloroacético
THA	Threo- $\beta$ -hidroxiaspartato
TNF- $\alpha$	Factor de necrosis tumoral alfa
VGLUT	Transportadores vesiculares de glutamato

## RESUMEN

Las vías glutamatérgicas representan el sistema de neurotransmisión excitador más abundante en el sistema nervioso central (SNC) de vertebrados, así su importancia se hace evidente en los procesos cognitivos. Dentro del SNC, las células más abundantes son las células gliales y su acople bioquímico con las neuronas es indispensable para la fisiología del SNC.

Una característica de todos los sistemas biológicos es que estos oscilan a través de dos tipos de variables, las controladas y las reguladas, cuyas asas de retro o anteroalimentación se encuentran reguladas o controladas por la actividad del sistema, así dentro del SNC encontramos que una de las moléculas principales que inicia estos cambios biológicos es el glutamato.

Se ha demostrado que la activación glutamatérgica cambia diferentes aspectos de respuesta tanto glial como neuronal, sin embargo no se ha caracterizado por completo la regulación de los componentes del sistema glutamatérgico. En el presente trabajo nos interesamos por elucidar la respuesta de dos componentes gliales indispensables en el acople bioquímico neurona gila, la glutamina sintetasa (GS) y el transportador de glutamato de alta afinidad GLAST.

En el presente trabajo demostramos que la actividad de GS es regulada por la actividad glutamatérgica únicamente bajo condiciones muy especiales de cultivo, las cuales semejan las etapas tempranas del desarrollo del SNC y esto solo sucede bajo una estimulación glutamatérgica crónica.

GLAST es el principal transportador de glutamato que se expresa en cerebelo por lo que el modelo de cultivo primario de células gliales de Bergmann nos permitió elucidar el efecto de una exposición aguda de glutamato sobre la actividad del transportador GLAST a largo plazo, encontrando que la exposición a glutamato aguda disminuye la actividad de GLAST a largo plazo por un mecanismo muy probablemente postraducciona.

## ABSTRACT

Glutamatergic pathways are the most abundant excitatory neurotransmitter system in the central nervous system ( CNS ) of vertebrates, hence its importance is evident in cognitive processes. Glial cells are the most abundant cells within the CNS and its biochemical coupling with neurons is essential for CNS physiology.

A feature of all biological systems is that they oscillate through two types of variables, the controlled and regulated variables, whose feedforward or feedback handles are regulated or controlled by the activity necessities of the system, within the CNS one of the main molecules that initiates these biological changes is glutamate.

It has been shown that activation of glutamatergic pathways modulate different aspects of both glial and neuronal responses, however, the regulation of glutamatergic components regulated by glutamate activity have not been fully characterized. In this work we are interested in elucidate the response of two biochemical glial components whose are essential for neuron-glia coupling, glutamine synthetase ( GS ) and high affinity glutamate transporter GLAST.

In this work we show that GS activity is regulated by glutamatergic activity only under very special conditions, which resemble the early stages in the development of the CNS and this regulation only is present under chronic glutamatergic stimulation.

GLAST glutamate transporter is the most abundant glutamate transporter expressed in glia cerebellum, in this context Bergmann glial cells primary culture allowed us to elucidate the effects of acute exposure on GLAST glutamate transporter activity in the long term, we found that acute glutamate exposure decreases GLAST activity in the long term by a mechanism which seems to be posttranslational.

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. El Sistema Nervioso Central (SNC) y su Participación en Procesos Cognitivos

Desde el comienzo de la filosofía los filósofos griegos se preguntaron de dónde y cómo se generaban los procesos complejos de comportamiento, así Aristóteles en el siglo IV a.C. propuso que toda la capacidad intelectual mostrada por los seres humanos se encontraba en el corazón. A comienzos del siglo II los estudios de Galeno de Pérfamo le permitieron proponer la hipótesis alternativa en donde el centro de los movimientos voluntarios radica en el encéfalo, sin embargo la naturaleza energética que desencadena todas las reacciones era desconocida. No fue hasta que Luigi Galvani en el siglo XVIII observó que la electricidad era el origen energético de los movimientos de los organismos y propuso que el centro de control de los movimientos es el cerebro, al generar los impulsos eléctricos necesarios para los movimientos. Esta teoría inició todo el movimiento del estudio electrofisiológico. El siguiente gran salto en el conocimiento de la función del cerebro llegó hasta el siglo XX con los estudios histológicos de Santiago Ramón y Cajal ayudándose de la tinción desarrollada por Camilo Golgi. Ramón y Cajal demostró que el SNC funciona de forma “celular” y no “reticular”, apuntando a las neuronas como la unidad funcional del SNC. Estos estudios le valieron el premio Nobel de Fisiología y Medicina a Sanitiago Ramón y Cajal compartido con Camilo Golgi en 1906. Una vez determinado que la unidad funcional del SNC es la neurona y que la propagación de las señales es la electricidad, Alan Hodking y Andrew Huxley analizaron las diferentes fases de la propagación eléctrica y los iones involucrados en ésta propagación en el modelo del axón del calamar gigante, estos ingeniosos y elegantes estudios abrieron una nueva era en el estudio electrofisiológico celular con el desarrollo de la técnica “fijación de voltaje” (voltage clamp) y sentaron las bases para el estudio básico celular de los fenómenos de aprendizaje y memoria, Hodking y Huxley por estos descubrimientos recibieron el premio Nobel en 1963. Hasta ese momento, se tenían las bases fisiológicas celulares para el estudio y correlación entre las neuronas y los cambios de comportamiento animal ante la misma situación, proceso conocido como aprendizaje y memoria. En términos generales podemos decir que existen tres hipótesis para correlacionar los fenómenos de aprendizaje y memoria con los cambios neuronales, la primera propuesta fue hecha por Donnal Hebb en 1949 con la publicación de su libro “The Organization of Behaviour” en donde por primera vez se propone una base bioquímica para los fenómenos de aprendizaje, en términos generales propone la plasticidad funcional, dice así: “Cuando

un axón de una célula A está lo suficientemente cerca para excitar a una célula B y esta actividad excitatoria se mantiene de forma persistente, debe haber algún cambio en un proceso metabólico en una o ambas células tal que la eficiencia de A dado un disparo de la célula B se incrementa”. La segunda propuesta se demostró en 1967 con los trabajos de Albert Globus y Arnold Bernard Scheibel los cuales demuestran una correlación directa entre la estimulación sensorial y el número de espinas dendríticas, que finalmente se traduce como la plasticidad anatómica, éste fenómeno había sido sugerido por Santiago Ramón y Cajal de acuerdo a sus observaciones en el tejido nervioso. La última forma básica de explicar los cambios de comportamiento ante un mismo estímulo o estímulos semejantes es la formación de nuevas conexiones neuronales, una propuesta reciente que hasta el momento sigue en controversia y estudio (1).

Desde los años sesentas, los avances en la genética y el desarrollo de la biología molecular han abierto todo un nuevo campo de investigación en el funcionamiento del SNC, un grupo protagonista en este ámbito es el encabezado por Eric Kandel quien ha sentado las bases moleculares para el entendimiento del aprendizaje y memoria, y por ello recibió el premio Nobel en el año 2000, tomando como paradigma el caracol de agua dulce *Aplysia punctata* con los elementos establecidos hace cien años por uno de los más grandes fisiólogos de la historia, Ivan P. Pavlov (1849-1936), en su ampliamente conocido fenómeno de condicionamiento clásico.

## 1.2. Las Células Gliales Una Visión General

Las células gliales constituyen las células más abundantes dentro del SNC llegando a representar alrededor del 80% de las células de este tejido en el ser humano. De forma general las células gliales se han dividido de acuerdo a su morfología en dos tipos: la microglia y la macroglia. La macroglia a su vez morfológicamente se ha subdividido en astrocitos y oligodendrocitos (2).

La función de la microglia se ha caracterizado como las células inmunológicas del SNC, encargándose de la fagocitosis de detritus celulares y eliminación de antígenos.

Los oligodendrocitos son células que envuelven los axones neuronales, incrementando la velocidad de propagación del potencial de acción al aislar los canales iónicos axonales.

Los astrocitos son el grupo de células gliales más abundante dentro del SNC, de forma interesante estas

células a principios del siglo XX eran consideradas como células de soporte físico para las neuronas, estudios subsiguientes comenzaron a elucidar y cambiar la forma de ver a los astrocitos. Inicialmente se determinó que los astrocitos estaban en una estrecha relación física con la unidad funcional del SNC (la sinapsis), posteriormente se determinó que los astrocitos participan en mantener un ambiente iónico neuronal estable. Con el avance en la investigación de los astrocitos se llegó a determinar que estas células presentaban expresión diferencial de proteínas del metabolismo anaplerótico y más aun, enzimas del metabolismo de glutamato, el neurotransmisor más abundante del SNC, estos descubrimientos dieron paso a la visión de los astrocitos como elementos bioquímicos esenciales para llevar a cabo el fenómeno de neurotransmisión. Finalmente en los últimos 30 años se ha propuesto que la transmisión sináptica y los fenómenos de plasticidad se encuentran dictados en parte por la activación de los astrocitos inducida por la liberación de neurotransmisor, lo que indica que bajo condiciones fisiológicas las células gliales pueden tener un papel central en procesos complejos como aprendizaje y memoria (3).

### 1.3. Glutamato como neurotransmisor

Desde el comienzo de la era bioquímica científica se había determinado que las concentraciones de glutamato en el SNC son muy elevadas, presuponiendo así un papel fisiológico muy importante en el SNC. No fue hasta finales de los años setentas y principios de los años ochentas del siglo XX que se comenzó a estudiar el glutamato como neurotransmisor en el sistema nervioso, y logrando demostrar que este aminoácido presentaba los cuatro criterios básicos necesarios para ser considerado como un neurotransmisor (4). Cuando se analizó el sistema glutamatérgico en el SNC se observó que éste se encontraba distribuido en todo el SNC (Figura 1) a diferencia de otros sistemas de neurotransmisión los cuales tienen vías más discretas, por lo que desde entonces se visualizó al glutamato como un activador general del SNC. A partir de ahí, se realizaron esfuerzos para trazar las rutas glutamatérgicas presentes en el SNC y con el incremento en el uso de técnicas moleculares se ha tratado de identificar y caracterizar las moléculas que participan en la sinapsis glutamatérgica, tales como receptores de glutamato, transportadores vesiculares y de membrana citoplásmica, y enzimas de síntesis y degradación del neurotransmisor.

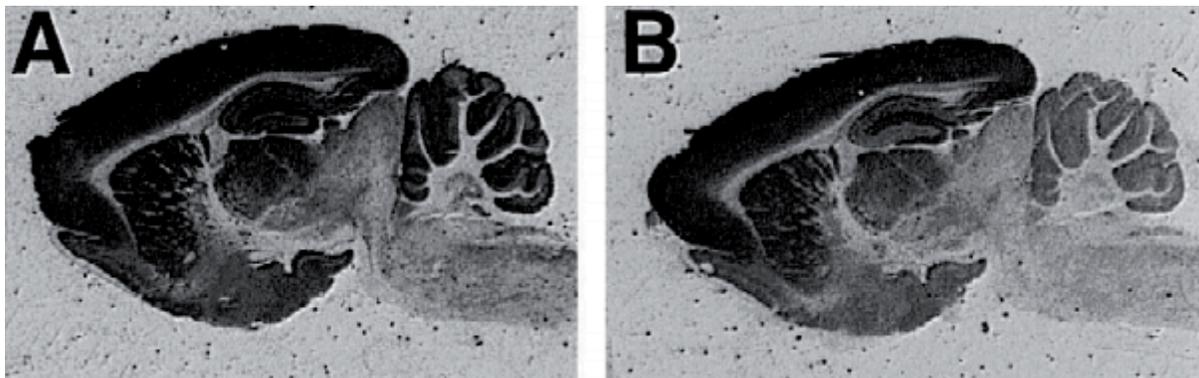


Figura 1. Autoradiografía de [<sup>3</sup>H]glutamato en el encéfalo de rata. A: Autoradiografía de [<sup>3</sup>H]-glutamato en presencia de NMDA y AMPA. B: Autoradiografía de [<sup>3</sup>H]-glutamato en presencia de quisqualato. Obsérvese como los sitios de unión totales (la suma de las autoradiografías A y B) de glutamato se encuentran distribuidos en todo el encéfalo. Tomado de (5).

Hoy en día contamos con una gran cantidad de información acumulada acerca del sistema glutamatérgico, la que nos permite tener un esquema general de como es que se lleva a cabo el fenómeno de neurotransmisión glutamatérgica en el SNC. Sin embargo, los elementos que constituyen el sistema son muy variados así como sus interacciones, lo que lo hace que las respuestas y sucesión de eventos ante los estímulos del neurotransmisor sean intrincadas y por lo tanto un sistema difícil de elucidar.

De forma muy general podemos describir la sinapsis glutamatérgica de la siguiente forma: La neurona presináptica expresa transportadores de glutamato vesiculares, los cuales transportan y concentran el glutamato en las vesículas sinápticas, estas vesículas son movilizadas a la membrana citoplásmica en donde se fusionan con ésta y liberan una cantidad discreta de glutamato (los cuantos de Bernard Katz), el glutamato liberado a la hendidura sináptica activa los receptores presentes en las membranas de las neuronas postsinápticas, el glutamato difunde en el espacio sináptico y al salir de éste volumen activa también los receptores presentes en las células gliales y es capturado por los transportadores expresados principalmente en los astrocitos que rodean a las neuronas (Figura2) (6).

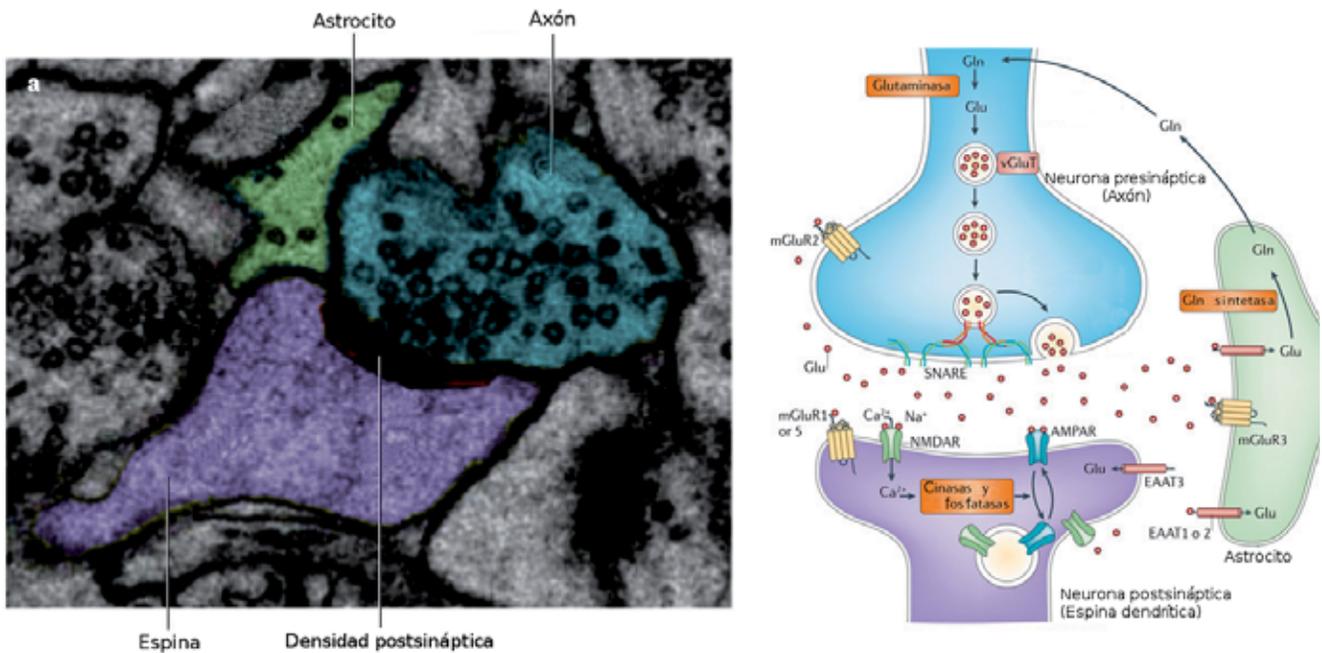


Figura 2. Micrografía y esquema de una sinapsis glutamatérgica. En el Panel izquierdo observamos una micrografía de la sinapsis en el hipocampo, en verde observamos una célula glial que se encuentra en estrecha relación física con las neuronas, en azul se encuentra la neurona presináptica y en morado la neurona postsináptica. En el Panel derecho observamos un esquema representativo de la micrografía de la izquierda, en el esquema se muestran los elementos principales que componen a la sinapsis glutamatérgica. Modificado de (7,8)

#### 1.4. Participación de los Astrocitos en la Sinapsis Glutamatérgica

##### 1.4.1. Participación Directa en la Neurotransmisión (Sinapsis Tripartita)

Como se mencionó en los apartados anteriores, desde el inicio del estudio de las neurociencias se ha aceptado a las neuronas como la unidad funcional del SNC, sin embargo, en los años noventa se encontró que los astrocitos eran capaces de responder a estímulos glutamatérgicos y a mecánicos a través de la elevación de calcio intracelular, y además, éste segundo mensajero era capaz de migrar a células adyacentes, a éste evento se le denominó ondas de calcio (*calcium waves*) (9,10). Después de la caracterización de las ondas de calcio se comenzó a estudiar los efectos de éstas elevaciones de calcio y de manera muy interesante se determinó que uno de los resultados era la liberación de sustancias neuroactivas (11,12) a las que se les llamó gliotransmisores, éste hecho marcaba la diferencia en la

visión de los astrocitos como células de soporte neuronal a células con una participación activa en la neurotransmisión y por ende en los procesos mediados por la neurotransmisión. Es este punto cuando se propone que la unidad funcional del SNC realmente consta de tres elementos celulares.

Dentro de la neurotransmisión glutamatérgica la liberación de gliotransmisores es un evento que se presenta ante estimulaciones neuronales fisiológicas y se inicia por la activación del receptor mGluR5, siendo el propio glutamato uno de los gliotransmisores liberados (13–15). Aunque la sinapsis tripartita comenzó a cambiar el panorama en el estudio del proceso de la información en el SNC aún no se puede considerar a las células gliales como células reguladoras de todos los procesos cognitivos (16), por lo que su papel y función en este ámbito sigue sin ser del todo elucidado.

#### 1.4.2. Participación Bioquímica

Durante el auge del estudio bioquímico de los organismos se determinó que la concentración de glutamato en SNC es muy elevada, posteriormente los análisis detallados en la compartimentalización del neurotransmisor dieron lugar a un esquema general de cómo se lleva a cabo la liberación y la distribución de glutamato entre las células del SNC (17). El establecimiento en la compartimentalización del glutamato era un indicio de la participación bioquímica de las células gliales en el sistema glutamatérgico y con ello se propuso lo que hoy se conoce como el ciclo glutamato-glutamina, sin embargo se desconocían los mecanismos por los cuales sucedía esta compartimentalización y las moléculas involucradas en la liberación de éstos aminoácidos.

Tiempo después con el surgimiento de la tecnología de producción de anticuerpos dirigidos a antígenos específicos se determinó que los astrocitos expresan dos enzimas claves en el metabolismo de glutamato que no expresan las neuronas y una enzima que no se expresa en astrocitos pero sí en neuronas. Una de las enzimas expresadas en astrocitos y no en neuronas es la glutamato deshidrogenasa (GD) (18). Al demostrarse la baja expresión de GD en neuronas comparado con las células gliales se confirmaba y daba una explicación a la compartimentalización de glutamato en SNC, así parcialmente explicando la idea de la existencia de un “pool” de glutamato necesario para la neurotransmisión y otro para proporcionar energía, además que dejaba a las neuronas “sensibles” a la deficiencia de metabolitos intermediarios del ciclo de Krebs debido a la falta de ésta enzima anaplerótica y así ganando fuerza la propuesta del ciclo glutamato-glutamina.

El siguiente gran hallazgo enzimático en determinar el mecanismo del acople glutamato-glutamina glía-neurona fue la demostración que la expresión glutamina sintetasa (GS) es glía específica (19).

La GS fue aislada y caracterizada en cerebro de bovinos en los años cincuentas (20,21), y sus propiedades enzimáticas mostraron estar directamente involucradas en el metabolismo de glutamato al tomar como sustratos al glutamato, ATP y iones amonio ( $\text{NH}_4$ ) dando como productos a glutamina, ADP y fosfato inorgánico, con ello se explica porqué las concentraciones de glutamato en las neuronas son más elevadas que en astrocitos.

Finalmente se caracterizó que la actividad de glutaminasa se encontraba presente en SNC (22) y posteriormente se demostró que la así llamada “glutaminasa mitocondrial activada por fosfato” se expresa únicamente en neuronas (23,24).

Dejando de lado las enzimas y con la tecnología creciente de DNA recombinante y la generación de anticuerpos se logró caracterizar los transportadores de glutamato de alta afinidad y determinar su localización (ya presuntiva) principalmente glial (25).

Recientemente se han identificado y caracterizado los transportadores de glutamina expresados en células gliales y en neuronas completando las bases teóricas en la propuesta del ciclo glutamato-glutamina (26).

Estos descubrimientos permitieron establecer un esquema bioquímico general de como es que se lleva a cabo el ciclo glutamato-glutamina (Figura 3), en el siguiente apartado se detalla más a fondo cada uno de los elementos que componen el ciclo.

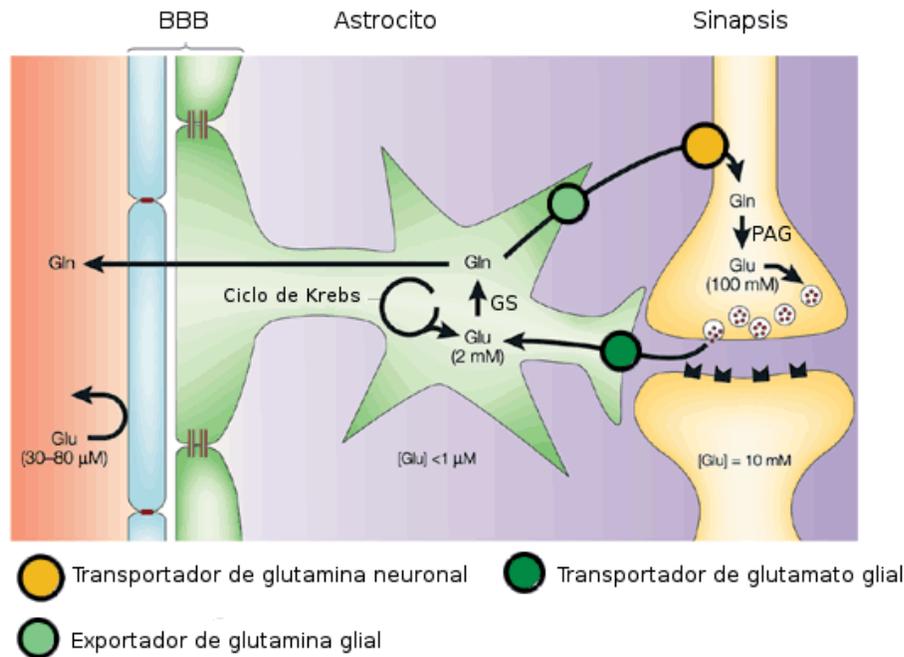


Figura 3. Esquema del ciclo glutamato/glutamina. En este esquema se muestra de manera muy general el ciclo glutamato-glutamina, haciendo énfasis en las concentraciones de los aminoácidos presentes en cada compartimento celular, ésta diferencia de concentraciones en cada aminoácido permitió proponer la existencia de la lanzadera de éstos aminoácidos. Modificado de (27)

#### 1.4.2.1. El Ciclo Glutamato-Glutamina

Como se mencionó anteriormente el ciclo glutamato-glutamina se infirió a partir del uso de trazadores radioactivos y observando la distribución diferencial de los metabolitos generados, posteriormente se comenzaron a describir las proteínas involucradas en el ciclo. Enseguida se detallará de manera breve las características de las proteínas involucradas en el ciclo, pero se hará énfasis en los dos últimos elementos que se abordarán: los transportadores de glutamato de alta afinidad y la glutamina sintetasa para tener un esquema más detallado acerca del trabajo que aquí nos compete.

##### 1.4.2.1.1. Transportadores de Glutamina

Los transportadores de glutamina fueron identificados por homología de secuencia con los transportadores de GABA vesiculares. Los transportadores de glutamina pertenecen a un la familia

genética descrita como SLC 38, las proteínas responsables del intercambio de glutamina entre glia y neuronas pertenecen a una misma familia llamada transportadores de aminoácidos neutros acoplados a sodio (SNAT) del sistema A y del sistema N, la diferencia principal es que el sistema N es un antiportador de protones y el sistema A no presenta ésta actividad.

#### 1.4.2.1.2. Transportadores de Glutamina Gliales (Sistema de Transporte N)

El sistema de transporte de aminoácidos N fue identificado en 1980 y sus miembros han sido caracterizados durante los últimos treinta años. Estas proteínas funcionan como acarreadores de varios aminoácidos incluyendo glutamina, asparagina e histidina (28,29). En SNC las proteínas de esta familia que se expresan son SNAT3 y SNAT5, los cuales se encuentran expresados preferentemente en astrocitos, estos transportadores acoplan el transporte de aminoácidos a un ion sodio y parecen poder tener un transporte de aminoácidos bidireccional. El sistema de transporte N presenta una topología propuesta de nueve segmentos transmembranales con el extremo amino terminal citoplasmático y el carboxilo terminal extracelular (figura 4). La afinidad de estos transportadores por la glutamina es de  $K_m \approx 1-1.5\text{mM}$  y se ha propuesto como las proteínas principales para el exporte de glutamina en células gliales (30,31).

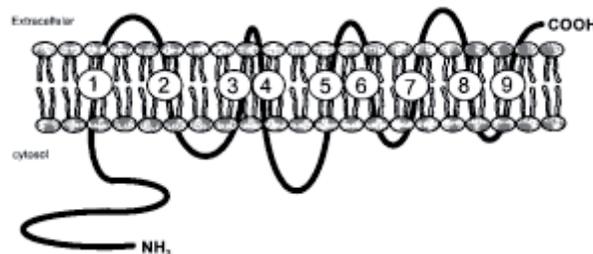


Figura 4. Topología de SNAT3. Topología propuesta para el transportador SNAT3 presente en astrocitos, la estructura se determinó con base en el índice de hidrofobicidad (31)

#### 1.4.2.1.3. Transportadores de Glutamina Neuronales (Sistema de Transporte A)

Los transportadores de glutamina neuronales pertenecen al sistema de transporte A, el cual fue

bioquímicamente caracterizado en los años sesentas por el grupo de Halvor N. Christensen en eritrocitos (32). La identificación y clonación de las proteínas que constituyen este sistema se han llevado a cabo en los últimos 20 años, aunque es posible que no todas las proteínas responsables del transporte de glutamina hayan sido encontradas (33).

Los transportadores del sistema A que se expresan en neuronas son SNAT1 y SNAT2. El transportador SNAT2 se caracterizó por clonación y expresión en células CV-1, la afinidad por glutamina en estas condiciones se caracterizó en  $K_m \approx 1.65 \pm 0.27$  mM para glutamina (34).

El transportador SNAT1 se clonó, expresó y caracterizó en células CV-1 presentando una afinidad por la glutamina de  $K_m \approx 0.49 \pm 0.9$  mM a  $pH=7.4$  (35).

El análisis de la secuencia primaria realizada de forma independiente sugirieron una topología semejante para los dos transportadores con once segmentos transmembranales, dos sitios probables de N-glicosilación extracelulares conservados y un sitio conservado de probable fosforilación por PKC (Figura 5).

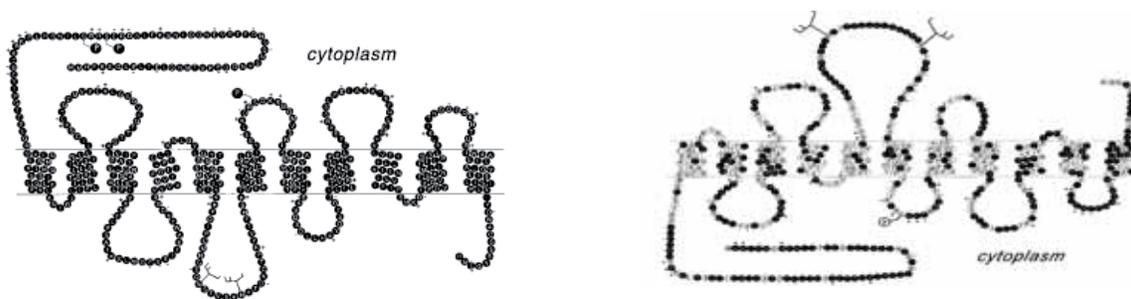


Figura 5. Topología de los transportadores SNAT1 y SNAT2. En el panel izquierdo se muestra la topología predicha para el transportador SNAT1 y en el derecho la topología predicha para el SNAT2, obsérvese que la topología predicha es la misma, con los sitios de fosforilación y glicosilación putativos altamente conservados (34,35)

#### 1.4.2.1.4. Glutaminasa

La enzima glutaminasa (E.C. 3.5.1.2) fue caracterizada en los años cincuentas y se determinó que

diversos tejidos presentaban esta actividad (22). Posteriormente se encontró que las proteínas encontrada en riñón y en hígado eran diferentes, tratándose de isoenzimas expresadas de forma tejido específico (36,37). La glutaminasa de hígado enriquecida por la técnica de “salt in-out” y cromatografía de exclusión molecular presenta una afinidad por la glutamina de  $K_m \approx 20\text{mM}$ , mientras que la expresión heteróloga y purificación de la enzima de riñón presenta una afinidad por la glutamina de  $K_m \approx 5\text{-}10\text{mM}$  (37,38). Tanto la isoenzima caracterizada en hígado como la caracterizada en riñón se han encontrado que se expresan en SNC con propiedades de regulación diferentes, aunque la isoforma caracterizada en riñón es la enzima principal que participa en el ciclo glutamato-glutamina al llevar a cabo alrededor del 70% de la conversión de glutamina a glutamato en la neurona (39).

El ratón *knock-out* para la isoforma de riñón, como era de esperarse, presenta una serie de alteraciones directamente relacionadas con la neurotransmisión glutamatérgica y gabaérgica, tales como disminución en la liberación de los neurotransmisores y disminución en el tiempo de la tasa de decaimiento ( $\tau$ ) de la corriente del potencial excitatorio postsináptico en corteza cerebral, demostrando con esto la importancia de la glutaminasa en la neurotransmisión glutamatérgica(39).

#### 1.4.2.1.5. Transportadores de Glutamato Vesiculares

Una vez convertida la glutamina en glutamato, éste es capturado por los transportadores de glutamato vesiculares para rellenar las vesículas de neurotransmisor. Hasta el momento se han caracterizado tres familias de transportadores de aminoácidos vesiculares, SLC17, SLC18 y SLC32, agrupados de acuerdo a la especificidad por su substrato y homología de secuencia. La familia SLC17 es transportador específico de aminoácidos aniónicos, tres de sus miembros han sido caracterizados como transportadores de glutamato (VGLT1, VGLT2 y VGLT3) (40).

Los transportadores de glutamato vesiculares fueron identificados inicialmente como transportadores de fosfato inorgánico, y pocos años más tarde se encontró que su papel fisiológico era el transporte de glutamato a vesículas en neuronas glutamatérgicas dándole el nombre de VGLUT1. VGLUT2 se caracterizó también como un transportador de fosfato inorgánico pero el análisis de homología de secuencia permitió relacionarlo con VGLUT1. El último transportador en caracterizarse fue VGLUT3 ya que había evidencia de que algunas neuronas dopaminérgicas y astrocitos también liberaban glutamato, sin embargo no expresaban ninguna de las proteínas VGLUT conocidas (41).

Debido a que la cantidad necesaria de glutamato en las vesículas para realizar la neurotransmisión es elevada, la concentración de glutamato en las vesículas debe ser alrededor de un orden de magnitud mayor que las concentraciones citoplásmicas, por lo que los transportadores de glutamato vesiculares deben de ser proteínas transportadoras dependientes de energía para generar el gradiente de concentración, la energía que los transportadores utilizan es el potencial de membrana ( $\psi$ ) y el gradiente de pH, estas fuerzas son generadas a través de la actividad de una ATPasa transportadora de protones, la cual acidifica las vesículas permitiendo general el gradiente de protones al usar la energía liberada por la hidrólisis del ATP y cambiando el potencial de membrana (42).

Los transportadores VGLUT1 y VGLUT2 presentan una afinidad por glutamato  $K_m \approx 1-5 \text{ mM}$  mientras que VGLUT3 tiene menos afinidad por la glutamina. La importancia de los VGLUT se ha mostrado en ratones *knock-out*, éstos ratones cuales presentan alteraciones en el la liberación cuántica de glutamato, y también se ha propuesto su participación activa en aprendizaje y memoria al regular el llamado “tamaño cuántico” (*quantal size*) en la liberación de glutamato al espacio sintético (43,44).

#### 1.4.2.1.6. Transportadores de Glutamato de Alta Afinidad

Hasta el momento se han clonado y caracterizado cinco transportadores de glutamato de alta afinidad expresados en SNC. Los transportadores neuronales de alta afinidad son tres, Transportador de Aminoácidos Excitatorios (EAAT; Excitatory Aminoacid Transporter) 3, 4 y 5 (los homólogos en roedores son: EAAT1, GLAST; EAAT2, GLT1; EAAT3, EAAC1). EAAT3 se encuentra expresado prácticamente en neuronas de todo el encéfalo, EAAT4 restringe su expresión a neuronas de Purkinje localizadas en el cerebelo y EAAT3 únicamente se expresa en neuronas de retina. En los últimos años se ha realizado un esfuerzo por caracterizar la regulación de los transportadores y se han encontrado diversas variantes expresadas por corte y empalme alternativo haciendo más complejo el sistema de transporte de glutamato y dando relevancia a los transportadores de glutamato tanto neuronales como gliales.

Debido a que este trabajo no se enfoca en los transportadores de glutamato neuronales no se seguirán abordando los mismos, sin embargo hay una gran cantidad de información acerca de los mismos en las siguientes revisiones Danbolt 2001, Takayasu y cols. 2009, Kanai y Hediger 2004, Raiteri y cols. 2002, Amara y Fontana 2002, Gegelashvilli y Schousboe 1998.

#### 1.4.2.1.6.1. *Transportador de Glutamato GLT1/EAAT2*

El transportador de glutamato GLT1 se clonó por vez primera a partir de cDNA de cerebro de rata, su sobreexpresión en células HeLa demostraron una afinidad por glutamato  $K_m \approx 2 \mu\text{M}$  y el análisis bioinformático reveló una topología de ocho segmentos transmembranales, estudios posteriores han corroborado la afinidad del transportador en el intervalo micromolar con variaciones de acuerdo al sistema celular de expresión utilizado variando de  $2 \mu\text{M}$  a  $20 \mu\text{M}$  (45). Pronto se realizaron anticuerpos contra este transportador y su análisis de expresión demostró su presencia en astrocitos de prácticamente todo el encéfalo, con elevada expresión en la neocorteza y en la formación hipocampal. La expresión ontogénica de GLT1 se caracteriza por una baja expresión en etapas embrionarias y aumento en su expresión directamente proporcional a la edad del organismo.

Se han descrito diversas variantes de mRNA de GLT1 generadas por “corte y empalme” alternativo que generan diferentes proteínas las cuales varían en la longitud y/o secuencia de sus extremos carboxilo o amino terminal (Figura 6A y 6B) y también se han encontrado variantes que procesan el mRNA en los exones internos (figura 6A) generando variantes de la proteína.

Respecto a las formas de “corte y empalme” alternativo en el extremo 5', existen al menos cuatro isoformas que varían en el extremo 5' UTR del mRNA (46) y se ha establecido que estas isoformas cambian su patrón de expresión a nivel traduccional tanto en condiciones fisiológicas (47) como en patológicas tales como la hipoxia, estrés oxidativo y la Esclerosis Lateral Amiotrófica (ALS) (48,49). Se han caracterizado dos isoformas que cambian los aminoácidos del extremo amino terminal (Figura 6B), estas isoformas de proteína varían en su expresión en tejido, expresándose abundantemente en hígado la isoforma corta y en cerebro la isoforma larga (50), es probable que estas variedades aunque no cambian las propiedades cinéticas del transportador, si cambien la interacción con otras proteínas tales como Ajuba y así probablemente regulando la transducción de señal inducida por glutamato (51).

El extremo 3' del mRNA que codifica para GLT1 presenta tres isoformas de corte y empalme alterativo GLT-1<sup>a</sup>, GLT-1b (también llamado GLT1v) y GLT-1c (Figura 4 B) (52), estas variantes codifican para proteínas que varían justamente en el dominio PDZ por lo que se ha propuesto que modifican su interacción con proteínas del citoesqueleto y de andamiaje, además se ha demostrado que estos residuos no cambian la cinética de transporte cuando son analizados por expresión heteróloga (53) si no que la interacción con proteínas de andamiaje permite que cambie sus propiedades electrofisiológicas

como la corriente de fuga (54) con proteínas. Es interesante hacer notar que la isoforma GLT-1b se ha propuesto que se expresa en neuronas siendo el presunto transportador de glutamato cuya existencia había sido predicha (55,56).

Las isoformas de mRNA que se procesan por “corte y empalme” alternativo en la región interna de los exones son cuatro hasta el momento. GLT-1 $\alpha$  se caracterizó en rata y carece del exón 9 (57), EAAT2/C4 el cual carece del exón 8 y fue identificado en muestras humanas como una isoforma candidata al diagnóstico de la ALS (58), EAAT2 $\Delta$ 7 se genera procesando el exón 7 y también se ha analizado como un probable factor para el desarrollo de ALS (59), finalmente GLT-1ex4 es una isoforma encontrada en rata la cual carece del exón 4 y a parte de su perfil de expresión en SNC y en testículo poco se conoce de este mRNA (60). Un estudio reciente ha revelado que las isoformas carente del exón 7, 8 y 9 al ser coexpresadas con la proteína completa, forman heterómeros y la afinidad de estos complejos por el substrato disminuye (61).

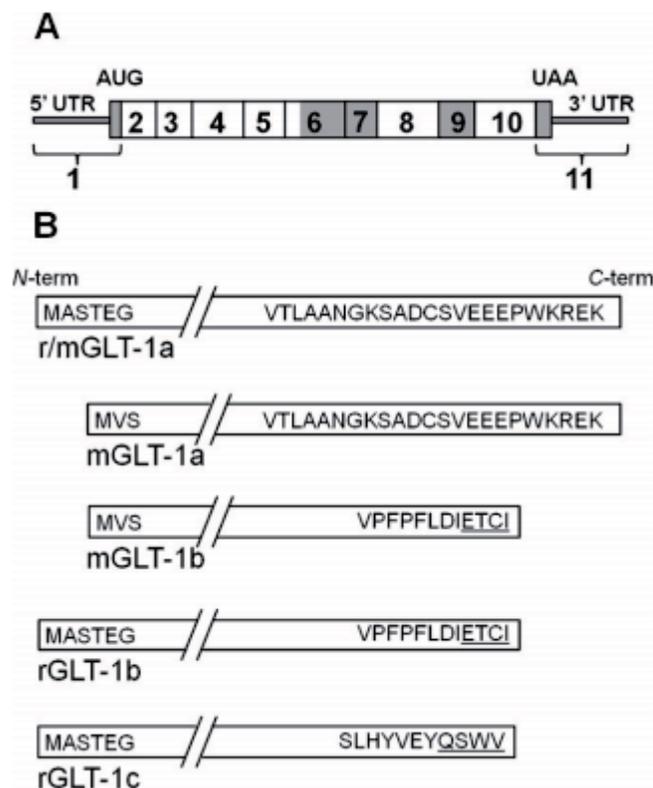


Figura 6. Variantes de mRNA y proteína del transportador GLT1. (A) Estructura del gen de GLT1, los exones que presentan procesamiento por corte y empalme alternativo se muestran en gris, cada

segmento enumerado del 1 al 11 representan los exones. (B) Estructura de las diferentes variantes de proteína GLT1 generadas por variantes de corte y empalme alternativo, se muestra los aminoácidos que varían y la longitud relativa de cada proteína. Tomado de (62)

La regulación transcripcional de GLT1 se ha estudiado ampliamente desde la clonación de su secuencia promotora (63) y con ello se ha reconocido al factor de transcripción NF- $\kappa$ B como un actor principal (Figura 7) ya sea como activador o represor transcripcional (64), se ha identificado que el sitio de unión de NF- $\kappa$ B se encuentra en la posición -272 respecto al sitio de inicio de la transcripción, el cual es activado por la ceftriaxona y se ha propuesto como blanco terapéutico en enfermedades involucradas con GLT1 (65,66). Estudios recientes han demostrado otras formas de regulación transcripcional, tales como la activación por PPAR- $\gamma$  (67), inducción transcripcional por RNA no codificante (68) y la activación de la proteína KBBP reclutando factores de transcripción, éste último mecanismo es regulado de manera presináptica y es parte del mecanismo por el cual los cultivos de astrocitos no expresan GLT1, éste evento tiene implicaciones fisiológicas evidentes en la interacción glía-neurona (69).

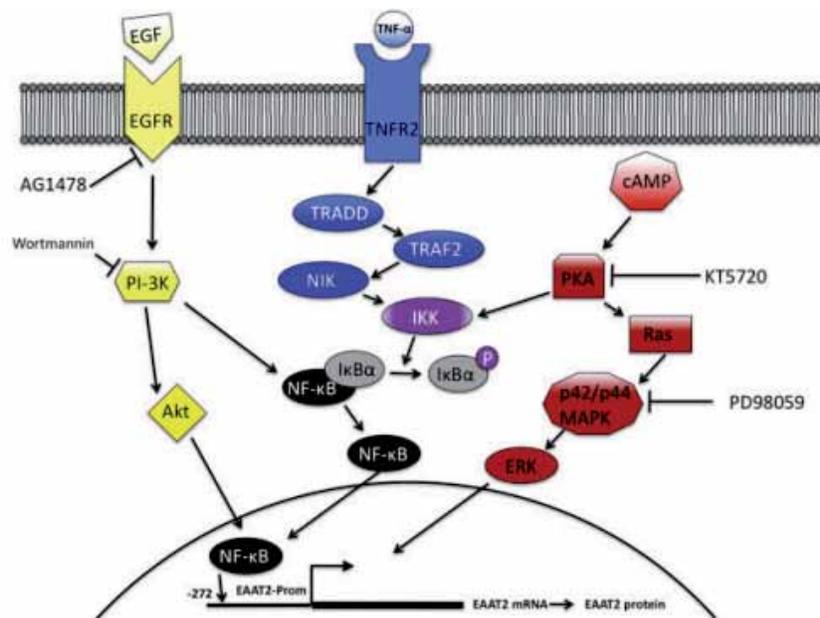


Figura 7. Vías de señalización las cuales inducen la transcripción de GLT1. Se ha caracterizado que la activación de la vía de las MAPK por factores de crecimiento tales como EGF culmina en la activación

de NF- $\kappa$ B de esta forma activando la transcripción de GLT1. La activación de TNFR2 por TNF- $\alpha$  lleva a la fosforilación de I $\kappa$ B $\alpha$  liberando a NF- $\kappa$ B y así activando la transcripción de GLT1. Tomado de (70)

El transportador GLT1 también se regula de forma epigenética, aunque pocos trabajos se han enfocado en este campo, se ha demostrado que en la región promotora existe una isla CpG cuya metilación está inversamente relacionada con la expresión de GLT1 (71,72). Otro nivel de regulación del transportador es a través de la formación de “clusters” de GLT1 membranales, este mecanismo parece estar regulado por la activación del propio transportador y probablemente por PKC, de manera interesante la formación de clusters está asociada al incremento de la actividad del transportador y a la vez a su internalización y degradación, formando un asa de retroalimentación y anteroalimentación dual (73). También se ha demostrado que el transportador es susceptible de ubiquitinación, mecanismo por el cual cambia su endocitosis constitutiva y se degrada, este fenómeno es iniciado por la activación de PKC (74,75).

#### 1.4.2.1.6.2. Transportador de Glutamato GLAST/EAAT1

La secuencia codificante para el transportador de glutamato de alta afinidad GLAST, fue y clonado en 1992 en oocitos de *Xenopus*, la cinética de Michaelis-Menten demostró una afinidad por glutamato de  $K_m \approx 70 \mu\text{M}$  (76).

Al igual que el mensajero de GLT1, se han encontrado diversas formas de “corte y empalme” alternativo del mRNA de GLAST. Hasta el momento se han encontrado tres formas de “corte y empalme” alternativo (Figura 8), la primera isoforma encontrada carece de exón 3 (GLAST1<sup>a</sup>) (77), la siguiente isoforma identificada carece del exón 9 (GLAST1b) (78) y la última carece del exón 5 y 6 (GLAST1c) (79). Poco se conoce acerca de estas isoformas de GLAST, sin embargo GLAST 1<sup>a</sup> y 1b incrementan su expresión en condiciones de hipoxia y parecen regular negativamente la captura de glutamato (62,80)

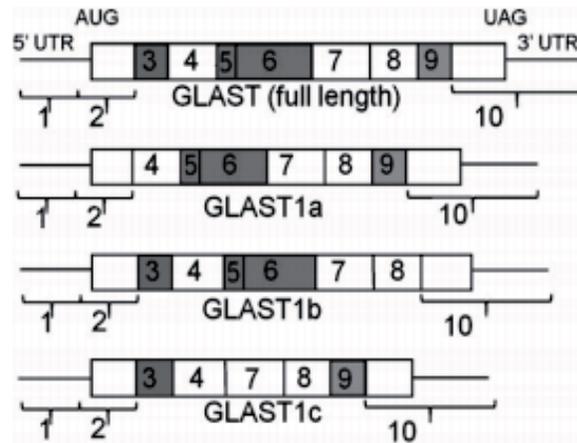


Figura 8 . Variantes de mRNA del transportador GLAST. Estructura del gen de GLT1, los exones que presentan procesamiento por “corte y empalme” alternativo se muestran en gris, cada segmento enumerado del 1 al 10 representan los exones. Tomado de (62)

Diversos factores modifican la expresión de GLAST, sin embargo los elementos en *cis* que regulan su transcripción están pobremente caracterizados, inicialmente se logró clonar 1.9 Kb río arriba del sitio de inicio de transcripción del gen EAAT1 de humano, los experimentos con esta región permitieron demostrar la unión de las proteínas Sp1, Sp3 y USF1, los experimentos con este fragmento también demostraron que la regulación transcripcional es muy variable al contexto celular, indicando una gran variedad de factores basales en el contexto celular involucrados en su regulación transcripcional (81).

El estudio de la secuencia promotora de GLAST es una cuestión difícil ya que las secuencias que flanquean la región del mRNA inmaduro no son regiones conservadas en las especies, por lo que las herramientas de alineamiento básico proporcionan poca información. Un análisis más detallado de la región promotora en humanos y rata fue llevado a cabo por el grupo de Engele Unger (2012), en este estudio se compararon la región promotora ya caracterizada de EAAT1 con la secuencia de rata, de manera muy interesante encontraron que aunque las secuencias no comparten homología existen varios sitios consenso de unión a ciertos factores de transcripción (CART, CEBP, GATA, HAML, MZF1, NfκB, NKXH, Oct1, SP1 y YY1) y el sitio basal de transcripción es de longitud muy parecido en ambas especies sugiriendo mecanismos de expresión basal semejantes para ambas especies. Sin embargo, no se ha elucidado el mecanismo de factores bien caracterizados que cambian la expresión de

GLAST (82–84).

Otro punto de regulación estudiado para la actividad de GLAST es el tráfico membranal del transportador (85). Se ha encontrado que alrededor del 70% de GLAST se encuentra en un compartimento intracelular (86), lo que sugiere que un punto de regulación que puede llevar cambios importantes en la actividad del transportador es la regulación de su tráfico desde y hacia la membrana citoplásmica. Los experimentos llevados a cabo por Guillet y cols (2005) demostraron que el bloqueo de PKA y la activación de PKC decreta la cantidad de transportadores GLAST en membrana citoplásmica, aumentando la cantidad de transportadores intracelulares (87), lo cual indica que la activación de PKC lleva a la internalización de GLAST mientras que la activación de PKA es importante para mantener a GLAST en la superficie celular.

La observación de que el factor IGF1 incrementa la captura de glutamato dependiente de GLAST (88) culminó en un mecanismo nuevo de regulación del transportador en el cual la interacción con la proteína Nedd4-2 con GLAST induce la disminución de GLAST, probablemente por ubiquitinación tal como sucede con el transportador GLT-1(74) sin embargo el mecanismo por el cual se regula GLAST dependiente de Nedd4-2 no se encuentra elucidado (89). Finalmente se ha demostrado que los últimos 4 aminoácidos de GLAST forman un sitio de unión para el dominio PDZ de la proteína “Factor regulador intercambiador de Na/H (NHERF)”, esta interacción incrementa la estabilidad de GLAST (90). El acople de GLAST a otras proteínas ha quedado establecido como sustento energético y acople metabólico lo cual de alguna manera puede especularse que este complejo es capaz de regular la actividad del transportador (91).

#### 1.4.2.1.7. Glutamina Sintetasa

La GS es una enzima que se identificó entre los años cincuenta y sesenta del siglo XX, en el SNC de bovinos por su actividad enzimática, y por dicha actividad se logró aislar y caracterizar (20,21).

El estudio de la regulación de esta enzima comenzó con el paradigma de la retina de pollo, la que presenta expresión diferencial de acuerdo al segmento del ojo, y además su expresión va en relación directa con la edad del pollo (92). Dos trabajos clásicos abrieron el estudio de la regulación de la GS: la caracterización de su regulación *in-vitro* por factores del suero solubles y su regulación por la

integridad del tejido (93,94).

La correlación observada del incremento de la GS con el tiempo del desarrollo del embrión y sus picos hormonales rápidamente dieron lugar a proponer y estudiar la regulación hormonal de la GS (95,96). El gen *GLUL* de pollo fue el primero parcialmente caracterizado, aunque solamente se logró analizar cerca de 400 nucleótidos río arriba del inicio de la transcripción, se encontró un elemento putativo de unión del receptor de glucocorticoides (GR). Aunque de manera interesante se encontró que el extremo 3' UTR es inusualmente grande, un año después se caracterizó parcialmente la secuencia del gen de rata encontrándose elementos semejantes al gen de pollo. Sin embargo, el sitio de unión del GR no se encontró en las 118 pares de bases analizadas río arriba del inicio de la transcripción (97,98) Con base en las secuencias de pollo analizadas y su localización en el genoma del pollo se diseñaron elegantes experimentos utilizando el modelo de retina de pollo para expresar un gen reportero y caracterizar los elementos en *cis* responsables de la regulación ontogénica de la GS (99) Finalmente se mapeó el elemento responsable de la activación por glucocorticoides en la secuencia que abarca del nucleótido -2120 al -2079, esta secuencia se caracteriza por tener un elemento canónico yuxtapuesto de reconocimiento por AP1, CRE y ATF yuxtapuesto y 8 nucleótidos río abajo el elemento de respuesta a glucocorticoides (GRE) a estos sitios en conjunto se propone llamarlos elemento compuesto de respuesta a glucocorticoides (cGRE) (100,101). El mapeo y la caracterización del elemento cGRE explicaba la inducción de GS dependiente de hormonas aunque todavía quedaba una interrogante importante por contestar ¿Porqué la GS presenta menor expresión en células disgregadas al compararse con el tejido intacto? El primer acercamiento directo para resolver esta pregunta fue la correlación inversa observada entre el nivel de expresión de la proteína Jun y la expresión de GS durante el desarrollo del embrión (102), puesto que Jun es un factor de proliferación contrapuesto a la maduración de las células se consideró a la GS como una molécula que indica “maduración celular”, aunque ya se había establecido una relación entre Jun y GS el mecanismo por el cual había una relación inversa entre estas dos proteínas se desconocían. Para ese momento había evidencia acerca de la formación de heterodímeros entre Jun y GR cuyo papel es la represión mutua de estos factores de transcripción (103–105), lo que evidenciaba que el nivel de regulación estaba dado a nivel transcripcional. El elemento que dio una fuerte evidencia que estos eventos se encontraban relacionados fue el haber demostrado que la actividad transcripcional del GR es abatida por la pérdida de los contactos celulares y los niveles de Jun se elevan a la vez y es un fenómeno el cual es dependiente de rearrreglos en el citoesqueleto (106,107).

Últimos reportes han establecido que el aumento en los niveles de Jun por la pérdida de los contactos celulares es debida a diversos mecanismos postranscripcionales específicamente debido a aumento en la traducción dependiente de una secuencia putativa de entrada interna del ribosoma (IRES) (107–109).

La GS también se regula a nivel postranscripcional, este fenómeno es inducido por altos niveles de glutamina extracelular e involucre la degradación del mRNA de GS (110–112) y la disminución de la vida media de la proteína. A nivel postraduccional se ha propuesto que la GS se modifica por nitrosilación en una tirosina ubicada en el sitio activo de la enzima haciéndola inactiva y se ha especulado que la activación de los NMDAR neuronales activan a la enzima óxido nítrico sintasa neuronal (nNOS) culminando en la inactivación de la GS que es glial (113,114).

En la Figura 9 se muestra un resumen de la regulación que hasta el momento se ha caracterizado para la GS en SNC. A pesar de la gran cantidad de grupos que han realizado el esfuerzo por caracterizar los mecanismos de regulación de la GS aún existen fenómenos de regulación no caracterizados para esta enzima (115,116).

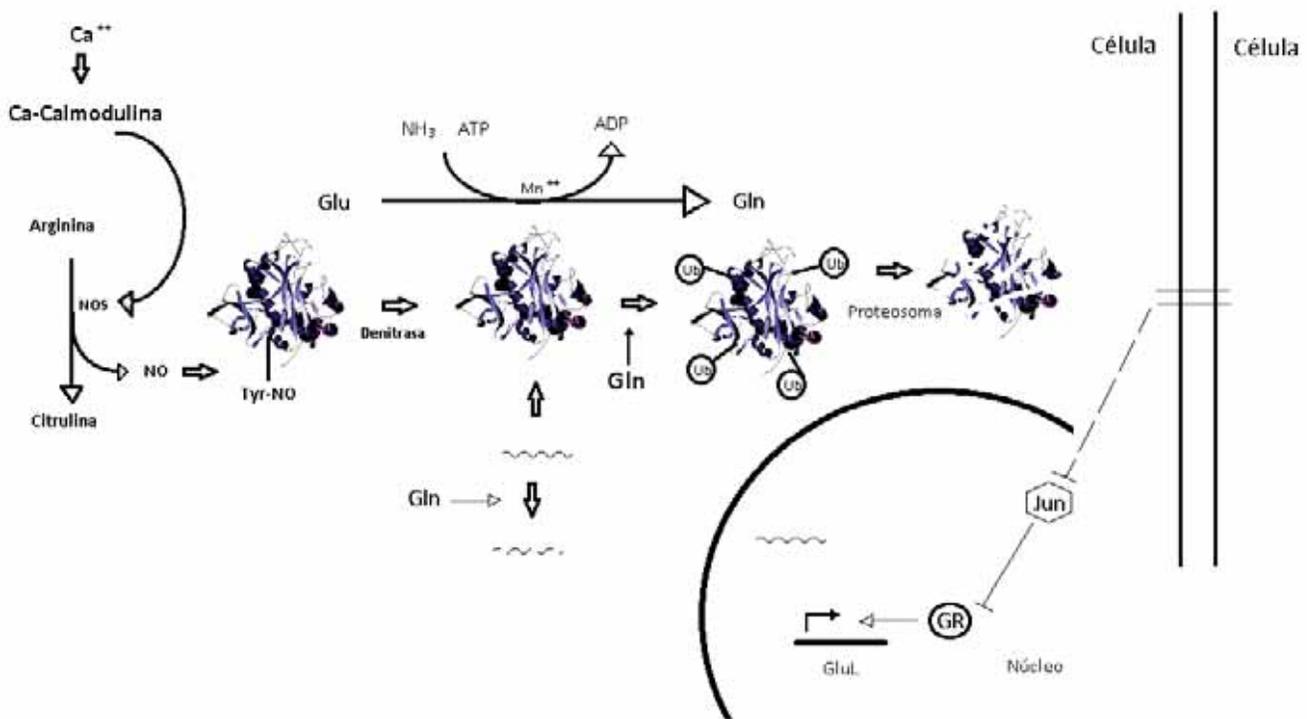


Figura 9. Esquema de la regulación de la GS. Los elementos hasta el momento bien caracterizados en

la regulación de la GS son: El GR, el cual es el factor de transcripción principal que activa la transcripción del mRNA de GS, la activación de éste es regulado por su dimerización con Jun; la producción de óxido nítrico (NO) el cual reacciona con un residuo de tirosina presente en el sitio activo y por lo tanto inactivando la GS; Y la glutamina la cual a través de mecanismos no caracterizados induce la ubiquitinación de la proteína que la lleva a su degradación y la disminución de la vida media del mRNA.

### 1.5. Transducción de Señal Mediada por Glutamato

Los mecanismos de transducción de señal iniciados por glutamato de manera clásica se estudiaron a través de la activación de sus receptores, pero en los últimos años se ha propuesto que la activación de los transportadores de alta afinidad son capaces también de actuar como moléculas transductoras de señal, éstos aspectos se abordarán en los siguientes apartados.

#### 1.5.1. Receptores de Glutamato

Una vez que se aceptó al glutamato como neurotransmisor se comenzó a trabajar sobre la caracterización de sus receptores y en general se encontró que existían dos tipos de respuestas inducidas por este neurotransmisor (y en general por todos los neurotransmisores), una respuesta de tiempo corto y corta duración y una respuesta de tiempo largo y larga duración. La respuesta de corta duración se caracterizó como una respuesta de influjo de iones por lo que a los receptores que inducían esta respuesta se les llamó ionotrópicos. Y en la respuesta de larga duración se observó que cambiaban en general el metabolismo celular por lo que a los receptores que inducían esta respuesta se les llamó receptores metabotrópicos.

##### 1.5.1.1. Receptores de Glutamato Metabotrópicos (mGluR)

Los mGluR son receptores acoplados a proteínas G. De estos receptores mGluR se han identificado 8 genes, de los cuales los receptores: mGluR1, mGluR5 y mGluR4 se ha observado que pueden presentar variantes de “splicing” alternativo. La estructura general de los mGluR consta de varios dominios (Figura 10), el dominio tipo LIBVP (proveniente de: proteína de unión a valina, leucina e isoleucina),

el cual es el responsable de la unión de glutamato, el dominio rico en cisteínas, el dominio de 7 segmentos transmembranales cuyos residuos de aminoácidos en la cara citosólica son responsables del acoplamiento a proteínas G; finalmente estas proteínas presentan un extremo carboxilo terminal largo, el que consta de alrededor de 300 aminoácidos, el cual se ha propuesto que sea blanco de varias cinasas, y por lo tanto module la función de estos receptores (117,118).

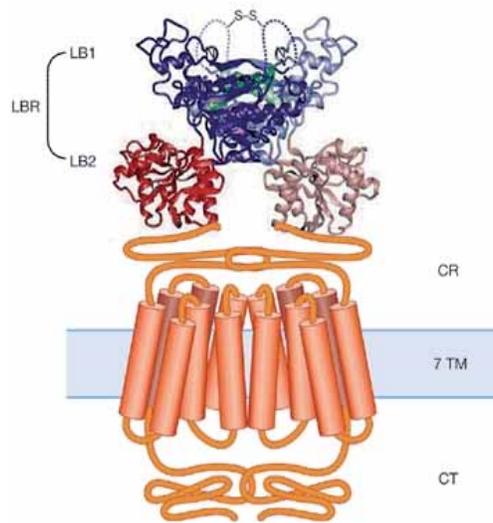


Figura 10. Estructura cristalina del receptor metabotrópico de glutamato subtipo 1 (mGluR1). En la figura se muestra la estructura cristalográfica del mGluR1 en su conformación en reposo. Tomado de (119)

Los mGluR se han clasificado en 3 grupos, de acuerdo a su homología de secuencia, sus propiedades farmacológicas y al sistema de segundo mensajero al cual se encuentran acoplados (Tabla 1).

Tabla 1.- Clasificación de los mGluR. Modificado de (118).

Grupo	Receptor	Proteína G acoplada	Mecanismo de señalización
I	mGluR1	$G\alpha_{q/11}$	Fosfolipasa C      ↓
	mGluR5		
II	mGluR2	$G\alpha_{i/o}$	Adenilato ciclasa      ↓
	mGluR3		
III	mGluR4	$G\alpha_{i/o}$	Adenilato ciclasa      ↓
	mGluR6		
	mGluR7		
	mGluR8		

#### 1.5.1.2. Receptores de Glutamato Ionotrópicos (iGluR)

Los iGluR son canales iónicos que se abren cuando se unen a su ligando, y éstos son funcionales como multímeros. Los iGluR se han subdividido y nombrado de acuerdo a su agonista específico, así tenemos a los receptores NMDA (NMDAR) los cuales permean  $Ca^{++}$  y  $Na^{+}$ , receptores AMPA (AMPA) que su apertura permea  $Ca^{++}$  y/o  $Na^{+}$  dependiendo de las subunidades que conforman al receptor y receptores KA (KAR) que permiten la entrada de  $Ca^{++}$  y/o  $Na^{+}$  dependiendo de las subunidades que lo conforman. Estos receptores comparten características estructurales comunes (Figura 11), por esta razón pueden agruparse en una sola familia. Los iGluR tienen un dominio amino terminal, el cual se encuentra en la cara extracelular; la región S1 se forma después del dominio carboxilo-terminal y la región S2 es un “loop” que se forma entre los dominios transmembranales 3 y 4; finalmente presenta un dominio carboxilo-terminal el cual se ha identificado como un sitio para la regulación de la actividad del transporte de iones a través de la desensibilización por fosforilación (120).

Tabla 2. Receptores de glutamato ionotrópicos y las subunidades que los conforman. Modificado de (Purves 2004).

Receptor	Subunidades que pueden conformar al receptor				
AMPA	Glu R1	Glu R2	Glu R3	Glu R4	
NMDAR	NR1	NR2A	NR2B	NR2C	NR2D
KAR	Glu R5	Glu R6	Glu R7	KA1	KA2

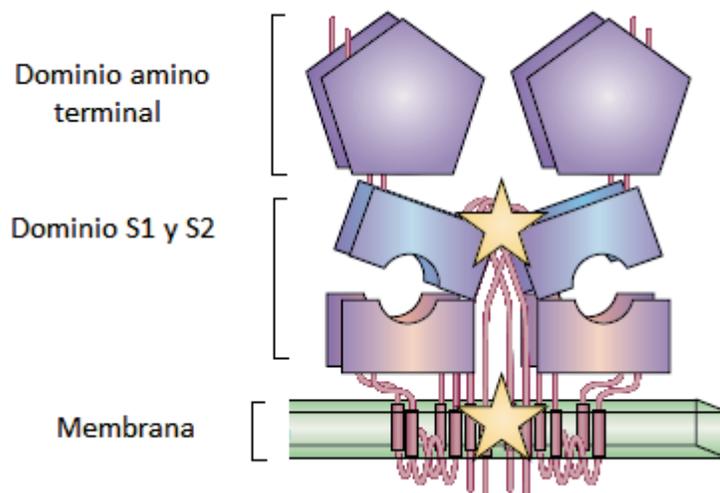


Figura 11. Esquema de la topología de los iGluRs. Las estrellas denotan los sitios de interacción importantes para la formación del tetrámero funcional. Modificado de (121)

### 1.5.2. Transportadores de Aminoácidos Como Moléculas Transductoras de Señal

Aunque de manera clásica se ha estudiado a los receptores como las moléculas transductoras de señal, últimos estudios se han enfocado en el estudio de los transportadores como moléculas transductoras de señal. El enfoque en general tiene dos vertientes, la primera es que los transportadores tienen dominios separados para transportar aminoácidos y para transducir la señal exterior, la segunda vertiente es analizar a los transportadores como moléculas electrogénicas que finalmente semejan a canales iónicos (122,123).

La propuesta de los transportadores como moléculas señalizadoras surgió al observar en levaduras que el transportador de aminoácidos Gap1 es capaz de activar la vía de PKA (124) a pesar de ser incapaz de transportar glutamina encendía vías de señalización, posteriormente se caracterizó el dominio responsable de transducción de señal y por ello se acuñó el nombre de “transceptor” para referirse a estas moléculas las cuales presentan una actividad dual (125).

Respecto a los transportadores de glutamato de alta afinidad, desde hace algunos años se ha demostrado en astrocitos de corteza que la activación de los transportadores lleva a cambios en el metabolismo y en la fisiología de los astrocitos (126–129) Sin embargo, no se habían propuesto mecanismos por el cual esta activación llevara a los cambios fisiológicos. Pocos años después se demostró que el transportador de glutamato GLAST se encuentra asociado a diferentes moléculas encargadas del metabolismo celular y otras tantas formando un macrocomplejo y permitiendo la especulación de la idea del acople con moléculas de andamiaje o antiportadores de segundos mensajeros, lo cual conllevaría a la transducción de la señal por la activación del transportador (91) Se ha propuesto un mecanismo de transducción secundaria en el cual el transportador de glutamato se acopla al antiportador de sodio y calcio permitiendo la entrada de calcio, el cual actúa como segundo mensajero (130,131).

## 1.6. Modelos del Sistema Glutamatérgico

A continuación se describirá dos modelos del SNC ampliamente utilizados en la literatura para el estudio de la regulación de los elementos involucrados en las sinapsis glutamatérgicas, como se verá estos modelos la mayoría de las sinapsis establecidas son de tipo glutamatérgico, lo cual es útil en el estudio de estos elementos.

### 1.6.1. Circuito Cerebelar

Las primeras descripciones anatómicas detalladas de la corteza cerebelar fueron realizadas por Santiago Ramón y Cajal. En la corteza cerebelar se pueden identificar tres capas: la capa molecular, la capa de Purkinje y la capa granular. En la capa granular encontramos a los cuerpos de las células granulares, la capa de Purkinje contiene los somas de las neuronas de Purkinje y entre las mismas se encuentran los cuerpos de las células gliales de Bergmann; finalmente en la capa molecular se encuentran las

arborizaciones dendríticas de las células de Purkinje y las fibras paralelas (que son los axones de las células granulares), estas células establecen sinapsis glutamatérgicas las cuales se encuentran envueltas por los procesos radiales de las células gliales de Bergmann. En la capa molecular también encontramos a las células en canasta y a las células de Golgi que son interneuronas gabaérgicas (Figura 12). Las células granulares son las neuronas más abundantes en el sistema nervioso central de vertebrados, y los axones que proyectan a la capa molecular se bifurcan tomando forma de “T”, y ya que estos axones corren de forma paralela a la “folia” cerebelar se conocen como fibras paralelas. Las células de Purkinje son neuronas con características muy peculiares, al contener las arborizaciones dendríticas más grandes en el encéfalo y un gran cuerpo celular (Kandel et al. 2000; Purves 2004; Afifi et al. 2005).

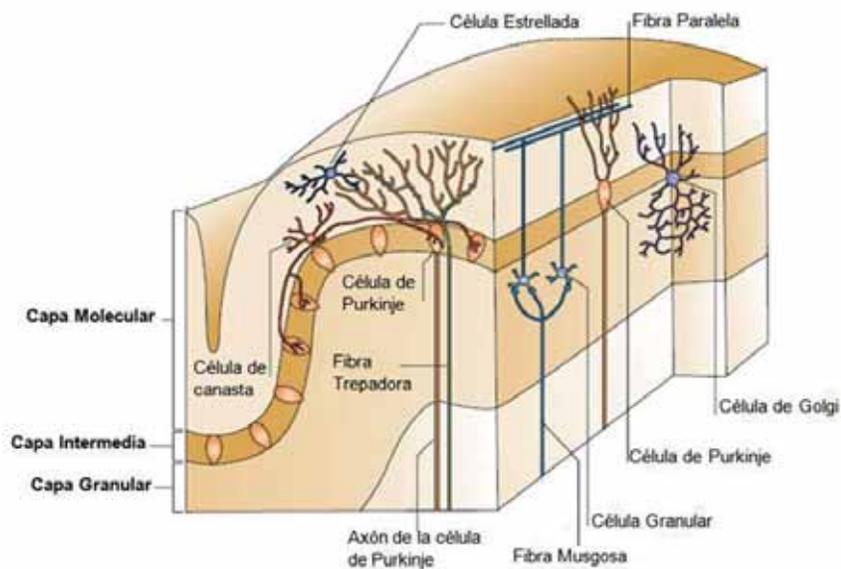


Figura 12. Circuito cerebelar. En la corteza cerebelar se identifican cinco tipos neuronales: las células de Purkinje, las neuronas granulares, las células estrelladas, las células en canasta y las células de Golgi. La única vía eferente es a través de las células de Purkinje, las cuales son activadas por las células granulares y las fibras trepadoras; las células estrelladas, las células en canasta y las células de Golgi son interneuronas gabaérgicas que regulan la despolarización de las neuronas de Purkinje. Modificado de (Kandel et al. 2000)

El circuito en la corteza cerebelar es relativamente sencillo, ya que consta únicamente de una

proyección eferente y de dos aferentes. Las únicas neuronas que tienen proyecciones eferentes en la corteza cerebelar son las células de Purkinje, que proyectan sus axones a los núcleos cerebelares. Las entradas en la corteza cerebelar están proporcionadas indirectamente por las fibras musgosas (axones provenientes de los núcleos pontinos) que activan a las células granulares, y las fibras trepadoras (axones con origen en la oliva inferior) que estimulan directamente a las células de Purkinje. Ambas sinapsis que impactan son de carácter excitatorio y el neurotransmisor liberado es el glutamato. Las interneuronas de la corteza cerebelar se encuentran haciendo sinapsis con las células granulares y con las células de Purkinje, y al ser sinapsis gabaérgicas, éstas regulan la activación de las células de Purkinje (Kandel et al. 2000; Ramnani 2006).

#### 1.6.1.1. Células Gliales de Bergmann

A través del desarrollo del sistema nervioso (SN), cuando las células de la corteza cerebral se encuentran comprometidas a su linaje, comienza la diferenciación de células de glía radial a astrocitos. Sin embargo, en el SNC maduro existen 3 estructuras en las que se conservan células de glía radial, en el bulbo olfatorio, en la retina las células de Müller, y en el cerebelo las células de glía de Bergmann (BGC) (Malatesta et al. 2008).

Las células gliales de Bergmann (también llamadas células epiteliales de Golgi) rodean las sinapsis establecidas por las fibras paralelas y las fibras trepadoras con las células de Purkinje, y su relación con la sinapsis es tan estrecha que incluso el espacio entre la glía de Bergmann y la sinapsis es menor que el espacio de la hendidura sináptica (Lehre y Rusakov 2002). La topología que presentan las células gliales de Bergmann es característica, éstas envuelven a la sinapsis, lo que les permite responder a los eventos de neurotransmisión (Figura 13). Las BGC expresan receptores y transportadores de glutamato, por lo tanto una vez liberado el neurotransmisor éste no solamente activa a la neurona postsináptica, sino que también actúa sobre las BGC, incluso las fibras paralelas tienen sitios de liberación extrasináptica de glutamato que activan únicamente a las BGC (Matsui y Jahr 2004), además existe una relación de 8:1 glía de Bergmann:neuronas de Purkinje para asegurar la cobertura de las sinapsis glutamatérgicas y gabaérgicas. La activación de los receptores y transportadores en la glía de Bergmann provoca cambios en su fisiología a corto, mediano y largo plazo. A corto plazo las células responden modificando postraduccionalmente a proteínas, cambiando los niveles energéticos de la

célula y el tráfico vesicular, a mediano plazo se regula la expresión genética a nivel traduccional y finalmente a largo plazo glutamato regula la transcripción de ciertos genes (Aguirre et al. 2000; Millan et al. 2004; Mendez et al. 2005; Gonzalez-Mejia et al. 2006; Morales et al. 2006; Barrera et al. 2008; Zepeda et al. 2008; Cruz-Solis et al. 2009; Zepeda et al. 2009; Lopez-Bayghen y Ortega 2010).

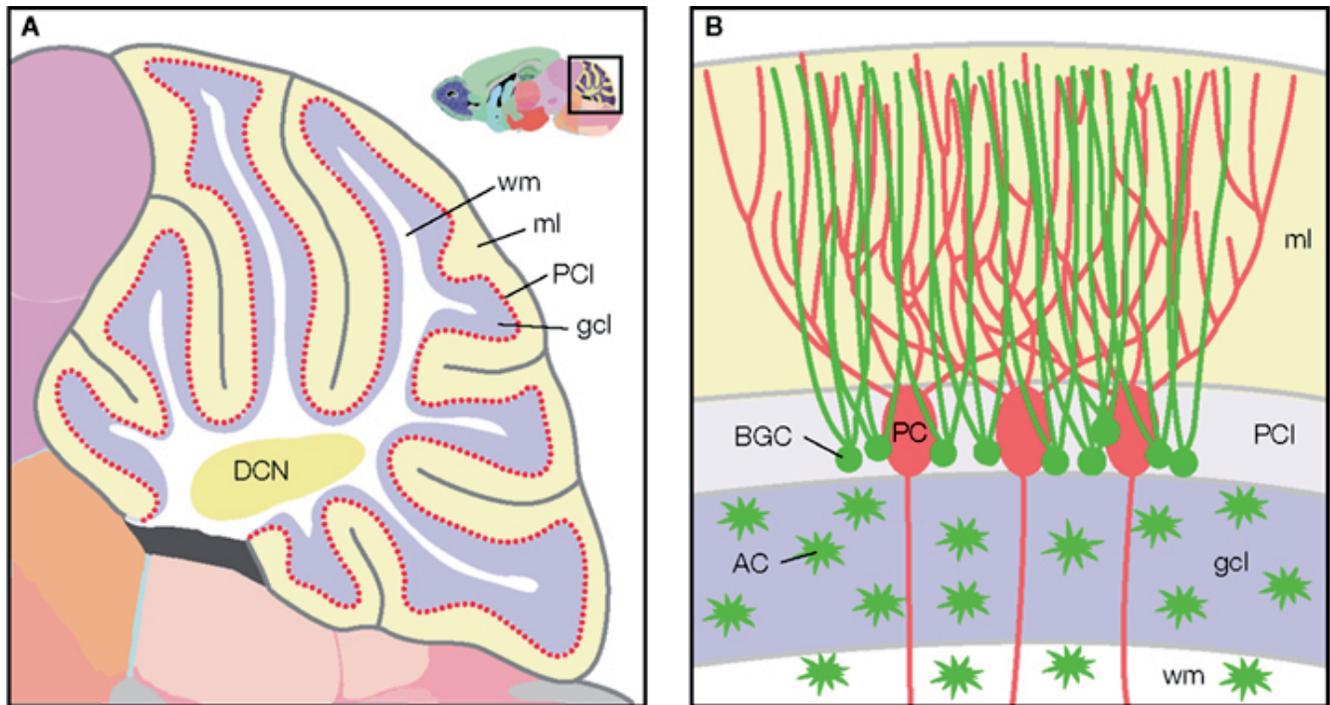


Figura 13. Esquema de la arquitectura cerebelar y las BGC. En el panel A se observa un corte sagital del cerebelo, mostrando las capas que componen la corteza cerebelar. En el Panel B se muestra la cantidad relativa de células presentes en las diferentes capas de la corteza cerebelar, también nótese como los procesos de las BGC se proyectan a la capa molecular por lo que envuelven la sinapsis establecidas por las células granulares y las células de Purkinje. Wm=materia blanca, gcl=capa granular, Pcl=capa de Purkinje, ml=capa molecular. Tomado de (132)

### 1.6.2. Médula Espinal

La médula espinal es la vía principal de flujo de información entre el cerebro y el sistema nervioso periférico. La médula espinal se encuentra envuelta por tres capas de tejido conectivo, las meninges

raquídeas, que de la más externa a la interna son, la duramadre, la aracnoides y la piamadre. Entre la duramadre y la aracnoides se halla el espacio subdural y entre la aracnoides y la piamadre, el subaracnoideo, este último es el que contiene el líquido cefalorraquídeo (133).

La organización de la médula espinal tiene apariencia segmentada debido a los pares de nervios espinales que salen de ella a intervalos regulares y cuya nomenclatura, al igual que la de los segmentos espinales, depende de su localización. Esta organización tiene una secuencia somatotrópica que se puede subdividir de acuerdo a las vértebras que protegen cada segmento medular, así encontramos que la parte cervical tiene aferencias de las extremidades superiores y los hombros, la parte torácica pertenece al tronco, la parte lumbar a las piernas y la parte sacral a los pies. En la cuerda raquídea se aprecian dos engrosamientos, el cervical y el lumbar, ambos coincidiendo con el emplazamiento de los nervios de las extremidades (133).

Cada nervio espinal se conecta con un segmento de la médula espinal mediante dos haces de axones llamados raíces. La raíz dorsal o posterior contiene fibras sensoriales y la raíz anterior o ventral las fibras motoras. Cada una de las raíces posteriores tiene un engrosamiento, el ganglio de la raíz dorsal, en donde se encuentran los cuerpos de las neuronas sensoriales. La sustancia gris medular está subdividida en asta anterior o ventral y en asta posterior o dorsal, y cada una de estas contiene cúmulos de cuerpos neuronales que constituye grupos que somatotópicamente están subdivididos en 10 láminas denominadas láminas de Rexed.

Al igual que la sustancia gris, la sustancia blanca está organizada en regiones: Columnas anteriores, posteriores y laterales. A su vez cada cordón consta de distintos haces de axones o fascículos. Existen dos tipos de fascículos, los sensoriales o ascendentes y los motores o descendentes. Las fibras nerviosas que conforman los fascículos ascendentes emergen de las neuronas de primer orden localizadas en el ganglio de la raíz dorsal. Los tractos ascendentes transmiten información sensorial desde los receptores sensoriales hasta niveles superiores del SNC. Los fascículos ascendentes grácil y cuneado ocupan la columna dorsal (llamado funículo dorsal), estas fibras llevan información relacionada al tacto. En la columna lateral, el tracto espinotalámico lateral está localizado de forma anterolateral, éste lleva información de dolor, temperatura y tacto grueso de estructuras somáticas y viscerales. El tracto espinocerebeloso dorsal y el ventral llevan información de propiocepción inconsciente procedente de músculos y articulaciones al cerebelo. En la columna ventral hay cuatro tractos prominentes: el tracto

espinotalámico anterior, que lleva dolor, temperatura e información relacionada con tacto a los núcleos del tronco del encéfalo y diencefalo; el tracto espino olivar, que lleva información de los órganos de Golgi al cerebelo; el tracto espino reticular y el espino tectal. Fibras intersegmentales que viajan del segmento 2 al 4 son conocidas como fascículo propio o tracto espinoespinal, el cual lleva información de dolor al tronco del encéfalo y diencefalo (134).

Así en términos muy generales tenemos que el circuito neuronal en la médula espinal tiene aferencias que pueden llegar de centros periféricos (como en el caso del arco reflejo simple) o de centros superiores que se conocen como los sistemas o proyecciones descendentes, estas aferencias en general consisten de neuronas glutamatérgicas; las interneuronas gabaérgicas cuyos ganglios se encuentran dentro de la misma médula, estas sinapsis intermedulares se encuentran rodeadas de astrocitos de médula al igual que el resto de las estructuras del SNC, y las neuronas eferentes colinérgicas que proyectan al sistema nervioso periférico (Figura 14).

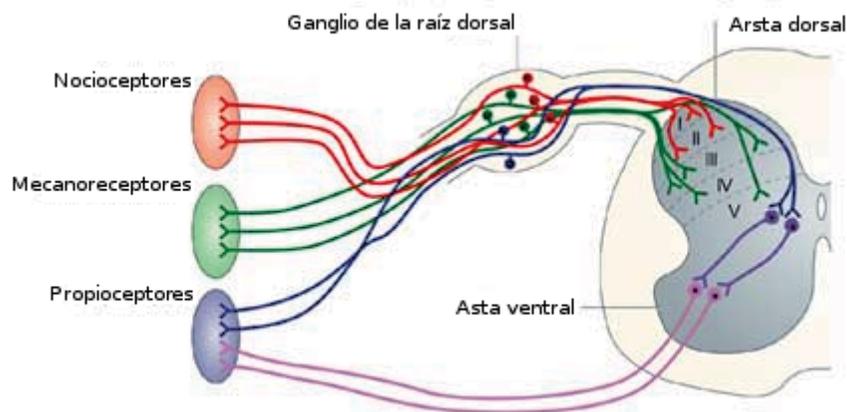


Figura 14. Esquema de las aferencias presentadas en médula espinal. Las aferencias presentadas en el esquema se reducen a las aferencias periféricas iniciadas por los nocioceptores, los mecanoreceptores y los propioceptores, éstas aferencias glutamatérgicas conectan con interneuronas glicinérgicas o gabaérgicas en la médula y las interneuronas conectan con las eferencias colinérgicas que terminan en el sistema periférico. Modificado de (135)

## 2. ANTECEDENTES

La regulación de la GS ha sido ampliamente caracterizada, sin embargo existen factores no caracterizados los cuales modifican su expresión. Se ha propuesto que la liberación glutamatérgica neuronal (persistencia de altas concentraciones de glutamato extracelular) es probable que modifique la expresión de GS, sin embargo, hasta el momento, no se ha podido demostrar que el glutamato modifique la expresión de la GS ante un estímulo glutamatérgico (115,136).

Las BGC al ser un tipo de glía envolvente casi totalmente de sinapsis glutamatérgicas es un buen modelo para el análisis de la respuesta glial a estímulos glutamatérgicos, por ello las BGC puede ser un modelo útil en el análisis de la regulación de la GS por glutamato.

Los cultivos organotípicos de médula espinal han sido un modelo útil para el análisis de diversos fenómenos, específicamente se han propuesto como modelo de neuropatías y en el estudio de blancos terapéuticos en neuropatías asociadas a disfunción medular (137,138). Los cultivos organotípicos son una alternativa de estudio cuando se requiere mantener la arquitectura celular en el tejido de análisis, por lo que son una alternativa en el estudio tanto de condiciones patológicas como fisiológicas de diversos tejidos. Al ser la GS una enzima que se regula por la interacción celular, los cultivos organotípicos ofrecen una oportunidad única en el estudio de la regulación de la GS en el SNC, por ello nos propusimos analizar la expresión de GS en cultivos organotípicos de rata expuestos a un bloqueador de los transportadores de glutamato como estímulo crónico al sistema glutamatérgico(137).

Las células gliales de Bergmann son un modelo adecuado para el estudio de los elemento gliales que participan en las sinapsis glutamatérgicas, y se ha demostrado que responden a estímulos glutamatérgicos modificando la funcionalidad de sus proteínas a corto, mediano y largo plazo en diversos puntos de regulación (transcripcional, traduccional, postraduccional) (139).

Uno de los fenómenos más evidentes de regulación del transportador GLAST presente en BGC es el fenómeno de anteroalimentación negativa en el transporte de glutamato, éste se ha estudiado y caracterizado en el corto plazo (30 a 60 minutos), en donde la activación de los transportadores de glutamato desencadenan la resultante disminución en la captura de glutamato debido a una disminución en la afinidad del transportador por su substrato (129) y a largo plazo (entre las 6 horas y las 12 horas

postestímulo), a diferencia del fenómeno a corto plazo, éste se desencadena por la activación de los AMPAR y se da por la disminución en los niveles de mRNA de GLAST (140–142). Con base en estos fenómenos nosotros nos preguntamos si una exposición aguda a glutamato es capaz de inducir cambios a largo plazo en la captura de glutamato en BGC, y cuál es el mecanismo por el cual suceden estos fenómenos. Estos resultados nos ayudarán a entender la biología de las BGC en el cerebelo.

### 3. OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto de la activación del sistema glutamatérgico sobre los niveles y la actividad de la Glutamina Sintetasa.

Determinar el efecto de la exposición aguda de glutamato sobre la actividad a largo plazo del transportador GLAST.

### 4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analizar la actividad y los niveles de GS en cultivos primarios de BGC y en la línea celular C-6 expuestos a glutamato.
- Analizar la actividad y los niveles de GS en el modelo de miniprismas de cerebelo de rata de 8 días de edad y en cultivos organotípicos de cerebelo de rata expuestos a glutamato de manera aguda.
- Analizar la actividad y los niveles de GS en el modelo de miniprismas de cerebelo de rata adulta despolarizados con altas concentraciones de potasio.
- Analizar la expresión de GS en cultivos organotípicos de médula espinal de rata.
- Analizar los niveles y actividad de GS en cultivos organotípicos de médula espinal en un modelo de activación glutamatérgica de forma crónica.
- Analizar la actividad del transporte de glutamato a largo plazo en BGC expuestas a glutamato de manera aguda.
- Determinar si el efecto de la regulación en la actividad del transportador de glutamato a largo plazo en BGC expuestas a glutamato de manera aguda es dependiente de la activación de los receptores y/o transportadores de glutamato.
- Determinar a que nivel de regulación se lleva acabo el efecto de la exposición aguda a glutamato sobre la actividad del transporte a largo plazo de [<sup>3</sup>H]-D-Aspartato en BGC.

## 5.MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivos organotípicos. Los cultivos organotípicos se realizaron de acuerdo a lo antes publicado (143). Ratas de 8 días de edad fueron sacrificadas por decapitación y se obtuvo la médula espinal o el cerebelo en solución salina Geys (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) a 4°C, las meninges fueron retiradas y la médula y el cerebelo fueron cortados en rebanadas de 350  $\mu\text{m}$  con ayuda de un “tissue chopper” (Millipore, Billerica, MA, USA). 5 rebanadas de médula o 3 rebanadas de cerebelo se colocaron en canastillas “minicells” (Millipore, Billerica, MA, USA) con poro de 0.4  $\mu\text{m}$  y éstas canastillas se colocaron en placas de cultivo de 6 pozos conteniendo 1ml de medio para organotípicos (MEM 50%, HEPES 25 mM, suero de caballo 25%, solución salina de Hanks 20%, glutamina 2mM, glucosa 6 mg/ml, pH=7.2). Los cultivos se mantuvieron a 37°C en 5% de CO<sub>2</sub> y el medio se cambió cada tercer día por medio fresco y los cultivos se mantuvieron en éstas condiciones 7 días *in-vitro*.

Los cultivos organotípicos de cerebelo de rata al día 8 *in-vitro* se adicionó una concentración final de glutamato 1 mM al medio de cultivo y se incubaron por el tiempo indicado.

Para los cultivos organotípicos de médula espinal, el día 8 *in-vitro* se cambió el medio por medio libre de suero (MEM 75%, HEPES 25 mM, solución salina de Hanks 20%, glutamina 2 mM, glucosa 6 mg/ml, pH=7.2), los cultivos se incubaron 24 horas y se adicionó al medio THA (o vehículo; NH<sub>4</sub>OH 10 mM) (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA) a la concentración indicada, el medio se cambió cada tercer día adicionando THA en cada cambio de medio y los cultivos se mantuvieron de esta forma hasta el final del tratamiento.

Una vez terminado el tiempo de tratamiento, los cultivos fueron colectados en un tubo Eppendorff de 1.5ml en 50 $\mu\text{l}$ /rebanada en solución de imidazol 50 mM (pH=7.4), el tejido se disgregó con un “pellet-pestle” (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA) a 4°C y sonicados a baja frecuencia por tres ciclos de sonicación/reposo de 5 segundos, los extractos se centrifugaron 10000xg a 4°C por 10 minutos y se tomó una alícuota para cuantificar proteínas totales por el método del ácido bicinonínico.

### Cultivos primarios de BGC

Los cultivos primarios de BGC se realizaron de acuerdo a lo publicado por (144). Embriones de pollo

de 14 días se sacrificaron y se obtuvo el cerebelo en solución salina de Puck ( $\text{CaCl}_2$  1 mM,  $\text{MgSO}_4$  0.6 mM, KCl 50 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.1 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  1.1 mM, NaCl 130 mM, glucosa 6 mM) a 4°C, el tejido se disgregó de manera mecánica y química con tripsina y Dnasa, el tejido disgregado se centrifugó y el sobrenadante se diluyó en azul de tripano para realizar una cuenta viable. La suspensión celular se diluyó a un millón de células/ml en DMEM con 10% suero fetal bovino, glutamina 2 mM y gentamicina 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , las células se mantuvieron in-vitro entre cuatro y siete días previo a los tratamientos. Previo a cada tratamiento el medio se sustituyó por medio libre de suero durante una hora y se adicionó los tratamientos indicados, los inhibidores se colocaron 30 minutos previo a los agonistas. Para realizar los ensayos de inmunodetección en fase sólida y los ensayos de actividad enzimática, los cultivos fueron lavados dos veces con PBS y cosechados en PBS+PMSF 1 mM, la suspensión se centrifugó a 10000xg por 15 minutos a 4°C y se retiró el sobrenadante por aspiración y las células se resuspendieron en solución amortiguadora RIPA con detergentes o imidazol (pH=7.4) e inhibidores de proteasas, se incubaron en agitación por 30 minutos y se centrifugaron para coleccionar el sobrenadante. La proteína total se cuantificó por el método de Bradford.

#### Miniprismas de cerebelo de rata

Ratas de 8 días de edad o adultas fueron sacrificadas por decapitación, se obtuvo el cerebelo y se cortó con ayuda de un “tissue chopper” (McMillan) de forma sagital y coronal, los cortes se colocaron en solución salina de Krebs-Ringer (glucosa 1.8,  $\text{MgCl}_2$  0.047, KCl 0.34, NaCl 7,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.1,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0.18,  $\text{Na}_2\text{HCO}_3$  1.26; gramos/litro) a 37°C con burbujeo constante de  $\text{CO}_2$ . Se permitió la estabilización del tejido por una hora y se tomaron las alícuotas necesarias de la suspensión del tejido para realizar los tratamientos.

Para realizar los ensayos de inmunodetección en fase sólida y los ensayos de actividad enzimática, los miniprismas se colocaron a 4°C y la suspensión se centrifugó a 10000xg por 15 minutos a 4°C, se retiró el sobrenadante por aspiración y las células se resuspendieron en imidazol 50 mM (pH=7.4), la suspensión se sonicó por 3 ciclos de 5 segundos cada uno sonicación/reposo a 4°C y los extractos se centrifugaron a 10000xg por 15 minutos a 4°C y se recuperó el sobrenadante. La proteína total se cuantificó por el método de Bradford.

## Inmunofluorescencia

Los cultivos organotípicos se fijaron con paraformaldehído 4% a temperatura ambiente por una hora y posteriormente se lavaron 3 veces con PBS por 15 minutos cada vez, una vez fijadas las rebanadas, éstas fueron bloqueadas en solución PBS-Tritón X-100 (0.2%) con 5% de suero de caballo. Las rebanadas bloqueadas se incubaron toda la noche con anticuerpo primario ratón anti GFAP (1:2000) (Abcam, San Francisco, CA, USA), conejo anti GS (1:10000) (Sigma, St.Louis, MO, USA), ratón anti SMI32 (1:1000) (Sternberger Monoclonals Inc., Princeton, NJ, USA) a 4°C. Las rebanadas fueron lavadas en PBS-Tween 20 (0.2%) (PBST) tres veces por 15 minutos e incubadas con el anticuerpo secundario apropiado Alexa Fluor<sup>®</sup> 555 cabra anti-conejo, Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 cabra anti-ratón ó Alexa Fluor<sup>®</sup> 546 cabra anti-conejo (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA) diluidos en solución amortiguadora de bloqueo por 1 hora a temperatura ambiente, después de la incubación las rebanadas se lavaron dos veces con PBST, posterior a esto las rebanadas se incubaron con DAPI por 20 minutos y se lavaron nuevamente tres veces con PBST. Finalmente las rebanadas se montaron con Superfrost<sup>®</sup> (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) en medio de montaje Fluoromount-G (SouthernBiotech, Birmingham, AL, USA). La fluorescencia fue visualizada por microscopia confocal (Leica TSC SP5; Leica Microsystems, Deerfield, IL, USA u Olympus FluoView<sup>TM</sup> FV1000; Hamburg, Germany)

## Inmunodetección en fase sólida

Cantidades iguales de proteínas (50 µg - 100 µg para cultivos en monocapa y 5 µg - 15 µg para cultivos organotípicos o miniprismas) fueron separadas por SDS-PAGE 10%, las proteínas fueron electrotransferidas a membranas de nitrocelulosa a corriente constante (180 mA) por 2 horas, la membrana se tiñó con Rojo de Ponceau para confirmar la presencia de proteínas y verificar la misma carga en cada muestra, la membrana fue lavada con PBS hasta desteñir y se bloquea por 2 horas con TBS 0.1% Tween20 (TBST) con 5% de leche descremada. La membrana se incubó a 4°C con los anticuerpos primarios correspondientes, anti-GS (1:30000) (Sigma, St.Louis, MO, USA), anti-actina (1:250) o anti-GLAST (1:1000) en TBST durante toda la noche. Las membranas se lavaron 3 veces con TBST a temperatura ambiente y se incubaron con anticuerpo secundario correspondiente anti-conejo

(1:4000) (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK) o anti-ratón (1:2000) (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK) acoplados a peroxidasa de rábano por 2 horas a temperatura ambiente, las membranas se lavaron 3 veces con TBST, las membranas se revelaron con el reactivo ECL Chemiluminescent Substrate Reagent Kit (Life Technologies) y las imágenes fueron capturadas en un fotodocumentador MicroChemi (DNR Bio-Imaging Systems). El anticuerpo monoclonal anti-actina fué donado por el doctor Manuel Hernández (Cinvestav-IPN). El anticuerpo anti-GLAST fué producido en nuestro grupo de trabajo (145). El análisis densitométrico se realizó con el software ImageJ y el análisis estadístico con el software Prism, GraphPad (San Diego, CA, USA)

#### Actividad de GS

La actividad de GS se determinó de acuerdo a lo publicado por (146). 100 µg de proteína de cultivos en monocapa ó 10 µg de proteína proveniente de cultivos organotípicos o miniprismas se mezclaron con 45 µl de la solución de ensayo para actividad de GS (Concentración final: imidazol 50 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 20 mM, ADP 0.16 mM, L-glutamina 50 mM, hidroxilamina 25 mM y MnCl<sub>2</sub> 2 mM), la mezcla de reacción se incubó por 90 minutos a 37°C. Para detener la reacción se añadió 200 µl de solución de paro (FeCl<sub>3</sub>, HCl y TCA; diluidos en agua bidestilada) y se midió la absorbencia a 500nm. Para determinar la cantidad de moles de  $\gamma$ -glutamilhidroxamato formados se realizó una curva patrón. La actividad específica se expresa como nmol de  $\gamma$ -glutamilhidroxamato/mg de proteína·min de reacción.

#### Captura de [<sup>3</sup>H]-D-Aspartato

Los cultivos fueron lavados tres veces con solución A (HEPES-NaOH 25 mM, NaCl 130 mM, KCl 5.4 mM, CaCl<sub>2</sub> 1.8 mM, MgCl<sub>2</sub> 0.8 mM, glucosa 33.3 mM y NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 mM, ajustado a pH 7.4) a 37°C y el medio se cambió por solución A con [<sup>3</sup>H]-D-Aspartato 0.4 µCi/ml durante 30 minutos, inmediatamente después de la incubación, las células se lavaron 3 veces con solución A a 4°C. Las células se lisaron con 250µl NaOH 0.1M al menos durante 2 horas y se tomó una alícuota para cuantificar proteínas totales por el método de Bradford, el resto se tomó para cuantificar radioactividad mezclando el lisado con líquido de centelleo a través de un contador de centelleo Beckman 7800LS.

### Ensayos de unión de [<sup>3</sup>H]-D-Aspartato

Los cultivos fueron lavados tres veces con solución A a 4°C y las células se incubaron por 15 minutos, posteriormente el medio se cambió por solución A con [<sup>3</sup>H]-D-Aspartato 0.6 µCi/ml y con la cantidad indicada de D-Aspartato, para modificar la actividad específica de radioactividad, durante 30 minutos, inmediatamente después de la incubación las células se lavaron 3 veces con solución A a 4°C. Las células se lisaron con 250 µl NaOH 0.1 M durante al menos 2 horas y se tomó una alícuota para cuantificar proteínas totales por el método de Bradford y el resto se tomó para cuantificar radioactividad mezclando el lisado con líquido de centelleo en un contador de centelleo Beckman 7800LS. La unión específica se determinó al sustraer la unión medida con un exceso de 1000 veces con sustrato no radioactivo.

### Cuantificación de mRNA por PCR tiempo real (qRT-PCR)

El RNA total se extrajo de los cultivos utilizando el método de Trizol. La cuantificación por tiempo real se llevó a cabo en un solo paso con 100 ng de RNA total usando el sistema KAPA SYBR Fast One Step qRT-PCR (KAPA BIOSYSTEMS KK4650) y el sistema Step One Plus Real Time PCR (Applied Biosystems). Los ciclos de amplificación fueron como sigue: un paso de síntesis de cDNA a 42°C por 5 minutos, seguidos por 40 ciclos de 95°C por 3 minutos y 60°C por 30 segundos. Los oligonucleótidos para amplificar fueron los siguientes:

S17 Fw CCGCTGGATGCGCTTCATCAG

S17 Rv TACACCCGTCTGGGCAAC

GLAST Fw GGCTGCGGGCATTCTC

GLAST Rv CGGAGACGATCCAAGAACCA

Para cuantificar el mRNA de GLAST se utilizó el análisis comparativo al obtener  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  respecto al gen de referencia S17.

## 6. RESULTADOS

### 6.1. Efecto de la Activación del Sistema Glutamatérgico sobre la Glitamina Sintetasa

*Glutamato no altera los niveles de la Glutamina Sintetasa a corto plazo en cultivos primarios de Células Gliales de Bergmann*

Para comenzar a analizar el efecto de glutamato sobre la GS decidimos exponer a cultivos primarios de BGC a glutamato de manera aguda y medir los niveles de GS por ensayos de actividad enzimática e inmunodetección en fase sólida. Como se puede observar en la Figura 15 la exposición a glutamato hasta los 60 minutos también probados a diferentes dosis no cambian la expresión de GS en estas células.

A

B

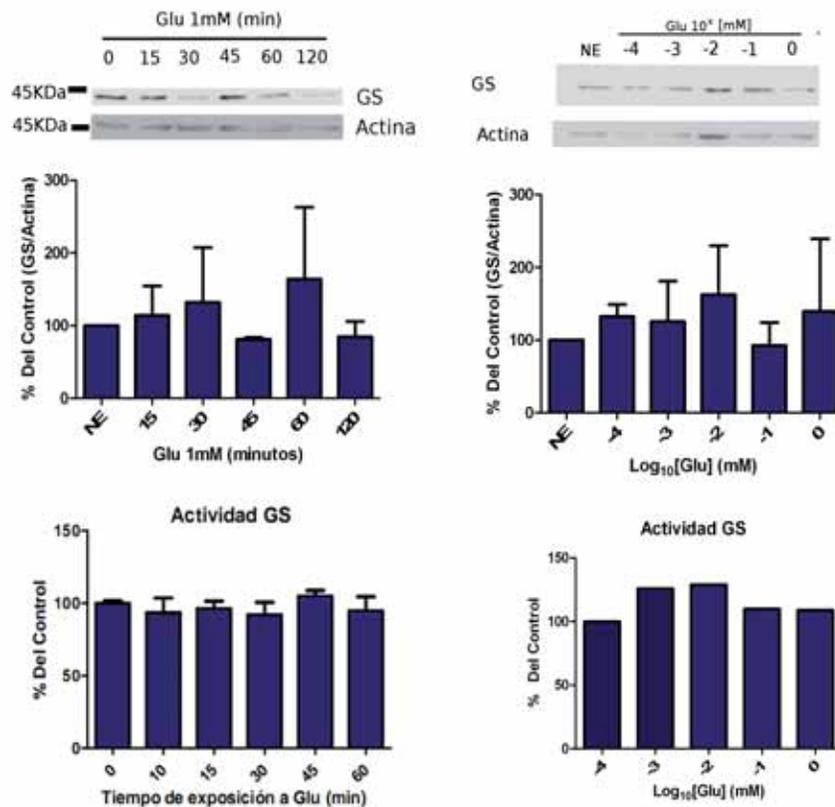


Figura 15. Efecto de glutamato sobre los niveles y actividad de GS en BGC expuestas a glutamato. A) Cultivos primarios de BGC fueron expuestos a glutamato 1 mM por el tiempo indicado y se analizaron los niveles (Panel superior) y actividad (Panel inferior) de GS. B) Cultivos primarios de BGC fueron expuestos a las concentraciones indicadas de glutamato durante 45 minutos y se analizaron los niveles (Panel Superior) y actividad (Panel Inferior) de GS. Cada barra indica la media + error estándar de la media (S.E.M.)

*Efecto de Glutamato sobre los niveles de GS a corto plazo en la línea celular de glioblastoma C-6*

La característica que ofrecen las líneas celulares para el análisis de la regulación de ciertas proteínas es su estabilidad y homogeneidad respecto a los cultivos primarios, por ello se decidió analizar si es que el glutamato tenía algún efecto de forma aguda sobre los niveles y actividad de GS en la línea celular C-6 que se ha tomado como modelo al conservar varias características astrocíticas. Como se observa en la figura 16, la exposición a glutamato de manera aguda en células C-6 no cambia los niveles de GS ni la actividad de la misma, a pesar de la relación directa entre la densidad óptica de la banda específica de GS con la cantidad de proteína analizada.

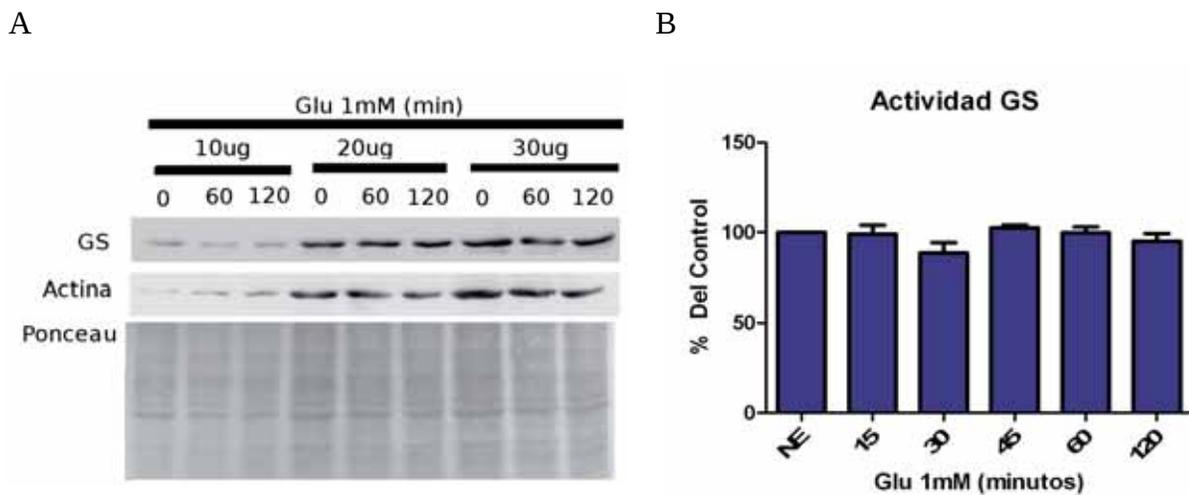


Figura 16. Efecto de glutamato sobre los niveles y actividad de GS en células C-6 expuestas a glutamato. A) Cultivos confluentes de células C-6 fueron expuestos a glutamato 1mM por el tiempo indicado y se analizaron los niveles de GS por inmunodetección en fase sólida. En el Panel Izquierdo se muestra 3 ensayos diferentes con cantidades crecientes de proteína, en la cual se puede observar la

relación directa entre la densidad óptica de la banda específica de GS y la cantidad de proteína analizada. B) Cultivos primarios de células C-6 fueron expuestos a glutamato 1 mM por el tiempo indicado y se analizó la actividad de GS. Cada barra indica la media + error estándar de la media (S.E.M.)

*Efecto de Glutamato sobre los niveles y actividad de GS a corto plazo en miniprismas de cerebelo de rata adulta y joven y en cultivos organotípicos de cerebelo de rata*

Como se ha mencionado previamente la GS es una enzima que se regula por la interacción celular, por lo que debe ser un factor a considerar cuando se analiza su regulación por otros factores, con esta idea en mente se analizó el efecto de glutamato sobre la actividad y niveles de GS en el modelo de miniprismas de cerebelo de rata en la etapa adulta, despolarizados con alto potasio como estímulo de liberación de glutamato, miniprismas de cerebelo de rata 8 días postnatal colocando directamente glutamato a los miniprismas como estímulo y cultivos organotípicos de cerebelo de rata 8. Como se observa en la Figura 17 la despolarización con alto potasio y los estímulos directos con glutamato no cambiaron la expresión ni la actividad de GS en el modelo de miniprismas de cerebelo de rata ni en el modelo de cultivos organotípicos de cerebelo.

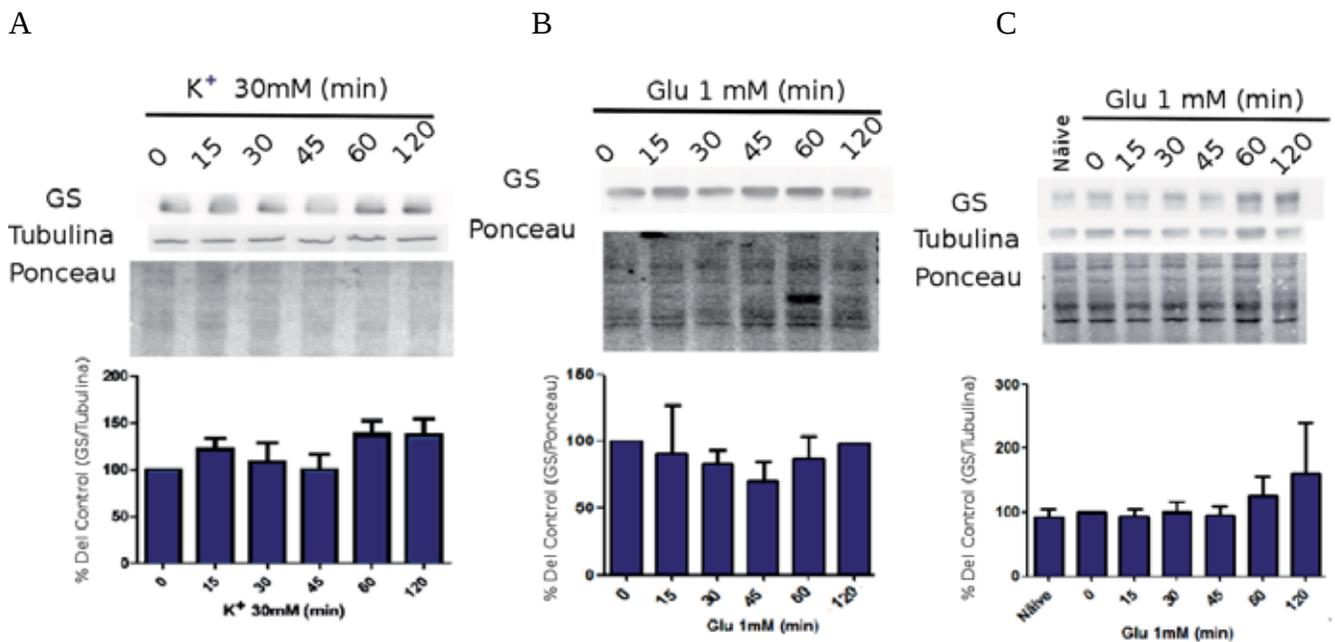


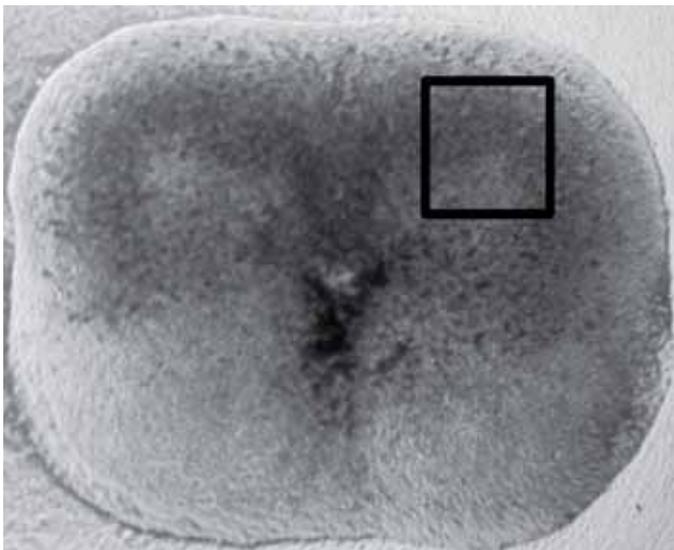
Figura 17. GS en miniprismas y cultivos organotípicos de cerebelo de rata expuestos a glutamato o inducidos a despolarización. A) Miniprismas de cerebelo de rata adulta fueron despolarizados con altas

concentraciones de potasio (30 mM) durante el tiempo indicado y se midieron los niveles de GS por inmunodetección en fase sólida. B) Miniprismas de cerebelo de rata de 8 días de edad fueron expuestos a glutamato 1 mM durante el tiempo indicado y se midieron los niveles de GS por inmunodetección en fase sólida. C) Cultivos organotípicos de cerebelo de rata fueron expuestos a glutamato 1 mM durante el tiempo indicado y se midieron los niveles de GS por inmunodetección en fase sólida. Cada barra indica la media + S.E.M.

*La activación del sistema glutamatérgico de manera crónica aumenta la expresión de GS en cultivos organotípicos de médula espinal*

La regulación no hormonal de la actividad de GS parece estar mediada a largo plazo, sin embargo este mecanismo no se ha establecido, aunque se ha especulado que el aumento en los niveles extracelulares de glutamato puede ser un factor importante en esta regulación (véase discusión en Gorovits et al. 1996). Para tratar de elucidar si es que el glutamato extracelular ejerce la regulación de GS se decidió tomar como modelo los cultivos organotípicos de médula, ya que estos permiten mantener las interacciones celulares establecidas en el tejido, y como estímulo glutamatérgico persistente se utilizó Threo- $\beta$ -hidroxiaspartato (THA), ya que se ha demostrado que la exposición crónica a este bloqueador del transporte de glutamato eleva de manera persistente los niveles de glutamato y a la vez tenemos una activación persistente de los transportadores de glutamato (137). Para comenzar la caracterización de la expresión de GS en cultivos organotípicos de médula, se realizó una inmunofluorescencia utilizando anticuerpos específicos dirigidos contra el carboxilo-terminal de la GS y contra la proteína GFAP (Figura 18 Panel B). Como se puede observar en la Figura 18, la GS presenta una localización citoplasmática y aunque no se logró detectar su expresión en los procesos de las células, a diferencia de la GFAP, su expresión parece ser preferentemente en astrocitos.

A



B

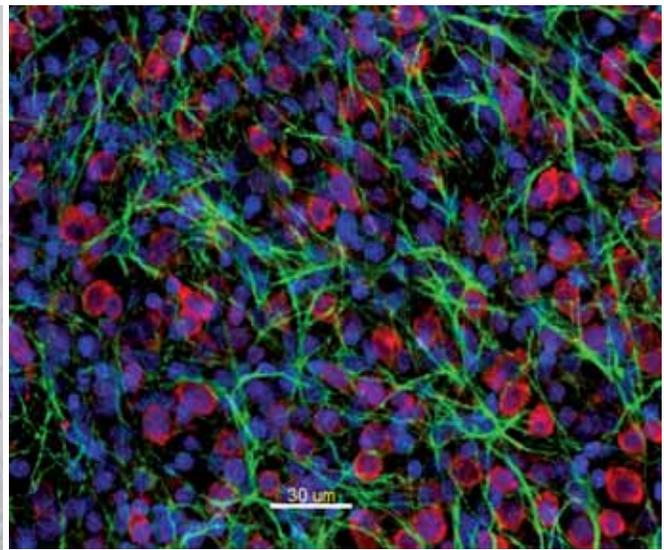
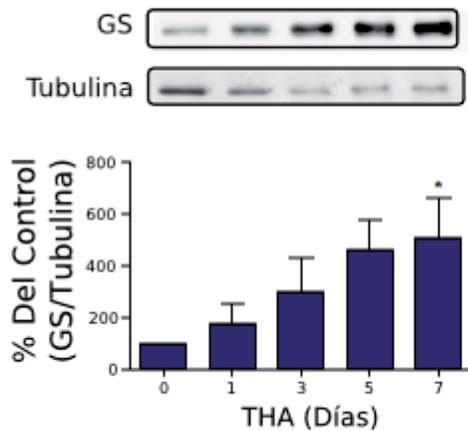


Figura 18. Expresión de GS en cultivos organotípicos de médula de rata. A) Micrografía (4x) representativa de luz visible de los cultivos organotípicos de médula a 7 DIV, la imagen muestra la integridad del tejido durante el tiempo de cultivo mantenido, el recuadro muestra la zona mostrada en B. B) Inmunofluorescencia de cultivos organotípicos de rata, en verde se observa la reactividad contra GFAP, en rojo se muestra la reactividad contra GS y en azul se observan los núcleos teñidos con DAPI. Como se observa en la imagen la presencia de GS es citoplasmática al igual que la reactividad de GFAP, ésta última proteína presenta reactividad principalmente en los procesos de los astrocitos.

Una de las formas de activar al sistema glutamatérgico de manera crónica es la exposición del cultivo a bloqueadores del transporte de glutamato. Cuando analizamos los niveles y actividad de GS de manera interesante observamos que tanto la cantidad de proteína medida por inmunodetección en fase sólida como la actividad enzimática de GS aumentan de manera directa respecto al tiempo de estimulación con THA llegando a niveles máximos a los 7 días y obteniendo un aumento de alrededor de un 500% (Figura 19), significando un aumento en la síntesis de la proteína funcional, además los incrementos en estos niveles recuerdan parte de los resultados ya antes publicados por Gorovits y col. (1996) y Patejunas y Young (1990), lo que indica que éste es un excelente modelo para investigar los fenómenos que subyacen a la activación de la GS por el sistema glutamatérgico.

A



B

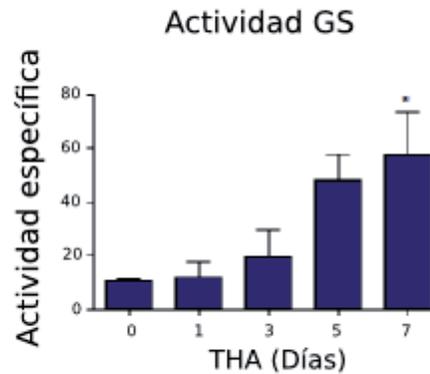
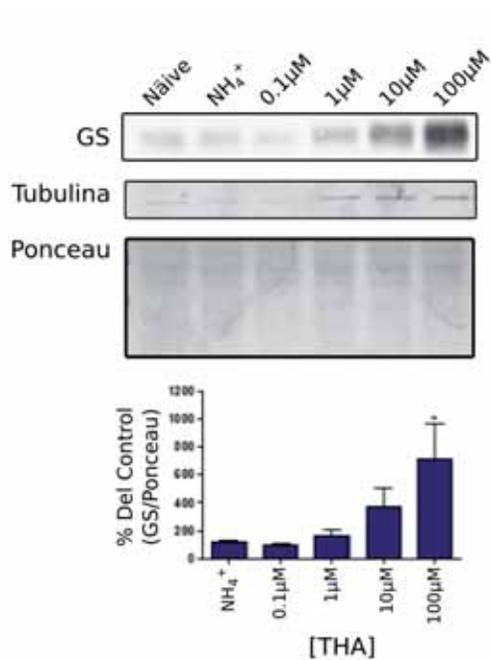


Figura 19. Efecto de la activación del sistema glutamatérgico sobre los niveles y la actividad de GS en cultivos organotípicos de médula espinal de rata. A) Cultivos organotípicos de médula espinal de rata fueron expuestos a THA 100  $\mu\text{M}$  por el tiempo indicado y se midieron los niveles de GS por inmunodetección en fase sólida, los niveles de GS incrementan de forma dependiente del tiempo a la exposición a THA. B) Cultivos organotípicos de médula espinal de rata fueron expuestos a THA 100  $\mu\text{M}$  por el tiempo indicado y se midió la actividad de GS, como se puede observar la actividad de GS incrementa de forma dependiente al tiempo a la exposición a THA. Cada barra indica la media + S.E.M. de tres experimentos independientes. Análisis estadístico ANOVA de una vía y prueba post-hoc Tukey, \* $P < 0.01$ .

Una vez determinado el efecto máximo a los 7 días de exposición a THA se realizó un análisis de la dosis necesaria para inducir el incremento en los niveles de GS exponiendo los cultivos desde 0.1  $\mu\text{M}$  hasta 100  $\mu\text{M}$  de THA (Figura 20), los resultados de dosis-respuesta indican que el efecto del THA es un efecto mediado por un transductor de señal y no un efecto inespecífico, al observar los cambios exponenciales en el incremento de GS. Con estos resultados concluimos que la GS es regulada por algún elemento del sistema glutamatérgico que es sentido del medio extracelular.

A



B

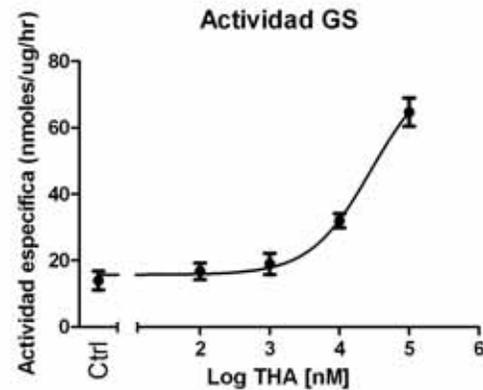


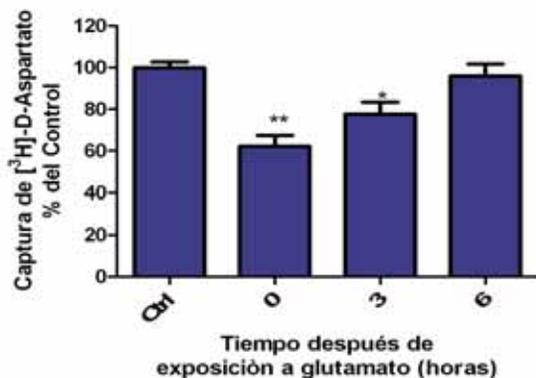
Figura 20. Dependencia de la dosis de THA sobre la actividad y los niveles de GS en cultivos organotípicos de médula espinal de rata. A) Cultivos organotípicos de médula espinal de rata fueron expuestos a la dosis indicada de THA por 7 días, se midieron los niveles de GS por inmunodetección en fase sólida, los niveles de GS incrementan de forma dependiente de la dosis de THA. B) Cultivos organotípicos de médula espinal de rata fueron expuestos a la dosis indicada de THA por 7 días, posterior al tiempo de incubación se midió la actividad de GS, como se puede observar la actividad de GS incrementa de forma dependiente a la dosis de THA. Cada barra indica la media + S.E.M. de tres experimentos independientes. Análisis estadístico ANOVA y prueba post-hoc Tukey, \* $P < 0.01$  Vs  $\text{NH}_4^+$ .  $\text{NH}_4^+$ = Vehículo( $\text{NH}_4\text{OH}$ ), Näive=Control no tratado.

### 6.2. Efecto de la activación del sistema glutamatergico sobre GLAST

Se han caracterizado dos efectos de glutamato sobre la actividad del transportador de glutamato, uno a corto plazo y uno a largo plazo. Con base en estos resultados nosotros nos preguntamos si es que una exposición a corto plazo del transportador permite que el desencadenamiento de un fenómeno a largo plazo, por lo que el problema se abordó de la siguiente forma, cultivos primarios de BGC fueron

expuestos durante 30 minutos a glutamato 1 mM, el medio se sustituyó por un medio libre de glutamato y se analizó la captura a diferentes horas posteriores a la exposición de glutamato (Figura 21 A). De manera interesante encontramos que el tratamiento con glutamato es capaz de inducir un fenómeno hasta las 3 horas posteriores a la exposición al aminoácido. Una vez que supimos que el efecto es capaz de persistir durante 3 horas, decidimos analizar la dependencia de la concentración de glutamato sobre el efecto a las 3 horas posteriores a la exposición de glutamato y analizando la captura de [<sup>3</sup>H]-D-Aspartato, de manera muy interesante observamos una IC<sub>50</sub> ~ 21.8 μM (Figura 21 B) que coincide con la constante de afinidad que presenta el transportador de glutamato de alta afinidad GLAST por el glutamato.

A



B

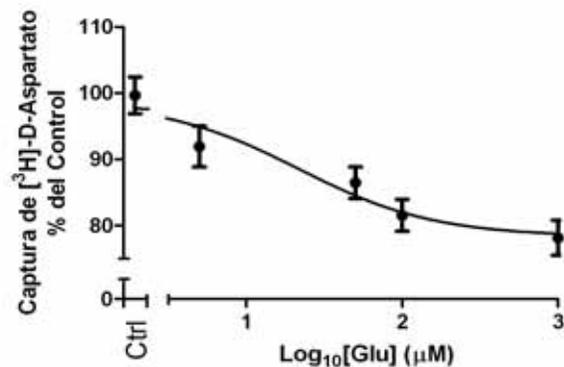
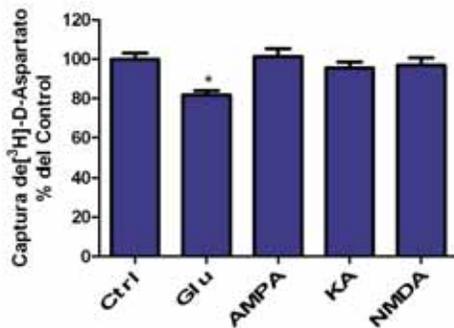


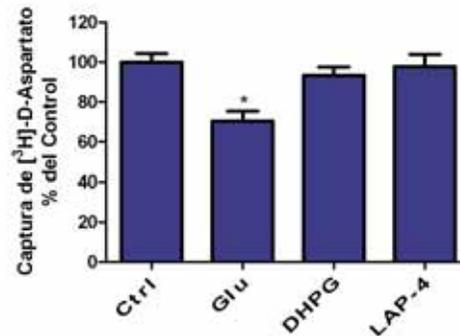
Figura 21. Efecto agudo de glutamato sobre la captura de [<sup>3</sup>H]-D-Aspartato a largo plazo. A) Cultivos primarios de BGC fueron expuestos a glutamato 1 mM por 30 minutos, el medio se cambió a un medio libre de glutamato y la captura de [<sup>3</sup>H]-D-Aspartato se analizó al tiempo indicado de incubación posterior a la exposición de glutamato. B) Cultivos primarios de BGC fueron expuestos a la concentración indicada de glutamato por 30 minutos, el medio se cambió a un medio libre de glutamato y las células se incubaron por 3 horas posterior a la incubación se analizó la captura de [<sup>3</sup>H]-D-Aspartato. Cada barra indica la media + S.E.M. de tres experimentos independientes. Cada punto indica la media ± S.E.M. de tres experimentos independientes. Análisis estadístico ANOVA y prueba post-hoc Tukey, \*\*P<0.001 \*P<0.05 vs Ctrl.

Debido a que algunos efectos observados en BGC al ser expuestas a glutamato dependen de la activación de los transportadores (129,131) y otros fenómenos dependen de la activación de los receptores (140), decidimos analizar si el efecto observado es dependiente de la activación de los receptores de glutamato, para ello se utilizaron agonistas específicos durante 30 minutos, se cambió el medio por un medio libre de agonistas y se incubaron las células por 3 horas para analizar la captura de [<sup>3</sup>H]-D-Aspartato. De manera interesante, tanto los agonistas de los iGluR como los agonistas de los mGluR no son capaces de mimetizar el efecto de glutamato sobre la captura de [<sup>3</sup>H]-D-Aspartato, indicando que la activación de los receptores de glutamato no está involucrada en la respuesta de anteroalimentación negativa de manera semejante a lo publicado por Gonzales y Ortega (2000). Con estos resultados nosotros nos preguntamos si es que la activación de los transportadores de glutamato participan en la respuesta inducida por glutamato, para ello utilizamos bloqueadores substratos [Threo-β-hidroxiaspartato (THA) y D-Aspartato] y no substratos [DL-threo-beta-benziloxiasparto (TBOA)] de los transportadores de glutamato de alta afinidad, permitiendo la activación o no de los transportadores de glutamato por 30 minutos e incubando las células 3 horas libres de los bloqueadores para analizar la captura de [<sup>3</sup>H]-D-Aspartato (Figura 22). De manera sorprendente solamente los bloqueadores capaces de ser transportados ejercen un efecto sobre la captura de [<sup>3</sup>H]-D-Aspartato de manera más marcada que el glutamato y a la vez el efecto de glutamato es abolido por la coexposición del bloqueador no transportable, sugiriendo fuertemente que el efecto de glutamato sobre su propia captura es mediado por la activación de los transportadores de glutamato y no por la activación de los receptores.

A



B



C

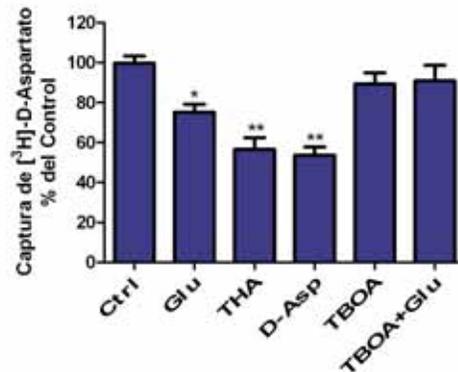


Figura 22. Análisis de la activación aguda de los receptores o los transportadores de glutamato sobre la captura de [<sup>3</sup>H]-D-Aspartato a largo plazo. A) Cultivos primarios de BGC fueron expuestos a glutamato 1 mM, AMPA 1 mM, KA 1 mM ó NMDA 1 mM por 30 minutos, el medio se cambió por un medio libre de agonistas y 3 horas después se analizó la captura de [<sup>3</sup>H]-D-Aspartato. B) Cultivos primarios de BGC fueron expuestos a glutamato 1 mM, DHPG 0.25 mM ó LAP-4 1 mM por 30 minutos, el medio se cambió por un medio libre de agonistas y 3 horas después se analizó la captura de [<sup>3</sup>H]-D-Aspartato. C) Cultivos primarios de BGC fueron expuestos a glutamato 1mM, D-Aspartato 1 mM, THA 100  $\mu$ M, TBOA 100  $\mu$ M ó TBOA+glutamato por 30 minutos, el medio se cambió por un medio libre de fármacos y 3 horas después se analizó la captura de [<sup>3</sup>H]-D-Aspartato. Cada barra indica la media + S.E.M. de tres experimentos independientes. Análisis estadístico ANOVA y prueba post-hoc Tukey, \*\*P<0.001 \*P<0.05 vs Ctrl.

Un fenómeno importante en la regulación de los transportadores de neurotransmisores, incluyendo los transportadores de glutamato, es su regulación del tráfico membranal a través de la exocitosis-endocitosis vesicular (74,147–149), por ello decidimos analizar una aproximación al analizar el comportamiento del transportador a través de una gráfica de unión, utilizando como ligando radioactivo [<sup>3</sup>H]-D-Aspartato, ya que tiene alta afinidad por los transportadores de glutamato y no así por los receptores de glutamato, en condiciones control y en células preexpuestas a glutamato. La gráfica de unión muestra que la afinidad del transportador por el [<sup>3</sup>H]-D-Aspartato no cambia pero la capacidad máxima de unión disminuye con la preexposición a glutamato (Figura 23), este resultado sugiere fuertemente que la cantidad de transportadores capaces de unir [<sup>3</sup>H]-D-Aspartato disminuye con la exposición previa a glutamato mientras que la afinidad del transportador por su substrato no cambia.

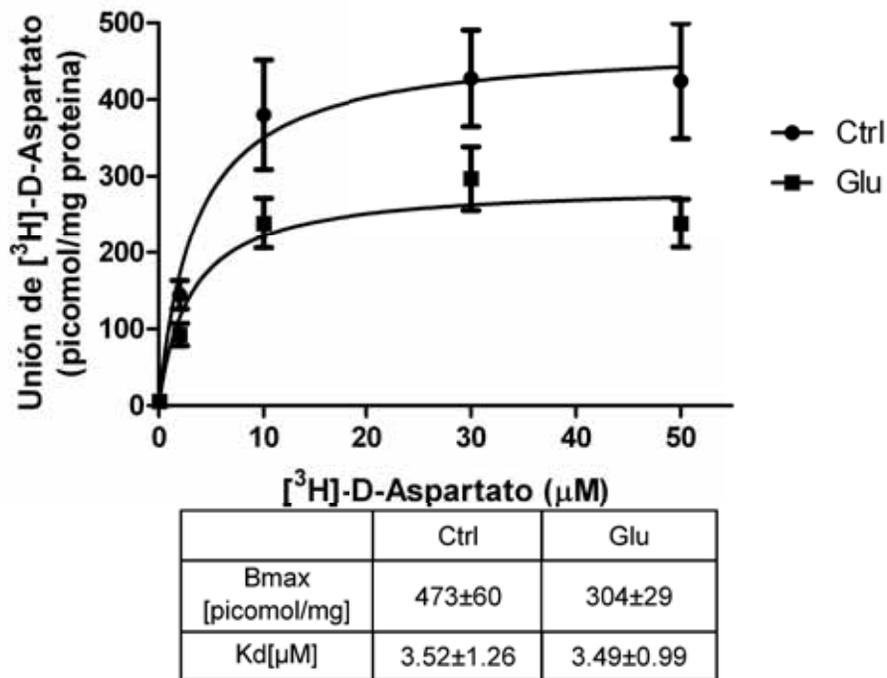


Figura 23. La exposición aguda a glutamato cambia la capacidad máxima de unión de [<sup>3</sup>H]-D-Aspartato. Cultivos primarios de BGC fueron o no expuestos a glutamato 1 mM por 30 minutos, posteriormente el medio se cambió por un medio libre de glutamato y se incubaron por 3 horas, posterior al tiempo de incubación se analizó la capacidad de unión de [<sup>3</sup>H]-D-Aspartato a la

concentración indicada. Cada punto indica la media  $\pm$  S.E.M. de tres experimentos independientes. Se realizó una prueba F, la cual arrojó el mejor ajuste para valores diferentes de Bmax ( $P=0.014$ ), el mismo valor de Kd ( $P=0.869$ ) y diferentes curvas para cada grupo de datos ( $P=0.0006$ ).

GLAST es el transportador más abundante en las BGC (56), ese fenotipo se mantiene en los cultivos primarios de estas células, por lo que GLAST es el transportador principal que media más del 90% de la captura de glutamato cultivos primarios de BGC (150), con esto en mente decidimos analizar los niveles de mRNA y de proteína GLAST, por RT-qPCR e inmunodetección en fase sólida respectivamente, en cultivos primarios de BGC expuestos a glutamato. Como se observa en la figura 24 ni los niveles totales de proteína GLAST ni los niveles de GLAST mRNA cambian cuando las células se exponen a glutamato, demostrando que el efecto de la activación de los transportadores de glutamato no se ejerce a través de la disminución total de la proteína GLAST ni de su mRNA, lo que fuertemente sugiere un efecto mediado a través del tráfico vesicular de GLAST.

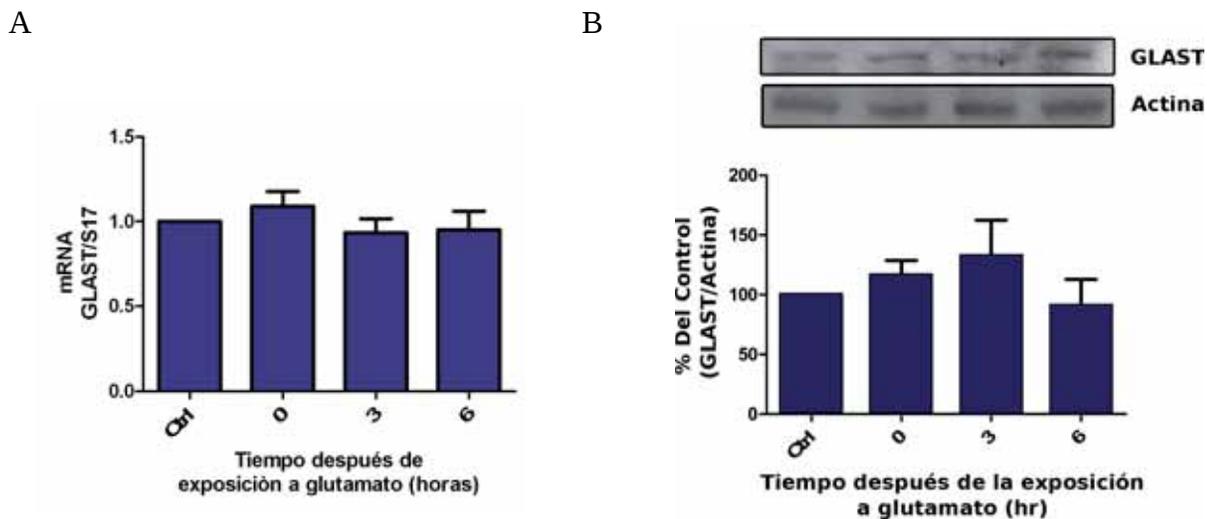


Figura 24. Efecto de la exposición aguda de glutamato sobre los niveles de mRNA y proteína GLAST a largo plazo en BGC. A) Cultivos primarios de BGC fueron expuestos a glutamato 1mM por 30 minutos, el medio se cambió por un medio libre de glutamato y las células se incubaron por el tiempo indicado, posterior al tiempo de incubación se extrajo RNA total y se cuantificó el mRNA de GLAST y S17, como se observa en la figura glutamato no cambia los niveles de mRNA de GLAST. B) Cultivos

primarios de BGC fueron expuestos a glutamato 1mM por 30 minutos, el medio se cambió por un medio libre de glutamato y las células se incubaron por el tiempo indicado y se analizaron los niveles de GS por inmunodetección en fase sólida, como se observa en la figura glutamato no altera los niveles de proteína GLAST.

## 7. DISCUSIÓN

El glutamato al ser un neurotransmisor excitotóxico es de primordial importancia mantener baja su concentración o su persistencia extracelular. Diversos mecanismos se han asociado con la regulación de la excitabilidad neuronal glutamatérgica, y estos mecanismos son tan importantes que dictan los procesos de plasticidad neuronal (151,152). La característica de las células gliales como moduladoras de la actividad sináptica ha surgido alrededor de veinte años atrás (9), sin embargo su participación como células indispensables en la formación de procesos cognitivos continúa en debate (13,153), sin embargo existe una base muy fuerte y una gran cantidad de sustento experimental que indica otros papeles que juegan los astrocitos envolventes de la sinapsis, entre ellos tenemos la regulación iónica del ambiente neuronal, el sostén físico y bioquímico neuronal, y en general la formación del “nicho” adecuado para que la sinapsis (hablando de manera clásica) pueda mantenerse funcionando (3). Uno de los elementos importantes para que suceda la formación de este “nicho”, sin lugar a dudas es la expresión de Glutamina Sintetasa (154–156), de ahí radica el estudio de su regulación, de manera clásica el elemento de regulación en *trans* que se caracterizó fue su inducción por glucocorticoides, lo que conllevó al estudio del GR, posteriormente se detallaron los elementos de su regulación en *cis*, dejando un panorama claro para la expresión preferencial en células gliales y hepatocitos (157).

A pesar de conocer los mecanismos de regulación de la GS en diversos sistemas celulares, se ha observado que en circunstancias particulares, no asociadas a regulación hormonal, regulan positivamente la expresión de GS (111,115,116), también existen algunos elementos codificados en el gen de la GS que dictan la transcripción de mensajeros diferentes y de forma interesante, uno de ellos es más abundante en SNC, esta forma de mRNA parece que se traduce de forma ineficiente comparado con el primero (158). Las características de esta regulación nos dieron paso a hipotetizar que podría ser un mecanismo de control para mantener regulados los niveles de glutamato extracelulares, ya que previamente nuestro grupo de trabajo había encontrado que niveles elevados de glutamato disminuyen la tasa de traducción en un tipo de glía envolvente de sinapsis glutamatérgicas (BGC) (159,160). Como observamos en la Figura 15 cuando exponemos a las BGC ó las células C-6 a diferentes dosis de glutamato por diferentes periodos de tiempo, fuimos incapaces de observar cambios en los niveles de expresión de GS ya sea medidos por inmunodetección en fase sólida o por la actividad de  $\gamma$ -glutamil

transferasa que presenta la GS, cabe la pena señalar que la concentración de glutamato utilizada a los tiempos indicados coinciden con la disminución de la incorporación de aminoácidos de manera global en este mismo modelo (159).

Una cuestión importante es a veces un sistema más homogéneo puede ayudarnos a observar fenómenos que involucran cambios sutiles a diferencia de los cultivos primarios. Por ello, decidimos evaluar si es que podríamos evidenciar el fenómeno en un cultivo celular bien caracterizado de glioblastoma de rata, las células C-6. Cuando analizamos la expresión de GS en estas células expuestas a glutamato no observamos diferencia en la expresión de células expuestas a glutamato, a pesar de que la densitometría de la inmunodetección en fase sólida tiene una relación lineal con la cantidad de proteína total analizada en el western blot (Figura 16).

Ya que la transcripción, y por lo tanto la cantidad de mRNA, de la GS depende fuertemente de las interacciones celulares tomamos un modelo diferente para analizar si es que existen variaciones en los niveles de GS en células expuestas a glutamato. Los miniprismas son un modelo útil y próximo al ambiente fisiológico ya que mantiene la arquitectura celular de un órgano o tejido. Por estas razones utilizamos el modelo de miniprismas de cerebelo de pollo y rata. Para promover la liberación de glutamato en los miniprismas de cerebelo de rata adulta se utilizó una concentración alta de potasio para despolarizar las neuronas granulares presentes en los miniprismas y en el caso de los miniprismas de pollo y rata de 8 días postnatal se utilizó un estímulo directo con glutamato. El análisis realizado muestra que no hay cambios en los niveles de GS cuando se exponen las células a glutamato lo cual indica que de manera aguda el glutamato parece no tener un efecto sobre los niveles de GS.

Tomando en cuenta todos los resultados anteriores parece no existir una relación en la actividad sináptica glutamatérgica basal y la expresión de GS, incluso cuando se analiza por trazadores radioactivos de manera estequiométrica el destino del glutamato liberado por la neurona se estima que alrededor de la mitad del glutamato entra al ciclo glutamato-glutamina (17,161), de forma aún más sorprendente parece ser que si se expone a un cultivo de astrocitos con altas concentraciones de glutamato a tiempos cortos y posteriormente se coloca glutamato radioactivo como trazador, la cantidad relativa de glutamato radioactivo metabolizado a glutamina es menor, esto quiere decir que hay una relación inversa entre la concentración de glutamato extracelular y metabolismo hacia glutamina a corto plazo, indicando que la actividad sináptica endógena a corto plazo es poco relevante

sobre la actividad de GS (162,163).

Cabe la pena hacernos el siguiente cuestionamiento ¿Bajo que condiciones se da la regulación no hormonal de los niveles de GS? Algunos experimentos sugieren que ésta regulación debe estar mediada a largo plazo (días) además de que la muerte neuronal (interesante que sean en su mayoría neuronas glutamatérgicas) se correlacionó con el efecto [ver discusión en (116)], cuando observamos que la aplicación crónica del bloqueador de los transportadores de glutamato; THA; en cultivos organotípicos de médula espinal incrementan de manera excepcional los niveles de GS (6 veces el control) además que la supresión de suero en los cultivos organotípicos evidencian el efecto, pensamos que este efecto es el efecto no hormonal más representativo observado tanto por Gorovits (1994) y Patejunas y Young (1990). Razonamos que el modelo utilizado por nuestro grupo de trabajo fue el punto decisivo para poder demostrar que la regulación no hormonal está mediada por la activación del sistema glutamatérgico; ya que en los trabajos anteriores la naturaleza del sistema no les permitía establecer cuales eran los factores involucrados en este fenómeno básicamente porque el tipo de cultivo utilizado no permitía cultivar más allá de unos pocos días y es prácticamente imposible cambiar la composición del medio.

Los resultados obtenidos con los cultivos organotípicos de médula demuestran la importancia de la activación del sistema glutamatérgico sobre los niveles de un componente crucial en el ciclo glutamato-glutamina, considerando las condiciones bajo las cuales se observa el incremento de GS dependiente de activación glutamatérgica parece ser que la activación glutamatérgica persistente (que de manera fisiológica podemos imaginarlo como el tono glutamatérgico en una región específica) es el factor determinante en la inducción de la GS. Una característica importante observada es que la supresión de suero (que incluye la ausencia de glucocorticoides) permite observar un incremento hasta del 500% en los niveles de GS, aunque el mecanismo por el cual la activación del sistema glutamatérgico activa la expresión de GS es completamente desconocido nuestros resultados arrojan ciertas pistas sobre el mismo, primero se necesita una activación persistente a largo plazo para activar la expresión, segundo parece ser necesario un sistema que contenga altos niveles de interacciones celulares lo que implica niveles bajos de Jun (108) y tercero la ausencia de glucocorticoides permite observar hasta un 500% de incrementos en los niveles de GS. De manera interesante estas condiciones coinciden plenamente por lo publicado por Patejunas y Young (1990), lo que significa que la actividad glutamatérgica es un

componente esencial en la inducción de GS en el desarrollo embrionario en el SNC.

Se ha demostrado que el bloqueador transportable THA además de activar los transportadores de glutamato es capaz de acumular glutamato en el medio extracelular por transporte reverso después de algunos días de persistencia de THA (137) Esta característica del modelo deja la posibilidad de que el incremento en los niveles de GS puede estar mediado tanto por la activación del transportador de glutamato, así como, por la activación de los receptores de glutamato presentes en las células gliales, tal como sucede en otros sistemas (126,131,140).

Otro componente importante del sistema glutamatérgico presente en células gliales, específicamente en las BGC, es el transportador de glutamato GLAST, una de las características de este transportador es que su actividad disminuye ante la exposición de altas concentraciones de glutamato. Sin embargo, existen claramente dos efectos mediados por mecanismos diferentes: El primero a corto plazo es a nivel postraduccional mientras que el efecto a largo plazo involucra cambios transcripcionales. Con base en esta idea pensamos analizar si el efecto a corto y a largo plazo de alguna manera se encuentran ligados por la transducción de señal inicial evocada por glutamato. Cuando nosotros analizamos la actividad del transportador en células expuestas a glutamato como era de esperarse observamos una disminución en la actividad a tiempos cortos posteriores al estímulo, y de manera interesante la actividad del transportador se mantiene disminuida respecto al control recuperándose con el tiempo y llegando a los niveles basales a las 6 horas posteriores al estímulo. Desde este punto se puede intuir que el efecto de corto plazo es un fenómeno separado del efecto a largo plazo y que el efecto a largo plazo solo se puede evocar con la persistencia del neurotransmisor durante el tiempo del ensayo. De manera interesante, a diferencia de lo antes observado, nosotros demostramos que 3 horas después de la exposición a glutamato la actividad del transportador se encuentra disminuida y que es un efecto mediado únicamente por la activación de los transportadores de glutamato, es interesante notar que a una hora de exposición a glutamato, la disminución de la captura de glutamato involucra un aumento de la  $K_m$  del transportador por glutamato, mientras que 3 horas después el mecanismo. El efecto aquí observado a las 3 horas es semejante a lo publicado por Munir y cols (2000) (128), aunque el efecto es contrario, lo que muy probablemente derive tanto de la maquinaria proteica de acople a los transductores de señal como de la maquinaria proteica específica expresada por las BGC y los astrocitos de la corteza (164). El mecanismo a través del cual sucede el fenómeno observado en el

trabajo presente aun no está esclarecido, sin embargo uno puede especular que es igual a como sucede en otros sistemas (127,165–167). La característica que comparten éstos trabajos es que el fenómeno es iniciado por la activación de los transportadores de glutamato (que de manera interesante muchos de éstos modelos expresan preferentemente GLAST), éstos fenómenos también comparten la característica de que la activación de PKC media el efecto, por lo que el segundo mensajero involucrado en la respuesta es el calcio. Las características antes mencionadas coinciden con lo recientemente publicado por Martínez-Lozada et al (2012) en donde la activación de GLAST activa indirectamente al intercambiador de sodio calcio, incrementando los niveles de calcio intracelulares y así activando diferentes respuestas mediadas por éste segundo mensajero, entre las cuales tenemos paro traduccional y rearreglo del citoesqueleto (131,160,168) (Figura 25).

De acuerdo a los resultados aquí mostrados estos resultados surge una pregunta intrigante ¿cuál es la funcionalidad de estos mecanismos de anteroalimentación negativa? Los resultados mostrados en este trabajo y otros obtenidos por nuestro grupo de trabajo sugieren que en un inicio principalmente se activan los transportadores de glutamato, los cuales en cierta medida previenen la activación de los receptores de glutamato, la activación de los transportadores culmina en diversos efectos entre los cuales está el paro traduccional (160) y la inhibición de la actividad del mismo transportador afectando su tráfico a membrana citoplásmica. La disminución en la cantidad de transportadores membranales inducen la persistencia de glutamato extracelular y activan los GluRs permitiendo llevar a cabo cambios en las CGB a largo plazo tales como la inhibición de la transcripción de GLAST y la activación de la transcripción de la proteína de unión a kainato (140,169) (Figura 25).

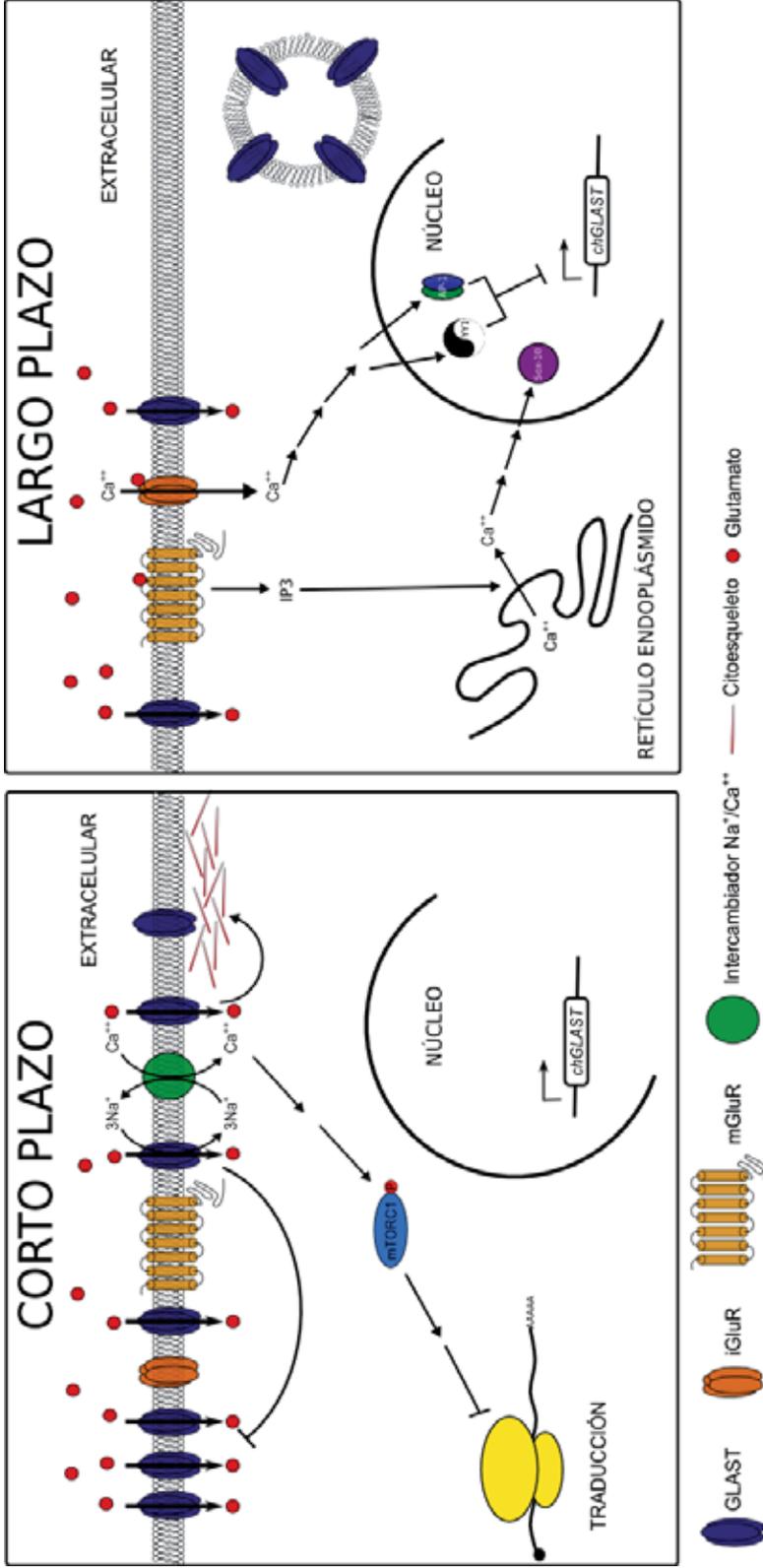


Figura 25. Modelo propuesto en la exposición aguda a glutamato en BGC. En el Panel Izquierdo se muestra los eventos a corto plazo (minutos) ejercidos por glutamato entre los cuales encontramos la fosforilación de mTOR y el rearrreglo del citoesqueleto, estos eventos se inician por la activación del transportador de glutamato de alta afinidad GLAST. En el Panel Derecho se muestran los eventos a largo plazo ejercidos por la persistencia del glutamato extracelular, una vez que se inhibe la actividad del transportador GLAST en las etapas iniciales, se permite la activación de los receptores de glutamato ejerciendo una inhibición de la transcripción de GLAST.

## 8. REFERENCIAS

1. Aimone JB, Wiles J, Gage FH. Computational Influence of Adult Neurogenesis on Memory Encoding. *Neuron*. 2009 Jan 29;61(2):187–202.
2. Purves D, Augustine G, Fitzpatrick D, Katz L, LaMantia A-S, Williams, et al., editors. Neuroglial Cells. *Neuroscience* [Internet]. 2nd ed. 2001. p. 8–11. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK10869>
3. Nedergaard M, Verkhratsky A. Artifact versus reality—How astrocytes contribute to synaptic events. *Glia*. 2012;60(7):1013–23.
4. Krnjević K. Glutamate and g-aminobutyric acid in brain. *Nature*. 1970;228(5267):119–24.
5. Testa CM, Hollingsworth ZR, Shinozaki H, Penney Jr. JB, Young AB. Selective metabotropic receptor agonists distinguish non-ionotropic glutamate binding sites. *Brain Res*. 1997 Oct 31;773(1–2):15–27.
6. Dingledine R, McBain C. Basic Neurochemistry: Glutamate and Aspartate Are the Major Excitatory Transmitters in the Brain [Internet]. 6th ed. Siegel G, Agranoff B, Albers R, editors. 1999. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK28252/>
7. Eroglu C, Barres BA. Regulation of synaptic connectivity by glia. *Nature*. 2010 Nov 11;468(7321):223–31.
8. Popoli M, Yan Z, McEwen BS, Sanacora G. The stressed synapse: the impact of stress and glucocorticoids on glutamate transmission. *Nat Rev Neurosci*. 2012 Jan;13(1):22–37.
9. Cornell-Bell A, Finkbeiner S, Cooper M, Smith S. Glutamate induces calcium waves in cultured astrocytes: long-range glial signaling. *Science*. 1990 Jan 26;247(4941):470–3.
10. Charles AC, Merrill JE, Dirksen ER, Sandersont MJ. Intercellular signaling in glial cells: Calcium waves and oscillations in response to mechanical stimulation and glutamate. *Neuron*.

1991 Jun;6(6):983–92.

11. Nedergaard M. Direct signaling from astrocytes to neurons in cultures of mammalian brain cells. *Science*. 1994 Mar 25;263(5154):1768–71.
12. Smith SJ. Neural Signalling: Neuromodulatory astrocytes. *Curr Biol CB*. 1994 Sep 1;4(9):807–10.
13. Panatier A, Vallée J, Haber M, Murai KK, Lacaille J-C, Robitaille R. Astrocytes Are Endogenous Regulators of Basal Transmission at Central Synapses. *Cell*. 2011 Sep 2;146(5):785–98.
14. Gordon GRJ, Iremonger KJ, Kantevari S, Ellis-Davies GCR, MacVicar BA, Bains JS. Astrocyte-Mediated Distributed Plasticity at Hypothalamic Glutamate Synapses. *Neuron*. 2009 Nov 12;64(3):391–403.
15. Lee CJ, Mannaioni G, Yuan H, Woo DH, Gingrich MB, Traynelis SF. Astrocytic control of synaptic NMDA receptors. *J Physiol*. 2007 Jun 15;581(3):1057–81.
16. Sun W, McConnell E, Pare J-F, Xu Q, Chen M, Peng W, et al. Glutamate-Dependent Neuroglial Calcium Signaling Differs Between Young and Adult Brain. *Science*. 2013 Jan 11;339(6116):197–200.
17. Hertz L, Kvamme E, McGeer E. Glutamine, Glutamate, and GABA in the Central Nervous System. Schousboe A, editor. Canada: A.R. Liss; 1983.
18. Aoki C, Milner T, Sheu K, Blass J, Pickel V. Regional distribution of astrocytes with intense immunoreactivity for glutamate dehydrogenase in rat brain: implications for neuron-glia interactions in glutamate transmission. *J Neurosci*. 1987 Jul 1;7(7):2214–31.
19. Martinez-Hernandez A, Bell KP, Norenberg MD. Glutamine synthetase: glial localization in brain. *Science*. 1977;195(4284):1356–8.
20. Greenberg J, Lichtenstein N. Effect of Manganous and Magnesium Ions Concentration on Glutamine Synthetase and Glutamotransferase of Sheep Brain. *J Biol Chem*. 1959 Sep

1;234(9):2337–9.

21. Elliott WH. Studies on the enzymic synthesis of glutamine. *Biochem J.* 1951;49(1):106–12.
22. Errera M, Greenstein J. Phosphate-activated glutaminase in kidney and other tissues. *J Biol Chem.* 1949;178:495–502.
23. Patel AJ, Hunt A, Gordon RD, Balázs R. The activities in different neural cell types of certain enzymes associated with the metabolic compartmentation glutamate. *Dev Brain Res.* 1982 May;4(1):3–11.
24. Weiler CT, Nyström B, Hamberger A. Glutaminase and glutamine synthetase activity in synaptosomes, bulk-isolated glia and neurons. *Brain Res.* 1979 Jan 19;160(3):539–43.
25. Rothstein JD, Martin L, Levey AI, Dykes-Hoberg M, Jin L, Wu D, et al. Localization of neuronal and glial glutamate transporters. *Neuron.* 1994 Sep;13(3):713–25.
26. Kanai Y, Hediger M. The glutamate/neutral amino acid transporter family SLC1: molecular, physiological and pharmacological aspects. *Pflüg Arch.* 2004 Feb 1;447(5):469–79.
27. Nedergaard M, Takano T, Hansen AJ. Beyond the role of glutamate as a neurotransmitter. *Nat Rev Neurosci.* 2002 Sep;3(9):748–55.
28. Kilberg MS, Handlogten ME, Christensen HN. Characteristics of an amino acid transport system in rat liver for glutamine, asparagine, histidine, and closely related analogs. *J Biol Chem.* 1980 May 10;255(9):4011–9.
29. Nakanishi T, Kekuda R, Fei Y-J, Hatanaka T, Sugawara M, Martindale RG, et al. Cloning and functional characterization of a new subtype of the amino acid transport system N. *Am J Physiol - Cell Physiol.* 2001;281(6):C1757–C1768.
30. Reimer RJ, Chaudhry FA, Gray AT, Edwards RH. Amino acid transport System A resembles System N in sequence but differs in mechanism. *Proc Natl Acad Sci.* 2000 Jul 5;97(14):7715–20.
31. Gu S, Roderick HL, Camacho P, Jiang JX. Identification and characterization of an amino acid

- transporter expressed differentially in liver. *Proc Natl Acad Sci*. 2000 Mar 28;97(7):3230–5.
32. Oxender DL, Christensen HN. Distinct Mediating Systems for the Transport of Neutral Amino Acids by the Ehrlich Cell. *J Biol Chem*. 1963 Nov 1;238(11):3686–99.
  33. Conti F, Melone M. The glutamine commute: Lost in the tube? Glutamate CNS Metab Neurotransmission Interact Inter Intracell Level. 2006 May;48(6–7):459–64.
  34. Yao D, Mackenzie B, Ming H, Varoqui H, Zhu H, Hediger MA, et al. A Novel System A Isoform Mediating Na<sup>+</sup>/Neutral Amino Acid Cotransport. *J Biol Chem*. 2000 Jul 28;275(30):22790–7.
  35. Varoqui H, Zhu H, Yao D, Ming H, Erickson JD. Cloning and Functional Identification of a Neuronal Glutamine Transporter. *J Biol Chem*. 2000 Feb 11;275(6):4049–54.
  36. Haser W, Shapiro R, Corthoys N. Comparison of the phosphate-dependent glutaminase obtained from rat brain and kidney. *Biochem J*. 229:399–408.
  37. Patel M, McGivan J. Partial purification and properties of rat liver glutaminase. *Biochem J*. 1984;220:583–90.
  38. Kenny J, Bao Y, Hamm B, Taylor L, Toth A, Wagers B, et al. Bacterial expression, purification, and characterization of rat kidney-type mitochondrial glutaminase. *Protein Expr Purif*. 2003 Sep;31(1):140–8.
  39. Masson J, Darmon M, Conjard A, Chuhma N, Ropert N, Thoby-Brisson M, et al. Mice Lacking Brain/Kidney Phosphate-Activated Glutaminase Have Impaired Glutamatergic Synaptic Transmission, Altered Breathing, Disorganized Goal-Directed Behavior and Die Shortly after Birth. *J Neurosci*. 2006 Apr 26;26(17):4660–71.
  40. Liguz-Leczna M, Skangiel-Kramska J. Vesicular glutamate transporters (VGLUTs): the three musketeers of glutamatergic system. *Acta Neurobiol Exp Wars*. 2007;67(3):207–18.
  41. Takamori S. VGLUTs: “Exciting” times for glutamatergic research? *Neurosci Res*. 2006 Aug;55(4):343–51.

42. Omote H, Miyaji T, Juge N, Moriyama Y. Vesicular Neurotransmitter Transporter: Bioenergetics and Regulation of Glutamate Transport. *Biochemistry (Mosc)*. 2011 May 25;50(25):5558–65.
43. Wojcik SM, Rhee JS, Herzog E, Sigler A, Jahn R, Takamori S, et al. An essential role for vesicular glutamate transporter 1 (VGLUT1) in postnatal development and control of quantal size. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 May 4;101(18):7158–63.
44. Edwards RH. The Neurotransmitter Cycle and Quantal Size. *Neuron*. 2007 Sep 20;55(6):835–58.
45. Pines G, Danbolt NC, Bjoras M, Zhang Y, Bendahan A, Eide L, et al. Cloning and expression of a rat brain L-glutamate transporter. *Nature*. 1992 Dec 3;360(6403):464–7.
46. Münch C, Schwalenstöcker B, Hermann C, Cirovic S, Stamm S, Ludolph A, et al. Differential RNA cleavage and polyadenylation of the glutamate transporter EAAT2 in the human brain. *Mol Brain Res*. 2000 Sep 15;80(2):244–51.
47. Kim S-Y, Chao W, Choi S-Y, Volsky DJ. Cloning and characterization of the 3'-untranslated region of the human excitatory amino acid transporter 2 transcript. *J Neurochem*. 2003;86(6):1458–67.
48. Münch C, Zhu B, Mink A, Seefried U, Riepe M, Ludolph A, et al. Chemical Hypoxia Facilitates Alternative Splicing of EAAT2 in Presymptomatic APP23 Transgenic Mice. *Neurochem Res*. 2008 Jun 1;33(6):1005–10.
49. Tian G, Lai L, Guo H, Lin Y, Butchbach MER, Chang Y, et al. Translational Control of Glial Glutamate Transporter EAAT2 Expression. *J Biol Chem*. 2007 Jan 19;282(3):1727–37.
50. Utsunomiya-Tate N, Endou H, Kanai Y. Tissue specific variants of glutamate transporter GLT-1. *FEBS Lett*. 1997 Oct 27;416(3):312–6.
51. Marie H, Billups D, Bedford FK, Dumoulin A, Goyal RK, Longmore GD, et al. The Amino Terminus of the Glial Glutamate Transporter GLT-1 Interacts with the LIM Protein Ajuba. *Mol Cell Neurosci*. 2002 Feb;19(2):152–64.

52. Rauen T, Wießner M, Sullivan R, Lee A, Pow DV. A new GLT1 splice variant: cloning and immunolocalization of GLT1c in the mammalian retina and brain. *Neurochem Int.* 2004 Dec;45(7):1095–106.
53. Leinenweber A, Machtens J-P, Begemann B, Fahlke C. Regulation of Glial Glutamate Transporters by C-terminal Domains. *J Biol Chem.* 2011 Jan 21;286(3):1927–37.
54. Sogaard R, Borre L, Braunstein TH, Madsen KL, MacAulay N. Functional modulation of the glutamate transporter variant GLT1b by the PDZ domain protein PICK1. *J Biol Chem [Internet].* 2013 May 22; Available from: <http://www.jbc.org/content/early/2013/05/22/jbc.M113.471128.abstract>
55. Schmitt A, Asan E, Lesch K-P, Kugler P. A splice variant of glutamate transporter GLT1/EAAT2 expressed in neurons: cloning and localization in rat nervous system. *Neuroscience.* 2002 Jan 18;109(1):45–61.
56. Danbolt NC. Glutamate uptake. *Prog Neurobiol.* 2001 Sep;65(1):1–105.
57. Lin C-LG, Bristol LA, Jin L, Dykes-Hoberg M, Crawford T, Clawson L, et al. Aberrant RNA Processing in a Neurodegenerative Disease: the Cause for Absent EAAT2, a Glutamate Transporter, in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neuron.* 1998 Mar;20(3):589–602.
58. Meyer T, Münch C, Liebau S, Fromm A, Schawalenstöcker B, Völkel H, et al. Splicing of the glutamate transporter EAAT2: a candidate gene of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1998 Dec 1;65(6):954–954.
59. Honig L, Chambliss D, Bigio E, Carroll S, Elliott J. Glutamate transporter EAAT2 splice variants occur not only in ALS, but also in AD and controls. *Neurology.* 2000;55(8):1082–8.
60. Lee A, Anderson AR, Stevens MG, Pow DV. Exon 4-skipping GLT-1: A new form of an abundantly expressed glutamate transporter. *Neurosci Lett.* 2011 Oct 31;504(3):228–31.
61. Gebhardt FM, Mitrovic AD, Gilbert DF, Vandenberg RJ, Lynch JW, Dodd PR. Exon-skipping Splice Variants of Excitatory Amino Acid Transporter-2 (EAAT2) Form Heteromeric Complexes

with Full-length EAAT2. *J Biol Chem.* 2010 Oct 8;285(41):31313–24.

62. Lee A, Pow DV. Astrocytes: Glutamate transport and alternate splicing of transporters. *Int J Biochem Cell Biol.* 2010 Dec;42(12):1901–6.
63. Su Z, Leszczyniecka M, Kang D, Sarkar D, Chao W, Volsky DJ, et al. Insights into glutamate transport regulation in human astrocytes: Cloning of the promoter for excitatory amino acid transporter 2 (EAAT2). *Proc Natl Acad Sci.* 2003 Feb 18;100(4):1955–60.
64. Sitcheran R, Gupta P, Fisher PB, Baldwin AS. Positive and negative regulation of EAAT2 by NF- $\kappa$ B: a role for N-myc in TNF $\alpha$ -controlled repression. *EMBO J.* 2005 Feb 9;24(3):510–20.
65. Lee S-G, Su Z-Z, Emdad L, Gupta P, Sarkar D, Borjabad A, et al. Mechanism of Ceftriaxone Induction of Excitatory Amino Acid Transporter-2 Expression and Glutamate Uptake in Primary Human Astrocytes. *J Biol Chem.* 2008 May 9;283(19):13116–23.
66. Rothstein JD, Patel S, Regan MR, Haenggeli C, Huang YH, Bergles DE, et al.  $\beta$ -Lactam antibiotics offer neuroprotection by increasing glutamate transporter expression. *Nature.* 2005 Jan 6;433(7021):73–7.
67. Romera C, Hurtado O, Mallolas J, Pereira MP, Morales JR, Romera A, et al. Ischemic preconditioning reveals that GLT1//EAAT2 glutamate transporter is a novel PPAR $\gamma$  target gene involved in neuroprotection. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2007 Jan 10;27(7):1327–38.
68. Bette S, Unger T, Lakowa N, Friedrich M, Engele J. Sequences of the Non-Coding RNA, NTAB, are Contained within the 3'-UTR of Human and Rat EAAT2/GLT-1 Transcripts and Act as Transcriptional Enhancers. *Cell Mol Neurobiol.* 2011 Apr 1;31(3):393–9.
69. Yang Y, Gozen O, Watkins A, Lorenzini I, Lepore A, Gao Y, et al. Presynaptic Regulation of Astroglial Excitatory Neurotransmitter Transporter GLT1. *Neuron.* 2009 Mar 26;61(6):880–94.
70. Kim K, Lee S-G, Kegelmann T, Su Z-Z, Das S, Dash R, et al. Role of Excitatory Amino Acid Transporter-2 (EAAT2) and Glutamate in Neurodegeneration: Opportunities for Developing

Novel Therapeutics. *J Cell Physiol.* 2010;226:2484–93.

71. Yang Y, Gozen O, Vidensky S, Robinson MB, Rothstein JD. Epigenetic regulation of neuron-dependent induction of astroglial synaptic protein GLT1. *Glia.* 2010;58(3):277–86.
72. Zschocke J, Allritz C, Engele J, Rein T. DNA methylation dependent silencing of the human glutamate transporter EAAT2 gene in glial cells. *Glia.* 2007;55(7):663–74.
73. Nakagawa T, Otsubo Y, Yatani Y, Shirakawa H, Kaneko S. Mechanisms of substrate transport-induced clustering of a glial glutamate transporter GLT-1 in astroglial–neuronal cultures. *Eur J Neurosci.* 2008;28(9):1719–30.
74. García-Tardón N, González-González IM, Martínez-Villarreal J, Fernández-Sánchez E, Giménez C, Zafra F. Protein Kinase C (PKC)-promoted Endocytosis of Glutamate Transporter GLT-1 Requires Ubiquitin Ligase Nedd4-2-dependent Ubiquitination but Not Phosphorylation. *J Biol Chem.* 2012 Jun 1;287(23):19177–87.
75. Martínez-Villarreal J, García Tardón N, Ibáñez I, Giménez C, Zafra F. Cell surface turnover of the glutamate transporter GLT-1 is mediated by ubiquitination/deubiquitination. *Glia.* 2012;60(9):1356–65.
76. Storck T, Schulte S, Hofmann K, Stoffel W. Structure, expression, and functional analysis of a Na(+)-dependent glutamate/aspartate transporter from rat brain. *Proc Natl Acad Sci.* 1992 Nov 15;89(22):10955–9.
77. Huggett JF, Mustafa A, O’Neal L, Manson DJ. The glutamate transporter GLAST-1 (EAAT-1) is expressed in the plasma membrane of osteocytes and is responsive to extracellular glutamate concentration. *Biochem Soc Trans.* 2002;30(6):890–3.
78. Vallejo-Illarramendi A, Domercq M, Matute C. A novel alternative splicing form of excitatory amino acid transporter 1 is a negative regulator of glutamate uptake. *J Neurochem.* 2005;95(2):341–8.
79. Lee A, Anderson AR, Beasley SJ, Barnett NL, Poronnik P, Pow DV. A new splice variant of the

glutamate–aspartate transporter: Cloning and immunolocalization of GLAST1c in rat, pig and human brains. *J Chem Neuroanat.* 2012 Jan;43(1):52–63.

80. Sullivan SM, Macnab LT, Björkman ST, Colditz PB, Pow DV. GLAST1b, the exon-9 skipping form of the glutamate-aspartate transporter EAAT1 is a sensitive marker of neuronal dysfunction in the hypoxic brain. *Neuroscience.* 2007 Oct 26;149(2):434–45.
81. Kim S-Y, Choi S-Y, Chao W, Volsky DJ. Transcriptional regulation of human excitatory amino acid transporter 1 (EAAT1): cloning of the EAAT1 promoter and characterization of its basal and inducible activity in human astrocytes. *J Neurochem.* 2003;87(6):1485–98.
82. Unger T, Lakowa N, Bette S, Engele J. Transcriptional Regulation of the GLAST/EAAT-1 Gene in Rat and Man. *Cell Mol Neurobiol.* 2012 May 1;32(4):539–47.
83. Figiel M, Maucher T, Rozyczka J, Bayatti N, Engele J. Regulation of glial glutamate transporter expression by growth factors. *Exp Neurol.* 2003 Sep;183(1):124–35.
84. Schlüter K, Figiel M, Rozyczka J, Engele J. CNS region-specific regulation of glial glutamate transporter expression. *Eur J Neurosci.* 2002;16(5):836–42.
85. Robinson MB. Acute Regulation of Sodium-Dependent Glutamate Transporters: A Focus on Constitutive and Regulated Trafficking. In: Sitte H, Freissmuth M, editors. *Neurotransmitter Transp.* Springer Berlin Heidelberg; 2006. p. 251–75.
86. Susarla BTS, Seal RP, Zeleniaia O, Watson DJ, Wolfe JH, Amara SG, et al. Differential regulation of GLAST immunoreactivity and activity by protein kinase C: evidence for modification of amino and carboxyl termini. *J Neurochem.* 2004;91(5):1151–63.
87. Guillet BA, Velly LJ, Canolle B, Masméjean FM, Nieoullon AL, Pisano P. Differential regulation by protein kinases of activity and cell surface expression of glutamate transporters in neuron-enriched cultures. *Neurochem Int.* 2005 Mar;46(4):337–46.
88. Gamboa C, Ortega A. Insulin-like growth factor-1 increases activity and surface levels of the GLAST subtype of glutamate transporter. *Neurochem Int.* 2002 Apr;40(5):397–403.

89. Boehmer C, Henke G, Schniepp R, Palmada M, Rothstein JD, Bröer S, et al. Regulation of the glutamate transporter EAAT1 by the ubiquitin ligase Nedd4-2 and the serum and glucocorticoid-inducible kinase isoforms SGK1/3 and protein kinase B. *J Neurochem.* 2003;86(5):1181–8.
90. Ritter SL, Asay MJ, Paquet M, Paavola KJ, Reiff RE, Yun CC, et al. GLAST stability and activity are enhanced by interaction with the PDZ scaffold NHERF-2. *Neurosci Lett.* 2011 Jan 3;487(1):3–7.
91. Bauer DE, Jackson JG, Genda EN, Montoya MM, Yudkoff M, Robinson MB. The glutamate transporter, GLAST, participates in a macromolecular complex that supports glutamate metabolism. *Glutamatergic Synap.* 2012 Sep;61(4):566–74.
92. Kirk DL, Moscona AA. Synthesis of experimentally induced glutamine synthetase (glutamotransferase activity) in embryonic chick retina in vitro. *Dev Biol.* 1963 Dec;8(3):341–57.
93. Moscona AA, Kirk DL. Control of Glutamine Synthetase in the Embryonic Retina in vitro. *Science.* 1965 Apr 23;148(3669):519–21.
94. Morris JE, Moscona AA. Induction of Glutamine Synthetase in Embryonic Retina: Its Dependence on Cell Interactions. *Science.* 1970;167(3926):1736–8.
95. Moscona AA, Piddington R. Enzyme Induction by Corticosteroids in Embryonic Cells: Steroid Structure and Inductive Effect. *Science.* 1967;158(3800):496–7.
96. Patejunas G, Young AP. Developmentally regulated primary glucocorticoid hormone induction of chick retinal glutamine synthetase mRNA. *J Cell Biochem.* 1987;35(3):205–16.
97. Haifeng P, Young AP. The structure of the chicken glutamine synthetase-encoding gene. *Gene.* 1989 Sep 1;81(1):169–75.
98. Van de Zande L, Labruyère WT, Arnberg AC, Wilson RH, van den Bogaert AJW, Das AT, et al. Isolation and characterization of the rat glutamine synthetase-encoding gene. *Gene.* 1990 Mar 15;87(2):225–32.

99. Pu H, Young AP. Glucocorticoid-inducible expression of a glutamine synthetase-CAT-encoding fusion plasmid after transfection of intact chicken retinal explant cultures. *Gene*. 1990 May 14;89(2):259–63.
100. Zhang HY, Young AP. A single upstream glucocorticoid response element juxtaposed to an AP1/ATF/CRE-like site renders the chicken glutamine synthetase gene hormonally inducible in transfected retina. *J Biol Chem*. 1991;266(36):24332–8.
101. Richardson J, Vinson C, Bodwell J. Cyclic Adenosine-3',5'-Monophosphate-Mediated Activation of a Glutamine Synthetase Composite Glucocorticoid Response Element. *Mol Endocrinol*. 1999;13(4):546–54.
102. Berko-Flint Y, Levkowitz G, Vardimon L. Involvement of c-Jun in the control of glucocorticoid receptor transcriptional activity during development of chicken retinal tissue. *EMBO J*. 1994;13(3):646–54.
103. Schüle R, Rangarajan P, Kliewer S, Ransone LJ, Bolado J, Yang N, et al. Functional antagonism between oncoprotein c-Jun and the glucocorticoid receptor. *Cell*. 1990 Sep 21;62(6):1217–26.
104. Schüle R, Evans RM. Functional Antagonism between Oncoprotein c-Jun and Steroid Hormone Receptors. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 1991 Jan 1;56:119–27.
105. Yang-Yen H-F, Chambard J-C, Sun Y-L, Smeal T, Schmidt TJ, Drouin J, et al. Transcriptional interference between c-Jun and the glucocorticoid receptor: Mutual inhibition of DNA binding due to direct protein-protein interaction. *Cell*. 1990 Sep 21;62(6):1205–15.
106. Reisfeld S, Vardimon L. Cell to cell contacts control the transcription activity of the glucocorticoid receptor. *Mol Endocrinol*. 1994 Sep 1;8(9):1224–33.
107. Vardimon L, Ben-Dror I, Oren A, Polak P. Cytoskeletal and cell contact control of the glucocorticoid pathway. *Signal Transduct Health Dis Highlighting Pineal Biol Biol Clocks*. 2006 Jun 27;252(1–2):142–7.
108. Knirsh R, Ben-Dror I, Spangler B, Matthews GD, Kuphal S, Bosserhoff AK, et al. Loss of E-

Cadherin-mediated Cell-Cell Contacts Activates a Novel Mechanism for Up-Regulation of the Proto-Oncogene c-Jun. *Mol Biol Cell*. 2009;20(7):2121-9.

109. Blau L, Knirsh R, Ben-Dror I, Oren S, Kuphal S, Hau P, et al. Aberrant expression of c-Jun in glioblastoma by internal ribosome entry site (IRES)-mediated translational activation. *Proc Natl Acad Sci*. 2012;109(42):E2875-E2884.
110. Stanulović VS, Garcia de Veas Lovillo RM, Labruyère WT, Ruijter JM, Hakvoort TBM, Lamers WH. The 3'-UTR of the glutamine-synthetase gene interacts specifically with upstream regulatory elements, contains mRNA-instability elements and is involved in glutamine sensing. *Biochimie*. 2006 Sep;88(9):1255-64.
111. Sandrasagra A, Patejunas G, Young AP. Multiple mechanisms by which glutamine synthetase levels are controlled in murine tissue culture cells. *Arch Biochem Biophys*. 1988 Nov 1;266(2):522-31.
112. Tiemeier DC, Milman G. Regulation of Glutamine Synthetase in Cultured Chinese Hamster Cells: Induction and Repression by Glutamine. *J Biol Chem*. 1972 Sep 25;247(18):5722-7.
113. Regina R, Vicente F. Control of brain glutamine synthesis by NMDA receptors. *Front Biosci*. 2007;12:883-90.
114. Görg B, Qvartskhava N, Voss P, Grune T, Häussinger D, Schliess F. Reversible inhibition of mammalian glutamine synthetase by tyrosine nitration. *FEBS Lett*. 2007 Jan 9;581(1):84-90.
115. Patejunas G, Young AP. Constitutive and glucocorticoid-mediated activation of glutamine synthetase gene expression in the developing chicken retina. *J Biol Chem*. 1990;265(25):15280-5.
116. Gorovits R, Yakir A, Fox LE, Vardimon L. Hormonal and non-hormonal regulation of glutamine synthetase in the developing neural retina. *Mol Brain Res*. 1996 Dec 31;43(1-2):321-9.
117. Conn PJ, Pin J-P. Pharmacology and Functions of Metabotropic Glutamate Receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1997;37(1):205-37.

118. Dhami GK, Ferguson SSG. Regulation of metabotropic glutamate receptor signaling, desensitization and endocytosis. *Pharmacol Ther.* 2006 Jul;111(1):260–71.
119. Moepps B, Fagni L. Mont Sainte-Odile: a sanctuary for GPCRs. *EMBO Rep.* 2003 Mar;4(3):237–43.
120. Kew JNC, Kemp JA. Ionotropic and metabotropic glutamate receptor structure and pharmacology. *Psychopharmacology (Berl).* 2005;179(1):4–29.
121. Madden DR. The structure and function of glutamate receptor ion channels. *Nat Rev Neurosci.* 2002 Feb;3(2):91–101.
122. Hyde R, Taylor PM, Hundal HS. Amino acid transporters: roles in amino acid sensing and signalling in animal cells. *Biochem J.* 2003;373(1):1–18.
123. Kriel J, Haesendonckx S, Rubio-Teixeira M, Van Zeebroeck G, Thevelein JM. From transporter to transceptor: Signaling from transporters provokes re-evaluation of complex trafficking and regulatory controls. *BioEssays.* 2011;33(11):870–9.
124. Donaton MCV, Holsbeeks I, Lagatie O, Van Zeebroeck G, Crauwels M, Winderickx J, et al. The Gap1 general amino acid permease acts as an amino acid sensor for activation of protein kinase A targets in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol.* 2003;50(3):911–29.
125. Van Zeebroeck G, Bonini BM, Versele M, Thevelein JM. Transport and signaling via the amino acid binding site of the yeast Gap1 amino acid transceptor. *Nat Chem Biol.* 2009 Jan;5(1):45–52.
126. Abe K, Saito H. Possible linkage between glutamate transporter and mitogen-activated protein kinase cascade in cultured rat cortical astrocytes. *J Neurochem.* 2001;76(1):217–23.
127. Duan S, Anderson CM, Stein BA, Swanson RA. Glutamate Induces Rapid Upregulation of Astrocyte Glutamate Transport and Cell-Surface Expression of GLAST. *J Neurosci.* 1999;19(23):10193–200.
128. Munir M, Correale DM, Robinson MB. Substrate-induced up-regulation of Na<sup>+</sup>-dependent

glutamate transport activity. *Neurochem Int.* 2000 Aug 1;37(2–3):147–62.

129. González MI, Ortega A. Regulation of high-affinity glutamate uptake activity in Bergmann glia cells by glutamate. *Brain Res.* 2000 Jun 2;866(1–2):73–81.
130. Lopez-Colome A, Martinez-Lozada Z, Guillem A, Lopez E, Ortega A. Glutamate transporter-dependent mTOR phosphorylation in Müller glia cells. *ASN NEURO.* 2012;4(5):e00095.
131. Martínez-Lozada Z, Hernández-Kelly LC, Aguilera J, López-Bayghen E, Ortega A. Signaling through EAAT-1/GLAST in cultured Bergmann glia cells. *Neurochem Int.* 2011 Nov;59(6):871–9.
132. Tanaka M, Yamaguchi K, Tatsukawa T, Theis M, Willecke K, Itohara S. Connexin43 and Bergmann glial gap junctions in cerebellar function. *Front Neurosci* [Internet]. 2008;2. Available from: <http://www.frontiersin.org/Journal/10.3389/neuro.01.038.2008/full>
133. Purves D, Augustine G, Fitzpatrick D, Katz L, LaMantia A-S, Williams, et al., editors. *Movement and its central control.* Neuroscience. 3rd ed. 2001. p. 371–9.
134. Kandel E, Schwartz J, Jessell T. *Principles of Neural Science.* McGraw-Hill Medical; 2000.
135. Caspary T, Anderson KV. Patterning cell types in the dorsal spinal cord: what the mouse mutants say. *Nat Rev Neurosci.* 2003 Apr;4(4):289–97.
136. Gorovits R, Yakir A, Fox LE, Vardimon L. Hormonal and non-hormonal regulation of glutamine synthetase in the developing neural retina. *Mol Brain Res.* 1996 Dec 31;43(1–2):321–9.
137. Rothstein JD, Jin L, Dykes-Hoberg M, Kuncl RW. Chronic inhibition of glutamate uptake produces a model of slow neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci.* 1993;90(14):6591–5.
138. Matyja E, Taraszewska A, Naganska J, Rafalowska J, Gebarowska J. Astroglial alterations in amyotrophic lateral sclerosis (ALS) model of slow glutamate excitotoxicity in vitro. *Folia Neuropathol.* 2006;44(3):183–90.
139. López-Bayghen E, Rosas S, Castelán F, Ortega A. Cerebellar Bergmann glia: an important model

to study neuron–glia interactions. *Neuron Glia Biol.* 2007;3(02):155–67.

140. López-Bayghen E, Espinoza-Rojo M, Ortega A. Glutamate down-regulates GLAST expression through AMPA receptors in Bergmann glial cells. *Mol Brain Res.* 2003 Jul 4;115(1):1–9.
141. Cruz-Solis I, Zepeda RC, Ortiz S, Aguilera J, López-Bayghen E, Ortega A. Glutamate-dependent transcriptional control in Bergmann glia: Sox10 as a repressor. *J Neurochem.* 2009;109(3):899–910.
142. López-Bayghen E, Cruz-Solís I, Corona M, López-Colomé AM, Ortega A. Glutamate-induced octamer DNA binding and transcriptional control in cultured radial glia cells. *J Neurochem.* 2006;98(3):851–9.
143. Stoppini L, Buchs P-A, Muller D. A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. *J Neurosci Methods.* 1991;37(2):173 – 182.
144. Ortega A, Eshhar N, Teichberg VI. Properties of kainate receptor/channels on cultured Bergmann glia. *Neuroscience.* 1991;41(2–3):335–49.
145. Martínez-Lozada Z, Guillem AM, Flores-Méndez M, Hernández-Kelly LC, Vela C, Meza E, et al. GLAST/EAAT1-induced Glutamine release via SNAT3 in Bergmann glial cells: evidence of a functional and physical coupling. *J Neurochem.* 2013;125(4):545–54.
146. Minet R, Villie F, Marcollet M, Meynial-Denis D, Cynober L. Measurement of glutamine synthetase activity in rat muscle by a colorimetric assay. *Clin Chim Acta.* 1997 Dec 10;268(1–2):121–32.
147. Cremona ML, Matthies HJG, Pau K, Bowton E, Speed N, Lute BJ, et al. Flotillin-1 is essential for PKC-triggered endocytosis and membrane microdomain localization of DAT. *Nat Neurosci.* 2011 Apr;14(4):469–77.
148. Lau T, Horschitz S, Bartsch D, Schloss P. Monitoring mouse serotonin transporter internalization in stem cell-derived serotonergic neurons by confocal laser scanning microscopy. *Neurochem Int.* 2009 Mar;54(3–4):271–6.

149. Hu J, Quick MW. Substrate-mediated regulation of  $\gamma$ -aminobutyric acid transporter 1 in rat brain. *Neuropharmacology*. 2008 Feb;54(2):309–18.
150. Ruiz M, Ortega A. Characterization of an Na<sup>+</sup>-dependent glutamate/aspartate transporter from cultured Bergmann glia. *NeuroReport*. 1995;6(15):2041–4.
151. Paoletti P, Bellone C, Zhou Q. NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. *Nat Rev Neurosci*. 2013 Jun;14(6):383–400.
152. Ito M. The molecular organization of cerebellar long-term depression. *Nat Rev Neurosci*. 2002 Nov;3(11):896–902.
153. Sun W, McConnell E, Pare J-F, Xu Q, Chen M, Peng W, et al. Glutamate-Dependent Neuroglial Calcium Signaling Differs Between Young and Adult Brain. *Science*. 2013 Jan 11;339(6116):197–200.
154. Eid T, Thomas M, Spencer D, Rundén-Pran E, Lai J, Malthankar G, et al. Loss of glutamine synthetase in the human epileptogenic hippocampus: possible mechanism for raised extracellular glutamate in mesial temporal lobe epilepsy. *The Lancet*. 2004 Jan 3;363(9402):28–37.
155. Bringmann A, Grosche A, Pannicke T, Reichenbach A. GABA and glutamate uptake and metabolism in retinal glial (Müller) cells. *Front Endocrinol [Internet]*. 2013;4. Available from: <http://www.frontiersin.org/Journal/10.3389/fendo.2013.00048/full>
156. Bringmann A, Pannicke T, Biedermann B, Francke M, Iandiev I, Grosche J, et al. Role of retinal glial cells in neurotransmitter uptake and metabolism. *Neurochem Int*. 2009 Mar;54(3–4):143–60.
157. Vardimon L, Ben-Dror I, Avisar N, Oren A, Shifan L. Glucocorticoid control of glial gene expression. *J Neurobiol*. 1999;40(4):513–27.
158. Shin D, Park S, Park C. A splice variant acquiring an extra transcript leader region decreases the translation of glutamine synthetase gene. *Biochem J*. 2003;374(1):175–84.

159. González-Mejia ME, Morales M, Hernández-Kelly LCR, Zepeda RC, Bernabé A, Ortega A. Glutamate-dependent translational regulation in cultured Bergmann glia cells: Involvement of p70S6K. *Neuroscience*. 2006;141(3):1389–98.
160. Flores-Méndez M, Martínez-Lozada Z, Monroy H, Hernández-Kelly L, Barrera I, Ortega A. Glutamate-Dependent Translational Control in Cultured Bergmann Glia Cells: eIF2 $\alpha$  Phosphorylation. *Neurochem Res*. 2013 Mar 28;1–9.
161. McKenna MC. The glutamate-glutamine cycle is not stoichiometric: Fates of glutamate in brain. *J Neurosci Res*. 2007;85(15):3347–58.
162. McKenna MC, Sonnewald U, Huang X, Stevenson J, Zielke HR. Exogenous Glutamate Concentration Regulates the Metabolic Fate of Glutamate in Astrocytes. *J Neurochem*. 1996;66(1):386–93.
163. McKenna M. Substrate Competition Studies Demonstrate Oxidative Metabolism of Glucose, Glutamate, Glutamine, Lactate and 3-Hydroxybutyrate in Cortical Astrocytes from Rat Brain. *Neurochem Res*. 2012 Nov 1;37(11):2613–26.
164. Bernabé A, Méndez JA, Hernández-Kelly LC, Ortega A. Regulation of the Na<sup>+</sup>-Dependent Glutamate/Aspartate Transporter in Rodent Cerebellar Astrocytes. *Neurochem Res*. 2003 Dec 1;28(12):1843–9.
165. Wang Z, Li W, Mitchell C, Carter-Dawson L. Activation of protein kinase C reduces GLAST in the plasma membrane of rat Müller cells in primary culture. *Vis Neurosci*. 2003;20(06):611–9.
166. Robinson MB. Acute Regulation of Sodium-Dependent Glutamate Transporters: A Focus on Constitutive and Regulated Trafficking. In: Sitte H, Freissmuth M, editors. *Neurotransmitter Transp*. Springer Berlin Heidelberg; 2006. p. 251–75.
167. Guillet BA, Velly LJ, Canolle B, Masméjean FM, Nieoullon AL, Pisano P. Differential regulation by protein kinases of activity and cell surface expression of glutamate transporters in neuron-enriched cultures. *Neurochem Int*. 2005 Mar;46(4):337–46.

168. Aguirre G, Rosas S, López-Bayghen E, Ortega A. Valproate-dependent transcriptional regulation of GLAST/EAAT1 expression: Involvement of Ying-Yang 1. *Neurochem Int.* 2008 Jun;52(7):1322–31.
169. Aguirre A, López T, López-Bayghen E, Ortega A. Glutamate Regulates Kainate-binding Protein Expression in Cultured Chick Bergmann Glia through an Activator Protein-1 Binding Site. *J Biol Chem.* 2000;275(50):39246–53.