



VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA

ciberer
Centro de Investigación Biomédica en Red
Enfermedades Raras

ibv INSTITUTO DE
BIOMEDICINA DE
VALENCIA CSIC

Doctorado en Biotecnología

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

**ALTERACIONES EN LA HOMEOSTASIS DEL
TRANSPORTADOR DE GLUTAMATO GLT-1 EN
LA ENFERMEDAD DE LAFORA**

Memoria presentada por

María del Carmen Muñoz Ballester

Para optar al grado de Doctora por la

Universidad de Valencia

Dirigida por:

Pascual Sanz Bigorra

Rosa Viana Ballester

Eva Pérez Jiménez

Valencia, mayo de 2017

Como directores:

D. Pascual Sanz Bigorra, Doctor en Farmacia, Profesor de Investigación del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) y del Centro de Investigación en Red de Enfermedades Raras (CIBERER).

D^ª. Rosa Viana Ballester, Doctora en Farmacia.

D^ª. Eva Pérez Jiménez, Doctora en Biología.

CERTIFICAN

Que D^ª. María del Carmen Muñoz Ballester, licenciada en Biología y máster en Aproximaciones Moleculares en Ciencias de la Salud por la Universidad de Valencia, con DNI 45841644E, ha realizado, bajo su dirección, el trabajo de tesis doctoral que lleva por título "**Alteraciones en la homeostasis del transportador de glutamato GLT-1 en la enfermedad de Lafora**".

Que se ha generado una publicación en una revista internacional del primer cuartil, siendo la candidata primera autora.

Que entendemos que el trabajo reúne los requisitos para ser susceptible de defensa ante el tribunal apropiado, por reflejar adecuadamente el estado del conocimiento y discutir apropiadamente el contenido y las implicaciones del trabajo realizado y porque las conclusiones recogen un avance suficiente en el campo objeto de estudio como para hacer al candidato merecedor del doctorado.

Valencia, a 9 de mayo de 2017

Fdo. Pascual Sanz Bigorra

Fdo. Rosa Viana Ballester

Fdo. Eva Pérez Jiménez

Para la realización de esta tesis doctoral, María del Carmen Muñoz Ballester ha disfrutado de una ayuda para la Formación de Profesorado Universitario (FPU) (FPU12-00383), del Ministerio de Educación, Cultura y Deporte.

El trabajo se ha llevado a cabo en el grupo U742 del CIBERER-Instituto de Salud Carlos III (IP, P. Sanz) enmarcado dentro de los siguientes proyectos de investigación:

- Programa Nacional de Biomedicina. Proyecto SAF2011-27442. "Bases moleculares de la fisiopatología de la epilepsia mioclónica progresiva de tipo Lafora. Identificación de nuevos sustratos del complejo laforina-malina" Años 2012-2014. Investigador Principal: Dr. Pascual Sanz. Centro: Instituto de Biomedicina de Valencia (CSIC), Valencia.

- Programa Nacional de Biomedicina. Proyecto SAF2014-54604-C3-1-R. "Buscando una terapia para la epilepsia mioclónica progresiva de Lafora" Años 01/01/2015-31/12/2017. Investigador Principal: Dr. Pascual Sanz. Centro: Instituto de Biomedicina de Valencia (CSIC), Valencia.

*A mis abuelos,
que me enseñaron
a no rendirme nunca*

AGRADECIMIENTOS

Cuando uno empieza una tesis, puede imaginar que no será un camino fácil. Puede hacerse una idea de las largas jornadas de trabajo que vivirá, los momentos amargos que pasará y lo emocionalmente agotador que puede resultar. Lo que nunca puede llegar a atisbar es la necesidad de apoyo que experimentará durante este periodo de formación. Estas líneas, aunque insuficientes, pretenden reconocer el mérito de todas esas personas que me han ayudado a poder llegar al final. Gracias por cada palabra de ánimo y por cada consejo. Cada palabra de esta tesis os pertenece, ya que sin vosotros no habría sido posible.

De entre todos aquellos que me han ayudado todos estos años, querría hacer una mención especial a ciertas personas que han sido especialmente relevantes para mí durante todos estos años.

En primer lugar querría agradecerle a Pascual el haberme dado la oportunidad de llevar a cabo este proyecto en su laboratorio. Gracias por confiar en mí en los momentos más críticos cuando ni siquiera yo lo hacía, por tu paciencia y por haber seguido hasta el final con esto aún sin haber sido precisamente la estudiante de doctorado ideal.

Gracias a Rosa, mi hermana mayor del laboratorio, por haberse convertido en una persona fundamental en mi vida y haber sido mi luz cuando no veía más que oscuridad. Gracias por haber sido un modelo a seguir todo este tiempo, tanto profesional como personal. Gracias por tus consejos y tus tirones de oreja, que de vez en cuando necesitaba.

Quiero dar las gracias también a Eva, una maravillosa científica que se ha ganado mi corazón y mi admiración cada día. Gracias por haberme enseñado tanto durante todo este tiempo y darme nuevas energías para poder acabar. Gracias también a toda tu familia (a Raúl, a Paula, a Juan Diego y a Samuel) por haberme acogido como a un miembro más y darme unos nuevos ojos con los que ver el mundo.

Aunque me vayan a faltar palabras para poder agradecer todo lo que se merecen, quiero dar las gracias al laboratorio que me ha apoyado y aguantado todo este tiempo. Gracias por haberos convertido en mi familia de Valencia y haberme hecho reír y disfrutar todos estos años. Gracias a Ada, a Carla, a Pablo, a Belén y muy especialmente a Miguel y a Ana. No puedo evitar haceros una mención especial. A Ana, por haber aparecido para salvarme y ayudarme a ser mejor cada día, y a Miguel, por compartir tantas cosas conmigo. Gracias a todas las personas que convivieron conmigo en el laboratorio en algún momento a lo largo de todos estos años. Gracias por ayudarme a sobrellevar mi pesimismo innato.

Gracias a todo el IBV, que se ha convertido en mi casa todos estos años. Gracias a todos aquellos que me dieron una palabra de ánimo y me ayudaron a crecer. Gracias especialmente a Lorena Tremiño, a Elena Carceller, a Carla Lloret, a Larissa Gonçalves, a Susi Eichberg, a Roberta Jorge y a Soledad Álvarez por escucharme siempre y ofrecerme no sólo su compañerismo sino también su amistad. Gracias asimismo a Amparo Almero por su profesionalidad y a Nuria Flames y Natalia Tapia por su ejemplo y pasión.

No puedo dejar de dar las gracias a mis profesores y compañeros de universidad, que en este nuevo periodo de formación han

llegado a ser grandes amigos con los que discutir y mejorar. Gracias a mis profesores Juli Peretó, Isabel Fariñas, Emilia Matallana y Juan Alcober entre otros por animarme a seguir adelante y haberme ayudado a despertar la característica más importante en un científico: la pasión por lo que se hace. Gracias a mis compañeros: Borja Holgado, Beatriz Mallebrera, Dani Tamarit, Fernando Cervera, José Aguilar, Darkos Bello, Ximo Pechuán, Silvia Moriano y Andrea García. Ellos han sido un punto de referencia y un estímulo para no rendirme y seguir mejorando. Gracias especialmente a Marta Pinto por demostrarme que no importan los kilómetros que nos separen, las verdaderas amigas siempre están para reconfortar cuando se las necesita. Gracias por ser tan única y excepcional como eres. Gracias asimismo a mis amigos de Banyuls (Venny, Mario y Guillaume), porque aún cuando estemos meses sin hablar o sin vernos, cuando he necesitado apoyo no han dudado en recorrer kilómetros para venir a estar a mi lado.

Una mención aparte merecen Mariano Collantes y Dani Martínez. Durante todos estos años, han sido posiblemente el apoyo más grande con el que he podido contar. Gracias por haberos convertido en mis ángeles particulares todos estos años. Gracias por vuestra amistad, que no conoce horas ni impedimentos; por vuestras bromas; por vuestro apoyo y por vuestra existencia. Gracias porque esta tesis es tan vuestra como mía, ya que sin vosotros nunca habría salido adelante. Y seguramente yo tampoco.

Muchas gracias a mis amigos de Elda, por intentar comprender el universo paralelo en el que vivimos los científicos. Gracias especialmente a Isabel y Patricia. Gracias por todas esas horas de teléfono y Skype para apoyarme, aún sin entender ni la mitad de

las cosas que digo. Gracias por no haberme fallado ni una sola vez en todos estos años. Os quiero.

Para acabar los que probablemente sean los agradecimientos más largos jamás escritos, quiero dar las gracias a las personas más importantes de mi vida: las de mi familia. Gracias por haberme apoyado en este largo camino sin dudar ni una sola vez; por haber aprendido lo que es un astrocito, la autofagia o los neurotransmisores; por animarme a seguir siempre luchando por mis sueños y por recordarme que ninguna meta está lo suficientemente lejos si uno se esfuerza. Gracias a mis padres, que me alentaron siempre a poner toda la pasión y ánimo posible en el trabajo, aún cuando las fuerzas fallan, y despertaron en mí desde bien pequeña el germen de la curiosidad, tan necesario en esta profesión. Gracias a mis hermanas, Ana y María José, mis compañeras de lucha en todas las batallas que se me presenten, Gracias por hacer más fácil la carrera de obstáculos que ha sido esta tesis, ya que saber que cuando tropiece me ayudarán a levantarme ha hecho todo más fácil.

Para terminar quiero darle las gracias a Alessandro, mi marido, por haber estado a mi lado. Por haber aguantado horarios imposibles fuera de casa, lágrimas de desesperación, viajes lejos de casa y ahorros gastados en lejanos congresos y cursos. Gracias por tu paciencia infinita y por haber sido la mayor fuente de felicidad durante esta etapa que parecía no tener fin. Gracias por saber reírte de todo, especialmente de mí y de mis agobios absurdos. Gracias porque para escribir todo aquello que tengo que agradecerte, necesitaría otra tesis entera. Espero que te conformes con estas palabras y la promesa de toda una vida tratando de devolver una parte de todo lo que me has dado estos años. GRACIAS.

ABREVIATURAS

AD: *Alzheimer disease*, enfermedad de Alzheimer.

BSA: *Bovine Serum Albumin*, albúmina de suero bovino.

CA1, CA2, CA3: *Cornus Ammonis* 1, 2 y 3.

cAMP: adenosín monofosfato cíclico.

CoIP: coinmunoprecipitación.

CREB: *cAMP Response Element-Binding protein*, proteína de unión a elementos de la respuesta por cAMP.

DAB: diaminobenzidina.

DG: giro dentado.

DHK: dihidrokainato.

DMEM: *Dulbecco's modified Eagle's medium*, medio de Eagle modificado por Dubecco.

DMSO: dimetilsulfóxido.

dNTPs: desoxirribosilnucleótidos trifosfato.

EAAT: *Excitatory Amino Acid Transporter*, transportador de aminoácidos excitatorios.

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético.

EEG: electroencefalograma.

EGF: *Epidermal growth factor*, factor de crecimiento epidérmico.

EGR: *Early Growth Response protein*, proteína de respuesta a crecimiento temprano.

ELA: esclerosis lateral amiotrófica.

ELAPD: Complejo parkinsoniano-demencia-esclerosis lateral amiotrófica o síndrome de Guam.

ENaC: *Epithelial Sodium Channel*, canal de sodio epitelial.

EPM: *Epilepsy, progressive myoclonus*; epilepsia, mioclonos progresivos.

FBS: *Fetal Bovine Serum*, suero fetal bovino.

GABA: ácido γ -aminobutírico.

GFAP: *Glial fibrillary acidic protein*, proteína fibrilar ácida de la glía.

GFP: *Green Fluorescence Protein*, proteína verde fluorescente.

GLT-1: *Glutamate transporter 1*, transportador de glutamato 1.

GTP: guanosín trifosfato.

HDAC: *Histone Deacetylase*, desacetilasa de histonas.

HD: *Huntington disease*, enfermedad de Huntington.

KO: *Knock Out*, deficiente para el gen indicado.

LB: Medio para cultivo de bacterias Luria-Bertani.

LCR: líquido cefalorraquídeo.

LD: *Lafora disease*, enfermedad de Lafora.

NFAT: *Nuclear Factor of Activated T cells*, factor nuclear de células T

activadas.

NF- κ B: *Nuclear Factor Kappa B*, factor nuclear kappa B.

PACAP: *Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide*, polipéptido activador de la adenilato ciclasa pituitaria.

PBS: *Phosphate Buffered Saline*, tampón fosfato salino.

PCR: *Polymerase Chain Reaction*, reacción en cadena de la polimerasa.

PD: *Parkinson disease*, enfermedad de Parkinson.

PE: ficoeritrina.

PFA: paraformaldehído.

PICK1: *Protein Interacting with C Kinase*, proteína de interacción con kinasa C.

PKC: *Protein Kinase C*, proteína kinasa C.

PMSF: fenilmetilsulfonil fluoruro.

PTZ: pentilentetrazol.

Sp1: *Specificity Protein 1*, proteína de especificidad 1.

SUMO: *Small Ubiquitin MOdifier*, modificador pequeño de la ubiquitina.

TNF- α : *Tumoral Necrosis Factor alpha*, factor de necrosis tumoral alpha.

UTR: *Untranslated Region*, región no traducida.

WGA: *Wheat Germ Agglutinin*, aglutinina de germen de trigo.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
1. La enfermedad de Lafora.....	1
1.1- La epilepsia.....	4
2. Los astrocitos en la epilepsia.....	8
2.1- La neuroglía y sus funciones.....	8
2.2- La astrogliosis reactiva.....	11
3. La recaptación de glutamato en el sistema nervioso central.....	12
3.1- El transportador de glutamato EAAT2.....	16
3.2- Regulación de EAAT2.....	21
4. La endocitosis, tráfico celular y su regulación.....	24
4.1- Endocitosis dependiente de clatrina.....	24
4.2- Endocitosis independiente de clatrina.....	25
4.3- Destinos celulares del cargo tras la endocitosis.....	27
4.4- Modificaciones post-traduccionales que regulan la endocitosis.....	27
4.4.1- Fosforilación.....	28
4.4.2- Glicosilación.....	28
4.4.3- Palmitoilación.....	29
4.4.4- Sumoilación.....	29
4.4.5- Ubiquitinación.....	30
5. La endocitosis de EAAT2 y su regulación.....	33
5.1- La E3-ubiquitín ligasa Nedd4-2.....	34
5.2- El papel de Nedd4-2 en la endocitosis de EAAT2.....	35

5.3- Las arrestinas en la endocitosis de EAAT2.	36
OBJETIVOS.....	41
MATERIAL Y MÉTODOS.....	45
1. Material biológico y condiciones de crecimiento.....	45
1.1- Animales.....	45
1.2- Cultivos celulares de mamíferos.	46
1.2.1- Líneas celulares.	46
1.2.2- Líneas celulares estables de SH-SY5Y.	47
1.2.3- Cultivo primario de astrocitos.....	48
1.2.4- Tratamientos.	50
1.3- Bacterias.....	51
2.- Vectores de expresión para células de mamífero utilizados.	52
3.- Análisis por inmunohistoquímica e inmunohistofluorescencia.	53
3.1- Obtención de las muestras de tejido animal para inmunodetección.	53
3.2- Análisis inmunohistoquímico.	53
3.3- Análisis por inmunohistofluorescencia.	55
4.- Captación de glutamato.....	56
5.- Determinación de GLT-1/EAAT2 en la superficie celular.	57
5.1- Citometría de flujo.	58
5.2- Análisis por inmunofluorescencia confocal.	59
6.- Análisis de proteínas por <i>western blot</i>	60
7.- Ensayo de coinmunoprecipitación en líneas celulares de mamífero.	62
8. Análisis de ubiquitinación en células de mamífero.	63
9.- Cuantificación del mRNA mediante qPCR.....	65
9.1- Extracción de RNA.....	65

9.2- Transcripción reversa.....	66
9.3- PCR cuantitativa.....	67
10.- Microdiálisis y determinación de la concentración.....	68
11.- Análisis estadístico.....	72
RESULTADOS.....	75
1. La homeostasis del transportador de glutamato está afectada en astrocitos primarios de ratones <i>Epm2a</i> ^{-/-} y <i>Epm2b</i> ^{-/-}	75
1.1- Los ratones <i>Epm2a</i> ^{-/-} y <i>Epm2b</i> ^{-/-} de 12 meses presentan reactividad astrocitaria.....	75
1.2- Los astrocitos primarios obtenidos de ratones <i>Epm2a</i> ^{-/-} y <i>Epm2b</i> ^{-/-} tienen afectada la captación de glutamato.....	77
1.3- Los niveles del transportador de glutamato GLT-1 están disminuidos en la membrana de astrocitos primarios <i>Epm2a</i> ^{-/-} y <i>Epm2b</i> ^{-/-}	78
1.4- La introducción de malina en astrocitos <i>Epm2b</i> ^{-/-} recupera los niveles de GLT-1 en la superficie.....	82
1.5- La sobreexpresión de laforina y malina en SH-SY5Y aumenta los niveles de EAAT2 en la membrana.....	85
1.6- El inhibidor de dinamina <i>dynasore</i> produce la acumulación de GLT-1 en la membrana de los astrocitos.....	88
2. Laforina y malina participan en la regulación de EAAT2 por ubiquitinación.....	92
2.1- Las células Hek293 como modelo de endocitosis de EAAT2.....	93
2.2- El complejo laforina-malina afecta a la ubiquitinación de EAAT2, provocando cambios en su solubilidad en detergentes no iónicos.	95
2.3- La ubiquitinación asociada al complejo laforina-malina de EAAT2 no etiqueta a la proteína a degradación proteica.....	101
2.4- Relación entre el complejo laforina-malina y Nedd4.2.....	103
2.4.1- Nedd4.2 no se ubiquitina por laforina-malina.....	103
2.4.2- Laforina y malina no interaccionan con Nedd4.2.....	105

2.4.3- La vida media de Nedd4 o Nedd4.2 no se ve afectada por la sobreexpresión de laforina y malina.	106
2.4.4- La ausencia de laforina o malina incrementa los niveles de Nedd4 en hipocampo de ratones modelo para la enfermedad de Lafora.....	108
2.5- El complejo laforina-malina favorece la ubiquitinación de la β -arrestina 1.....	109
3. La homeostasis del glutamato está afectada en ratones <i>Epm2b</i> ^{-/-} . 118	
3.1- GLT-1 está aumentado en ratones <i>Epm2b</i> ^{-/-}	118
3.2- El aumento de GLT-1 en hipocampo de ratones <i>Epm2b</i> ^{-/-} se da en neuronas y no en astrocitos.	122
3.3- Estado de otros transportadores de glutamato en hipocampo de ratones <i>Epm2b</i> ^{-/-}	124
3.4- Los niveles de glutamato extracelular se encuentran aumentados en el hipocampo de ratones <i>Epm2b</i> ^{-/-}	127
DISCUSIÓN	77
1. Alteración del metabolismo del glutamato en astrocitos <i>Epm2a</i> ^{-/-} y <i>Epm2b</i> ^{-/-}	135
2. Participación de laforina-malina en la regulación de la endocitosis de GLT-1: nuestra hipótesis.....	139
3. La homeostasis de los transportadores de glutamato en ratones <i>Epm2b</i> ^{-/-}	145
4. Los niveles de glutamato extracelular en el hipocampo se encuentran aumentados en ratones <i>Epm2b</i> ^{-/-}	152
CONCLUSIONES	142
REFERENCIAS.....	169

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1. La enfermedad de Lafora.

La epilepsia mioclónica progresiva de Lafora (enfermedad de Lafora, LD, OMIM 254780) es una enfermedad rara de herencia autosómica recesiva, con una prevalencia de aproximadamente 4 casos por cada millón de habitantes, relativamente más frecuente en países mediterráneos (Turnbull et al., 2016). Se caracteriza porque los pacientes presentan neurodegeneración, epilepsia y acumulación de poliglucosanos insolubles en el citoplasma de células del corazón, músculo e hígado y en neuronas. Estos poliglucosanos se denominan cuerpos de Lafora y toman el nombre del descubridor de la enfermedad, el médico español Gonzalo Rodríguez Lafora, quien los describió por primera vez en 1911 (Lafora, 1911).

Se trata de una enfermedad que aparece en la infancia o adolescencia y, al no disponer todavía de un tratamiento adecuado, lleva a la muerte del paciente unos 10 años después de la aparición de los primeros síntomas (Berkovic et al., 1986; Ganesh et al., 2006).

En las últimas décadas, se han hecho grandes avances en la comprensión de las bases moleculares de la enfermedad. Se han identificado mutaciones en dos genes, *EPM2A* (Minassian et al., 1998; Serratos et al., 1999) y *EPM2B* (Chan et al., 2003), que explicarían la base de la enfermedad en un 92% de los casos. *EPM2A* codifica la proteína laforina, una fosfatasa dual de 331 aminoácidos con un dominio funcional de unión a carbohidratos en

el extremo N-terminal (Minassian et al., 2000; Wang et al., 2002). *EPM2B*, por otra parte, codifica la proteína malina, una E3 ubiquitín ligasa de 395 aminoácidos con un dominio RING en el extremo N-terminal y seis dominios NHL en la región C-terminal (Chan et al., 2003; Gentry et al., 2005; Lohi et al., 2005). El hecho de que los pacientes con mutaciones en laforina o en malina sean neurológica e histopatológicamente indistinguibles, junto con la evidencia de que laforina y malina son capaces de interactuar físicamente, sugiere que ambas proteínas forman un complejo funcional (Gentry et al., 2005; Lohi et al., 2005; Solaz-Fuster et al., 2008). En este complejo, laforina reclutaría de manera específica sustratos para que fuesen ubiquitinados por malina. Entre estos sustratos encontramos proteínas relacionadas con la biosíntesis de glucógeno (Cheng et al., 2007; Rubio-Villena et al., 2013; Vilchez et al., 2007; Worby et al., 2008), lo que podría explicar la formación de los cuerpos de Lafora característicos de la enfermedad.

Sin embargo, desde el momento de la descripción de la enfermedad, existe una controversia sobre si los cuerpos de Lafora son la causa o la consecuencia de la enfermedad, ya que existen otras rutas moleculares afectadas en la enfermedad de Lafora, muchas de ellas comunes a las encontradas en otras enfermedades neurodegenerativas.

Recientemente se ha demostrado que los cuerpos de Lafora, además de contener poliglucosanos, presentan proteínas ubiquitinadas y productos con estados de glicosilación avanzada (Delgado-Escueta, 2007), sugiriendo que contienen proteínas mal plegadas destinadas a degradación. Además, hace unos años se describió que el complejo laforina-malina promueve la degradación

de proteínas mal plegadas (Garyali et al., 2009) y protege las células del estrés en el retículo endoplásmico (Liu et al., 2009; Vernia et al., 2009a). Se ha descrito la afectación de la autofagia en diferentes modelos de la enfermedad de Lafora (Aguado et al., 2010; Criado et al., 2012; Knecht et al., 2012, 2010). Todo esto apoya la hipótesis de que en la enfermedad de Lafora se produce un desorden en la eliminación de proteínas y, por tanto, en la proteostasis, que podría contribuir al desarrollo de la enfermedad, al igual que ocurre en otras enfermedades neurodegenerativas que cursan con acumulación de proteínas mal plegadas como la enfermedad de Alzheimer (AD) (Eisele, 2013) o la enfermedad de Parkinson (PD) (Bosco et al., 2011; Melki, 2015).

Por otra parte, recientemente se ha descrito que el estrés oxidativo es una de las características distintivas de la enfermedad de Lafora (Romá-Mateo et al. 2015a; Romá-Mateo et al. 2015b). El aumento del estrés oxidativo es asimismo común a otras muchas enfermedades neurológicas y puede contribuir a un aumento del estrés en el retículo endoplásmico. Se ha demostrado que modelos celulares y animales deficientes en laforina o malina son más susceptibles al estrés en este orgánulo (Vernia et al., 2009b). El estrés en el retículo endoplásmico favorece una más rápida acumulación de proteínas mal plegadas o incluso la muerte neuronal.

Por último, recientemente se ha descrito la presencia de neuroinflamación en cerebros de ratones modelos para la enfermedad de Lafora en edades tempranas (López-González et al., 2016). La neuroinflamación es asimismo una característica común con otras muchas enfermedades neurológicas y se ha descrito que

podría tener un efecto positivo para la supervivencia neuronal a corto plazo pero que, si llega a ser crónica, podría tener efectos deletéreos en el normal funcionamiento del sistema nervioso (Pekny y Pekna 2014). Por ello, también este factor podría estar contribuyendo al desarrollo del cuadro clínico observado en la enfermedad de Lafora.

A pesar de todos los avances que se han realizado hasta la fecha en la comprensión de los procesos que participan en la enfermedad de Lafora, todavía no se conoce el origen de una de las características principales de la enfermedad: la epilepsia.

1.1- La epilepsia.

La epilepsia se define como un trastorno en el que se presentan convulsiones recurrentes debido a un proceso crónico subyacente. Una convulsión es un fenómeno paroxístico producido por descargas anormales, excesivas e hipersincrónicas de un grupo de neuronas del sistema nervioso central. El término epilepsia hace referencia a un fenómeno clínico heterogéneo más que a una sola enfermedad, puesto que existen muchas formas y causas de epilepsia (Kasper et al., 2005). Esto supone que no todas las epilepsias pueden ser tratadas de igual modo y que a pesar de existir más de 20 fármacos antiepilépticos, el 30% de las epilepsias no puedan ser tratadas satisfactoriamente (Pitkänen et al., 2016).

Una de las diferencias que aporta heterogeneidad a la epilepsia es el área del cerebro que puede estar implicada tanto en la generación de las convulsiones como en la repetición de las mismas. Algunas de las áreas descritas son la corteza prefrontal (Goldring, 1972), el tálamo e hipotálamo (Gibbs and Gibbs, 1951), la

amígdala (Miyasaka and Kawamura, 1963) o el hipocampo (Earle et al., 1953). Esta última área se encuentra siempre afectada en la epilepsia lóbulo-temporal, la mayoritaria en adultos (Schwartzkroin, 1994).

El hipocampo es una estructura cerebral presente en todos los mamíferos, que forma parte del sistema límbico y que se localiza en la parte interna del lóbulo temporal. Presenta la forma de un tubo curvado, el cual se divide en diferentes subzonas: *Cornus Ammonis* (CA)1, CA2, CA3 y el giro dentado (DG) (**Figura 1**). Las principales funciones del hipocampo están relacionadas con la memoria y el manejo del espacio. Desde que se comenzó a estudiar la estructura y la formación de esta región cerebral, se la ha relacionado con la epilepsia. El hipocampo parece ser una zona especialmente sensible al desarrollo de convulsiones, tanto al aplicar fármacos convulsionantes como por manipulaciones físicas (Schwartzkroin, 1994). Además, pacientes con epilepsia lóbulo-temporal presentan esclerosis en esta zona cerebral, es decir, patrones de daño cerebral con pérdida neuronal, gliosis y reorganización axonal (Pitkänen et al., 2016). Por otra parte, la clínica refuerza la importancia de esta área en epilepsias intratables, ya que se ha observado que las epilepsias más difíciles de tratar farmacológicamente son aquellas que tienen su origen en el hipocampo (Spencer et al., 1993). Por todo ello, esta área del cerebro tiene especial relevancia en los estudios de la epilepsia.

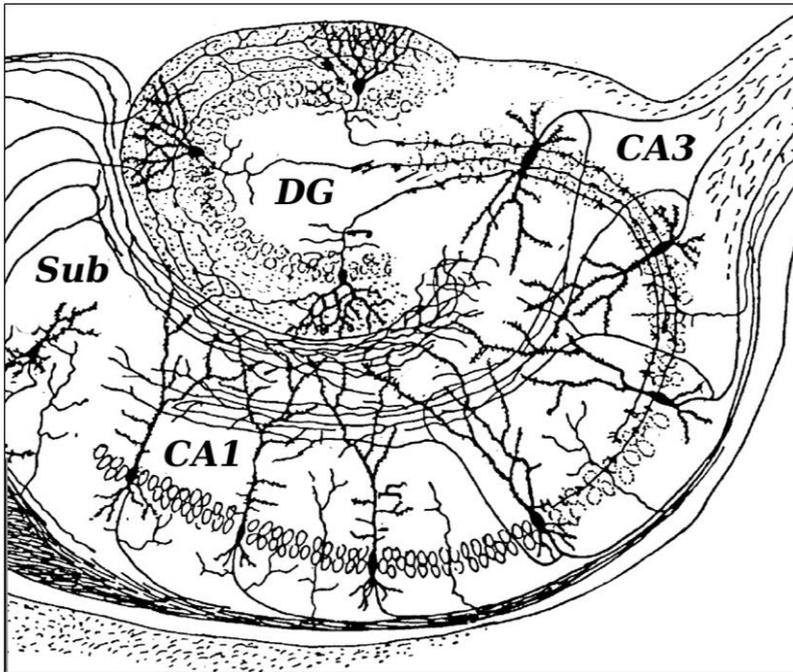


Figura 1. Esquema del hipocampo de roedor con sus subzonas. CA1: *Cornu Ammonis 1*, CA3: *Cornu Ammonis 3*, DG: giro dentado, Sub: subiculum. Autor: Ramón y Cajal, 1911. Fuente: www.wikipedia.org.

La epilepsia es la primera manifestación clínica que se da en los pacientes de la enfermedad de Lafora. Aparece en adolescentes normales que comienzan a padecer convulsiones sensibles a estímulo, especialmente a estímulos visuales, que se presentan como una ceguera transitoria o alucinaciones visuales (Turnbull et al., 2016). Estos síntomas iniciales de epilepsia progresan dando paso a convulsiones generalizadas de diferentes tipos: tónico-clónica, ausencias o mioclonías. En las últimas fases de la enfermedad, las convulsiones son generalizadas, refractarias, ocurren en estado de reposo y se incrementan con la emoción, la acción o la estimulación. Esta epilepsia generalizada se acompaña

además de demencia, psicosis, ataxia cerebelar, disartria, mutismo y, finalmente, fallo respiratorio que lleva a la muerte del paciente aproximadamente una década después de la aparición de los primeros síntomas de la enfermedad (Ahmad et al., 2017; Franceschetti et al., 2006; Minassian, 2001; Striano et al., 2008).

Aunque la epilepsia es el primer signo clínico que aparece, anomalías en el electroencefalograma (EEG) preceden a este signo. Estas alteraciones consisten en un fondo casi normal o enlentecido y una actividad paroxística generalizada o focal, normalmente no acentuada por el sueño. Estas descargas anormales, que aumentan su ritmo desde la parte posterior del cerebro, pueden ser indicativas de la enfermedad (Jennesson et al., 2010).

El hecho de que la epilepsia sea una característica clínica tan importante en la enfermedad de Lafora y que, sin embargo, se hayan llevado a cabo escasas investigaciones sobre los mecanismos moleculares que la desencadenan puede sorprender. Hasta la fecha, además de los resultados que se presentan en esta tesis, existen sólo dos estudios que se centran en las bases moleculares de las convulsiones en la enfermedad de Lafora y ambos sugieren la afectación del sistema GABAérgico, el principal sistema inhibitorio en el sistema nervioso, en el córtex cerebral (Canafoglia et al., 2010; Ortolano et al., 2014). En el trabajo de Ortolano y colaboradores, se propone que existe una disfunción de las neuronas GABAérgicas, responsables de la liberación del principal neurotransmisor inhibitorio, incluso antes de que los cuerpos de Lafora aparezcan en las células. Todo esto apunta a un papel secundario de estos poliglucosanos en el desarrollo de los

signos patológicos de la enfermedad frente a la importancia que cobra la epilepsia y la neurodegeneración.

Por otra parte, durante todos estos años todos los estudios se han centrado en un único tipo celular, la neurona, dejando de lado la implicación en la enfermedad del resto de células que conforman el sistema nervioso y permiten su correcto funcionamiento.

Ya desde la primera descripción de la enfermedad en 1911, se observó la afectación de las células gliales en LD (Lafora and Glueck, 1911). El doctor Lafora describió una hiperplasia de las células gliales; sin embargo, durante casi un siglo no se profundizó en la relevancia que este hallazgo podía tener en la fisiopatología de la enfermedad. No obstante, cada vez surgen más estudios que destacan el papel que juega la glía en diferentes enfermedades neurológicas como AD (Osborn et al., 2016), enfermedad de Huntington (HD) (Crotti and Glass, 2015) o la epilepsia (Coulter and Steinhäuser, 2015), donde se sabe que tiene un papel esencial.

2. Los astrocitos en la epilepsia.

2.1- La neuroglía y sus funciones.

Tradicionalmente se han llamado células de glía o neuroglía a aquellas células presentes en el sistema nervioso que contribuyen al correcto funcionamiento de la función neurológica, pero que no son neuronas. Fueron descritas por primera vez en 1858 por Rudolf Virchow, quien erróneamente las describió como tejido conectivo y les dio el nombre de glía, que en griego bizantino significa pegamento (Kettenmann and Verkhratsky, 2008). Durante más de

un siglo la glía ha sido considerada un mero soporte estructural de las neuronas, haciendo que se extendiese una visión del funcionamiento del sistema nervioso enfocada en la neurona. Esta visión trata de explicar todo lo que ocurre en el cerebro, ya sea en condiciones fisiológicas como patológicas, centrándose en el estado de las neuronas. Sin embargo, cada vez más estudios confirman que la glía desempeña funciones fisiológicas esenciales y, por lo tanto, el buen funcionamiento del cerebro y de todo el sistema nervioso en general dependen completamente de que la glía sea funcional (Parpura et al., 2013; Verkhratsky et al., 2016). En 1999 Araque y colaboradores introdujeron el concepto de sinapsis tripartita, que proponía que el elemento básico para transmitir información en el cerebro no serían una neurona presináptica y una neurona postsináptica, sino que un tercer tipo celular, una célula de la glía, era un requisito indispensable para que la neurona funcionase correctamente (Araque et al., 1999). Según esta hipótesis, el flujo de información no iría sólo de la neurona presináptica a la postsináptica, sino que podría darse entre cualquiera de los elementos que forman la sinapsis.

Dentro de la neuroglía, existen distintos tipos celulares con funciones diferentes. Los principales del sistema nervioso central son: la microglía, células fagocitarias de origen mesenquimal con un importante papel inmunitario; oligodendrocitos, responsables de la formación de la vaina de mielina que envuelve a los axones y permite un impulso eléctrico eficiente; y los astrocitos, las células gliales más numerosas que juegan un papel esencial para el mantenimiento de la homeostasis cerebral.

Algunas de las funciones más importantes que tradicionalmente se han atribuido a los astrocitos son las siguientes: a) sirven de soporte metabólico a las neuronas, b) tienen un papel principal en la recaptación o degradación de neurotransmisores, c) actúan como una glándula endocrina, proveyendo de sustancias que son liberadas a la sangre, d) regulan el procesamiento de la información y la conectividad sináptica en el cerebro y, e) controlan el estado de sueño y vigilia (Parpura et al., 2013). Últimamente, a estas funciones bien conocidas se han ido añadiendo otras. Los astrocitos tienen un papel en la neurogénesis en cerebros adultos (Buffo et al., 2008; Laywell et al., 2000; Seri et al., 2001). Además, son capaces de transmitir información gracias a los gliotransmisores que liberan en el espacio sináptico y a las corrientes de calcio que, difundándose a través de las uniones de tipo *gap* (*gap junction*), que permiten que los astrocitos formen un sincitio, transmiten información entre sinapsis que se encuentren alejadas (Araque et al., 2000; Schipke et al., 2008). Todo esto lleva a plantear que en el sistema nervioso no existe un tipo celular que sea más importante que otro y que la alteración en uno de ellos podría no sólo favorecer el desarrollo de una enfermedad neuronal, sino llegar a desencadenarla.

De hecho, cada vez se encuentran más evidencias de la implicación de los astrocitos en diferentes enfermedades como AD, PD, la enfermedad de Huntington (HD), la esclerosis lateral amiotrófica (ELA), la isquemia cerebral, la hiperamonemia, la esquizofrenia, el trauma cerebral o la epilepsia. En todas estas enfermedades los astrocitos responden activándose en un proceso conocido como reactividad astrocitaria (Parpura et al., 2013).

2.2- La reactividad astrocitaria.

La reactividad astrocitaria se puede definir como una reacción de defensa constitutiva, con múltiples pasos y evolutivamente conservada, en la que se activan los astrocitos frente a situaciones patológicas que afectan al sistema nervioso central. Cuando los astrocitos se activan muestran un patrón de expresión génica diferente y exhiben distintas características morfológicas y funcionales, destacando la sobreexpresión de proteínas estructurales como los filamentos intermedios GFAP (*glial fibrillary acidic protein*, proteína fibrilar ácida de la glía) y vimentina.

La reactividad astrocitaria cumple una función adaptativa, ya que permite restaurar la homeostasis del sistema, limitar el tejido dañado y hacer frente al estrés agudo. Sin embargo, si esta respuesta persiste a lo largo del tiempo, aparece una situación de estrés continuado que acaba teniendo consecuencias deletéreas (Pekny and Pekna, 2014). Por ello, la reactividad astrocitaria se ha convertido en una diana terapéutica a la que atacar en enfermedades en las que esta respuesta se mantiene en el tiempo, como ocurre en las enfermedades neurodegenerativas o en las epilepsias.

Hasta hace unos años, tanto los tratamientos antiepilépticos como la investigación de la epilepsia se centraban únicamente en el funcionamiento anómalo de las neuronas, sin prestar atención a otros tipos celulares como los astrocitos. Cada vez existen más evidencias de que los astrocitos sufren una profunda remodelación patológica en el contexto de la epilepsia (Coulter and Steinhäuser, 2015). Estos cambios van desde alteraciones en los canales iónicos (D'Ambrosio et al., 1999; Kivi et al., 2000), receptores (Maljevic et

al., 2006; Meldrum et al., 1999; Vincent and Mulle, 2009) y transportadores (Proper et al., 2002), hasta cambios en la organización de los dominios astrocíticos (dominios espaciales no solapantes en los que se organizan los astrocitos) (Oberheim et al., 2008). Todas estas alteraciones llevan a un fallo generalizado de la homeostasis dependiente de astrocitos en las áreas afectadas (Bedner et al., 2015; Steinhäuser et al., 2016). Por otra parte, cuando se da una epilepsia, los cambios en los astrocitos van siempre acompañados de una reactividad astrocitaria que difiere de la encontrada en otras enfermedades neurodegenerativas y cuya severidad se correlaciona con la probabilidad de volver a desarrollar un episodio convulsivo (Oberheim et al., 2008).

Entre los cambios bioquímicos descritos en los astrocitos reactivos en la epilepsia destaca la disminución de varios reguladores del ciclo glutamato-glutamina, incluyendo la glutamina sintetasa (Eid et al., 2004; Malthankar-Phatak et al., 2006; van der Hel et al., 2005) y los transportadores de glutamato, que es el principal neurotransmisor excitatorio (Mathern et al., 1999; Proper et al., 2002). Esta disminución podría contribuir significativamente a un aumento de la excitabilidad, debido a defectos en la regulación de la homeostasis del glutamato extracelular y en la provisión de neurotransmisores.

3. La recaptación de glutamato en el sistema nervioso central.

El glutamato es un aminoácido con gran importancia en el metabolismo cerebral que, además, actúa como principal

neurotransmisor excitatorio en el cerebro. Su liberación en el espacio sináptico por parte de neuronas glutamatérgicas, permite su unión a receptores postsinápticos, ya sean ionotrópicos, como los AMPA, los de kainato o los de NMDA, o metabotrópicos, como los mGluR, favoreciendo la despolarización de la neurona postsináptica. De este modo, se genera un nuevo impulso eléctrico en la neurona postsináptica.

La rápida eliminación de este neurotransmisor del espacio sináptico es esencial para poder retornar a un estado basal con rapidez y evitar la sobreactivación de los receptores postsinápticos. Si esto último ocurre, se puede producir un aumento de la excitación (Fonnum, 1984), la aparición de convulsiones (Ben-Ari, 1985; Nadler and Cuthbertson, 1980; Olney et al., 1972) y se puede llegar a provocar la muerte neuronal por un mecanismo conocido como excitotoxicidad (Choi and Hartley, 1993; Meldrum, 1991, 1986, Olney et al., 1986, 1972). Ésta se debe a que la activación continuada de los receptores de glutamato favorece la entrada de altos niveles de Ca^{+2} a la célula, lo que provoca la activación de diversas enzimas dependientes de este ion, como endonucleasas, fosfolipasas y proteasas, que dañan estructuras celulares como las que componen el citoesqueleto, la membrana y el DNA, conduciendo a la muerte neuronal (Bruno et al., n.d.; Choi and Hartley, 1993; Lankiewicz et al., 2000; Olney et al., 1986).

El mecanismo molecular que permite eliminar rápidamente el glutamato del espacio sináptico está basado en la presencia de transportadores de glutamato de alta afinidad localizados en la superficie de las células que participan de dicha sinapsis. Estas proteínas reciben el nombre de EAAT (del inglés *excitatory amino*

acid transporter, en español transportador de aminoácidos excitatorios). Por cada molécula de glutamato que introducen en la célula cotransportan tres iones sodio (Na^+) y un protón (H^+), y antiportan un ion potasio (K^+) (Levy et al., 1998; Zerangue et al., 1996). Por ello, para mantener este transporte en contra de concentración, se necesitan gradientes transmembrana de Na^+ , K^+ y H^+ que se mantienen a través de la bomba Na^+/K^+ ATPasa (**Figura 2b**). Además, se ha descrito que estos transportadores también pueden funcionar como canales de cloro o incluso transportar agua (MacAulay et al., 2004, 2001).

En mamíferos existen cinco miembros en la familia de transportadores de glutamato: EAAT1, llamado GLAST (*glutamate aspartate transporter*) en ratón (Arriza et al., 1994; Stoffel et al., 1992); EAAT2, que recibe el nombre de GLT-1 (*glutamate transporter 1*) en ratón (Arriza et al., 1994; Danbolt et al., 1990); EAAT3, llamado EAAC1 (*excitatory amino acid carrier 1*) en roedores (Arriza et al., 1994; Kanai and Hediger, 1992); EAAT4, expresado predominantemente en neuronas del cerebelo (Fairman et al., 1995) y EAAT5, que se expresa principalmente en la retina (Arriza et al., 1997). EAAT1 y EAAT2 se encuentran principalmente en células de la glía y son los más importantes en la eliminación del glutamato en el espacio sináptico, mientras que EAAT3 y EAAT4 se expresan preferencialmente en neuronas (**Figura 2a**). De todos los transportadores de glutamato que se han descrito, el que presenta una función más importante es EAAT2.

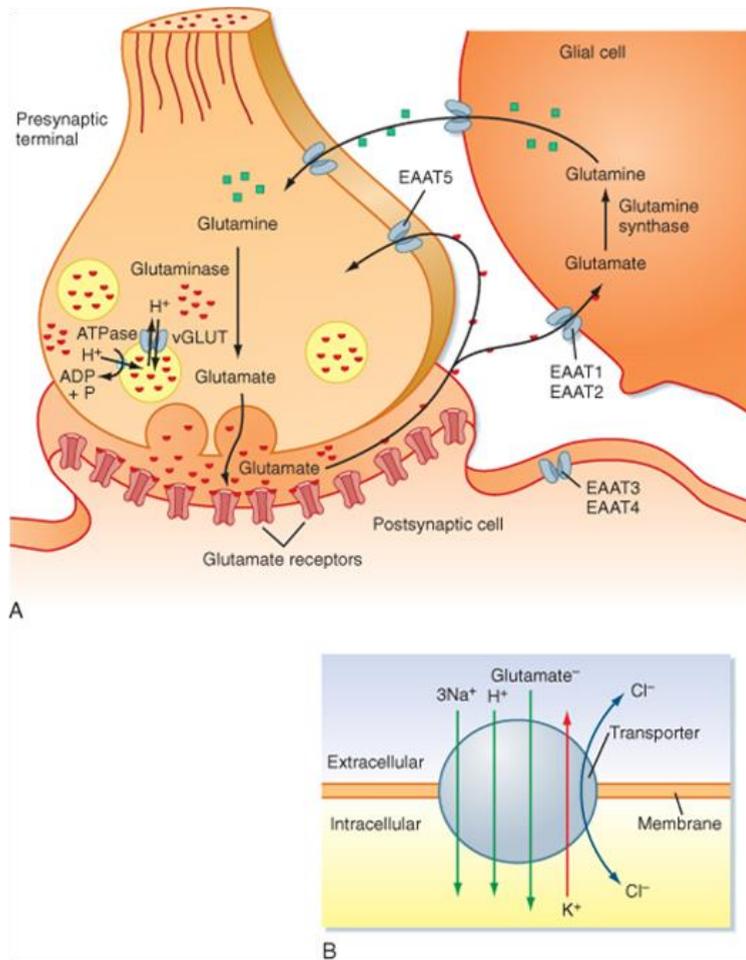


Figura 2. a) Esquema de una sinapsis glutamatérgica en la que se muestra la localización de los diferentes tipos de transportadores de glutamato que se pueden encontrar. EAAT2, el principal transportador de glutamato, se encuentra principalmente en astrocitos. EAAT1 es exclusivamente astrocitario. EAAT3 es un transportador neuronal con expresión somatodendrítica. EAAT4 se localiza en la neurona en áreas del cerebro muy restringidas. EAAT5 se localiza exclusivamente en la retina. **b)** Esquema que muestra el sentido de flujo de los diferentes iones durante el transporte de glutamato a través de la membrana. Fuente: Koeppen & Stanton: Berne & Levy Physiology. 6ª edición, versión *online*.

Una vez que el glutamato ha sido captado por los astrocitos, puede tener diferentes destinos:

1) Volver a liberarse al espacio extracelular como gliotransmisor (Araque et al., 2000).

2) Entrar en el ciclo de Krebs a través de una reacción catalizada por la glutamato deshidrogenasa y usarse como combustible metabólico (Dennis et al., 1977).

3) Convertirse en glutamina por una reacción catalizada por la glutamina sintetasa. Este destino es crítico para la síntesis de glutamato neuronal, a través del ciclo glutamina-glutamato, y para la síntesis de GABA, a través del ciclo glutamina-glutamato-GABA (Martinez-Hernandez et al., 1977).

Por todo ello, si la recaptación de glutamato falla, además de la hiperexcitación y la toxicidad derivada de los altos niveles de glutamato extracelular, se verían comprometidas muchas rutas metabólicas tanto en astrocitos como neuronas, incluyendo aquellas que permiten sintetizar neurotransmisores en las neuronas excitatorias e inhibitorias. Por eso, la recaptación de glutamato es un paso crucial para el buen funcionamiento del cerebro.

3.1- El transportador de glutamato EAAT2.

EAAT2 (GLT-1 en ratones) es el responsable de la recaptación del 90% del glutamato extracelular (Tanaka et al., 1997) y supone un 1% del total de proteína en el cerebro (Lehre and Danbolt, 1998). La delección del gen que codifica EAAT2/GLT-1 en un organismo modelo como el ratón elimina el 95% de la recaptación de glutamato

en el cerebro, lo que lleva a una muerte prematura debida a convulsiones que no pueden ser tratadas (Tanaka et al., 1997).

Esta proteína se encuentra codificada por el gen *SLC1A2*, que está compuesto por 11 exones. Este gen da lugar a múltiples variantes de mRNA que dan lugar a proteínas con ocho dominios transmembrana, que forman trímeros funcionales (Greuer et al., 2014; Kim et al., 2003; Maragakis et al., 2004). EAAT2 presenta además dos sitios de N-glicosilación localizados extracelularmente en el lazo entre los dominios transmembrana 3 y 4 (**Figura 3**).

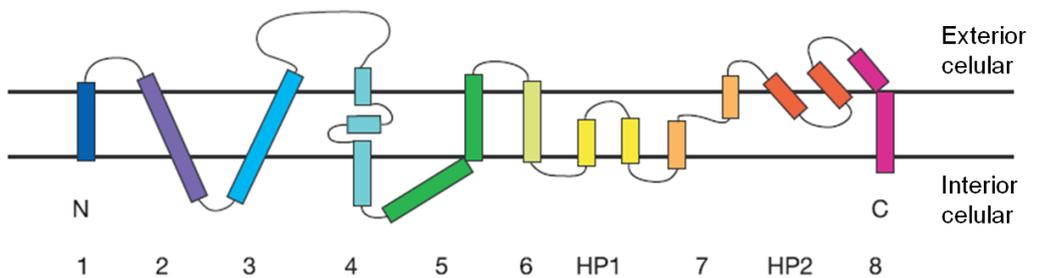


Figura 3. Representación esquemática de la topología transmembrana del receptor de glutamato EAAT2/GLT-1, basada en la estructura de la proteína homóloga en la arquea *Pyrococcus horikoshii*. Esta proteína cuenta con ocho dominios transmembrana y dos horquillas helicoidales (HP1 y HP2). Los dominios transmembrana 1, 2, 4 y 5 forman parte del dominio de trimerización mientras que los dominios 3, 6, 7 y 8 junto con HP1-2 están incluidos en el dominio de transporte del sustrato. El lazo extracelular entre el dominio 3 y 4 puede estar glicosilado. Fuente: adaptado de Yernool et al (Yernool et al., 2004).

Los transcritos de EAAT2 contienen una larga región 3' que no se traduce (3' UTR) y múltiples variantes tanto en el extremo C-terminal como en el N-terminal (**Figura 4**). Existen dos variantes en el N-terminal que dan lugar a la síntesis de EAAT2 con dos comienzos

distintos de la proteína: uno sería MASTEG- y el otro MVSANN-, sin que hasta la fecha se hayan encontrado diferencias funcionales entre ambas variantes (Rozyczka y Engele, 2005). En el extremo C-terminal encontramos tres variantes posibles que se han estudiado con más profundidad: la tipo *a* o EAAT2a, que presenta la secuencia –PWKREK; la tipo *b* o EAAT2b, que tiene la secuencia –DIETCI y la tipo *c* o EAAT2c, cuya secuencia es –EYQSWV (Grewer et al., 2014; Meyer et al., 1998; Münch et al., 1998; Rauen et al., 2004; Utsunomiya-Tate et al., 1997). Tanto EAAT2b como EAAT2c contienen un dominio PDZ (subrayado) que les permite interactuar con la proteína PICK1, mientras que en EAAT2a este dominio está ausente (Bassan et al., 2007; Sogaard et al., 2013). Sin embargo, esta interacción no parece afectar a la capacidad para captar glutamato de las diferentes isoformas (Chen et al., 2002; Sullivan et al., 2004). En un primer momento se asoció una isoforma u otra al tipo celular en el cual tenía lugar su expresión. EAAT2, a pesar de tener un patrón principalmente astrocítico, también se expresa en neuronas, especialmente en hipocampo (Chen et al., 2004; Danbolt et al., 2016; Rimmele and Rosenberg, 2016). Por ello, ciertos trabajos sugirieron que la expresión de la isoforma EAAT2a se daba mayoritariamente en astrocitos mientras que la isoforma EAAT2b era más frecuente en neuronas (Chen et al., 2002; Schmitt et al., 2002). Sin embargo, estudios posteriores demostraron que la isoforma expresada preferencialmente en neuronas es la EAAT2a, mientras que tanto la isoforma EAAT2a como la EAAT2b se expresan en astrocitos, siendo esta última minoritaria. En los últimos años se ha relacionado alteraciones en la expresión de EAAT2b con ciertas patologías (**Tabla 1**). No obstante, la ausencia de anticuerpos comerciales capaces de identificar y distinguir ambas

isoformas hace que estos datos se basen en los niveles de mRNA y no en los de proteína expresada (Chen et al., 2004), haciendo más complicado el análisis.

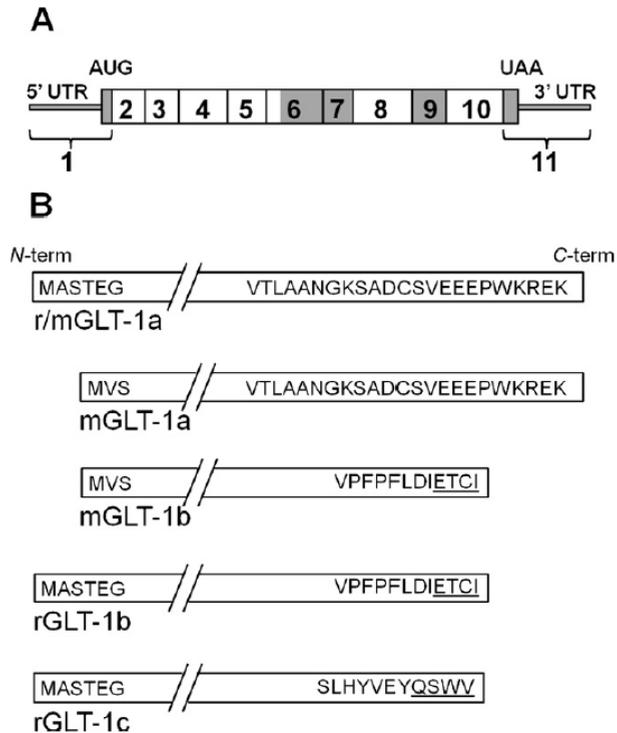


Figura 4. Isoformas de GLT-1 por procesado alternativo. **a)** Diagrama que muestra los exones presentes en el gen *SLC1A2*. Los mostrados en gris son los que están sujetos a procesado alternativo. **b)** Ilustración esquemática de las diferentes isoformas de GLT-1, donde puede variar tanto el N-terminal como el C-terminal. Las secuencias subrayadas en el C-terminal son los dominios PDZ. UTR= región no traducida, AUG= codón de inicio, UAA= codón de parada. El prefijo “m” hace referencia a que se ha encontrado en ratón y el “r” a rata (Lee and Pow, 2010).

Tabla 1. Evidencias de regulación diferencial de EAAT2a/GLT-1a y EAAT2b/GLT-1b en respuesta a enfermedades y manipulaciones experimentales.

Enfermedad/ Manipulación	Especie	Efecto sobre GLT-1a	Efecto sobre GLT-1b	Referencia
ELA	Humano	↓ proteína	↑ proteína en neuronas	Maragakis et al., 2004
Esquizofrenia	Humano	No cambios	↑ mRNA	O'Donovan et al., 2015
Hipoxia neonatal	Cerdo	↓ proteína	↑ proteína en neuronas	Pow et al., 2004
Traumatismo craneoencefálico	Rata	↑ proteína en hipocampo	↓ proteína en córtex, hipocampo y tálamo	Yi et al. 2005
ELAPD*	Ratón	↓ proteína en médula espinal y córtex somatosensorial	↓ proteína en espina dorsal, córtex somatosensorial, estriado, córtex motor y córtex piriforme	Wilson et al. 2003
Estrés por confinamiento	Rata	↑ mRNA y proteína en el giro dentado y CA3	↑ proteína en todo el hipocampo sin cambio en mRNA	Reagan et al. 2004
Adrenalectomía	Rata	↑ mRNA	Sin cambios	Autry et al. 2006
Glucocorticoides	Rata	↑ proteína en hipocampo	↑ proteína sólo en CA3 y giro dentado	Autry et al. 2006

*ELAPD: Complejo parkinsonismo-demencia-esclerosis lateral amiotrófica o síndrome de Guam. Modificado de Lauriat & McInnes 2007.

3.2- Regulación de EAAT2.

La cantidad de EAAT2 que hay presente en la sinapsis determina la capacidad de un astrocito para eliminar eficientemente el glutamato de este espacio y, por tanto, evitar la excitotoxicidad. Dada la importancia de EAAT2 en este proceso, su expresión y actividad está finamente regulada a nivel transcripcional, traduccional y post-traduccional.

Existen diferentes compuestos tanto endógenos como farmacológicos que son capaces de provocar la activación de la transcripción, como PACAP, EGF, estrógenos y sus derivados. También existen compuestos que reprimen la transcripción de EAAT2 como cAMP o TNF- α (Figiel and Engele, 2000; Karki et al., 2014b, 2013; Lee et al., 2012; Sitcheran et al., 2005; Su et al., 2003). Además, el promotor de EAAT2 contiene varias secuencias de unión de factores de transcripción tales como NF- κ B, Sp1, N-myc, CREB, EGR y NFAT (Ghosh et al., 2011; Su et al., 2003). Entre todos los factores de transcripción que pueden contribuir a cambios en la transcripción de EAAT2, destaca NF- κ B. Se sabe que la activación transcripcional de EAAT2 por EGF tiene lugar a través de NF- κ B (Ghosh et al., 2011; Sitcheran et al., 2005; Su et al., 2003; Zelenia et al., 2000). Además, el tamoxifeno (un antagonista del receptor de estrógenos), el raloxifeno (un modulador selectivo del receptor de estrógenos) y el 17- β -estradiol aumentan la expresión de NF- κ B y CREB (Karki et al., 2014b, 2013; Lee et al., 2012). Éstas y otras evidencias invitan a pensar que la ruta de NF- κ B tiene un importante papel en el control de la transcripción de EAAT2 (Takahashi et al., 2015).

La transcripción de EAAT2 también está regulada a nivel epigenético. Inhibidores de la desacetilasa de histonas (HDAC) incrementan la expresión del principal transportador de glutamato (Perisic et al., 2010). Además, Yin-Yang 1 (YY1), un factor de transcripción ubicuo, disminuye la actividad del promotor de EAAT2, reclutando HDACs como co-represores (Karki et al., 2014). Por último, se ha observado que el promotor de EAAT2 presenta en el córtex una hipometilación si se compara con los niveles de metilación observados en el cerebelo, lo que podría explicar por qué en esta última zona la expresión de EAAT2 está disminuida respecto a la encontrada en el córtex (Perisic et al., 2012). Todos estos resultados indican que el estado de acetilación y de metilación del promotor de EAAT2 está involucrado en los niveles de expresión de este gen.

Por otra parte, la traducción es otro proceso que parece estar regulado en la expresión de EAAT2. La corticosterona controla la traducción de EAAT2 en ratones y en astrocitos en cultivo a través de la región 5' no traducida (5' UTR) (Tian et al., 2007). Además, se ha detectado un micro-RNA, miR-124a, que llega a los astrocitos a través de exosomas neuronales y aumenta la traducción de EAAT2 (Morel et al., 2013).

Por último, existe una regulación a nivel post-traducciona que permite modular la actividad del transportador, su localización, su actividad y su degradación.

Una de las modificaciones post-traduccionales mejor descritas es la palmitoilación en la cisteína 38 (ver apartado 4.4.3 de Introducción), que es esencial para que EAAT2 pueda captar el glutamato extracelular y cuya alteración en la enfermedad de Huntington se

ha asociado con una disminución en la capacidad de EAAT2 para mantener la homeostasis del glutamato (Huang et al., 2010). Otra modificación ampliamente descrita es la sumoilación (adición de grupos SUMO, descrita en el apartado 4.4.4 de Introducción) de EAAT2 en el extremo C-terminal, que se relaciona con la localización del transportador en compartimentos intracelulares y que parece estar comprometida en ciertas mutaciones observadas en ELA (Foran et al., 2014). Mención aparte merece la ubiquitinación de EAAT2 que se expondrá en el apartado 5 de la Introducción.

Se sabe también que EAAT2 está sujeto a muchas otras regulaciones que todavía no somos capaces de comprender en profundidad. En 2015, Murphy-Royal y sus colaboradores publicaron un estudio en el que demostraron que EAAT2 presentaba una alta capacidad de difundir lateralmente en la superficie de la membrana plasmática y que la localización que finalmente adquiriría dependía de la actividad sináptica (Murphy-Royal et al., 2015). Esto demuestra que existen mecanismos que subyacen a la regulación de EAAT2 directamente relacionados con su función que aún deben ser investigados con profundidad.

Uno de ellos es toda la maquinaria molecular que regula la endocitosis de EAAT2, que se ha demostrado que está afectada en enfermedades neurodegenerativas como ELA (Vanoni et al., 2004), pero que aún están lejos de comprenderse. En este trabajo aportaremos nuevos conocimientos sobre las modificaciones post-traduccionales que regulan la endocitosis de EAAT2.

4. La endocitosis, tráfico celular y su regulación.

Se entiende por endocitosis la internalización de macromoléculas y componentes de la membrana celular mediante la invaginación de la misma y la formación de vesículas endocíticas. Se trata de un proceso altamente regulado que permite variar la composición proteica y lipídica de las membranas celulares, incluyendo receptores y transportadores. La mayoría de transportadores, como EAAT2, se encuentran regulados por endocitosis, ya que este proceso permite controlar la cantidad de transportador localizado en la superficie celular y, por lo tanto, su actividad.

Además, la degradación proteica y el control de calidad de las proteínas de membrana también se ven regulados por este proceso, ya que la endocitosis es un requisito previo para poder degradar una proteína de membrana. Por ello, existen mecanismos que permiten etiquetar una única proteína de membrana para su internalización.

La endocitosis puede tener lugar por diversos mecanismos, que pueden dividirse en dos grandes grupos: los dependientes de clatrina y los independientes de clatrina.

4.1- Endocitosis dependiente de clatrina.

Es el mecanismo de internalización mejor conocido hasta la fecha. Este tipo de endocitosis es especialmente relevante en las sinapsis, ya que está implicado en el reciclaje de las vesículas sinápticas tras la liberación de los neurotransmisores y en la regulación de numerosos tipos de receptores postsinápticos, transportadores gliales y transportadores neuronales (Jung and Haucke, 2007).

En este mecanismo, los dominios citoplasmáticos de las proteínas de la membrana plasmática son específicamente reconocidos por

proteínas adaptadoras y empaquetados en vesículas recubiertas de la proteína clatrina que posteriormente pasan al interior celular. El proceso se inicia con la interacción entre los dominios de la proteína diana y las proteínas adaptadoras, pudiendo este reconocimiento estar mediado por modificaciones postraduccionales. A continuación, las proteínas adaptadoras reclutan a la clatrina que polimeriza en forma poliédrica, recubriendo la incipiente invaginación. Por último, la GTPasa dinamina crea un anillo alrededor de la base de la invaginación e induce su escisión, formando una vesícula endocítica.

Estudios previos han descrito que la endocitosis de EAAT2 y GLT-1 se puede dar por un mecanismo dependiente de clatrina, estando mediada por la activación de la proteína quinasa C (PKC) (García-Tardón et al., 2012; Martínez-Villarreal et al., 2012).

4.2- Endocitosis independiente de clatrina.

La endocitosis independiente de clatrina está mucho menos estudiada. Todas las endocitosis independientes de clatrina requieren de colesterol libre, proteínas y lípidos que residen en balsas lipídicas ricas en esfingolípidos. Estas balsas lipídicas (en inglés, *lipid rafts*) son microdominios de la membrana celular que mantienen proteínas ancladas a la membrana por medio de glicosilfosfatidilinositol. Son estructuras extremadamente dinámicas y juegan un papel importante en la compartimentalización de diversos procesos celulares, siendo clave no sólo en la endocitosis, sino también en la transducción de señales. Entre las diferentes vías de endocitosis independiente de clatrina que existen, la mejor caracterizada es la vía dependiente de caveolina (Grant y Donaldson, 2009; Mayor y Pagano, 2007).

Las caveolas son invaginaciones en la membrana plasmática de aproximadamente 50-80 nm, marcadas por la presencia de una proteína de la familia de las caveolinas. El análisis bioquímico y proteómico de las fracciones de membrana de las caveolas muestran un enriquecimiento en esfingolípidos y colesterol, proteínas de señalización y agrupaciones de proteínas ancladas a glicosilfosfatidilinositol. La fisión vesicular en la endocitosis dependiente de caveolinas depende directamente de la GTPasa dinamina, al igual que ocurría en la endocitosis dependiente de clatrina. Las caveolas funcionan como microdominios de membrana que participan en una gran variedad de procesos celulares además de la endocitosis, tales como la transducción de señales, el transporte de colesterol y la transcitosis.

Además de la endocitosis dependiente de caveolina también existen otros tipos de endocitosis, como la dependiente de Cdc42, la dependiente de ARF6 o la dependiente de RhoA (Mayor and Pagano, 2007).

La endocitosis dependiente de caveolina es el mecanismo de endocitosis descrito para el transportador de glutamato EAAT3 (Gonzalez et al., 2007). La regulación de EAAT2 también se ha asociado a esta vía de endocitosis, ya que el transportador presenta niveles de expresión alterados cuando la expresión de caveolina se altera (Abousaab et al., 2016; Zschocke et al., 2005). Además, se ha demostrado una regulación recíproca entre la caveolina y GLT-1 (EAAT2 en humanos), por lo que es posible que este transportador, además de ser endocitado por vías dependientes de clatrina pueda también pasar al interior celular por endocitosis independiente de ésta (Zschocke et al., 2005).

4.3- Destinos celulares del cargo tras la endocitosis.

Independientemente de la vía de endocitosis por la cual el cargo es endocitado, éste es normalmente enviado a un endosoma temprano. Desde allí, el cargo puede ser conducido por diferentes itinerarios:

- El cargo puede pasar desde un endosoma temprano a endosomas tardíos y lisosomas para su degradación.
- Puede pasar a la red *trans* del aparato de Golgi.
- El endosoma puede reciclarse para volver a llevar el cargo a la membrana plasmática. Se piensa que ésta podría ser la ruta por defecto y que serían necesarias otras señales para que el destino del cargo fuera cualquiera de los anteriores. Hay que tener en cuenta que la internalización de parte de la membrana debe verse compensada por rutas de reciclaje endosómico que retornen gran parte de las proteínas y lípidos endocitados a la membrana plasmática. El equilibrio entre la endocitosis y el reciclaje controla la composición de la membrana plasmática y las proteínas que en ella se encuentran presentes. Este equilibrio determina procesos celulares como la captación de nutrientes, la adhesión celular, la migración celular, la citoquinesis, la polaridad celular, la transducción de señales y, por supuesto, el transporte a través de la membrana (Grant y Donaldson, 2009).

4.4- Modificaciones post-traduccionales que regulan la endocitosis.

Una de las características de la endocitosis es que es un proceso altamente regulado, en el cual se seleccionan las proteínas que

deben pasar al interior celular y su destino. Para que las proteínas sustrato de la endocitosis puedan ser reconocidas por la maquinaria celular responsable de ello, deben sufrir modificaciones post-traduccionales que se reconocen como un código que marca a la proteína para ser endocitada. Existen diversas modificaciones post-traduccionales que permiten reconocer una proteína como sustrato de la endocitosis (Zhang y Kim, 2017).

4.4.1- Fosforilación.

La fosforilación es la adición enzimática de un grupo fosfato a un aminoácido que presenta un grupo hidroxilo libre, ya sea treonina, serina o tirosina. Esta adición de un grupo fosfato suele suponer un cambio conformacional en la proteína. La fosforilación fue la primera modificación post-traduccional descrita y se conoce su implicación en casi todos los procesos celulares: activación de enzimas, localización subcelular, control del ciclo celular o la transducción de señales. Además, se trata de una modificación reversible enzimáticamente por acción de las fosfatasas, enzimas capaces de eliminar grupos fosfato (Zhang y Kim, 2017).

4.4.2- Glicosilación.

La N-glicosilación es una modificación post-traduccional altamente conservada que consiste en la adición de un oligosacárido, conocido como glicano, a un grupo amino del residuo de la asparagina de una proteína. La glicosilación contribuye a la asociación de las proteínas en microdominios de la membrana plasmática, determinando así su endocitosis. Un estudio reciente demostró que la glicosilación en la cola N-terminal de los receptores de dopamina D₂ y D₃ determina la

ruta endocítica que seguirán los receptores a través de las interacciones con microdominios específicos (Min et al., 2015).

4.4.3- Palmitoilación.

La palmitoilación consiste en la adición de un grupo palmitoilo (una cadena de 16 carbonos) a la cisteína de una proteína diana a través de una palmitoil-transferasa. Se trata de una modificación post-traducciona reversible que suele tener lugar en residuos de cisteínas de proteínas de membrana o, con menos frecuencia, en serinas y treoninas. La palmitoilación tiene efectos en la localización de varios receptores en la membrana plasmática. Por ejemplo, es requerida para la localización adecuada de receptores como el D₃ de la dopamina, el receptor de cannabinoides CB1 o el PAR2 (Adams et al., 2011; Oddi et al., 2012; Zhang et al., 2016).

La palmitoilación tiene relevancia en la endocitosis de ciertos receptores. Esta modificación post-traducciona es necesaria para la endocitosis del receptor de la hormona tirotrópica (Groarke et al., 2001), el receptor de somatostatina 5 (Hukovic et al., 1996) o el receptor PAR2 (Adams et al., 2011), entre muchos otros. También puede ser una modificación inhibidora de la endocitosis como ocurre con el receptor de la coriogonadotropina humana (Kawate and Menon, 1994).

4.4.4- Sumoilación.

La sumoilación es un proceso de modificación post-traducciona en el cual, tras una reacción enzimática en tres pasos, se produce una unión covalente de la proteína SUMO (del inglés ***Small-Ubiquitin-like Modifier***) a un residuo de lisina de la proteína diana. Se trata de una

modificación reversible por enzimas conocidas como deSUMOilasas. Esta modificación es análoga a la ubiquitinación, modificación de la que se hablará a continuación. Además de presentar similitudes en el mecanismo de reacción y las enzimas implicadas, ambas modificaciones guardan una relación funcional. Ambas modificaciones tienen lugar sobre residuos de lisinas, pudiendo competir entre ellas o favorecer el que tras la incorporación de una modificación, se produzca la otra.

La sumoilación está implicada en numerosos procesos celulares tales como el transporte nuclear, la regulación transcripcional, la apoptosis, la estabilidad proteica, la respuesta al estrés o la endocitosis, siendo esencial para una correcta función sináptica (Schorova y Martin, 2016). Por ejemplo, la sumoilación de la subunidad GluR6 del receptor de kainato en respuesta a NMDA induce la endocitosis de estos receptores (Martin et al., 2007).

4.4.5- Ubiquitinación.

Aunque todas las modificaciones post-traduccionales anteriormente descritas contribuyen a la regulación de la endocitosis de EAAT2/GLT-1, es la ubiquitinación la modificación que tiene un papel más preponderante en este proceso.

La ubiquitinación es el proceso por el cual un modificador de naturaleza proteica de 76 aminoácidos llamado ubiquitina se une covalentemente a través de un enlace isopeptídico a un residuo de lisina de la proteína diana. La ubiquitina recibe este nombre por tratarse de un modificador presente ubicuamente en todos los organismos eucariotas. Este péptido fue descrito por primera vez por Goldstein en 1975 (Schlesinger et al., 1975; Schlesinger y

Goldstein, 1975), aunque fue en las décadas posteriores cuando se profundizó sobre el papel que podía tener en la biología de la célula. En 1981, Ciechanover y colaboradores establecieron que la ubiquitina servía para etiquetar proteínas que debían ser degradadas por un proceso dependiente de ATP, que hoy en día sabemos que está mediado por el proteasoma (Ciechanover et al., 1981). Por ello, la ubiquitina se ha relacionado desde entonces con la degradación proteica aunque hoy sabemos que las ubiquitinas son moléculas señalizadoras que participan en prácticamente todos los procesos que existen en la célula.

El mecanismo de ubiquitinación tiene lugar en tres pasos catalizados por tres enzimas diferentes que actúan de forma coordinada (**Figura 5**):

- 1) Activación. La cascada comienza con la activación de la ubiquitina en una reacción de dos pasos catalizada por la enzima activadora de ubiquitina E1 o E1-activasa dependiente de ATP.
- 2) Conjugación. La enzima conjugadora de ubiquitina o E2-conjugasa transfiere la ubiquitina desde la E1-activasa hasta el centro activo de la E2.
- 3) Ligación. El paso final en el proceso de ubiquitinación es la unión entre la ubiquitina y el sustrato. En este proceso, la E3-ubiquitín ligasa determina la especificidad de la reacción. Existen dos grupos principales de E3-ubiquitín ligasas en función de su estructura y mecanismo de acción: la familia HECT (*Homologous to the E6AP Carboxyl Terminus*) y la familia RING (*Really Interesting New Gene*). Las proteínas de la familia HECT presentan

una cisteína catalítica en la que la E2 descarga la ubiquitina antes de que ésta sea transferida al sustrato (Rotin y Kumar, 2009). La familia RING, por el contrario, al carecer de una cisteína catalítica, media la transferencia directa de la ubiquitina desde la E2 al sustrato (Deshaies y Joazeiro, 2009). La mayoría de E3-ubiquitín ligasas pertenecen a la familia RING.

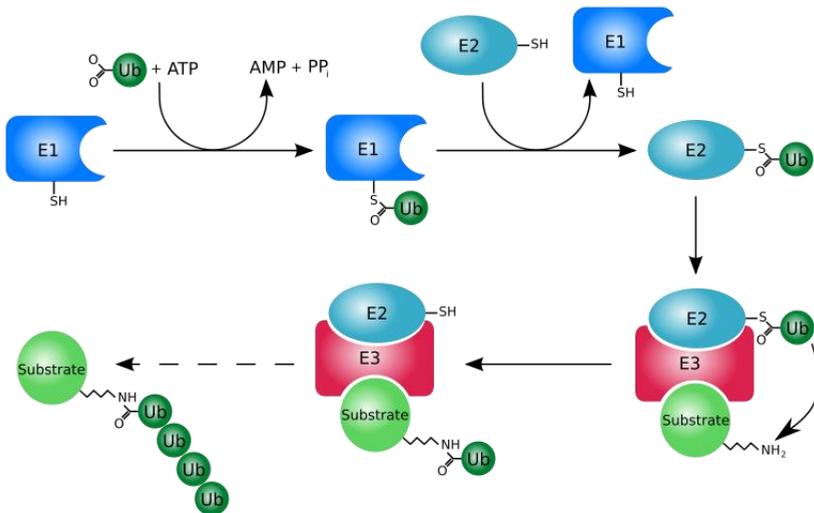


Figura 5. Cascada de reacciones de la ubiquitinación. E1: E1-activasa, E2: E2-conjugasa, E3: E3-ubiquitín ligasa, Ub: ubiquitina, ATP: adenosín trifosfato, AMP: adenosín monofosfato, PPi: fosfato inorgánico. La línea discontinua indica que la elongación de la cadena puede tener lugar. Fuente: www.wikipedia.org, imagen de Roger B. Dodd.

La ubiquitinación constituye un auténtico código de etiquetado de proteínas para distintos destinos celulares. Una proteína puede sufrir la adición de una ubiquitina en una sola lisina (monoubiquitinación) o la adición de una ubiquitina en varios residuos de lisina (multi-monoubiquitinación). Además, la ubiquitina

posee siete residuos de lisina que pueden ser a su vez ubiquitinados, formando cadenas de ubiquitina (poliubiquitinación) que se detecta como un bandeo continuo o *smearing* cuando las proteínas ubiquitinadas se analizan por *western blot*. Estas cadenas de ubiquitina pueden formarse con diferente topología. Todo esto supone un auténtico código de etiquetado que hace que una misma proteína pueda presentar una ubiquitinación diferente según su destino celular (Hicke y Dunn, 2003; Rotin y Staub, 2011). Una de las consecuencias de la ubiquitinación en un receptor de membrana es la de mediar en su endocitosis. La ubiquitinación es una modificación que ha demostrado ser especialmente relevante en las sinapsis ya que controlan la estabilidad, actividad y localización de receptores y transportadores (Lin y Man, 2013).

5. La endocitosis de EAAT2 y su regulación.

Como ya se ha descrito, EAAT2 es un transportador de glutamato altamente regulado a diferentes niveles (Takahashi et al., 2015). Al igual que ocurre con otros transportadores, se ha postulado que EAAT2 permanece en vesículas intracelulares cerca de la membrana plasmática de manera que, en caso de necesitarse súbitamente más transportador, éste pueda situarse con celeridad en la superficie celular para llevar a cabo su función (Underhill et al., 2015).

Aunque la regulación de la endocitosis de EAAT2 es muy compleja y se encuentra regulada por diferentes modificaciones post-traduccionales como la fosforilación por parte de la quinasa PKC (García-Tardón et al., 2012), la sumoilación (Foran et al., 2014)

o la palmitoilación (Huang et al., 2010), es la ubiquitinación por parte de la E3-ubiquitín ligasa Nedd4-2 la que se postula que tiene un papel más relevante.

5.1- La E3-ubiquitín ligasa Nedd4-2.

Nedd4-2 o Nedd4L (del inglés *Neural precursor cell-Expressed Developmentally Downregulated gene 4 Like* o *-2*) es una E3-ubiquitín ligasa de tipo HECT. Nedd4-2 pertenece a una familia de nueve miembros que se denomina Nedd4 (Ingham et al., 2004). *Nedd4* o *Nedd4-1*, el miembro prototípico de la familia a la que da nombre, se identificó inicialmente como una proteína implicada en el desarrollo del sistema nervioso central del ratón (Kumar et al., 1992). La proteína Nedd4 contiene un dominio C2 de unión a lípidos y/o proteínas dependiente de calcio en el extremo N-terminal, 3 o 4 dominios WW de interacción proteína-proteína y un dominio HECT en el extremo C-terminal (**Figura 6**). Estos dominios aparecen en todos los miembros de la familia Nedd4, cambiando sólo el número de dominios WW. Nedd4 y Nedd4-2 son capaces de unirse a motivos PPxY (PY o LPSY) de los sustratos a través de sus dominios WW (Kanelis et al., 2001; Kasanov et al., 2001; Staub et al., 1996).

Todas las enzimas que forman parte de la familia Nedd4 están implicadas en la ubiquitinación de proteínas de membrana con el fin de etiquetarlas y mediar su tráfico intracelular (Goel et al., 2015). De hecho, el primer sustrato que se identificó para Nedd4 fue el canal epitelial de sodio ENaC (del inglés *Epithelial Sodium Channel*), cuya endocitosis y degradación está mediada por Nedd4 (Staub et al., 1996) y, como se descubrió posteriormente, también por Nedd4-2 (Harvey et al., 2001; Snyder et al., 2003). Así, se demostró que

Nedd4 y Nedd4-2 pueden compartir sustratos (Yang y Kumar, 2010).

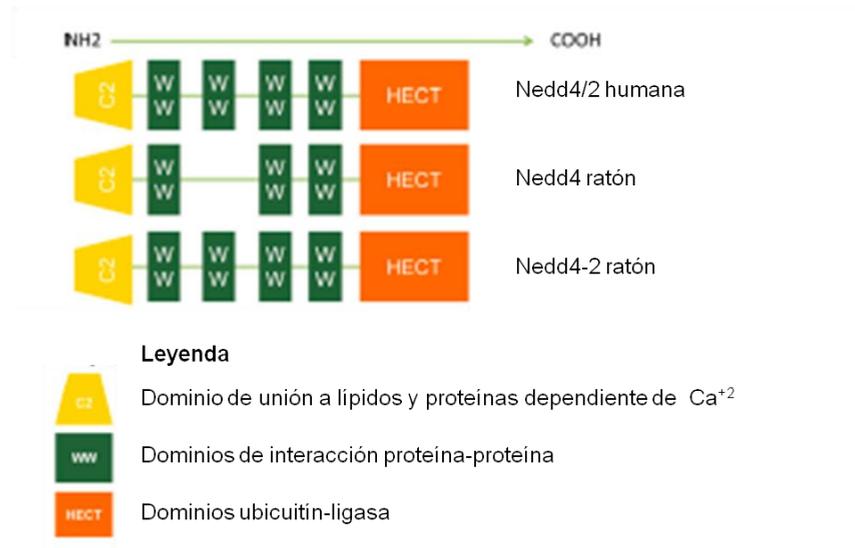


Figura 6. Representación esquemática de los dominios presentes en las proteínas Nedd4 y Nedd4-2. En el extremo N-terminal, ambas proteínas presentan un dominio de unión a lípidos y proteínas dependiente de Ca^{+2} , los dominios WW son dominios de interacción proteína-proteína y el dominio HECT es el dominio E3-ubiquitín ligasa. Los dominios WW y HECT se encuentran conservados evolutivamente. Adaptado de Donovan y Poronnik, 2013.

5.2- El papel de Nedd4-2 en la endocitosis de EAAT2.

Aunque desde 2008 se conocía la implicación de la ubiquitinación en la endocitosis del transportador EAAT2/GLT-1 (Sheldon et al., 2008), es en 2012 cuando García-Tardón y colaboradores identificaron que la proteína responsable de dicha ubiquitinación era Nedd4-2 y que dicha modificación tenía lugar en la cola C-terminal de EAAT2/GLT-1 (García-Tardón et al., 2012). Esta ubiquitinación es una señal de endocitosis y degradación, por lo que la sobreexpresión de Nedd4-2 tiene como consecuencia una

disminución en los niveles de EAAT2/GLT-1 que hay en la superficie celular y, por lo tanto, una disminución en la capacidad para captar glutamato extracelular.

Sin embargo, EAAT2 no tiene motivos PY de reconocimiento, por lo que aparentemente no podría ser un sustrato de Nedd4-2. No obstante, se ha descrito que existen moléculas adaptadoras que sirven de enlace entre Nedd4-2 y diferentes sustratos, entre las que destacan las arrestinas (Becuwe et al., 2012).

5.3- Las arrestinas en la endocitosis de EAAT2.

La importancia de las arrestinas como adaptadores en la ubiquitinación de proteínas de membrana por parte de E3-ubiquitín ligasas de la familia Nedd4 ha sido puesta en evidencia en diversas ocasiones. En mamíferos, la familia de las arrestinas está formada por las arrestinas visuales (arrestina-S y arrestina-4), las α -arrestinas (TXNIP y ARRDCs1-5) y las β -arrestinas (β -arrestina 1 y β -arrestina 2) (Becuwe et al., 2012).

En un reciente trabajo de Ibáñez y colaboradores se describió que la β -arrestina 1 sirve de enlace entre Nedd4-2 y GLT-1 para su endocitosis. Además, se propone también la participación de la α -arrestina 1 como intermediario entre Nedd4-2 y GLT-1. De este modo, el mecanismo de ubiquitinación de EAAT2/GLT-1 que se conoce hasta la fecha estaría llevado a cabo por Nedd4-2, que ubiquitinaría a EAAT2/GLT-1 sirviéndose de la β -arrestina 1 y probablemente de la α -arrestina 1 como adaptadores. EAAT2/GLT-1 resultaría así etiquetada para ser endocitada y degradada en el lisosoma (**Figura 7**) (Ibáñez et al., 2016).

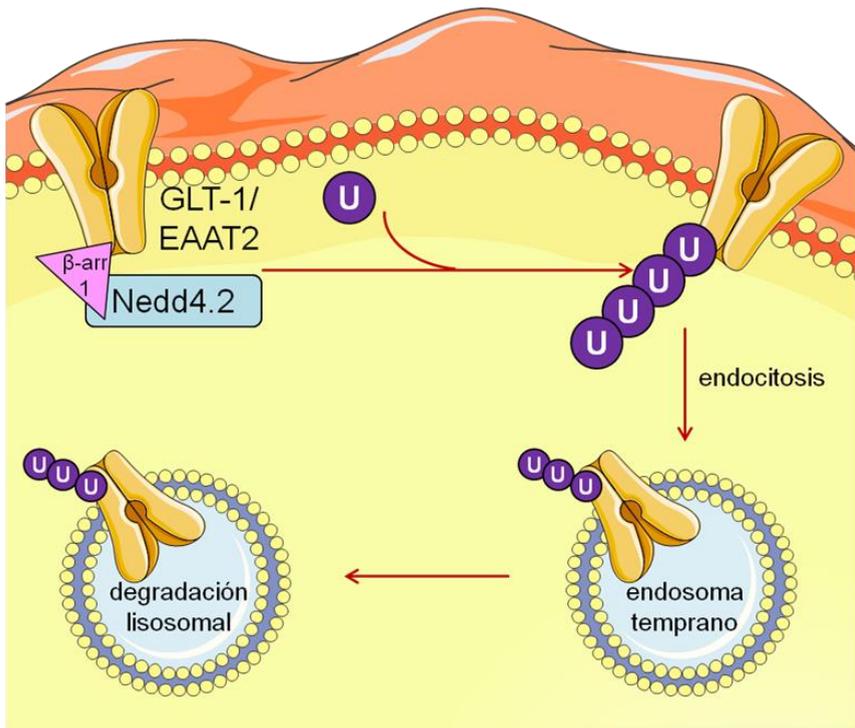


Figura 7. Esquema del proceso de ubiquitinación de EAAT2/GLT-1. Nedd4-2 entra en contacto con EAAT2/GLT-1 usando como adaptador a la β -arrestina 1 (no se incluye a la α -arrestina 1 en el esquema ya que todavía no se ha confirmado su participación en el proceso (Ibañez et al., 2016)). Nedd4-2 procede a la poliubiquitinación de EAAT2/GLT-1 en el extremo C-terminal de la proteína, lo que etiqueta a la proteína para ser endocitada, tras lo que pasará a ser degradada por el lisosoma. U: ubiquitina, β -arr 1: β -arrestina 1. Imagen propia a partir de modelos disponibles en Servier Medical Art.

Por todo ello, en este trabajo de tesis se ha querido conocer la implicación que puede tener EAAT2/GLT-1 en el desarrollo de la epilepsia en la enfermedad de Lafora y el papel que el complejo laforina-malina puede tener en la regulación de la endocitosis de este transportador de glutamato astrocitario.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

El objetivo principal de esta tesis doctoral ha sido determinar las bases moleculares de la epilepsia en la enfermedad de Lafora. Para ello, nos planteamos los siguientes subobjetivos:

1. Analizar la homeostasis del transportador de glutamato GLT-1 en astrocitos primarios de ratones *Epm2a*^{-/-} y *Epm2b*^{-/-}, modelos de la enfermedad de Lafora.
2. Estudiar la implicación del complejo laforina-malina en la regulación del transportador GLT-1/EAAT2.
3. Investigar el estado del transportador de glutamato GLT-1 en el hipocampo de ratones *Epm2b*^{-/-}.

MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Material biológico y condiciones de crecimiento.

1.1- Animales.

Este estudio fue llevado a cabo siguiendo estrictamente las recomendaciones recogidas en la Guía del Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC, España). Todos los procedimientos con animales fueron aprobados por el comité ético del Instituto de Biomedicina de Valencia-CSIC [número de permiso: INTRA12 (IBV-4)] y autorizados por la Dirección General de Agricultura, Ganadería y Pesca de la Generalitat Valenciana. En todo momento se intentó minimizar el sufrimiento animal.

En este trabajo se han utilizado ratones machos deficientes en laforina (*Epm2a*^{-/-}) y ratones deficientes en malina (*Epm2b*^{-/-}), además de ratones control con fondo C57BL/6JRccHsd adquiridos en la compañía Harlan Labs (Barcelona, España). Con el fin de minimizar el efecto de las diferencias debidas a fondo genético, los ratones *Epm2b*^{-/-} que se habían utilizado previamente en otros trabajos del laboratorio (Aguado et al., 2010; Criado et al., 2012) se retrocruzaron con ratones C57BL/6JRccHsd diez generaciones para obtener ratones *Epm2b*^{-/-} en fondo puro. Los ratones *Epm2a*^{-/-}, fueron cedidos por el doctor Matthew Gentry (University of Kentucky, Estados Unidos). Los ratones se mantuvieron en el

estabulario del IBV-CSIC con ciclos de luz y oscuridad 12 horas/12 horas con una temperatura constante de 23°C y con agua y comida *ad libitum*.

Se utilizaron ratones de diferentes edades (día 0, 16 días, 3 meses, 9 meses y 12 meses) según se indica en cada experimento.

1.2- Cultivos celulares de mamíferos.

Todo el trabajo de cultivos celulares ha sido realizado en una campana de bioseguridad de nivel II-A. El material estéril de plástico utilizado para sembrar las células ha sido adquirido de la casa comercial Sarstedt.

El crecimiento de los cultivos celulares se ha llevado a cabo en atmósfera húmeda, a 37°C y con una concentración de CO₂ del 5%. El mantenimiento de las líneas celulares se realizó despegando las células confluentes de las placas de cultivo por tripsinización (Tripsina-EDTA: 200 mg/L Versene (EDTA), 500 mg/L Tripsina 1:250, Lonza), centrifugación y resiembra de las células en medio fresco.

1.2.1- Líneas celulares.

Durante el desarrollo de este trabajo se han utilizado dos líneas estables:

- SH-SY5Y: Células derivadas de la línea SK-N-SH, que provenían de un neuroblastoma de una niña de cuatro años (Biedler et al., 1978). Las células fueron cedidas por el doctor Domingo Baretino (Instituto de Biomedicina de Valencia-CSIC). Estas células se crecieron en el medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM): *Nutrient Mixture*

F-12 (Ham's) con 25 mM de glucosa (Lonza), complementado con un 15% de suero fetal bovino (FBS, Thermo Fisher Scientific) inactivado por calor, 2 mM L-glutamina, 100 U/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomina.

- Hek293. Células embrionarias de riñón humano. Estas células fueron adquiridas en la *Health Protection Agency Culture Collection* (Salisbury, UK). Las células se crecieron en medio DMEM con 25 mM de glucosa (Lonza) suplementado con un 10% de FBS (Thermo Fisher Scientific) inactivado por calor, 2 mM L-glutamina, 100 U/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomina.

Las células fueron sembradas con una densidad de 1×10^6 células para placas p60 (60 mm de diámetro) o de 3×10^6 células para placas p100 (100 mm de diámetro).

Las células SH-SY5Y se transfectaron con Xtreme GENE HP (Roche) según las indicaciones del fabricante, utilizando una relación de µg de DNA: µL de reactivo de transfección de 1:3. Las células Hek293 también se transfectaron con Xtreme GENE HP (Roche) pero en esta ocasión utilizando una relación de DNA: µL de reactivo de transfección de 1:2. Las células transfectadas se dejaron creciendo durante 24 horas antes de realizar los ensayos.

1.2.2- Líneas celulares estables para la sobreexpresión de laforina o malina en SH-SY5Y.

Durante esta tesis doctoral se establecieron líneas celulares SH-SY5Y que sobreexpresaban establemente la proteína laforina

etiquetada con HA (hemaglutinina) o la proteína malina etiquetada con el mismo epítipo. Para ello se transfectaron células SH-SY5Y sembradas en placas p100 con plásmido pCDNA-HA-laforina humana o pCDNA-HA-malina humana utilizando Xtreme GENE HP (Roche) como se ha descrito en el apartado anterior. También se generaron líneas estables para el plásmido pCDNA-HA-vacío como control.

A continuación se determinó la dosis de G418 (Sigma) mínima para matar el 100% de las células SH-SY5Y, que fue de 250 µg/mL. Este producto es letal para células eucariotas pero el plásmido de interés contenía un gen de resistencia al producto. Durante dos meses las células que habían incorporado el plásmido al genoma se seleccionaron con G418 a 250 µg/mL. Cuando aparecieron clones de un diámetro aproximado de 0.5 cm, se tripsinizaron y se transfirieron a una placa de 24 pocillos utilizando discos de clonación (Sigma). Posteriormente se procedió a la expansión de los diferentes clones en placas de un diámetro cada vez mayor hasta llegar a placas p60, donde se comprobó la expresión de la proteína de interés, laforina o malina, mediante *western blot*. En los experimentos realizados con estas células, se utilizaron al menos dos clones independientes de cada genotipo.

1.2.3- Cultivo primario de astrocitos.

Los cultivos primarios de astrocitos de ratones control, *Epm2a*^{-/-} y *Epm2b*^{-/-} se obtuvieron a partir de córtex cerebral de ratones recién nacidos (p0) según se ha descrito en la literatura (Miñana et al., 1998). En este protocolo se aísla el córtex de las crías de ratón y se coloca en medio DMEM y tras la disgregación el tejido por aspiración con pipetas de vidrio con la boca estrechada, se agita en

vórtex durante un minuto a máxima velocidad, favoreciendo así la eliminación de las neuronas. La suspensión resultante se filtra a través de una malla de nylon con poro de 90 μm previamente esterilizada con etanol al 70%. Esta filtración permite eliminar restos de capilares sanguíneos y agregados celulares. Por último se resuspenden las células en DMEM con 25 mM de glucosa suplementado con un 20% de suero inactivado, 1% de anfotericina B, 1% de penicilina, 1% de estreptomicina, 1% de glutamina y 1% (v/v) más de glucosa 1 M y se siembran 2,5 placas p60 por cada cría de ratón. Las placas se incuban en una atmósfera húmeda a 37°C con un 5% de CO₂. A los cuatro días se les cambia el medio. Siete días después se sustituye este medio por DMEM suplementado con 10% de suero inactivado, 1% de anfotericina B, 1% de penicilina, 1% de estreptomicina, 1% de glutamina y dibutilil cAMP 0,27 mM (Sigma). Este medio se sigue cambiando cada 3-4 días hasta que se cumplen tres semanas de la obtención de los astrocitos, momento en el cual se realizaron los ensayos. La pureza del cultivo de astrocitos se confirmó por inmunofluorescencia utilizando anticuerpos anti-GFAP (marcador de astrocitos; Sigma-Aldrich), anti-Neurotrofina 3 (marcador neuronal; Chemicon International) y anti-iba-1 (marcador de microglía; Wako).

En los experimentos que se indica, los astrocitos se transfectaron con los plásmidos descritos mediante Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante. Pasadas 48 horas desde la transfección, se llevó a cabo el ensayo correspondiente.

1.2.4- Tratamientos.

- *Dynasore* (Sigma): Inhibidor de dinamina, una proteína que controla la endocitosis dependiente de clatrina y de caveolina. Este producto se utilizó en astrocitos corticales primarios en suspensión a 100 μ M durante tiempos de 1, 5, 15, 30 y 60 minutos a 37°C, según se indique en el ensayo. A continuación, las células se centrifugaron en frío y se llevó a cabo el marcaje de proteínas de superficie para citometría de flujo tal y como se describe en el apartado 5.1 de Material y Métodos. Como control se añadió DMSO que es el disolvente donde se encuentra disuelto el *dynasore*.
- MG132/NH₄Cl/leupeptina: Inhibidores de la degradación proteica. MG132 es un inhibidor del proteasoma a concentraciones bajas, NH₄Cl inhibe la degradación lisosómica alcalinizando el lumen del lisosoma y la leupeptina inhibe las proteínas lisosomales. Cuatro horas antes de recoger las células, se cambió el medio a las células Hek293 y se añadió MG132 a 10 μ M (Enzo, Life Sciences), NH₄Cl a 20 mM (Sigma) y leupeptina 100 μ M (Sigma) al medio de cultivo. Transcurridas las cuatro horas, las muestras se congelaron en nitrógeno líquido y permanecieron congeladas a -80°C hasta que se procesaron.
- Cicloheximida (Sigma): Inhibidor del ribosoma y por lo tanto de la síntesis proteica *de novo*. Tras 18 horas de transfección, las células se trataron con cicloheximida a 300 μ M. Tras diferentes tiempos de tratamiento (0, 4, 7, 10, 18 y 24 horas) las placas se congelaron en nitrógeno líquido y permanecieron congeladas a -80°C hasta su procesado.

1.3- Bacterias.

En este trabajo se ha utilizado la cepa DH5 α de *Escherichia coli* (Stratagene) para la amplificación de los plásmidos usados en las transfecciones de células de mamífero. Las bacterias se crecían inicialmente en placas de medio LB (1% peptona, 0,5% extracto de levadura y 1% NaCl a pH 7,5, agar 1,8%) a 37°C, de donde se seleccionaba una colonia que se crecía en volúmenes de 200 mL de LB líquido a 37°C en agitación. El medio estaba suplementado con el antibiótico de selección correspondiente al plásmido (100 μ g/mL de ampicilina o kanamicina).

2.- Vectores de expresión.

Los vectores de expresión utilizados en esta tesis se indican en la Tabla 2.

Tabla 2. Plásmidos de mamífero utilizados.

cDNA	VECTOR	PROCEDENCIA
GFP-malina	pCDNA3.1	Laboratorio P. Sanz
GFP-malinC46Y	pCDNA3.1	Laboratorio P. Sanz
GFP-malinaP69A	pCDNA3.1	Laboratorio P. Sanz
GFP-malinaD146N	pCDNA3.1	Laboratorio P. Sanz
GFP-malinaL261P	pCDNA3.1	Laboratorio P. Sanz
HA-malina	pCMV	Laboratorio P. Sanz
HA-laforina	pCMV	Laboratorio P. Sanz
EAAT2	pcDNA	Laboratorio P. Dodd (U. of Queensland)
Laforina antisentido	pSuper	Laboratorio P. Sanz
Flag-laforina	pCMV	Laboratorio P. Sanz
Flag-malina	pCMV	Laboratorio P. Sanz
6xHis-ubiquitina	pCMV	Laboratorio M. Rodríguez (Biogune)
HA-Nedd4.2	pCMV	Laboratorio L. Yenush (IBMCP-CSIC)
HA-GLT-1a	pcDNA3	Laboratorio F. Zafra (Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa"-CSIC)
Flag-Nedd4.2	pCMV	Laboratorio L. Yenush (IBMCP-CSIC)
GFP- β -arrestina1	pEGFP-N3	Laboratorio F. Zafra (Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa"-CSIC)

3.- Análisis por inmunohistoquímica e inmunohistofluorescencia.

3.1- Obtención de las muestras de tejido animal para inmunodetección.

Ratones machos de 16 días, 3 meses y 12 meses de edad se sacrificaron mediante dislocación cervical. Se extrajo el cerebro y se separaron los dos hemisferios, de los cuales el izquierdo se congeló en nitrógeno líquido para estudios de qPCR y obtención de extractos proteicos. El hemisferio derecho se destinó al análisis de inmunohistoquímica, para lo cual se fijó en paraformaldehído (PFA) al 4% durante 24 horas a 4°C en agitación. Tras tres lavados con tampón fosfato salino (PBS, del inglés *phosphate buffer saline*), las muestras se deshidrataron embebiéndolas primero en etanol al 50% durante 10 minutos en agitación a temperatura ambiente y posteriormente en etanol al 70% durante toda una noche a temperatura ambiente. A continuación, se procesaron en un centro de inclusión EC-350 Myr (Microm) donde se completó la deshidratación de los tejidos con concentraciones crecientes de etanol y xileno, tras lo cual se llevó a cabo la inclusión en parafina (Panreac). Posteriormente, se realizaron cortes seriados de 4µm de los tejidos embebidos en parafina utilizando un microtomo de rotación HM-340E (Microm) y se adhirieron a portaobjetos tratados con poli-L-lisina (BDH).

3.2- Análisis inmunohistoquímico.

Los portaobjetos con las muestras parafinadas se desparafinaron a 60°C en estufa durante 30 minutos seguido de dos lavados por inmersión en xilol. Después se pasaron a etanol al 100%. A continuación, fueron sumergidas durante 20 minutos en una

solución de metanol: H₂O₂ (29:1) para bloquear la actividad peroxidasa endógena y seguidamente se desenmascararon los antígenos que podían haberse bloqueado por la fijación con PFA, utilizando una solución de EDTA Tris-HCl 10 mM a pH 9 a 90°C durante 20 minutos.

Cuando las muestras se atemperaron, se realizó un bloqueo de antígenos inespecíficos utilizando una solución 5% FBS/1% BSA (albúmina de suero bovino) en PBS durante 20 minutos a temperatura ambiente. Seguidamente, se procedió a la incubación con el anticuerpo primario correspondiente (**Tabla 3**) durante toda la noche a 4°C. Los anticuerpos se diluyeron en la misma solución empleada en el bloqueo. Tras la incubación con el anticuerpo primario, se lavaron las muestras tres veces con PBS (10 minutos por lavado) y se incubaron a temperatura ambiente durante 45 minutos con el anticuerpo secundario correspondiente conjugado con biotina (**Tabla 3**) diluido en PBS con 1% de BSA. A continuación, se lavaron las muestras tres veces en PBS (10 minutos por lavado) y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente con el complejo avidina-biotina-peroxidasa (ABC, Vectastain Elite, Vector Laboratories).

Para revelar la reacción se utilizó un kit de diaminobenzidina (DAB) como sustrato cromogénico para la peroxidasa (DAB, Vector Laboratories), siguiendo las recomendaciones del fabricante. La reacción química se visualizó con un microscopio óptico para determinar el tiempo adecuado de revelado y se detuvo con agua. Para poder contrastar la señal, se realizó una tinción con hematoxilina (Sigma). Las muestras se deshidataron y se montaron utilizando DPX (Merck). En cada determinación se realizó un control

negativo utilizando sólo el anticuerpo secundario correspondiente. Las imágenes se tomaron con un microscopio Leica DM6000 y se analizaron utilizando el software ImageJ (NIH).

Tabla 3. Listado de anticuerpos y diluciones utilizados en inmunohistoquímica.

ANTICUERPO	DILUCIÓN	FABRICANTE
Anti-EAAT2	1/1000	Santa Cruz Biotechnology
Anti-EAAT1	1/100	Santa Cruz Biotechnology
Anti-EAAT3	1/750	Millipore
Anti-Nedd4	1/200	Abcam
Anti-ratón biotinilado	1/1000	Jackson ImmunoResearch
Anti-conejo biotinilado	1/1000	Jackson ImmunoResearch

3.3- Análisis por inmunohistofluorescencia.

Para llevar a cabo la detección por inmunofluorescencia sobre los cortes de cerebro, se desparafinaron a 60°C durante 30 minutos, seguido de dos lavados de 10 minutos en xilol, y se rehidrataron utilizando alcoholes de graduación decreciente (100%, 90%, 70% y 50%) durante al menos 10 minutos. A continuación, se sumergieron las muestras en una solución de KBH₄ (1 mg/mL diluido en PBS) durante 40 minutos para disminuir la autofluorescencia del tejido. Tras un lavado en PBS, se procedió al desenmascaramiento de antígenos bloqueados por la fijación con PFA, empleando una solución de EDTA Tris-HCl 10 mM a pH 9 a 90°C durante 20 minutos. Cuando las muestras retornaron a la temperatura ambiente, se lavaron una vez con agua y se procedió al bloqueo de antígenos inespecíficos utilizando una solución de FBS 5%/BSA 1%

en PBS durante al menos 30 minutos a temperatura ambiente. El anticuerpo primario correspondiente a cada experimento se diluyó en la solución de bloqueo (**Tabla 4**) y la muestra se dejó incubando toda la noche a 4°C. Al día siguiente, se lavaron las muestras tres veces con PBS durante 10 minutos y se incubaron con los anticuerpos secundarios diluidos en BSA al 1% (**Tabla 4**). Tras tres lavados más en PBS, las muestras se incubaron en DAPI diluido 1/10000 en PBS durante 10 minutos. Finalmente, las muestras se lavaron en PBS y se montaron usando el medio para cubreobjetos Aqua-Poly/Mount coverslip medium (Polysciences, Inc. Eppelheim). Las imágenes se adquirieron con un microscopio confocal Leica TCS SP8 (Leica) y se procesaron con el software ImageJ (NIH).

Tabla 4. Listado de anticuerpos y diluciones utilizados en inmunohistofluorescencia.

ANTICUERPO	DILUCIÓN	FABRICANTE
Anti-GFAP	1/200	Abcam
Anti-glutamina sintetasa (GS)	1/200	Abcam
Anti-EAAT2	1/200	Santa Cruz Biotec
Anti-NeuN	1/200	Millipore
Anti-conejo Alexa Fluor 488	1/400	Invitrogen
Anti-ratón Texas Red	1/400	Invitrogen
Anti-ratón Alexa Fluor 594	1/400	Invitrogen

4.- Captación de glutamato.

Cultivos primarios de astrocitos de ratones control, *Epm2a*^{-/-} y *Epm2b*^{-/-} se sembraron 48 horas antes del ensayo con una densidad de 2×10^5 células/pocillo en placas de 48 pocillos y se

dejaron crecer en medio DMEM suplementado con un 10% de suero inactivado, 1% de anfotericina B, 1% de penicilina, 1% de estreptomycin y 1% de glutamina en una atmosfera húmeda a 37°C con un 5% de CO₂. Las células se lavaron dos veces con PBS a 37°C y se incubaron con L-glutamato [2 µCi/mL L-[³H]-glutamato (PerkinElmer)] en PBS a 37°C durante 10 minutos. Las incubaciones se realizaron por triplicado. Como control negativo, se realizó una determinación en paralelo con PBS sin sodio (el NaCl fue sustituido isosmóticamente por cloruro de colina), ya que los transportadores de glutamato necesitan sodio para poder cotransportar glutamato. El ensayo se paró por aspiración del tampón seguida de dos lavados con PBS frío o con PBS sin sodio frío, según el caso. Las células se lisaron con una solución 0,2 M de NaOH y se midió la radioactividad acumulada con un medidor de líquido de centelleo (PerkinElmer Liquid Scintillation Analyzer Tri-Carb 2800TR). La captación de glutamato se expresó como el incremento de cambio en la incorporación de radioactividad en las células tratadas con PBS respecto a las tratadas con PBS sin sodio.

5.- Determinación de EAAT2/GLT-1 en la superficie celular.

En esta tesis se han utilizado dos metodologías para determinar la cantidad de EAAT2/GLT-1 localizado en la superficie celular. Una de ellas, la citometría de flujo, es un método cuantitativo que permite determinar la cantidad de transportador de cada célula individualmente mediante fluorescencia. Utilizamos también un método cualitativo basado en microscopía de fluorescencia confocal que permite visualizar grandes cambios en los niveles de

fluorescencia y sirve como control de la integridad de las membranas.

5.1- Citometría de flujo.

Astrocitos corticales primarios de ratón, células humanas de neuroblastoma SH-SY5Y y/o células humanas Hek293 se sembraron en placas p60 y se cultivaron según se describe en el apartado 1 de Material y métodos. En los experimentos que se indica, las células se transfectaron y 24 horas después de la transfección se tripsinizaron durante 4 minutos, tras lo cual las células se resuspendieron en el medio de cultivo donde normalmente se crece cada tipo celular para parar la acción de la tripsina. Las células que no se transfectaron fueron asimismo tripsinizadas del mismo modo. Tras una centrifugación de 5 minutos a 4°C a 1200 rpm, las células se lavaron dos veces con PBS frío y se incubaron con anticuerpo anti-EAAT2 (Santa Cruz Biotechnology) diluido en PBS con BSA al 1% a 4°C durante 30 minutos. A continuación, las células se lavaron dos veces con PBS frío y se incubaron con anticuerpo secundario anti-ratón conjugado a ficoeritrina (Santa Cruz Biotechnology) diluido en PBS con BSA al 1% durante 30 minutos a 4°C. Pasado este tiempo, las células se volvieron a lavar con PBS frío y se fijaron con PFA al 4% en PBS durante 20 minutos a temperatura ambiente. Como controles se utilizaron células que no se incubaron ni con anticuerpo primario ni con anticuerpo secundario para determinar la autofluorescencia de las células y tratarla como fondo, así como células que habían sido marcadas únicamente con anticuerpo secundario. La fluorescencia estimada proporcional a la cantidad de EAAT2/GLT-1 en la superficie celular se midió utilizando el citómetro de flujo BD FACSCanto (BD Biosciences) y se analizó, bien con el *software* que

proporciona la casa comercial BD Biosciences, bien con el *software* FlowJo, según se indique en cada experimento.

5.2- Análisis por inmunofluorescencia confocal.

Astrocitos corticales primarios de ratón se crecieron sobre cubreobjetos en placas de 12 pocillos. Estas células se lavaron dos veces con PBS frío y se incubaron con anticuerpo anti-EAAT2 en PBS con BSA al 1% durante 30 minutos a 4°C. A continuación, las células se lavaron con PBS frío dos veces y se incubaron con anticuerpo anti-ratón conjugado a TexasRed en BSA al 1% durante 30 minutos. Tras un par de lavados con PBS frío, las células se incubaron a 4°C durante 20 minutos con aglutinina de germen de trigo (WGA, *Wheat Germ Agglutinin*) conjugado a Alexa Fluor 488 (Invitrogen) para comprobar la integridad de la membrana. Esta molécula es una lectina capaz de unirse a proteínas glicosiladas por lo que, si la membrana se ha mantenido íntegra, se unirá a la membrana y resultará marcada fluorescentemente. Si, por el contrario, la membrana no se ha conservado íntegra, WGA se unirá además a proteínas localizadas en el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi, dando lugar a un patrón de fluorescencia muy diferente y cercano al núcleo. Tras la incubación con WGA, las células se lavaron con PBS frío, se fijaron con PFA al 4% en PBS durante 20 minutos a temperatura ambiente, se lavaron tres veces con PBS y se montaron en portaobjetos utilizando Aqua-Poly/Mount coverslip medium. Las imágenes se adquirieron con un microscopio confocal Leica TCS SP8 y se procesaron con el *software* ImageJ (NIH).

6.- Análisis de proteínas por *western blot*.

Para llevar a cabo los análisis por *western blot* de los extractos celulares de astrocitos corticales primarios, células SH-SY5Y y células Hek293, éstas se lisaron en 200 μ L de tampón RIPA (20 mM Tris-HCl, pH 7,5; 150 mM NaCl; 1 mM EDTA; 1% Nonidet-40; 1 mM Na_3VO_4 , 1 mM de fenilmetilsulfonil fluoruro (PMSF) y un cóctel de inhibidores de proteasas (Roche)) utilizando rascadores para levantar las células de las placas. Los extractos se homogeneizaron utilizando una jeringuilla de 25G x 5/8" y se centrifugaron a 10.000 g durante 15 minutos en frío. Se recogieron los sobrenadantes y la concentración de proteína se cuantificó por el método Bradford (Dc Protein Assay, Bio-Rad). Se tomaron 30 μ g de proteína y se analizaron por SDS-PAGE usando geles de poliacrilamida del porcentaje adecuado (8-10%) con un grosor de 1,5 mm. Antes de cargar las muestras, se les añadió tampón de carga SB 2x (*sample buffer*) (125 mM Tris-HCl pH 6,8, 20% de glicerol, 4% de SDS, 0,04 mg/mL de azul de bromofenol y 31 mg/mL de ditioneitol (DTT)) y se hirvieron durante 5 minutos a 100°C. La electroforesis se llevó a cabo a 120 V en un sistema *mini-protean Electrophoresis System* (Bio-Rad), en tampón compuesto por 0,2 M de glicina, 25 mM de Tris y 0,1% (p/v) de SDS.

La transferencia a una membrana de nitrocelulosa se llevó a cabo durante 90 minutos a 200 mA en un tampón compuesto por 0,1 M de glicina, 12,5 mM de Tris y 20% (v/v) de metanol. A continuación, la membrana se bloqueó con leche desnatada en polvo al 2% (p/v) en T-TBS (20 mM de Tris-HCl pH 7,5, 150 mM de NaCl y 0,1% (v/v) de Tween-20) durante al menos 45 minutos a temperatura ambiente en agitación. Después, la membrana se incubó durante toda la noche con el anticuerpo primario específico a 4°C en agitación

(Tabla 5). Tras tres lavados con T-TBS de 10 minutos en agitación, las membranas se incubaron durante 45 minutos a temperatura ambiente en agitación con el anticuerpo secundario correspondiente conjugado a moléculas fluorescentes. El exceso de anticuerpo secundario se eliminó mediante tres lavados con T-TBS y se obtuvieron las imágenes con el sistema de adquisición de imágenes Odyssey Infrared Imaging System (LI-COR Biosciences). Estos resultados se analizaron utilizando el software Image Studio Lite versión 3.1 (LI-COR Bioscience).

En los casos que se indican, se utilizaron anticuerpos secundarios conjugados a HRP (*horseradish peroxidase*), llevando a cabo la inmunodetección con el sistema de quimioluminiscencia FUJILAS4000 (Fujifilm) y usando como agente revelador ECL-Plus (Amersham Biosciences, GE Healthcare).

Tabla 5. Anticuerpos empleados en el análisis por *western blot*.

ANTICUERPO	DILUCIÓN	FABRICANTE
Anti-EAAT2	1/1000	Santa Cruz
Anti-actina	1/3000	Sigma
Anti-HA	1/5000	HA
Anti-FLAG	1/1000	Sigma
Anti-Nedd4.2	1/10000	Millipore
Anti-Nedd4	1/5000	Abcam
Anti-GFP	1/5000	ImmunoKontakt
Anti-ratón IRDye680LT	1/5000	LI-COR Bioscience
Anti-conejo IRDye800CW	1/5000	LI-COR Bioscience
Anti-ratón HRP	1/5000	Santa Cruz
Anti-conejo HRP	1/5000	Santa Cruz

7.- Ensayo de coimmunoprecipitación.

Para estudiar la interacción entre Nedd4-2 y el complejo laforina-malina, llevamos a cabo una coimmunoprecipitación (CoIP) en células Hek293. Estas células se sembraron en placas p100 y 24 horas después se transfectaron con Lipofectamina con los plásmidos pCMV-HA-Nedd4.2, pCMV-HA-malina y pCMV-Flag-laforina. Después de 24 horas se lisaron en 400 μ L de tampón de lisis para CoIP (25 mM Tris-HCl a pH8, 5 mM NaF, 5 mM Na₄P₂O₇, 100 mM KCl, 0,5% de Triton X100 (v/v), 1 mM de PMSF, 1 mM de Na₃VO₄ e inhibidores de proteasas (Roche)) con una jeringuilla de 25Gx5/8" y se centrifugaron durante 5 minutos a 5000 rpm en frío. Del sobrenadante se separó una fracción que se analizó para

comprobar si la sobreexpresión había funcionado correctamente. Se tomó 1 mg de proteína del sobrenadante restante que se incubó con resina proteína A IPA 3000 (Repligene) inmovilizada para eliminar uniones específicas, dejándose en agitación durante 30 minutos a 4°C. A continuación, se inmunoprecipitó laforina incubando el extracto celular con 2 µL de anticuerpo anti-FLAG (Sigma) durante 2 horas a 4°C y añadiendo posteriormente resina de agarosa con proteína A/G inmovilizada (Protein A/G PLUS Agarose Immunoprecipitation Reagent, Santa Cruz Biotech), que se incubó durante 2 horas a 4°C. La resina con el inmunoprecipitado se recuperó mediante centrifugación en frío a 800 rpm y se lavó 4 veces con PBS para eliminar uniones inespecíficas. Se añadieron 60 µL de SB 2x a las muestras y se hirvieron a 100°C durante 5 minutos. El eluido se analizó por *western blot* revelando con anticuerpo anti-flag para comprobar la precipitación de la laforina y con anticuerpo anti-HA para determinar si malina y/o Nedd4-2 inmunoprecipitaron con ésta.

8. Análisis de ubiquitinación en células de mamífero.

Para los ensayos de ubiquitinación se utilizaron células Hek293 que se transfectaron con plásmidos que expresaban las E3-ubiquitina ligasas correspondientes para cada experimento, el sustrato que debía ser ubiquitinado y un plásmido que expresa ubiquitina con una cola de histidinas (6xHisUb), usando como reactivo de transfección Xtreme GENE HP (Roche). La cola de histidinas de ubiquitina permite su separación por cromatografía de afinidad con resina de cobalto (TALON, Clontech) (**Figura 7**). Tras 18 horas de transfección, las células se lisaron en un tampón A desnaturalizante

para evitar la acción de las deubiquitinasas endógenas (tampón A: 6M cloruro de guanidinio, 0,1 M Na₃PO₄, 0,1M Tris-HCl pH8). En los casos que se indican, al tampón se le añadió un 1% de Nonidet-40 (v/v). El lisado fue retirado de las placas con un rascador y homogeneizado usando una jeringuilla de 25Gx5/8” de 1 mL. Los extractos fueron clarificados por centrifugación a 12.000 x g durante 15 minutos y la fracción soluble se recogió y cuantificó usando el método Bradford *Protein Assay* (Bio-Rad). 1500 µg de proteína total se incubaron con 100 µL de resina de cobalto (TALON, Clontech) durante tres horas en rotación a temperatura ambiente. El primer lavado se realizó con 1 mL de tampón B (6 M cloruro de guanidinio, 0,1 M Na₃PO₄ pH 8, 0,1 M Tris-HCl pH 8 y 10 mM imidazol), al que siguieron cuatro lavados con 1 mL de tampón C (8M Urea, 0,1M Na₃PO₄ pH 8, 0,1 M Tris-HCl pH8 y 10 mM de imidazol). La elución de las proteínas unidas a la resina se realizó mediante la adición de 50 µL de tampón de carga SB 2x y la ebullición de la muestra durante 5 minutos. El análisis de las proteínas retenidas se realizó por *western blot* usando los anticuerpos adecuados según se describe en la **Tabla 5**.

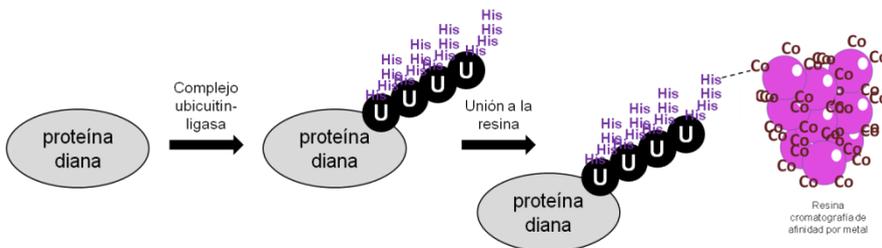


Figura 7. Esquema de la cromatografía de afinidad por metal empleada para detectar ubiquitinación en células de mamífero. U: ubiquitina, His: histidina, Co: cobalto.

9.- Cuantificación del mRNA mediante qPCR.

9.1- Extracción de RNA.

Hipocampos de ratón que habían sido congelados en nitrógeno líquido y almacenados a -80°C , se lisaron en $400\ \mu\text{L}$ de TriPure Isolation Reagent (Sigma) sobre hielo, realizando movimientos de arriba-abajo con la micropipeta y con jeringuillas de $25\text{G}\times 5/8''$ de $1\ \text{mL}$. Las muestras se dejaron incubando 10 minutos a temperatura ambiente para asegurar la completa disociación de los complejos nucleoproteicos. A continuación, se añadieron $80\ \mu\text{L}$ de cloroformo en cada muestra y se agitó enérgicamente durante 15 segundos. Las muestras se incubaron 10 minutos a temperatura ambiente para favorecer la separación de las fases. Posteriormente se llevó a cabo una centrifugación a $12000\ \times\ \text{g}$ de 15 minutos a 4°C que permitió la separación de la muestra en tres fases: una fase superior incolora que contenía el RNA, una fase intermedia blanca que contenía el DNA y una fase inferior roja que contenía las proteínas. Se tomaron $150\ \mu\text{L}$ de la fase superior incolora con cuidado de no arrastrar nada de las fases inferiores y se trasvasaron a un nuevo tubo. Se añadieron $187\ \mu\text{L}$ de isopropanol, se agitó enérgicamente y se incubó durante 10 minutos para favorecer la formación de precipitados de RNA. Posteriormente se llevó a cabo una centrifugación de 30 minutos a $16000\ \times\ \text{g}$ en frío y se conservó el pellet con el RNA. Este pellet se lavó con $250\ \mu\text{L}$ de etanol al 70% (v/v) agitando enérgicamente y de nuevo las muestras se centrifugaron 5 minutos a $16000\ \times\ \text{g}$ en frío. Tras eliminar por completo el etanol dejando secar la muestra, el pellet se resuspendió en $50\ \mu\text{L}$ de agua-DEPC (agua tratada con un 1% de dietil pirocarbonato) y se incubó un mínimo de 10 minutos y un

máximo de 15 minutos a 55°C. Por último, se cuantificó la cantidad total de RNA utilizando un espectrofotómetro NanoDrop2000 y se valoró su pureza considerando el ratio A_{260}/A_{280} , que debía encontrarse entre 1,6 y 2,0 para ser considerado como adecuado para el ensayo.

Para extraer el RNA de los astrocitos corticales de ratones, se llevó a cabo un protocolo similar. Placas p60 de astrocitos se congelaron en nitrógeno líquido y se lisaron con 800 μL de TriPure Isolation Reagent (Sigma) sobre hielo utilizando rascadores. El resto del protocolo se desarrolló igual que en el caso de las muestras de hipocampo, ajustando los volúmenes al doble de lo anteriormente descrito.

9.2- Transcripción reversa.

Una vez obtenido el RNA, se llevó a cabo la síntesis de cDNA a partir de éste. Para ello se empleó el kit Expand Reverse Transcriptase (Roche).

A 1 μg del RNA obtenido se le añadieron 50 picomoles de hexámeros y se añadió agua hasta un volumen total de 9,5 μL . Esta mezcla se incubó 10 minutos a 65°C, tras lo cual se colocó en hielo. A continuación se le añadió el resto de componentes de la reacción [Expand Reverse Transcriptase Buffer 5x a una concentración 1x, DTT 100 mM, dNTPs 1 mM, Inhibidor de RNasa (Roche) 10U/ μL , Expand Reverse Transcriptase 50 U/ μL], se incubó a 30°C durante 10 minutos y posteriormente a 42°C durante 45 minutos. Por último, las muestras se dejaron en hielo y se añadió 80 μL de agua para diluir la muestra.

9.3- PCR cuantitativa (qPCR).

Con el fin de estimar la cantidad de cDNA de un gen particular respecto a un gen de referencia en una muestra, se utilizó la técnica de la PCR cuantitativa, abreviada qPCR del inglés *quantitative PCR*. Esta técnica también se conoce con el nombre de PCR en tiempo real o *real-time PCR*, abreviado RT-PCR. En este trabajo se ha optado por la utilización de la forma qPCR ya que RT-PCR puede confundirse con la técnica de la retrotranscripción+PCR (RT-PCR).

En nuestros ensayos hemos utilizado las sondas Universal Probes (Roche) combinadas con los cebadores adecuados que nos indicaba el software de Roche ProbeFinder (**Tabla 6**). El kit de amplificación empleado fue el TaqMan Fast Universal Master Mix (Applied Biosystems). La mezcla de reacción y el programa empleado para la amplificación vienen determinados por el fabricante (Applied Biosystems). Siguiendo las recomendaciones de éste, se añadió 10 μ M de cada cebador, 0,1 μ L de sonda, 5 μ L de DNA y el TaqMan Fast Universal Master Mix a 1x a cada pocillo. Para la amplificación se utilizó el termociclador 7500 Real-Time PCR System de Applied Biosystems, con el software 7500 Software v2.0.4. El método de cuantificación que hemos utilizado es el denominado $\Delta\Delta$ CT, que viene descrito en la guía de cálculo proporcionada por el fabricante. En estos ensayos se han utilizado como genes endógenos de referencia bien el que codifica la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (*Gapdh*), o bien el que codifica la hipoxantina-guanina fosforibosiltransferasa (*Hprt*), según se indique en cada experimento.

Tabla 6. Relación de genes analizados por RT-PCR.

cDNA	Cebador (+)	Cebador (-)	Sonda
GLT-1a	GATGCCTTCCTGGATCTCATT	CAGAACTTTCTTTGTCACTGTC TGA	103
GLT-1b	TTCTACAGCTGAGAGAATGGTCA	TTCGGTGCTTTGGCTCAT	83
GLAST	AGAAGGTAAAATCGTGCAGGTC	ACCAGATTGGGAGGGA	84
EAAC1	TTTTCTGGGGAAATTCTGA	ATCCAGTGCAGCGACACC	89
GAPDH	AGCTTGTCATCAACGGGAAG	TTTGATGTTAGTGGGGTCTCG	9
HPRT	TCCTCCTCAGACCGACTTTT	CCTGGTTCATCATCGCTAATC	95

10.- Microdiálisis *in vivo* y determinación de la concentración de glutamato.

Para poder determinar *in vivo* la concentración de glutamato extracelular en el hipocampo, se utilizó la técnica de la microdiálisis (**Figura 8**). Estos ensayos se llevaron a cabo en el laboratorio del Dr. Francesc Artigas en el Instituto de Investigaciones Biomédicas de Barcelona-CSIC. Estos experimentos se realizaron con ratones macho *Epm2b*^{+/+} y *Epm2b*^{-/-} de 9 meses de edad.

En primer lugar, se fabricaron sondas de microdiálisis concéntricas con una membrana de 2 mm de longitud. Después de anestesiarse a los ratones con pentobarbital sódico (120 mg/kg intraperitoneal), los ratones se colocaron en un sistema estereotáxico para ratón (David Kopf Instruments) y las sondas de diálisis se implantaron en el hipocampo. Éstas se aseguraron al cráneo con tornillos de anclaje y cemento dental. Las coordenadas estereotáxicas desde el Bregma y la superficie del cráneo fueron: anteroposterior (AP) -3 mm, lateral (L) -3 mm, dorsoventral (DV) -4,5 mm; según Paxinos y Franklin (Franklin y Paxinos, 2012).

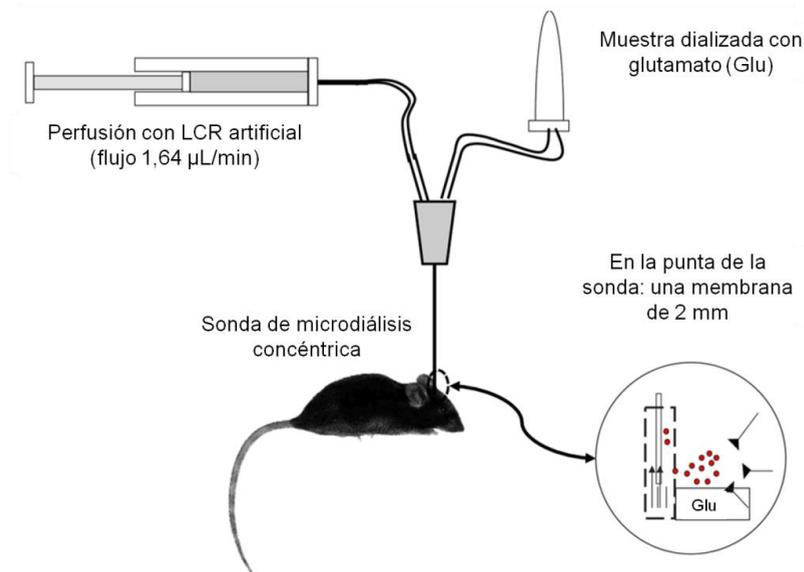


Figura 8. Representación de la microdiálisis. La bomba perfunde líquido cefalorraquídeo (LCR) hacia la sonda colocada intracranealmente. La sonda tiene en la punta una membrana de 2 mm que permite la difusión de los neurotransmisores hacia el tubo de recepción de la muestra dializada. Adaptada de Gardier (Gardier, 2013).

El primer ensayo de microdiálisis se llevó a cabo 20-24 horas después de la cirugía, manteniendo a los ratones con libertad de movimiento mientras se les administraba de forma constante a través de las sondas fluido con una composición similar al líquido

cefalorraquídeo (LCR), que contenía 125 mM de NaCl y 2,5 mM de KCl. El líquido cefalorraquídeo artificial se perfundía a 1,6 μ L/minuto con una bomba para jeringa Harvard model 22 (Harvard Apparatus) conectada a una conexión giratoria (Instech). Tras 2,5 horas con un flujo de 1.6 μ L/minuto, se tomaron cuatro muestras de LCR cada 10 minutos para establecer los niveles basales de glutamato antes del tratamiento farmacológico. A continuación, a los ratones se les administró dihidrokainato (DHK) en el hipocampo de forma local a través de la sonda. El dihidrokainato es un inhibidor específico del transportador de glutamato GLT-1. Se administró DHK a 0,1 mM, 0,3 mM, 1 mM y 3 mM y se tomaron cuatro muestras de dializado cada 10 minutos para cada una de las concentraciones.

Al día siguiente, se procedió al segundo experimento de microdialísis con los mismos ratones. Durante 2,5 horas se descartó la muestra dializada y a continuación se tomaron 6 muestras de LCR cada 10 minutos para establecer los niveles basales de glutamato antes del tratamiento farmacológico. A continuación, se administraron de forma intraperitoneal distintas dosis de pentilentetrazol (PTZ). Este fármaco es un epileptogénico que inhibe el receptor del neurotransmisor inhibitorio GABA, al cual ya se ha demostrado previamente que son sensibles los ratones modelo de la enfermedad *Epm2b*^{-/-} (García-Cabrero et al., 2014). Se administraron dos dosis (10 mg/kg y 30 mg/kg) y se tomaron 6 muestras de dializado para cada dosis. Cuando se completaron los experimentos, los ratones se sacrificaron por dislocación cervical y los cerebros se extrajeron rápidamente y se congelaron en hielo seco para el subsiguiente análisis histológico que permitía determinar la localización de la sonda.

La concentración de glutamato en las muestras dializadas se determinó utilizando un sistema de HPLC que consistía en un Waters 717plus autosampler, una bomba cuaternaria de gradiente Waters 600 y una columna Nucleosil 5 μ ODS (10 cm x 0,4 cm, Tekno-kroma). Las muestras dializadas fueron derivatizadas en una precolumna con reactivo OPA y todo el proceso fue llevado a cabo por el autosampler. Brevemente, se añadieron 90 μ L de agua destilada a los 10 μ L de muestra dializada tras lo que se añadieron 15 μ L de reactivo OPA. Tras 2,5 minutos de reacción, 80 μ L de la mezcla se inyectaron en la columna. La detección se llevó a cabo con un detector de fluorescencia Waters 470 utilizando longitudes de onda de excitación y emisión de 360 nm y 450 nm respectivamente. La fase móvil se bombeó a 0,8 μ L/minuto y contaba con dos componentes (Calcagno et al., 2006): solución A, compuesta de 0,05 M de Na₂HPO₄, 28% de metanol, con un pH ajustado a 6,4 con un 85% de H₃PO₄; y solución B, compuesta por metanol/H₂O (ratio 8:2). Tras la elución del pico de glutamato en 3 minutos con un 100% de solución A, se estableció un gradiente desde el 100% de solución A hasta un 100% de solución B en dos minutos. Tras lavar los picos de elución tardíos (3 minutos), la fase móvil volvió a las condiciones iniciales (100% de solución A) en dos minutos. El límite de detección del glutamato fue de 0,2 pmol (ratio de señal-ruido de 3). La cuantificación del glutamato se llevó a cabo por comparación con una curva estándar diaria que comprendía las concentraciones de neurotransmisores que se esperaban en las muestras dializadas.

11.- Análisis estadístico.

Los valores se han expresado como la media más la desviación estándar de al menos tres experimentos independientes. Para estimar la significatividad estadística cuando se comparaban muestras con dos grupos, se utilizó el t-test de Student de dos colas asumiendo homocedasticidad. El cálculo se realizó utilizando el software Microsoft Office Excel 2007 (Microsoft).

Cuando se comparaban muestras que tenían un solo factor pero había más de dos grupos, se analizó la normalidad de los datos con el test de Komogorv-Smirnov, se valoró la homocedasticidad con la prueba de Levène y se procedió a utilizar un test ANOVA de un factor, utilizando un contraste de medias previamente planificadas para analizar los grupos respecto al control. Cuando se encontró efecto significativo, se utilizó el análisis *post hoc* de Bonferroni. Para llevar a cabo estas pruebas se empleó el paquete estadístico SPSS 17.0.

Para analizar los ensayos de microdiálisis se utilizó una ANOVA de medidas repetidas de dos factores fijos (tiempo y tratamiento). Cuando se encontraron efectos, se utilizó el análisis *post hoc* de Duncan o Holm-Sidak según se especifique en el experimento. Estos análisis estadísticos se realizaron con el software GraphPad Prism 5.

En todos los casos, el umbral de significatividad se estableció en un p-valor por debajo de 0,05 (* p-valor<0,05, ** p-valor<0,01, *** p-valor<0,001).

RESULTADOS

RESULTADOS

1. La homeostasis del transportador de glutamato está afectada en astrocitos primarios de ratones *Epm2a*^{-/-} y *Epm2b*^{-/-}.

- 1.1- Los ratones *Epm2a*^{-/-} y *Epm2b*^{-/-} de 12 meses presentan reactividad astrocitaria.

Dado que la reactividad astrocitaria es un fenómeno descrito tanto en diferentes enfermedades neurodegenerativas como en epilepsia y puede afectar a la capacidad de los astrocitos para regular los niveles sinápticos de glutamato, se propuso valorar si este proceso proinflamatorio tenía lugar en los ratones modelo para la enfermedad de Lafora.

Para ello, se llevaron a cabo inmunodetecciones en cortes de cerebro de ratones control, *Epm2a*^{-/-} y *Epm2b*^{-/-} de avanzada edad (12 meses) con anticuerpos anti-GFAP (rojo) y anti-glutamina sintetasa (verde) (**Figura 9**). Se observó un incremento de la expresión de GFAP en el hipocampo de los ratones *Epm2a*^{-/-} y *Epm2b*^{-/-} respecto a los controles, encontrándose una mayor marca en los ratones *Epm2b*^{-/-}. Este resultado indica una astrocitosis reactiva presente en estos ratones y sugiere que este proceso podría asimismo darse en la enfermedad de Lafora. Sin embargo, no se vio un incremento en el número de células positivas para glutamina sintetasa, marcador general de astrocitos, lo que sugiere que en nuestro modelo no existe una proliferación anormal de astrocitos asociada a la reactividad de estas células.

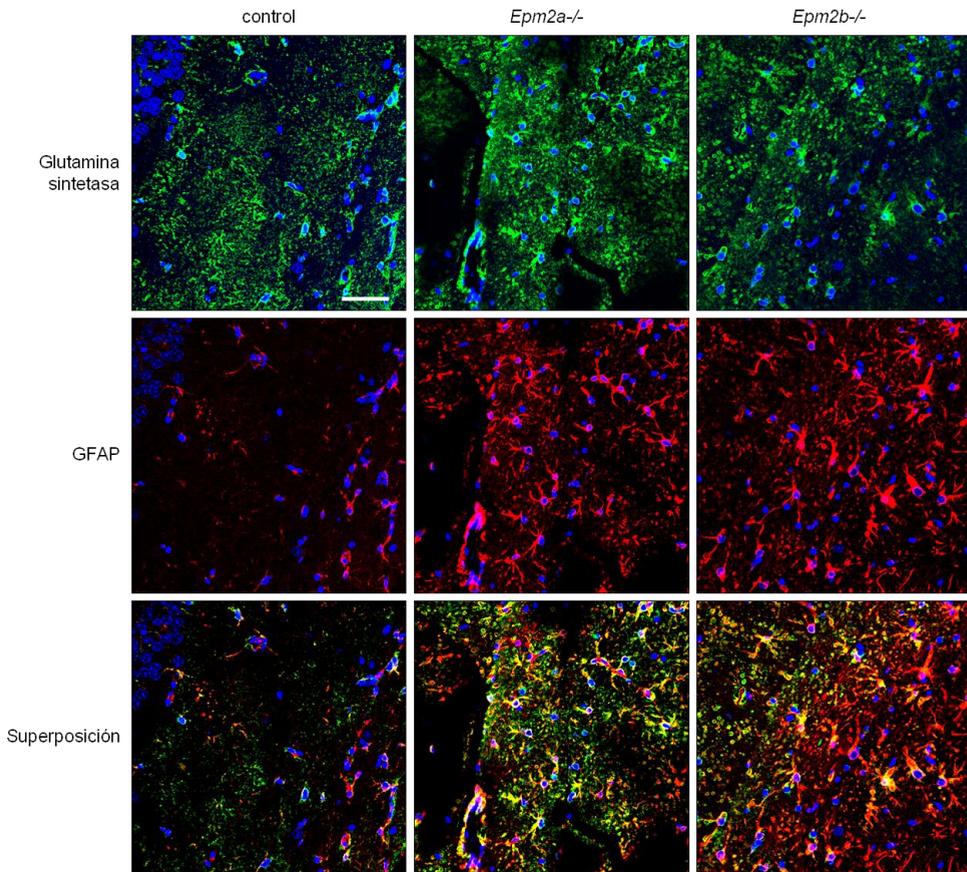


Figura 9. La expresión de GFAP está incrementada en ratones *Epm2a*^{-/-} y *Epm2b*^{-/-}, indicando una reactividad astrocitaria. Regiones del hipocampo de ratones de 12 meses control, *Epm2a*^{-/-} y *Epm2b*^{-/-} se analizaron por inmunohistofluorescencia usando anticuerpos anti-glutamina sintetasa (verde, paneles superiores) y anti-GFAP (rojo, paneles centrales) utilizando anticuerpos secundarios anti-conejo conjugado a Alexa Fluor 488 y anti-ratón conjugado a Texas Red respectivamente. Los núcleos se marcaron con DAPI y aparecen en azul. La imagen superpuesta de ambos marcajes se muestra en los paneles inferiores. Se eligió una imagen representativa de cada uno de los diferentes genotipos estudiados. Barra: 50 μ m.

1.2- Los astrocitos primarios obtenidos de ratones *Epm2a*^{-/-} y *Epm2b*^{-/-} tienen afectada la captación de glutamato.

Como la activación reactiva de astrocitos se ha asociado con una desregulación de diferentes procesos llevados a cabo por estas células (Pekny y Pekna, 2014), incluyendo la captación de glutamato, quisimos comprobar si en astrocitos primarios procedentes del córtex de ratones *Epm2a*^{-/-} y *Epm2b*^{-/-} la capacidad para captar glutamato estaba afectada. Para ello añadimos glutamato radioactivo al medio de reacción de los astrocitos primarios dejándolo durante diez minutos, lavamos, lisamos las células y valoramos el glutamato radioactivo que habían sido capaces de internalizar los astrocitos. La **Figura 10** muestra que los astrocitos primarios procedentes de ratones *Epm2a*^{-/-} y *Epm2b*^{-/-} captan respectivamente entre un 50% y un 40% menos glutamato.

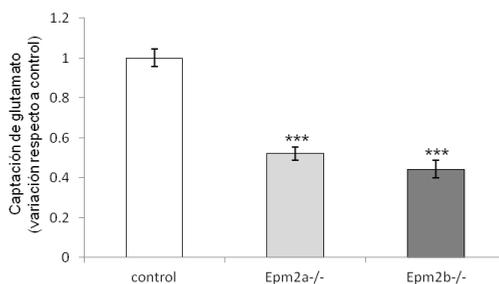


Figura 10. La captación de glutamato está disminuida en astrocitos primarios corticales *Epm2a*^{-/-} y *Epm2b*^{-/-} respecto al control. Los resultados se expresan como el ratio entre la captación de glutamato en un tampón que contiene Na⁺ y la captación de glutamato en un tampón osmóticamente equivalente pero carente de Na⁺. El cotransporte de este ion es esencial para el funcionamiento de los principales transportadores de glutamato en el astrocito, por lo que en ausencia de Na⁺ los transportadores son incapaces de captar glutamato. Los datos están normalizados tomando como referencia la captación de los astrocitos control. Los valores representan la media aritmética de 5 experimentos diferentes y las barras la desviación estándar correspondiente (***)p-valor<0,001 usando un test ANOVA).

- 1.3- Los niveles del transportador de glutamato GLT-1 están disminuidos en la membrana de astrocitos primarios *Epm2a*^{-/-} y *Epm2b*^{-/-}.

En astrocitos existen dos tipos de transportadores de glutamato, GLT-1 y GLAST. De ellos, GLT-1 es el principal ya que es el responsable de la captación del 90% del glutamato extracelular (Kim et al., 2011; Lin et al., 2012). Por ello, fue el primer candidato a analizar en astrocitos de ratones *Epm2a*^{-/-} y *Epm2b*^{-/-}.

En primer lugar, se analizaron los niveles de GLT-1 en extractos proteicos de astrocitos control, *Epm2a*^{-/-} y *Epm2b*^{-/-} mediante *western blot* y no se encontraron diferencias de expresión entre los diferentes genotipos (**Figura 11a**). Se analizaron también los niveles de mRNA de la isoforma principal de GLT-1 (GLT-1a) mediante qPCR y tampoco se observaron diferencias significativas entre los astrocitos control y los astrocitos *Epm2a*^{-/-} o *Epm2b*^{-/-} (**Figura 11b**). Intentamos analizar del mismo modo los niveles de mRNA de la isoforma *b* de GLT-1. Sin embargo, la expresión de esta GLT1-b en astrocitos estaba por debajo del límite de detección de la técnica.

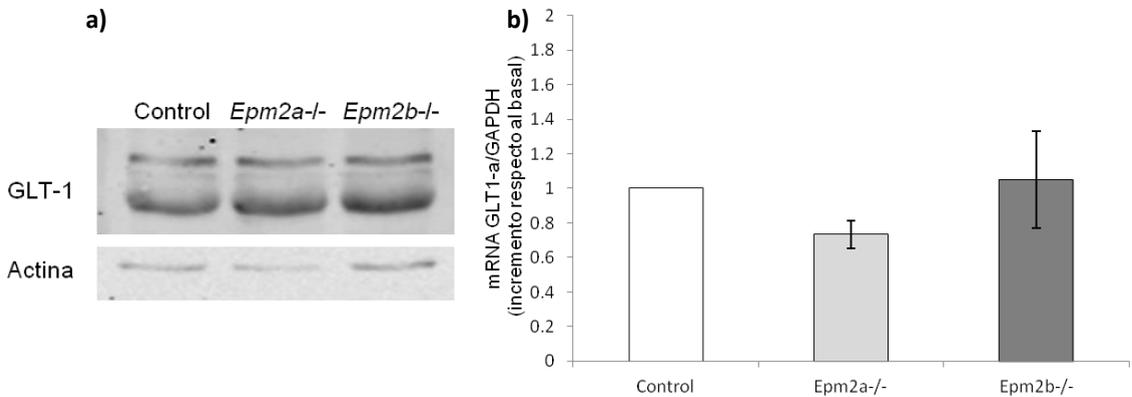


Figura 11. Los niveles totales de GLT-1 en astrocitos primarios corticales no varían entre los control, *Epm2a*^{-/-} o *Epm2b*^{-/-}. **a)** Western blot de extractos proteicos totales (30 μ g) de astrocitos primarios controles, *Epm2a*^{-/-} y *Epm2b*^{-/-}. Se utilizó el anticuerpo anti-EAAT2 (panel superior) y el anticuerpo anti-actina (panel inferior) para normalizar la cantidad de proteína. **b)** Niveles de expresión de mRNA del gen *Slc1a2* que codifica para GLT-1a respecto a *Gapdh* a partir de astrocitos primarios controles, *Epm2a*^{-/-} y *Epm2b*^{-/-}. Los datos expresan la media y la desviación estándar de tres experimentos independientes. No se encontraron diferencias en los niveles de expresión de GLT-1 de proteína o mRNA.

A pesar de no encontrar diferencias en los niveles totales de GLT-1 entre los astrocitos de diferente genotipo, este transportador seguía siendo el principal candidato a estar afectado, ya que se había observado una disminución muy significativa en la capacidad para transportar glutamato en astrocitos *Epm2a*^{-/-} y *Epm2b*^{-/-}, y éste es el recaptador de glutamato más relevante en el cerebro. Para que GLT-1 pueda llevar a cabo su función correctamente necesita estar localizado en la membrana plasmática, por lo que quisimos comprobar si los niveles de GLT-1 localizado en la superficie celular eran iguales en todos los genotipos. Por ello, llevamos a cabo un inmunomarcaje fluorescente en astrocitos primarios control,

Epm2a^{-/-} y *Epm2b*^{-/-} sin permeabilizar la células, de manera que sólo se marcó el GLT-1 de la superficie celular. Los astrocitos se analizaron mediante citometría de flujo, siendo los niveles de fluorescencia de cada célula proporcionales a la cantidad de GLT-1 en superficie. Se observó que los astrocitos primarios *Epm2a*^{-/-} y *Epm2b*^{-/-} tenían respectivamente un 80% y un 70% menos de GLT-1 localizado en la superficie celular comparado con los astrocitos control (**Figura 12a**). Además, se comprobó cualitativamente por microscopía confocal que el método de marcaje en la superficie funcionaba: se realizó el mismo inmunomarcaje de GLT-1 en superficie y se añadió la lectina WGA (*wheat germ agglutinin*) marcada con un fluoróforo (Alexa Fluor 488). Esta lectina se une a proteínas glicosiladas, por lo que si la integridad de la membrana se mantiene se localizará en la membrana plasmática exclusivamente, pero si existen poros que permiten su entrada, se unirá también a orgánulos intracelulares, especialmente al aparato de Golgi. Como se aprecia en la **Figura 12b**, solo se observa marcaje de WGA en la superficie celular, indicando que la integridad de las membranas plasmáticas se ha mantenido. Esto también nos permitió comprobar que se observa una disminución del marcaje de GLT-1 en astrocitos *Epm2a*^{-/-} y *Epm2b*^{-/-}, por lo que la microscopía confocal corrobora la validez del método de marcaje y es coherente con los resultados de fluorescencia obtenidos por citometría.

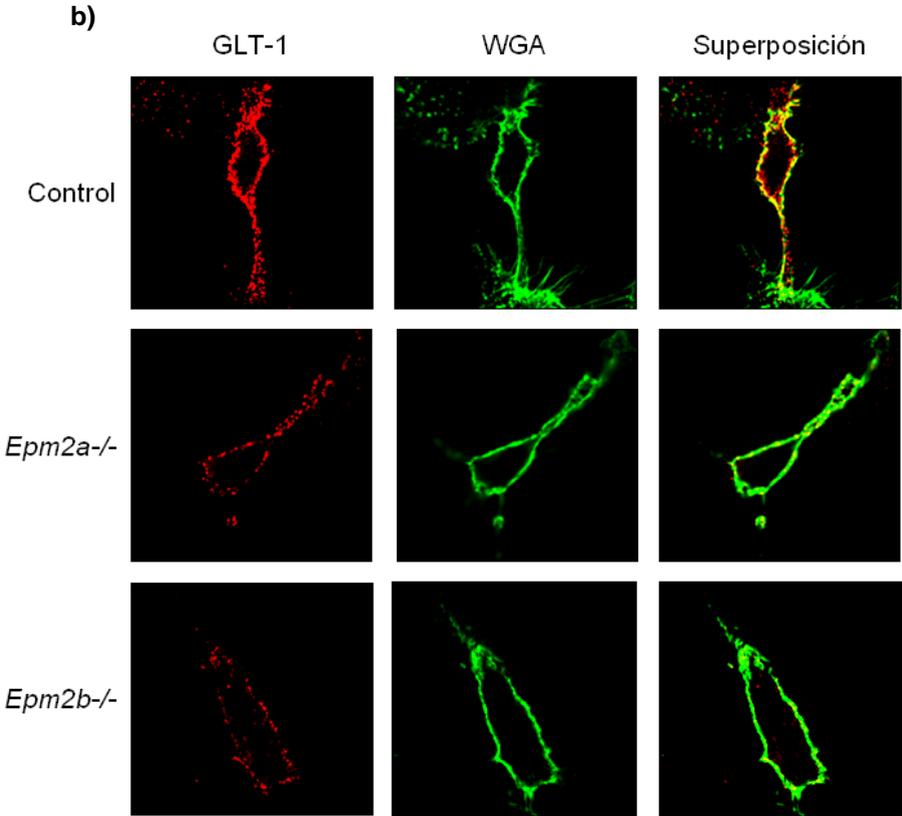
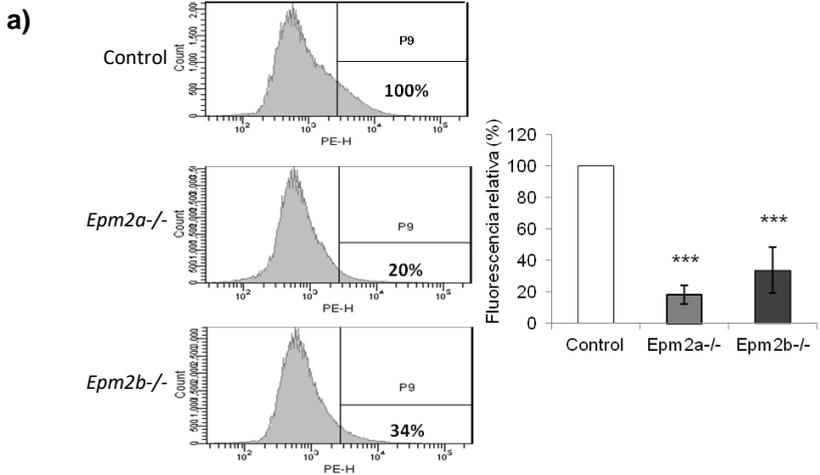


Figura 12. GLT-1 se encuentra disminuido en la membrana plasmática en astrocitos primarios *Epm2a*^{-/-} y *Epm2b*^{-/-}. **a)** Análisis de los niveles de GLT-1 en la membrana por citometría de flujo. La fluorescencia es proporcional a la cantidad de GLT-1 marcado en condiciones nativas con anticuerpo anti-EAAT2 y un anticuerpo secundario anti-ratón conjugado a ficoeritrina (PE). Los histogramas representan los niveles de fluorescencia (PE-H) respecto al número de células (*count*); la línea vertical separa la fluorescencia dependiente de PE de señales inespecíficas (el umbral se determinó utilizando astrocitos marcados únicamente con anticuerpo secundario y sin primario). Los resultados se obtuvieron utilizando el *software* proporcionado por BD Biosciences. A la derecha se representa gráficamente la fluorescencia media obtenida en tres experimentos independientes y las barras indican la desviación estándar (***)p-valor<0,001 utilizando la prueba ANOVA). **b)** Muestras similares de astrocitos se analizaron por microscopía confocal marcando GLT-1 con anticuerpo primario anti-EAAT2 y anticuerpo secundario anti-ratón conjugado a Texas Red (primera columna). Además, se utilizó WGA marcado con fluoróforo Alexa Fluor 488 (segunda columna) como indicador de la integridad de la membrana plasmática. En la tercera columna aparece la superposición de ambas imágenes.

1.4- La reintroducción de malina en astrocitos *Epm2b*^{-/-} recupera los niveles de GLT-1 en la superficie.

Dado que no se habían encontrado diferencias significativas entre los resultados de los astrocitos de ratones *Epm2a*^{-/-} y los astrocitos de ratones *Epm2b*^{-/-}, decidimos utilizar ratones de un único genotipo, el *Epm2b*^{-/-}, en los siguientes ensayos. El siguiente paso que dimos fue comprobar si la reintroducción de malina, mediante su sobreexpresión en un plásmido que expresaba el gen *EPM2B* humano, recuperaba los niveles normales de GLT-1 en la superficie. Para ello, transfectamos astrocitos *Epm2b*^{-/-} con el plásmido pCDNA3.1-GFP-Malina y analizamos los niveles de GLT-1 en superficie mediante citometría de flujo. Los resultados se representaron en forma de histograma (**Figura 13a** y **13b**). Corroborando el experimento anterior, el porcentaje de población con altos niveles de fluorescencia proporcional a la cantidad de

GLT-1 en la membrana pasa del 100% en astrocitos *Epm2b+/+* al 43% en astrocitos *Epm2b-/-*, en consonancia con los resultados anteriores. Cuando posteriormente se introdujo el plásmido pCDNA3.1-GFP-vacío en astrocitos *Epm2b-/-* no se observó un importante cambio en los niveles de fluorescencia. Cuando por el contrario se transfectó el plásmido pCDNA3.1-GFP-Malina, los niveles de GLT-1 en la superficie aumentaban hasta recuperar valores similares a los encontrados en astrocitos *Epm2b+/+* (86%), demostrando que la complementación con malina humana era suficiente para recuperar los niveles normales de GLT-1 en la membrana.

A continuación, se quiso saber si la introducción de variantes de malina con mutaciones patológicas encontradas en pacientes era asimismo capaz de revertir el fenotipo encontrado en los astrocitos modelo para la enfermedad. Para ello, utilizamos diferentes plásmidos usados previamente en el laboratorio que expresaban el gen de malina con las siguientes mutaciones aminoacídicas: C46Y, P69A, D146N y L261P (Couarch et al., 2011). Cada uno de los plásmidos fue transfectado en diferentes placas de astrocitos *Epm2b-/-* utilizando Lipofectamina 2000, como se describe en Material y Métodos. A las 48 horas las células se marcaron sin permeabilizar con anticuerpo anti-EAAT2 y anticuerpo secundario anti-ratón conjugado a PE y se analizaron las muestras por citometría de flujo. Los resultados obtenidos y reflejados en los histogramas de la **Figura 13a** y en el gráfico de barras de la **Figura 13b** mostraron que ninguno de los plásmidos que expresaban las diferentes formas mutantes de malina era capaz de revertir el fenotipo de deficiencia de GLT-1 en superficie característicos de los

Resultados

astrocitos *Epm2b*^{-/-}, siendo los niveles similares a los encontrados en astrocitos *Epm2b*^{-/-} sin transfectar.

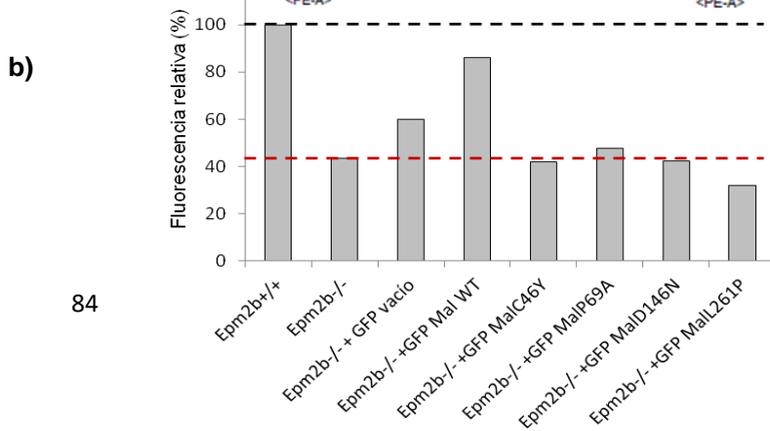
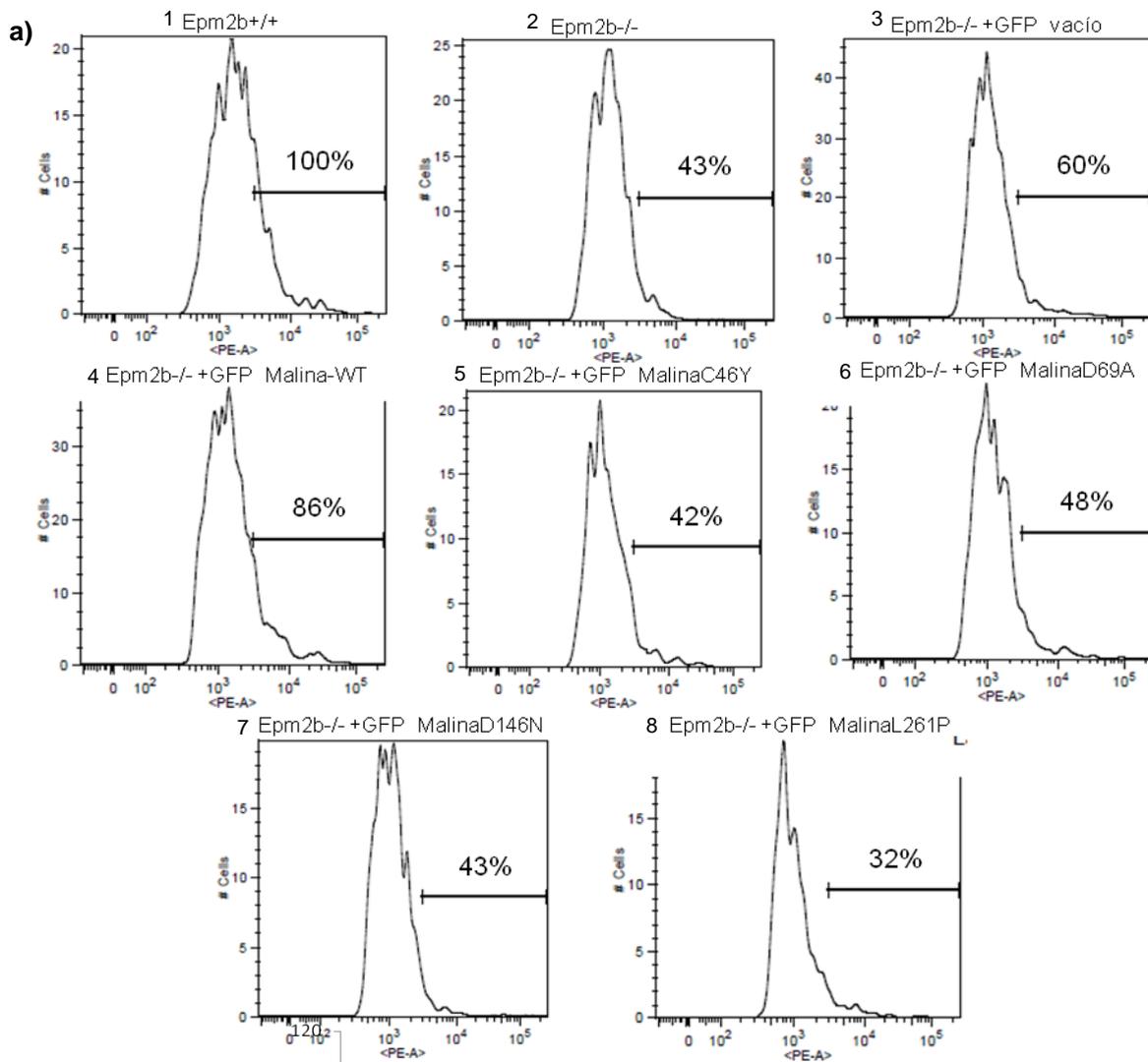


Figura 13. Niveles en superficie celular de GLT-1 en astrocitos primarios *Epm2b*^{-/-} donde se reintroduce malina silvestre y malina mutante. Astrocitos corticales primarios se transfectaron con los plásmidos indicados utilizando Lipofectamina 2000 y tras 48 horas se marcaron sin haber sido permeabilizados con anticuerpo anti-EAAT2 y anticuerpo secundario anti-ratón conjugado a PE. Las células se analizaron a continuación por citometría de flujo. **a)** Histogramas donde en abscisas se representan los niveles de fluorescencia (PE-A), proporcionales a los niveles de GLT-1 en superficie, respecto al número de células (*count*) de astrocitos *Epm2b*^{+/+}, *Epm2b*^{-/-} y astrocitos *Epm2b*^{-/-} transfectados con malina silvestre o diferentes formas mutantes de ésta. La línea negra horizontal delimita los niveles de fluorescencia que han sido considerados positivos y la cifra superior, el porcentaje de células con esos niveles. 1: *Epm2b*^{+/+}, 2: *Epm2b*^{-/-}, 3: *Epm2b*^{-/-} +GFP vacío, 4: *Epm2b*^{-/-} +GFP-Malina WT, 5: *Epm2b*^{-/-} +GFP-MalinaC46Y, 6: *Epm2b*^{-/-} +GFP-MalinaP69A, 7: *Epm2b*^{-/-} +GFP-MalinaD146N y 8: *Epm2b*^{-/-} +GFP-MalinaL261P. Los datos de citometría se analizaron utilizando el software FlowJo. **b)** Representación gráfica de la fluorescencia relativa de los histogramas anteriores. La línea negra corresponde al valor de fluorescencia de los astrocitos *Epm2b*^{+/+} y la roja a los astrocitos *Epm2b*^{-/-}.

1.5- La sobreexpresión de laforina y malina en SH-SY5Y aumenta los niveles de EAAT2 en la membrana.

Para continuar analizando la participación de laforina y malina en la regulación de la presentación en superficie de GLT-1, optamos por sobreexpresar este complejo y ver las consecuencias que esto podía tener en la localización de GLT-1 en la membrana. Sin embargo, dado que para obtener astrocitos primarios se necesita un gran número de animales, para este ensayo decidimos utilizar una línea celular estable inmortalizada: las SH-SY5Y. Esta línea celular de neuroblastoma presenta por una parte la ventaja de ser una línea de origen humano, por lo que los resultados obtenidos se podrían extender a lo que ocurre en seres humanos y, por otra parte, es capaz de expresar endógenamente EAAT2, el nombre que recibe GLT-1 en humanos.

Como la línea celular SH-SY5Y no es fácil de transfectar con varios plásmidos a la vez, optamos por generar líneas estables de

SH-SY5Y que sobreexpresasen o bien laforina o bien malina. Estas líneas celulares estables se transfectaron con un plásmido que codificaba la proteína del complejo laforina-malina que faltaba: la línea estable de laforina, con pCMV-HA-malina y la línea estable de malina, con pCMV-HA-laforina. A las 24 horas de la transfección, las células se marcaron en la superficie con anticuerpo primario anti-EAAT2 y secundario anti-ratón conjugado a PE y se analizó su fluorescencia por citometría de flujo. Además, una placa transfectada en paralelo se lisó con tampón RIPA y se analizó por *western blot* para comprobar que la sobreexpresión había funcionado.

En la **Figura 14a** observamos cómo la sobreexpresión de HA-laforina y HA-malina ha funcionado correctamente y cómo los niveles de expresión de ambas proteínas son similares aún si una de ellas está expresada establemente y la otra no. Además, se observa también que no hay cambio en la cantidad total de EAAT2 cuando sobreexpresamos laforina y malina. En el apartado **b** de la misma figura podemos observar cómo la sobreexpresión de laforina y malina induce un aumento estadísticamente significativo en la localización de EAAT2 en la superficie de hasta 3,5 veces. Estos resultados concuerdan con la hipótesis de que laforina y malina juegan un papel en la regulación de la localización subcelular de EAAT2, también en células humanas. En la figura se representan los datos del total de experimentos, independientemente de si las células eran estables para laforina o para malina, ya que los resultados eran similares.

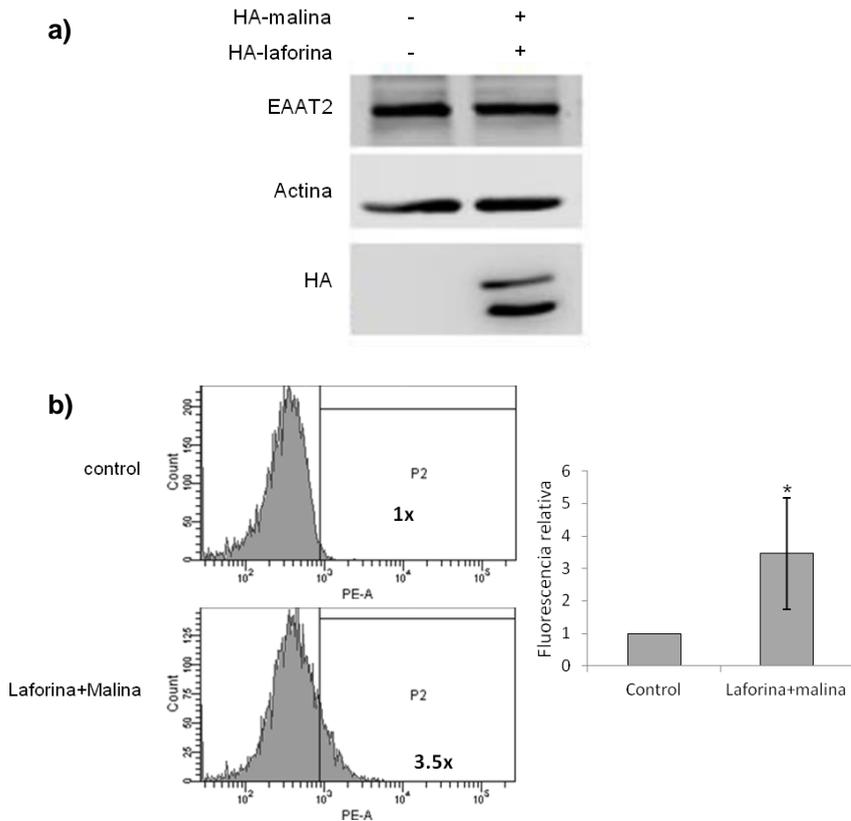


Figura 14. La sobreexpresión de laforina y malina en células SH-SY5Y provoca el aumento de EAAT2 en la superficie celular. **a)** *Western blot* de lisados de SH-SY5Y (30 μ g de proteína) que sobreexpresan laforina y malina, una de ellas de forma estable (en este caso laforina). La sobreexpresión de laforina-malina no afecta los niveles de totales de EAAT2. **b)** Análisis de los niveles de EAAT2 en la superficie de SH-SY5Y por citometría de flujo. En el histograma superior se representa la fluorescencia asociada a los niveles de EAAT2 expresado en la superficie de células SH-SY5Y control (PE-A) respecto al número de células (count) y en el inferior la de células SH-SY5Y que sobreexpresan laforina de forma estable y malina de forma transitoria. Los resultados se obtuvieron utilizando el *software* proporcionado por BD Biosciences. A la derecha, un gráfico de barras representa los niveles de fluorescencia relativa media de las SH-SY5Y con y sin sobreexpresión de laforina-malina de tres experimentos diferentes, donde se ve un incremento de EAAT2 en la superficie estadísticamente significativo asociado a la sobreexpresión de laforina-malina. Las barras representan la desviación estándar (*= p-valor<0.05; test t-Student).

- 1.6- El inhibidor de dinamina *dynasore* produce la acumulación de GLT-1 en la membrana de los astrocitos.

Como todos nuestros resultados apuntaban a una implicación del complejo laforina-malina en la regulación de la localización de GLT-1 en la membrana plasmática, consideramos interesante estudiar los mecanismos moleculares de esta regulación para saber en qué paso podía estar participando dicho complejo.

Los niveles de GLT-1 en la membrana están determinados por el equilibrio entre la llegada de GLT-1 a la membrana y la endocitosis del transportador. La endocitosis de la mayoría de proteínas del sistema nervioso es dependiente de dinamina, por lo que inhibir esta GTPasa con el compuesto *dynasore* puede ser una herramienta útil para saber si es la llegada a la membrana o la endocitosis la que está afectada en los astrocitos *Epm2b*^{-/-}.

En este ensayo, añadimos *dynasore* a placas de cultivo de astrocitos *Epm2b*^{+/+} y *Epm2b*^{-/-}. Como control se añadió DMSO a otras placas de astrocitos *Epm2b*^{+/+} y *Epm2b*^{-/-}. Tras una incubación de media hora a 37°C, todas las muestras fueron marcadas con anticuerpo primario anti-EAAT2 y anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con PE sin ser permeabilizadas, tras lo cual se analizaron por citometría de flujo para valorar los niveles medios de fluorescencia asociada a GLT-1 por célula.

Como se aprecia en el gráfico de barras de la **Figura 15a**, la adición de *dynasore* al medio provocaba un aumento muy significativo de la fluorescencia asociada a GLT-1 de la superficie celular tanto en astrocitos *Epm2b*^{+/+} como *Epm2b*^{-/-}. Esto demuestra que GLT-1 se

acumula en la membrana como consecuencia del bloqueo de la endocitosis dependiente de dinamina. Durante la realización de estos ensayos observamos que la adición de DMSO al medio disminuía la presencia de GLT-1 en la superficie celular de astrocitos con respecto a los niveles sin tratar. Esta disminución hacía que los niveles de GLT-1 en la superficie de estos astrocitos control cuando se añadía DMSO fuesen similares a los encontrados en los astrocitos *Epm2b*^{-/-} (ver sección 1.3 de Resultados). Esto sugería que la adición del disolvente DMSO podía afectar al resultado del experimento y camuflar en parte diferencias entre los dos genotipos.

Una posible explicación a la ausencia de diferencias entre astrocitos *Epm2b*^{+/+} y *Epm2b*^{-/-} en la acumulación de GLT-1 tras la adición de *dynasore* era que los niveles de GLT-1 en la membrana estuviesen saturados tras 30 minutos de efecto del *dynasore*. Esto impediría ver diferencias en el GLT-1 superficial entre astrocitos *Epm2b*^{+/+} y *Epm2b*^{-/-} tanto si existiese una ralentización en la llegada de GLT-1 a la membrana plasmática en astrocitos *Epm2b*^{-/-} como si se diese una aceleración de la endocitosis de GLT-1 en los astrocitos modelo de la enfermedad.

Para comprobar cuál de estas rutas se encontraba alterada en astrocitos *Epm2b*^{-/-}, se llevaron a cabo dos experimentos. El primero de ellos pretendía demostrar si la aplicación de *dynasore* a tiempos más cortos provocaba diferencias en la velocidad de acumulación de GLT-1 en la membrana entre el genotipo control y el deficiente en malina. De ser así, podríamos pensar que es la incorporación a la membrana de GLT-1 la que se encontraría disminuida en astrocitos *Epm2b*^{-/-} frente a los *Epm2b*^{+/+}. Para ello,

añadimos *dynasore* a diferentes tiempos (0 minutos, 1 minuto, 10 minutos y 30 minutos) a astrocitos *Epm2b+/+* y *Epm2b-/-*, los marcamos con anticuerpo anti-EAAT2 y anticuerpo secundario anti-ratón conjugado a PE y comprobamos la fluorescencia por citometría de flujo. No se encontraron diferencias significativas en los niveles de GLT-1 en la membrana entre los dos genotipos a ningún tiempo de tratamiento y en ambos casos los niveles de GLT-1 en la membrana aumentaban (**Figura 15b**). El efecto del *dynasore* era tan inmediato que la máxima acumulación de GLT-1 se daba en el primer minuto, sugiriendo una incorporación similar de GLT-1 a la membrana plasmática en ambos genotipos.

En segundo lugar, se aprovechó que el efecto del *dynasore* es reversible para comprobar si el problema se encontraba en la endocitosis del transportador. Una célula que ha sido tratada con *dynasore* recupera su capacidad de endocitar utilizando la dinamina cuando el *dynasore* se elimina del medio. Para ello se añadió *dynasore* a astrocitos *Epm2b+/+* y *Epm2b-/-* durante 60 minutos con el fin de acumular GLT-1 en la membrana. A continuación, se retiró el producto, se añadió medio de cultivo sin *dynasore* y se fueron recogiendo muestras a diferentes tiempos (0, 5 y 15 minutos desde la eliminación del *dynasore* del medio), para ver cuánto tardaba en endocitarse el transportador que se había acumulado en presencia del producto. Se observó una tendencia de los astrocitos *Epm2b-/-* a endocitar más rápidamente GLT-1 que los astrocitos *Epm2b+/+*, ya que en las células con el genotipo *Epm2b-/-*, la fluorescencia asociada a GLT-1 disminuía más rápidamente que en las *Epm2b+/+*. Sin embargo, las diferencias encontradas entre los astrocitos *Epm2b+/+* y *Epm2b-/-* no era estadísticamente significativa a ningún tiempo (**Figura 15c**).

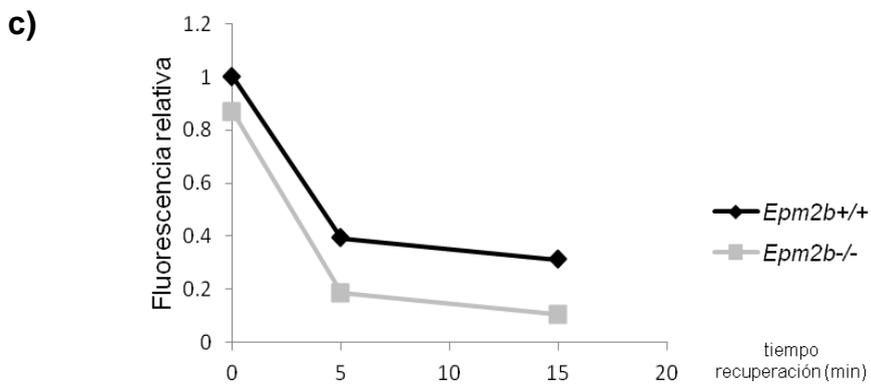
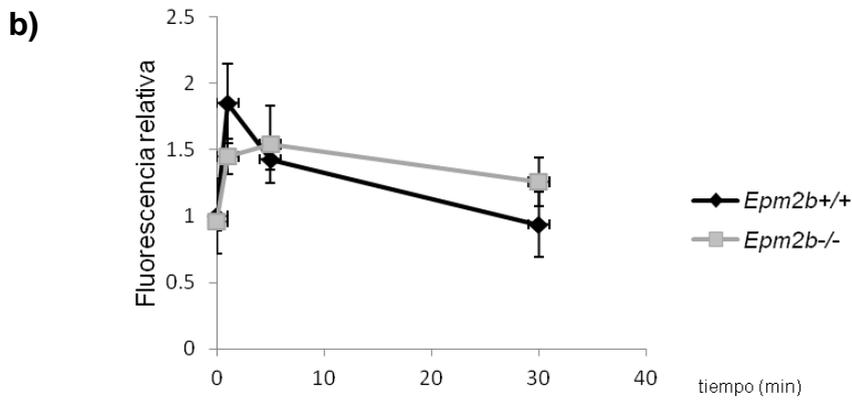
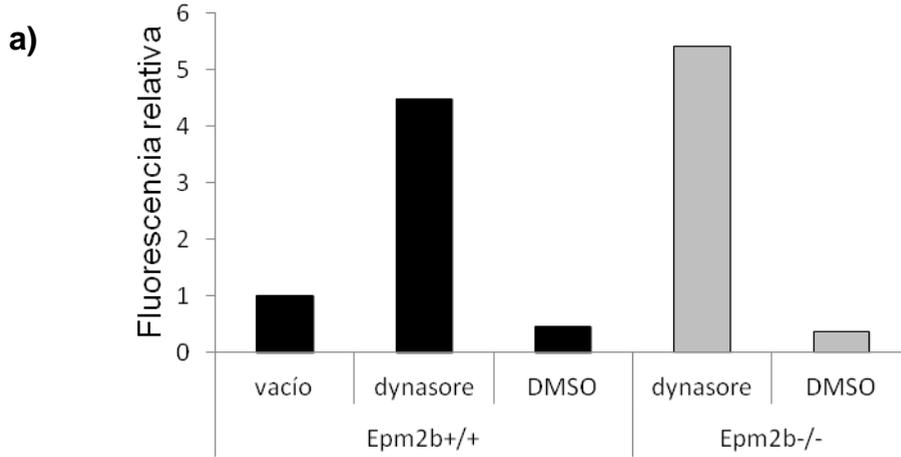


Figura 15. a) La adición de *dynasore* induce la acumulación de GLT-1 en la membrana celular tanto en astrocitos *Epm2b*^{-/-} como en *Epm2b*^{+/+}. El gráfico de barras muestra la fluorescencia relativa de PE-A en presencia de *dynasore* o DMSO para el genotipo *Epm2b*^{+/+} (negro) y *Epm2b*^{-/-} (gris). Se considera fluorescencia igual a 1 la fluorescencia hallada en astrocitos *Epm2b*^{+/+} en ausencia de *dynasore* o DMSO. **b)** Acumulación de GLT-1 en la superficie de astrocitos *Epm2b*^{+/+} (negro) y *Epm2b*^{-/-} (gris) a diferentes tiempos. Se representa la fluorescencia relativa respecto al tiempo transcurrido desde la aplicación de *dynasore*. Se considera fluorescencia igual a 1 la fluorescencia de cada genotipo a tiempo 0. **c)** Recuperación de los niveles de GLT-1 en astrocitos *Epm2b*^{+/+} (negro) y *Epm2b*^{-/-} (gris) tras haber aplicado *dynasore* durante una hora y eliminar el reactivo del medio. Se representa la fluorescencia relativa asociada a GLT-1 respecto al tiempo transcurrido desde la eliminación del *dynasore* del medio. Se considera fluorescencia igual a 1 a la obtenida en astrocitos *Epm2b*^{+/+} tras la aplicación de *dynasore* durante una hora. En todos los experimentos los resultados se analizaron con el software FlowJo y se llevó a cabo un test ANOVA para dos factores cruzados.

Por lo tanto, estos ensayos apuntan a una posible endocitosis acelerada de GLT-1 en astrocitos *Epm2b*^{-/-}, que debería estudiarse con más profundidad y por diferentes metodologías. Por otra parte, hay que tener en cuenta que la utilización de *dynasore* para evaluar la dinámica de GLT-1 en la internalización o incorporación a la membrana podría no ser la más adecuada ya que el disolvente en el que se encuentra, DMSO, afecta a la localización del transportador en la superficie celular.

2. Laforina y malina participan en la regulación de EAAT2 por ubiquitinación.

2.1- Las células Hek293 como modelo de endocitosis de EAAT2.

En nuestro afán por conocer los mecanismos moleculares que conducen a una disminución de los niveles de GLT-1 en la membrana plasmática en células modelo para la enfermedad de Lafora, necesitábamos realizar ensayos con un gran número de células y transfectar varios plásmidos a la vez, por lo que los modelos celulares utilizados hasta este momento, astrocitos primarios corticales y células de neuroblastoma SH-SY5Y, resultaban inadecuados. Las células Hek293, en cambio, son células embrionarias de riñón humano que presentan una alta tasa de proliferación y pueden ser fácilmente transfectadas, por lo que eran el modelo ideal para llevar a cabo dichos ensayos. No obstante, fue necesario comprobar que en este nuevo modelo celular se reproducía lo descrito anteriormente sobre la regulación subcelular de EAAT2.

Para ello, se silenció la expresión de la proteína laforina mediante la utilización del plásmido p-Super-Laforina, que expresaba un RNA de interferencia (RNAi) complementario al mRNA que codifica laforina. Este mecanismo, que permite silenciar la expresión de la proteína, ya había sido utilizado previamente en el laboratorio (Vernia et al., 2009a). El citado plásmido expresa adicionalmente la proteína GFP, por lo que las células que están transfectadas pueden ser seleccionadas por fluorescencia. Se transfectó también el plásmido pCDNA-EAAT2, ya que este transportador no presenta una

expresión endógena muy elevada en células Hek293. Se analizaron los niveles de EAAT2 en la membrana plasmática mediante citometría de flujo seleccionando específicamente las células que expresaban GFP y se encontró que la fluorescencia media asociada a los niveles de EAAT2 en superficie se veía disminuida en las células en las que se había silenciado laforina (**Figura 16**). En el histograma de la **Figura 16a** se aprecia que dado un mismo nivel de fluorescencia asociada a EAAT2 (PE-A), hay más células control (rojo) que células con la laforina silenciada (azul). Además, la cuantificación de la fluorescencia relativa mostrada en el gráfico ratifica este resultado, obteniéndose un 23% menos de fluorescencia en las células silenciadas. Por lo tanto, el silenciamiento de laforina en células Hek293 reproduce lo encontrado en astrocitos primarios. Se concluyó entonces que las células Hek293 podían ser un buen modelo para realizar ensayos relacionados con la regulación de EAAT2 a través del complejo laforina-malina.

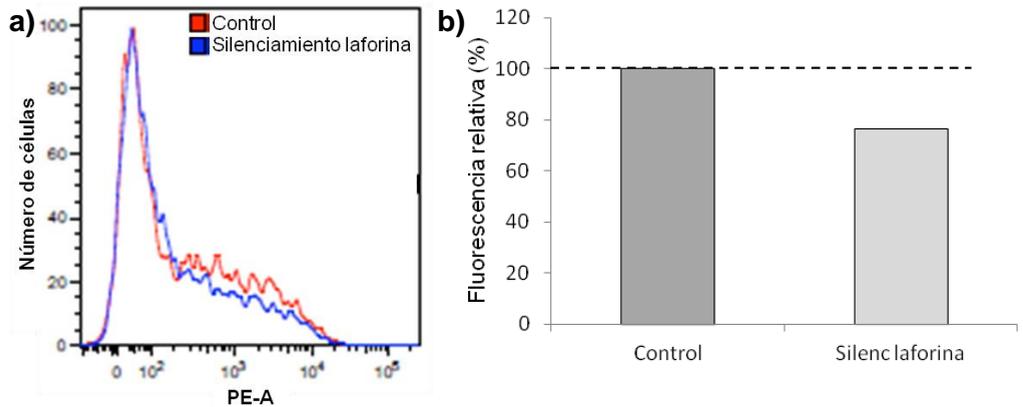


Figura 16. El silenciamiento de laforina en células Hek293 provoca una disminución de los niveles de EAAT2 superficiales. **a)** Histograma que muestra los niveles de fluorescencia asociados a la presencia de EAAT2 en superficie (PE-A) respecto al número de células. La línea roja corresponde al control y la azul a las células en las que se ha silenciado laforina. En el histograma se muestran las células que expresaban el plásmido GFP. Los datos se analizaron con el software FlowJo. **b)** Gráfico de barras que muestra la fluorescencia relativa de las células con el silenciamiento de laforina respecto al control.

2.2- El complejo laforina-malina afecta a la ubiquitinación de EAAT2, provocando cambios en su solubilidad en detergentes no iónicos.

Se conoce que el tráfico de EAAT2 entre orgánulos, al igual que en el caso de otros transportadores, se regula por ubiquitinación (ver Introducción). Dado que laforina y malina forman un complejo capaz de ubiquitinar diferentes sustratos, quisimos comprobar si la ubiquitinación de EAAT2 variaba cuando sobreexpresábamos el complejo laforina-malina.

Para ello, utilizamos una técnica de cromatografía de afinidad en la que se sobreexpresa un plásmido que codifica una ubiquitina fusionada a una cola de histidinas. De este modo, las proteínas que se etiqueten con esta molécula se unirán a la resina de afinidad. Además, sobreexpresamos EAAT2 (el sustrato de la reacción) y laforina y malina (ya sea juntas o de manera individual). Como control positivo de ubiquitinación de EAAT2 utilizamos la sobreexpresión de Nedd4.2, una E3 ubiquitín-ligasa responsable de la ubiquitinación de EAAT2 (ver Introducción). La ubiquitinación de EAAT2 se analizó mediante *western blot* revelando con un anticuerpo primario anti-EAAT2. Además, se comprobó la expresión de las diferentes proteínas en el extracto crudo.

El resultado obtenido (**Figura 17**) fue inesperado, ya que la ubiquitinación de EAAT2 se encontraba disminuida cuando se introducía malina o el complejo laforina-malina (calles 4 y 5) respecto a cuando no se añadía ningún elemento del complejo (calle 2). Además, la coexpresión de Nedd4.2 no permitía rescatar la inhibición de la ubiquitinación de EAAT2 por el complejo laforina-malina (calle 7).

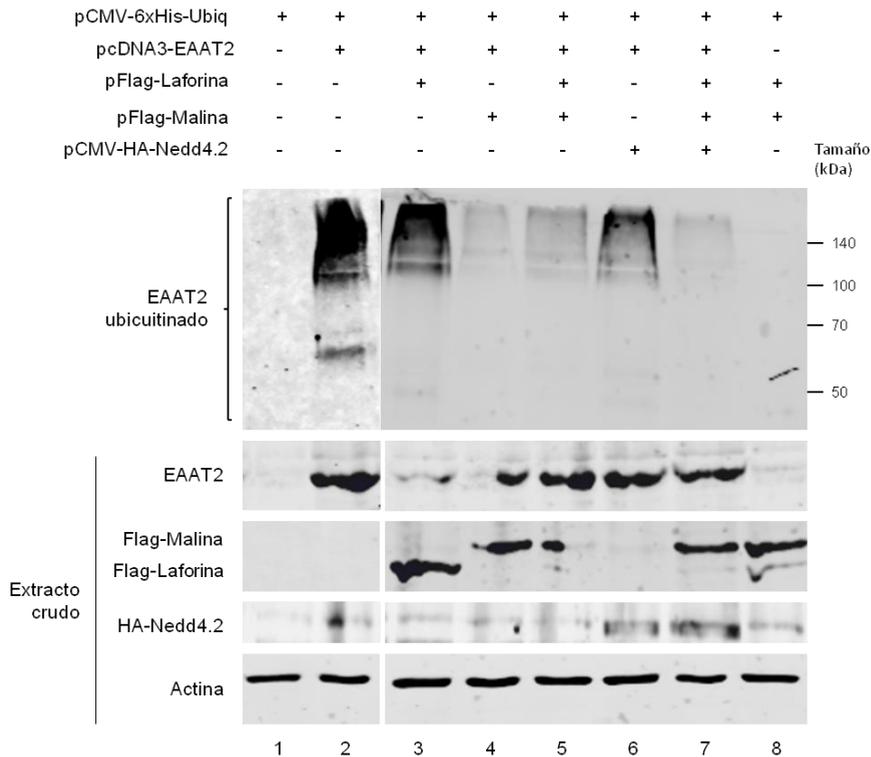


Figura 17. La ubiquitinación de EAAT2 soluble está disminuida en células que sobreexpresan laforina y malina. Células Hek293 fueron transfectadas con los plásmidos indicados. Las proteínas ubiquitinadas se purificaron por cromatografía de afinidad como se describe en Material y Métodos. Las proteínas purificadas se analizaron por *western blot* utilizando anticuerpos anti-EAAT2. Los extractos crudos (30 μ g de proteína) se analizaron también por *western blot* utilizando los siguientes anticuerpos: anti-EAAT2, anti-flag (para detectar malina y laforina), anti-HA (para detectar Nedd4.2) y anti-actina como control de carga. El panel superior muestra las proteínas ubiquitinadas.

Ante este resultado inesperado y dado que EAAT2 es una proteína integral de membrana, se decidió realizar un ensayo de cromatografía de afinidad utilizando un detergente no iónico (Nonidet-P40) en el tampón de lisis con el fin de favorecer la solubilización de la proteína.

Resultados

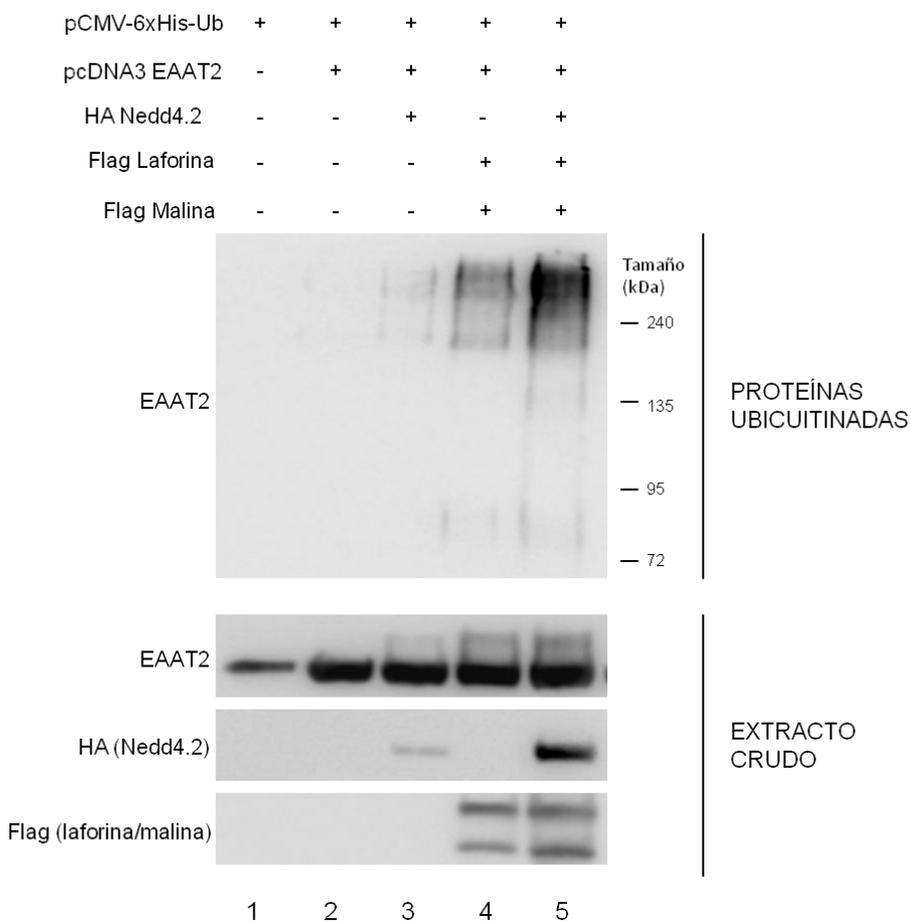


Figura 18. La ubiquitinación de EAAT2 aumenta en células que sobreexpresan laforina y malina. Células Hek293 fueron transfectadas con los plásmidos indicados y lisadas en presencia de cloruro de guanidinio 6M y Nonidet-P40 al 1%. Las proteínas ubiquitinadas se purificaron por cromatografía de afinidad y fueron analizadas por *western blot*, utilizando anticuerpo primario anti-EAAT2 y anticuerpo secundario anti-ratón conjugado a una molécula fluorescente. Los extractos crudos (30 μ g de proteína) fueron asimismo analizados por *western blot* utilizando los siguientes anticuerpos: anti-EAAT2 y anti-flag (para detectar laforina y malina) y anti-HA (para detectar Nedd4.2). Las proteínas ubiquitinadas se muestran en el panel superior.

Los resultados de este nuevo ensayo (**Figura 18**) indicaron que los niveles de ubiquitinación de EAAT2 aumentaban en presencia de Nedd4.2 (control positivo, calle 3 respecto de calle 2). En estas condiciones laforina y malina eran capaces de ubiquitinar a EAAT2 (calle 4). Por otra parte, en presencia tanto de laforina-malina como de Nedd4.2, EAAT2 aparecía aún más ubiquitinada (calle 5). Todo esto parece indicar que el complejo laforina-malina sí es capaz de inducir un aumento de la ubiquitinación de EAAT2 y que esta proteína modificada se encuentra en fracciones insolubles. Por lo tanto, la modificación inducida por el complejo laforina-malina sólo puede ser detectada tras aplicar detergentes no iónicos al extracto proteico y no en condiciones como las utilizadas en la **Figura 17**.

A continuación, se realizó un ensayo de ubiquitinación en presencia de Nonidet-P40 utilizando GLT-1 como sustrato en lugar de EAAT2 para confirmar que lo observado en la proteína humana ocurría también en la proteína de ratón. Los resultados (**Figura 19**) son similares a los encontrados para EAAT2, ya que aparece un aumento de ubiquitinación de GLT-1 en condiciones de sobreexpresión combinada del complejo laforina-malina y Nedd4-2 (calle 4). Sin embargo, la ubiquitinación dependiente de Nedd4.2 no se aprecia, probablemente porque los niveles de Nedd4.2 sobreexpresado son inferiores (calle 3) o porque la ubiquitinación mediada por esta E3-ubiquitín ligasa es menos eficiente.

Resultados

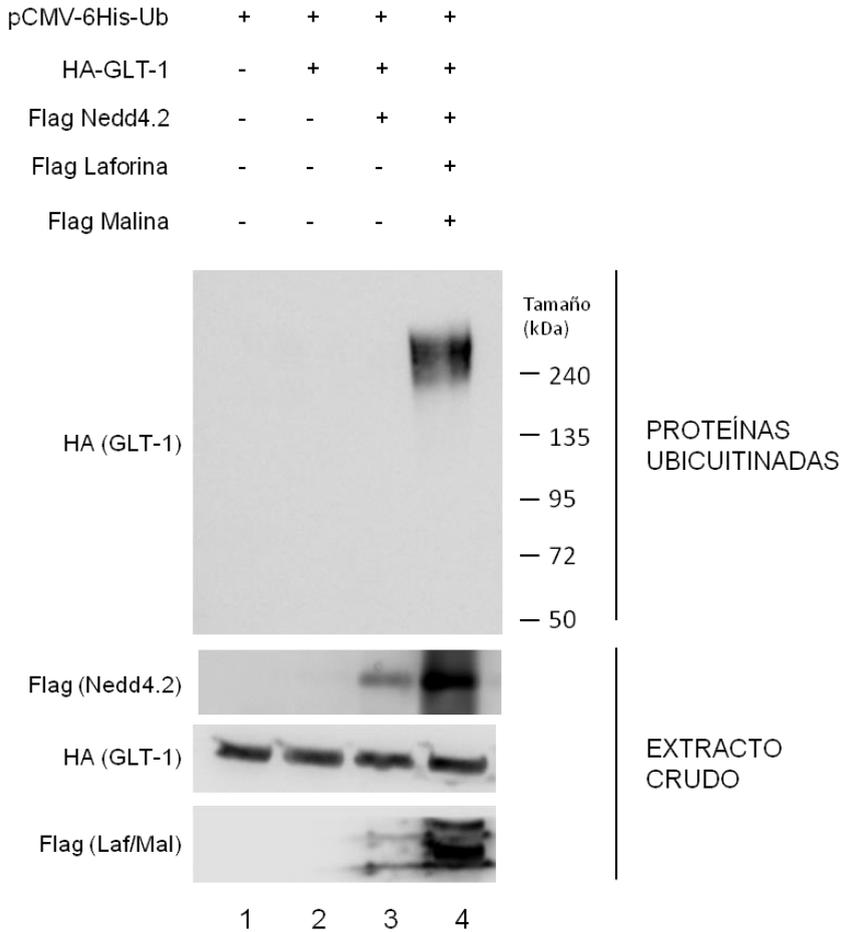


Figura 19. La ubiquitinación de GLT-1 aumenta en presencia de laforina y malina. Células Hek293 fueron transfectadas con los plásmidos indicados y lisadas en presencia de cloruro de guanidinio 6M y Nonidet-P40 1%. Las proteínas ubiquitinadas fueron purificadas mediante cromatografía de afinidad, analizadas mediante *western blot* y reveladas con anticuerpos anti-HA. Los extractos crudos (30 μ g de proteína) se analizaron mediante *western blot* y se utilizaron los siguientes anticuerpos para el revelado: anti-HA (para detectar GLT-1), anti-flag (para detectar Nedd4.2, laforina y malina). El panel superior muestra las proteínas ubiquitinadas y purificadas.

2.3- La ubiquitinación de EAAT2 asociada al complejo laforina-malina no etiqueta a la proteína a degradación proteica.

La ubiquitinación es una modificación post-traducciona que, además de participar en la endocitosis, regula otros procesos celulares. Entre ellos destaca la degradación de proteínas. Para conocer si la ubiquitinación que estábamos observando en EAAT2 servía para etiquetar la proteína para degradación, realizamos un nuevo ensayo de ubiquitinación en presencia y ausencia de inhibidores del proteasoma (MG132) e inhibidores de la degradación lisosomal (NH₄Cl y leupeptina). Si la ubiquitinación dirigiese la proteína a degradación, esperaríamos ver un aumento de la cantidad de proteína en las muestras en las que se utilizan inhibidores respecto a aquellas que no se han tratado con ellos.

En la **Figura 20** se aprecia que no existen diferencias importantes en los niveles de ubiquitinación de EAAT2 cuando se añaden o no inhibidores de la degradación de proteínas. Esto indica que el destino de EAAT2 ubiquitinado no es la degradación proteica, ya que de ser así la marca sería menor en ausencia de inhibidores. Como se observa en la **Figura 20** y en consonancia con los resultados mostrados en la **Figura 18**, la ubiquitinación de EAAT2 es máxima cuando se expresan laforina-malina y Nedd4-2 conjuntamente.

Resultados

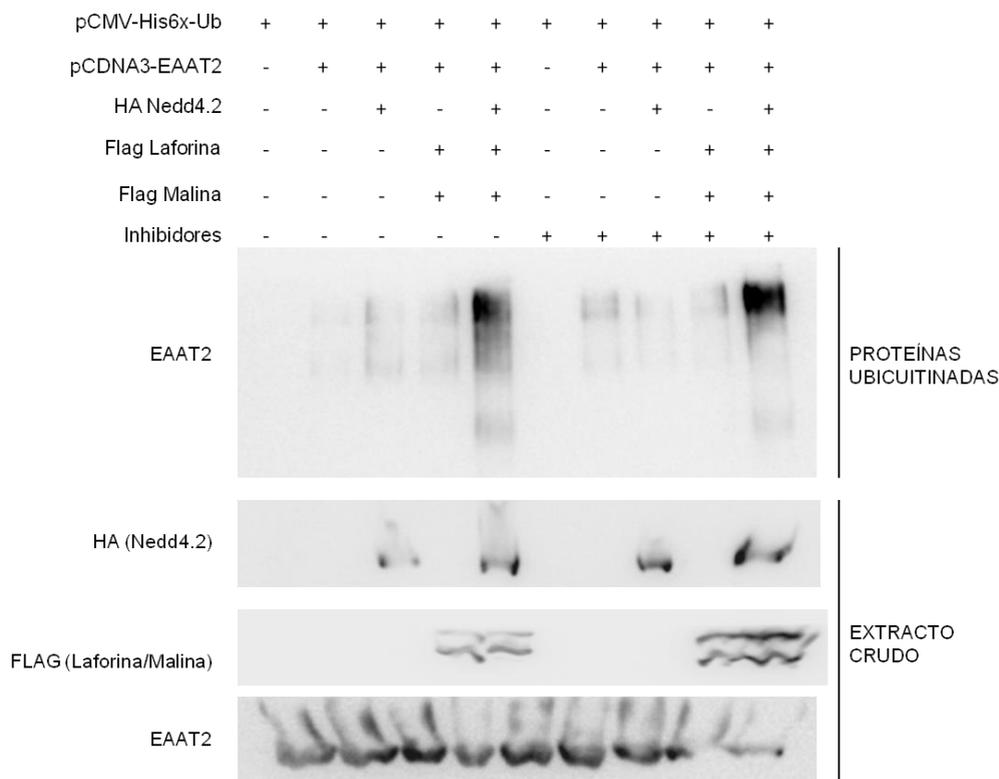


Figura 20. La ubiquitinación de EAAT2 en células que sobreexpresan laforina-malina no se ve alterada por la presencia o ausencia de inhibidores de la degradación proteica. Células Hek293 fueron transfectadas con los plásmidos indicados, la mitad de ellas tratadas con MG132 (10 μ M), leupeptina (100 μ M) y NH₄Cl (20 mM) durante 4 horas y la otra mitad sin este tratamiento, lisadas en presencia de Nonidet-P40 1% y cloruro de guanidinio 6M. Las proteínas ubiquitinadas fueron purificadas mediante una cromatografía de afinidad y analizadas mediante *western blot*, revelado con anticuerpos anti-EAAT2 y anti-ratón conjugado a HRP. Los extractos crudos se analizaron también por *western blot* utilizando anticuerpos anti-HA (para detectar Nedd4.2), anti-flag (para detectar laforina y malina) y anti-EAAT2. El panel superior muestra las proteínas ubiquitinadas.

2.4- Relación entre el complejo laforina-malina y Nedd4.2.

Con el fin de comprender mejor cómo el complejo laforina-malina estimula la ubiquitinación de EAAT2, nos decidimos a abordar la relación que podía existir entre dicho complejo y la única proteína capaz de ubiquitinar EAAT2 descrita hasta la fecha: Nedd4.2. Para ello, realizamos diferentes ensayos que profundizaban en el papel que laforina o malina podían desempeñar en la función biológica de Nedd4.2. Además, muchos de estos ensayos se ampliaron incluyendo a la proteína Nedd4, una proteína paróloga de Nedd4.2 con la que comparte funciones y sustratos.

2.4.1- Nedd4.2 no se ubiquitina por laforina-malina.

En primer lugar, dado que laforina y malina forman un complejo con actividad E3-ubiquitin ligasa, quisimos saber si Nedd4.2 era ubiquitinada por laforina-malina. Para ello llevamos a cabo un ensayo con células Hek293 transfectadas con ubiquitinas con colas de histidinas, laforina-malina y Nedd4.2, donde se analizó la presencia de Nedd4.2 ubiquitinada en ausencia y presencia de laforina-malina.

La **Figura 21** muestra el *western blot* resultante de ese ensayo. En primer lugar se ve que el control positivo de ubiquitinación ha funcionado, ya que cuando se utilizó anticuerpo anti-flag, que detectaba laforina o malina, sí aparecía la escalera de proteínas de diferente peso molecular característica de un patrón de ubiquitinación, demostrando que laforina y malina se ubiquitinan por el complejo laforina-malina. No obstante, no había ninguna señal de

Resultados

ubiquitinación cuando revelamos con anticuerpo anti-HA que reconoce a Nedd4.2.

Además, también se utilizó anticuerpo anti-Nedd4.2, capaz de reconocer a la proteína endógena, y apareció una banda en la fracción ubiquitinada. No obstante, esta banda aparecía en todas las calles por lo que podría tratarse de una reacción inespecífica.

Utilizamos también un anticuerpo anti-Nedd4 y se obtuvo un resultado similar, ya que no se observó ningún patrón de ubiquitinación asociado a la sobreexpresión de laforina-malina.

Este experimento demuestra que laforina y malina no tienen ningún efecto en la ubiquitinación de Nedd4.2 o Nedd4.

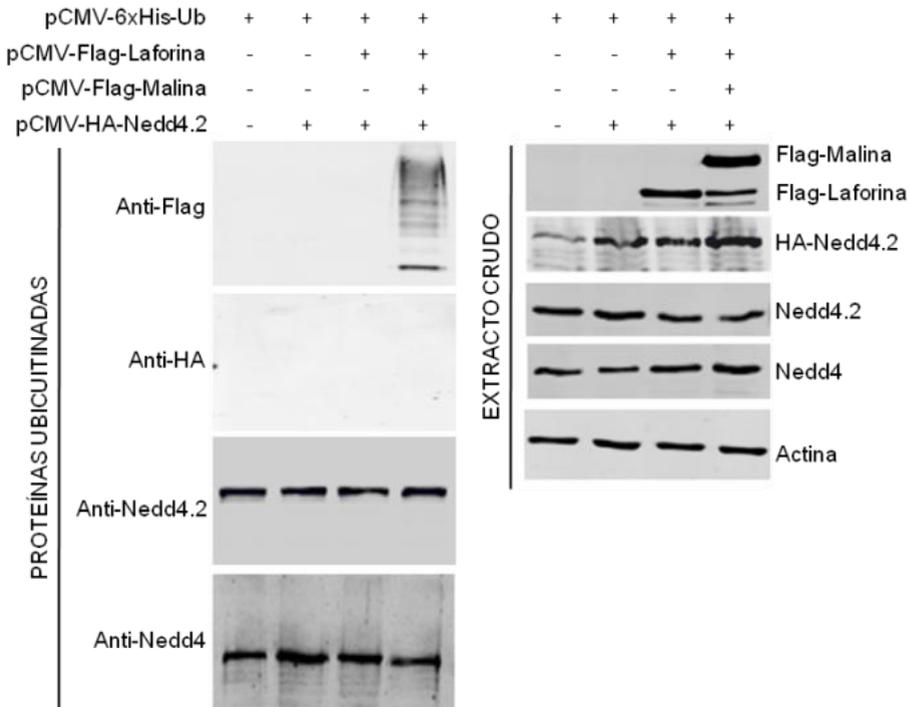


Figura 21. Laforina y malina no ubiquitinan a Nedd4.2 ni a Nedd4. Células Hek293 fueron transfectadas con los plásmidos indicados. Las proteínas ubiquitinadas fueron purificadas mediante una cromatografía de afinidad en presencia de cloruro de guanidinio 6M y analizadas mediante *western blot*, utilizando anticuerpos anti-flag (para detectar laforina y malina), anti-HA (Nedd4.2), anti-Nedd4.2 y anti-Nedd4. Los extractos crudos (30µg) se analizaron también por *western blot* utilizando anticuerpos anti-flag (para detectar laforina y malina), anti-HA (para detectar Nedd4.2), anti Nedd4, anti-Nedd4.2 y anti-actina como control de carga.

2.4.2- Laforina y malina no interaccionan con Nedd4.2.

Para continuar indagando en la relación entre Nedd4.2 y el complejo laforina-malina, quisimos comprobar si laforina o malina eran capaces de interaccionar físicamente con Nedd4.2. Para ello, llevamos a cabo una coinmunoprecipitación (CoIP) en células Hek293 sobreexpresando HA-Nedd4.2, HA-malina y Flag-laforina. Se inmunoprecipitó laforina con anticuerpo anti-flag y se analizó por *western blot* si Nedd4.2 estaba también presente en el inmunoprecipitado. La **Figura 22** muestra el resultado de la CoIP donde se ve que en ningún caso Nedd4.2 aparece en el inmunoprecipitado, indicando ausencia de interacción, mientras que malina sí que es purificada, demostrando la efectividad de la técnica.

Resultados

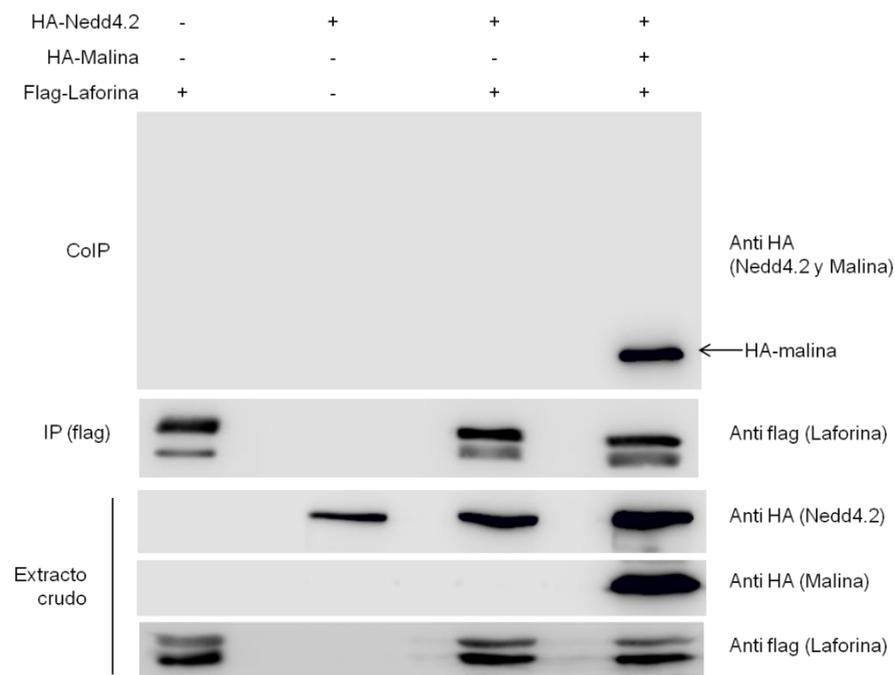


Figura 22. Laforina y malina no interaccionan con Nedd4.2 mediante CoIP en células de mamífero. Células Hek293 fueron transfectadas con los plásmidos que se indican, lisadas y se llevó a cabo la inmunoprecipitación de laforina con anti-flag para purificar laforina. El purificado se analizó mediante *western blot* y se reveló con anti-HA (para detectar Nedd4.2 y malina). Los extractos crudos también se analizaron por *western blot* (parte inferior de la figura) y se revelaron con anti-HA y anti-flag.

2.4.3- La vida media de Nedd4 o Nedd4.2 no se ve afectada por la sobreexpresión de laforina y malina.

Uno de los parámetros que puede alterarse en las proteínas por efecto de la ubiquitinación por laforina y malina es la vida media que éstas tienen. Por ello, se planteó la posibilidad de que el complejo laforina-malina tuviese un papel en la estabilidad de Nedd4 o Nedd4.2. Para ello analizamos la vida media de Nedd4 y Nedd4.2 endógena en células Hek293 en presencia y ausencia de laforina-

malina sobreexpresada. Para ello, se transfectaron células Hek293 con Flag-laforina y Flag-malina y se trataron con cicloheximida, un inhibidor de la síntesis proteica. Una vez añadida la cicloheximida, el cambio en los niveles de proteína depende exclusivamente del ritmo de degradación de la proteína. Tras el tratamiento se recogieron muestras a diferentes tiempos (0, 4, 7, 10, 18 y 24 horas), se analizaron mediante *western blot* y se cuantificaron para comprobar si la degradación de Nedd4 y Nedd4.2 había sido más rápida en un caso o en otro. Los niveles de actina se utilizaron como control de carga. Los resultados no revelaron diferencias en la vida media de Nedd4 o Nedd4.2 cuando se sobreexpresaba laforina y malina (**Figura 23**).

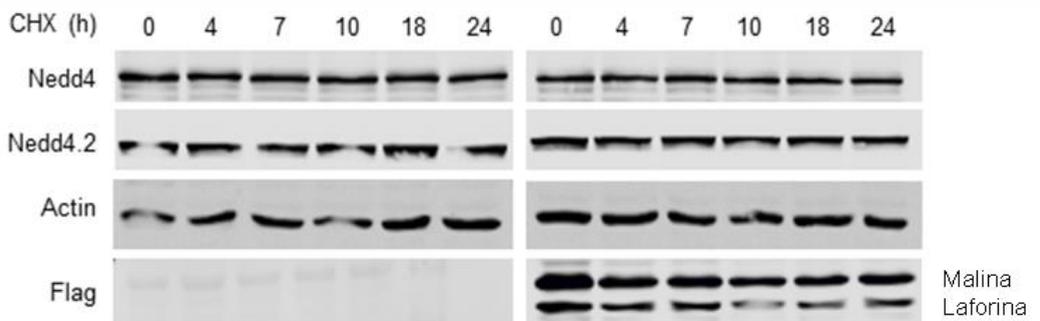


Figura 23. La vida media de Nedd4.2 o Nedd4 no se ve alterada por la sobreexpresión de laforina o malina. Células Hek293 fueron transfectadas con plásmido vacío (paneles izquierda) o con pCMV-Flag-laforina y pCMV-Flag-malina (paneles derecha) y tratadas con cicloheximida (300 μ M) durante diferentes tiempos. Los extractos de células lisadas (30 μ g) se analizaron por *western blot* y se revelaron con anticuerpos anti-Nedd4, anti-Nedd4-2, anti-actina y anti-flag (malina y laforina). Los números en la parte superior indican las horas transcurridas desde el tratamiento con cicloheximida hasta la recogida de las muestras.

2.4.4- La ausencia de laforina o malina incrementa los niveles de Nedd4 en hipocampo de ratones modelo para la enfermedad de Lafora.

Una vez se comprobó que la sobreexpresión del complejo laforina y malina no promovía la ubiquitinación de Nedd4 o Nedd4.2 ni afectaba a su vida media, se quiso comprobar si la ausencia de cualquiera de las proteínas que constituyen el complejo laforina-malina tenía relevancia en la biología de Nedd4 o Nedd4.2. Para ello se llevó a cabo una inmunohistoquímica utilizando anticuerpo anti-Nedd4 en hipocampo de ratones controles, *Epm2a*^{-/-} y *Epm2b*^{-/-} de 12 meses de edad, que nos permitiese valorar los niveles de esta proteína en un modelo de ratón de la enfermedad de Lafora respecto a un control.

En la **Figura 24** se aprecia una mayor marca de Nedd4 (marrón) en el hipocampo de ratones *Epm2a*^{-/-} y *Epm2b*^{-/-}, que resulta aún más intensa en los últimos. Todo esto indicaría que la expresión de Nedd4 está incrementada en el hipocampo de ratones modelo para la enfermedad de Lafora, lo cual podría tener implicaciones en la regulación de GLT-1.

Debido a la ausencia de anticuerpos comerciales capaces de detectar Nedd4.2 en inmunohistoquímica, no se pudieron realizar ensayos similares para conocer los niveles de esta otra proteína en cerebros de ratones modelo para la enfermedad de Lafora.

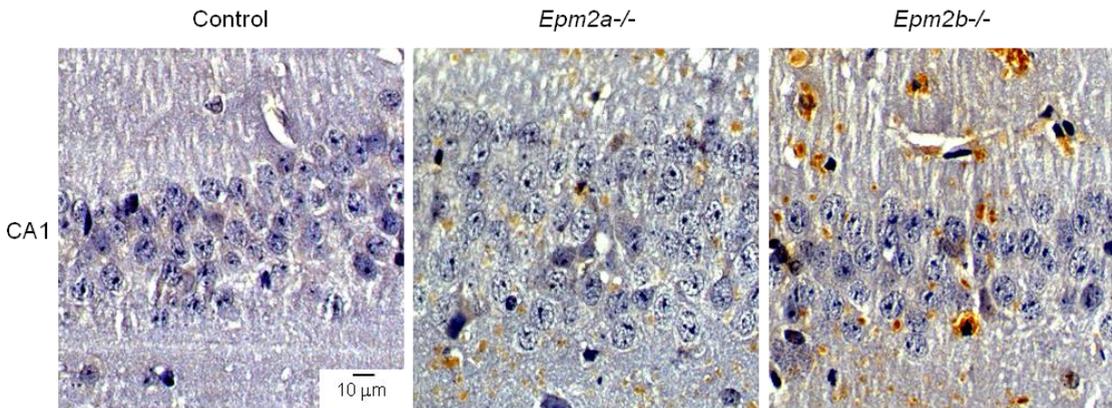


Figura 24. Inmunohistoquímica de Nedd4 en hipocampo de ratones control, *Epm2a-/-* y *Epm2b-/-* de 12 meses de edad. Se llevó a cabo una inmunodetección con el sistema ABC en cortes sagitales de cerebro parafinados de ratones controles, *Epm2a-/-* y *Epm2b-/-* utilizando anticuerpo anti-Nedd4 y contratiñendo con hematoxilina. Las fotos corresponden a la región CA1 del hipocampo donde el color marrón indica la presencia de Nedd4 y el azul marca las estructuras celulares ácidas. Barra: 10 µm.

2.5- El complejo laforina-malina favorece la ubiquitinación de la β -arrestina 1.

Hasta el momento habíamos encontrado un incremento de la ubiquitinación de EAAT2 o GLT-1 en presencia de laforina y malina. Sin embargo, no parecía estar debida a un efecto directo de este complejo sobre Nedd4.2, ya que el complejo era incapaz de interactuar con Nedd4.2 o modificar su estado de ubiquitinación.

Además de Nedd4.2 existen otros elementos esenciales en la ubiquitinación de EAAT2, entre los que destacan las arrestinas. Estas proteínas actúan como andamiaje entre EAAT2 y Nedd4.2, ya que EAAT2 carece de los dominios PY que le permitirían ser

reconocida por Nedd4.2. Las arrestinas actúan por tanto como moléculas adaptadoras permitiendo que EAAT2 entre en contacto con Nedd4.2 y que esta última pueda ejercer su acción.

Entre todas las arrestinas que pueden interaccionar con Nedd4.2, decidimos centrar nuestra atención en la β -arrestina 1 que, hasta la fecha, ha sido la única relacionada con la ubiquitinación de GLT-1 por Nedd4.2 (Ibañez et al., 2016). Por ello, se quiso conocer si el complejo laforina-malina tenía algún efecto en la biología de la β -arrestina 1 que permitiera explicar la modificación observada en el patrón de ubiquitinación de EAAT2 por este complejo.

Lo primero que se comprobó fue si el complejo laforina-malina era capaz de ubiquitinar a la β -arrestina 1. Para ello, se realizó un ensayo de cromatografía de afinidad que permitió valorar la ubiquitinación de la β -arrestina 1 en presencia de laforina-malina. Este ensayo se realizó tanto en presencia como en ausencia de inhibidores, ya que la vida media de la β -arrestina 1 podría estar afectada por la sobreexpresión del complejo laforina-malina. Para ello, el ensayo se realizó en células Hek293 tratadas con inhibidores de la degradación lisosomal y del proteasoma (leupeptina y NH_4Cl y MG132, respectivamente) durante 4 horas y en células sin tratar. Las células se lisaron en presencia de Nonidet-P40 para solubilizar correctamente las proteínas. La **Figura 25** muestra que cuando se sobreexpresa el complejo laforina-malina, se produce un aumento en la ubiquitinación de la β -arrestina 1, indicando que el complejo juega un papel en la regulación de esta proteína por ubiquitinación. La ubiquitinación de β -arrestina 1 que se observa en presencia de inhibidores es mayor que la observada en ausencia de éstos, lo que sería compatible con una degradación de la β -arrestina 1 en

ausencia de inhibidores. Sin embargo, los niveles totales de la proteína en el extracto crudo son muy similares en ausencia o presencia de inhibidores de la degradación proteica, lo que apunta a que el destino mayoritario de la ubiquitinación no es la degradación. Podríamos pensar que, al frenar la degradación proteica, se aumenta y favorece el incremento de ubiquitinación de la β -arrestina 1 por estabilización de algún elemento adicional que desconocemos.

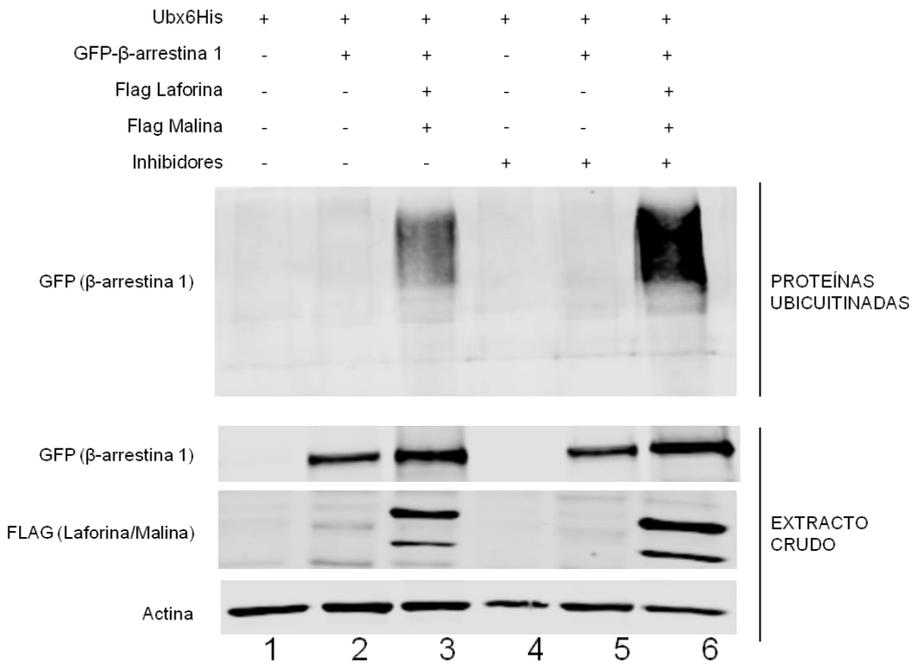


Figura 25. Los niveles de ubiquitinación de la β -arrestina 1 aumentan en presencia del complejo laforina-malina. Células Hek293 fueron transfectadas con los plásmidos indicados. La mitad de las muestras (tres primeras calles) no fueron tratadas con inhibidores de degradación proteica durante cuatro horas (MG132 10 μ M, leupeptina 100 μ M y NH_4Cl 20 mM) y el resto sí (tres últimas calles). Las muestras se lisaron en presencia de Nonidet-P40 y cloruro de guanidinio 6M y las proteínas ubiquitinadas fueron purificadas mediante una cromatografía de afinidad y analizadas mediante *western blot* utilizando anticuerpos anti-GFP (β -arrestina 1) (panel superior). Los extractos crudos (30 μ g) fueron también analizados mediante *western blot* con anticuerpos anti-flag (laforina y malina), anti-GFP (β -arrestina 1) y anti-actina (paneles inferiores).

A continuación, se planteó si el incremento de la ubiquitinación de la β -arrestina 1 tenía alguna consecuencia en los niveles de ubiquitinación de EAAT2 o GLT-1. Para comprobarlo, llevamos a cabo un nuevo ensayo de ubiquitinación en el cual se sobreexpresó EAAT2, el complejo laforina-malina y la β -arrestina 1. Además, también se sobreexpresó Nedd4-2, proteína con la que la β -arrestina 1 interacciona y forma un complejo funcional.

En primer lugar, se analizó el nivel de ubiquitinación de la β -arrestina 1 cuando se expresaban también EAAT2 y Nedd4-2. Como se aprecia en la **Figura 26**, el aumento de la ubiquitinación de la β -arrestina 1 se produce cuando además del complejo laforina-malina se sobreexpresa EAAT2 y Nedd4-2 (calle 6) y no se da en presencia únicamente de EAAT2 y Nedd4-2 (calle 5).

En el mismo ensayo, una vez comprobada la ubiquitinación de la β -arrestina 1, se procedió a analizar los niveles de ubiquitinación de EAAT2 (**figura 27**). Se observó que el incremento de la ubiquitinación de EAAT2 que se da en presencia de laforina, malina y Nedd4-2 (calle 4) no se acentúa al sobreexpresar también la β -arrestina 1 sino al contrario (calle 6). Esto sugiere que o bien la ubiquitinación de la β -arrestina 1 disminuye la ubiquitinación de EAAT2 en presencia de laforina y malina o bien, al ser EAAT2 y la β -arrestina 1 sustratos del complejo laforina-malina, existe una competición por sustrato que hace que EAAT2 no llegue a estar tan ubiquitinada.

Este mismo ensayo se realizó utilizando como sustrato de ubiquitinación la forma murina GLT-1 y se replicó el resultado tanto para la ubiquitinación de la β -arrestina 1 (**Figura 28**) como para la

ubiquitinación de GLT-1 (**Figura 29**), apoyando así los resultados obtenidos.

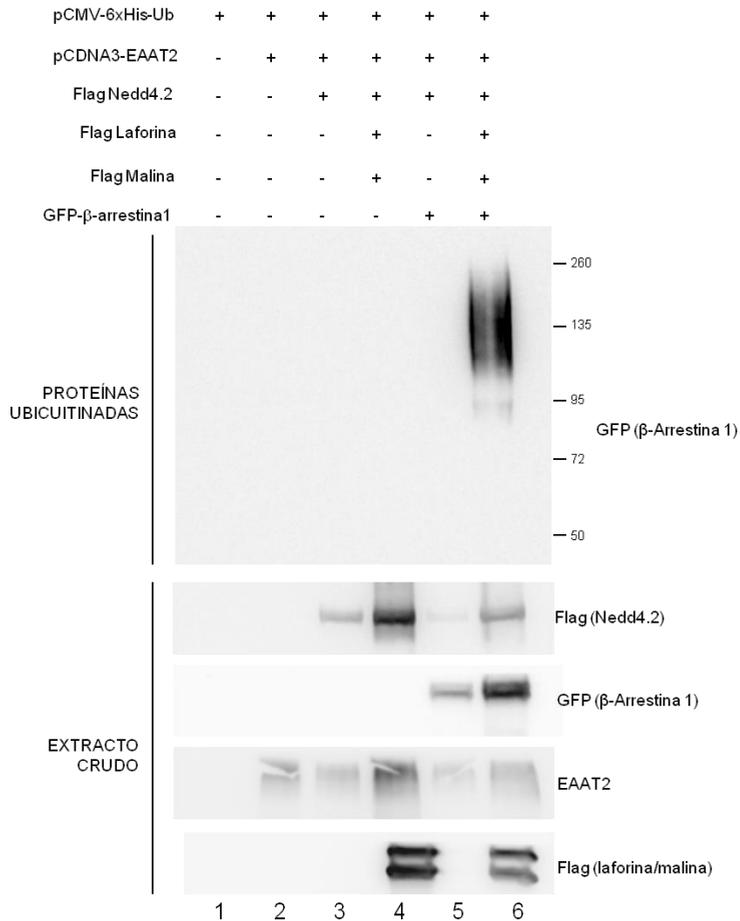


Figura 26. Los niveles de ubiquitinación de β -arrestina 1 están aumentados en presencia de laforina-malina, Nedd4-2 y EAAT2. Células Hek293 fueron transfectadas con los plásmidos indicados, tratadas con MG132 (10 μ M), leupeptina (100 μ M) y NH_4Cl (20 mM) durante 4 horas y lisadas en presencia de Nonidet-P40 y cloruro de guanidinio 6M. Las proteínas ubiquitinadas fueron purificadas mediante cromatografía de afinidad y analizadas por *western blot*, utilizando anticuerpos anti-GFP y anticuerpo secundario anti-conejo unido a HRP. Los extractos crudos (30 μ g) fueron analizados asimismo por *western blot*, utilizando anticuerpos primarios anti-flag (para detectar Nedd4.2, laforina y malina), anti-EAAT2 y anti-GFP (β -arrestina 1). El panel superior corresponde a las proteínas purificadas mediante la cromatografía y los inferiores a las muestras de los extractos crudos.

Resultados

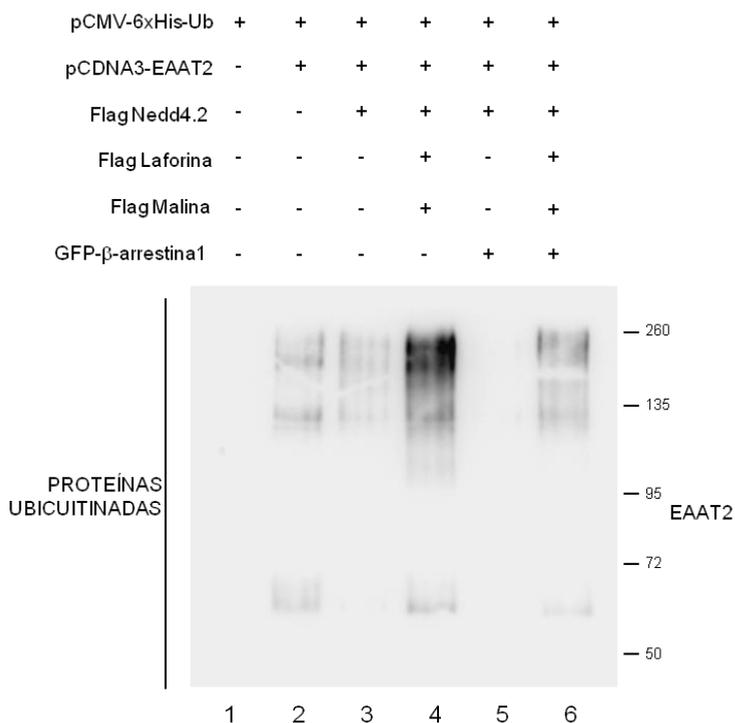


Figura 27. La ubiquitinación de β -arrestina 1 por laforina-malina interfiere con la ubiquitinación de EAAT2. Células Hek293 fueron transfectadas con los plásmidos indicados, tratadas con inhibidores de degradación proteica durante 4 horas y lisadas en presencia de Nonidet-P40 y cloruro de guanidinio 6M. Las proteínas ubiquitinadas fueron purificadas mediante una cromatografía de afinidad y analizadas mediante *western blot* utilizando anticuerpos anti-EAAT2. Los extractos crudos son los mismos que aparecen en la **Figura 26**.

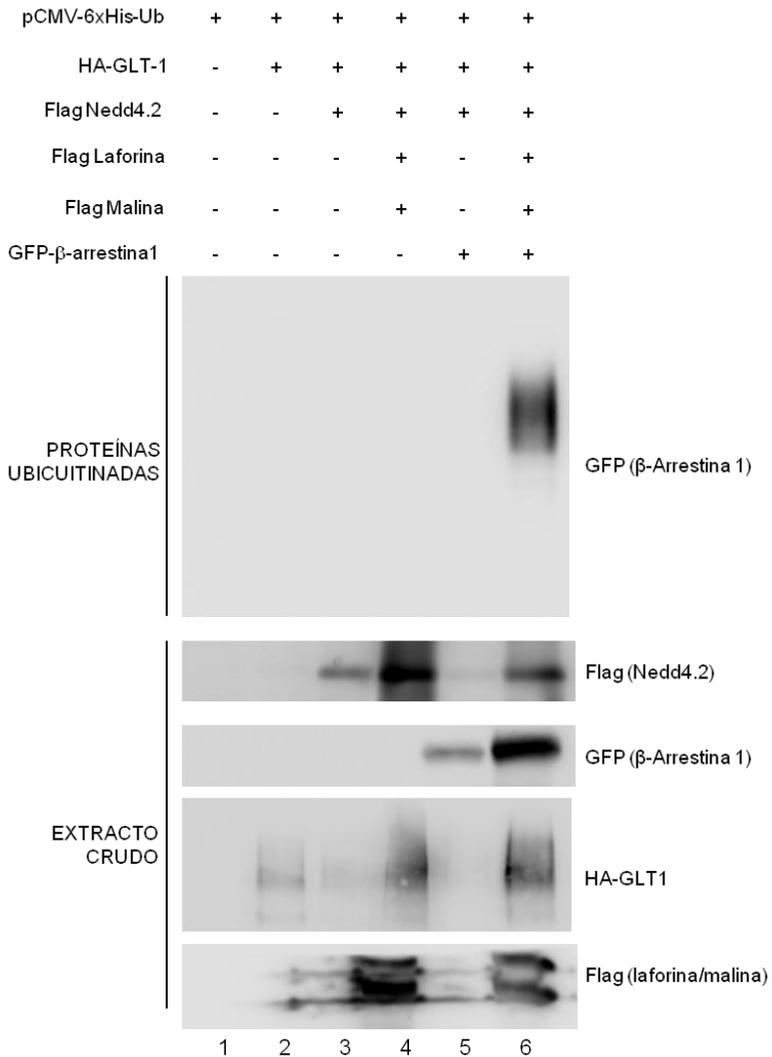


Figura 28. Los niveles de ubiquitinación de β -arrestina 1 son dependientes de laforina-malina. Células Hek293 fueron transfectadas con los plásmidos indicados, tratadas con MG132 (10 μ M), leupeptina (100 μ M) y NH₄Cl (20 mM) durante cuatro horas y lisadas en presencia de Nonidet-P40 y cloruro de guanidinio 6M. Las proteínas ubiquitinadas fueron purificadas mediante cromatografía de afinidad y analizadas por *western blot*, utilizando anticuerpos anti-GFP. Los extractos crudos (30 μ g) fueron analizados asimismo por *western blot*, usando anticuerpos anti-FLAG (Nedd4.2, laforina y malina), HA (GLT-1) y anti-GFP (β -arrestina 1). El primer panel corresponde a las proteínas purificadas mediante la cromatografía y los inferiores a las muestras de los extractos crudos.

Resultados

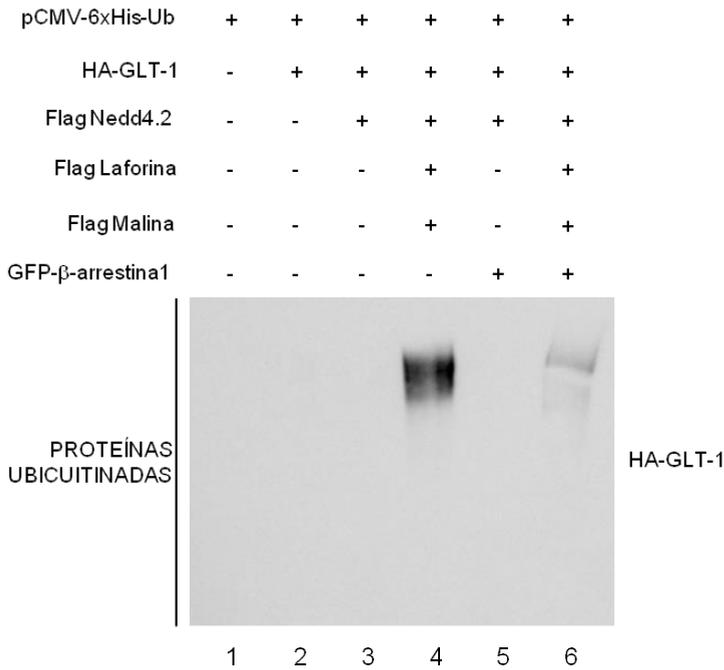


Figura 29. La ubiquitinación de β -arrestina 1 interfiere con la ubiquitinación de GLT-1. Células Hek293 fueron transfectadas con los plásmidos indicados, tratadas con inhibidores de degradación proteica durante 4 horas y lisadas en presencia de Nonidet-P40 y cloruro de guanidinio 6M. Las proteínas ubiquitinadas fueron purificadas mediante una cromatografía de afinidad y analizadas mediante *western blot* utilizando anticuerpos anti-HA (GLT-1) (panel superior). Los extractos crudos son los mismos que los mostrados en la **Figura 28**.

Los resultados mostrados en este apartado sugieren una modificación en el patrón de ubiquitinación de EAAT2/GLT-1 cuando se sobreexpresa el complejo laforina-malina que está relacionado con un cambio en la solubilidad del transportador. Esta modificación postraduccional parece ser independiente de la ubiquitinación que lleva a cabo Nedd4.2 y que ha sido previamente descrita. Todo ello nos invita a pensar que, cuando existe una deficiencia en cualquiera de las dos proteínas que conforman el complejo laforina-malina como ocurre en la enfermedad de Lafora, la ubiquitinación normal

del transportador EAAT2/GLT-1 se encontrará alterada, lo cual tendría consecuencias en su solubilidad y, como consecuencia, en su funcionalidad.

3. La homeostasis del glutamato está afectada en ratones *Epm2b*^{-/-}.

Una vez obtenidos los resultados sobre la biología molecular del transportador GLT-1 tanto en astrocitos primarios como en líneas celulares, decidimos comprobar si las alteraciones en la localización subcelular y en las modificaciones post-traduccionales de GLT-1 observadas tenían consecuencias fisiopatológicas relevantes en modelos animales de la enfermedad de Lafora. Para ello, se eligió el modelo de ratón *Epm2b*^{-/-} ya que los resultados de trabajos previos mostraban un fenotipo más severo tanto en parámetros patológicos de la enfermedad como en neuroinflamación.

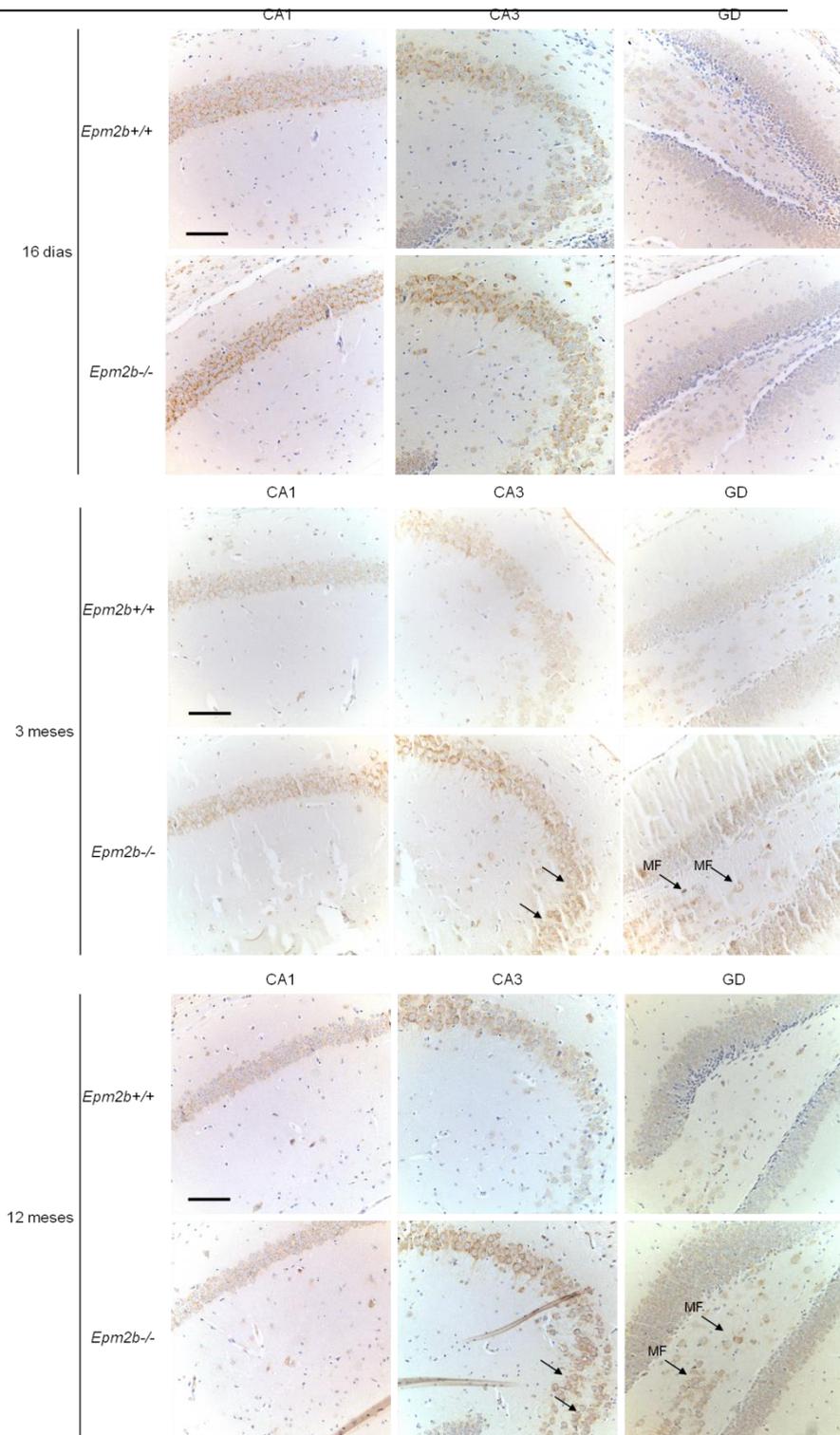
3.1- GLT-1 está aumentado en ratones *Epm2b*^{-/-}.

La primera aproximación para conocer el estado de GLT-1 en ratones *Epm2b*^{-/-} fue estudiar su expresión proteica en cerebro. Para ello, se llevó a cabo una inmunohistoquímica en cerebros de ratones de diferentes edades (16 días, 3 meses y 12 meses) que habían sido fijados, parafinados y cortados con microtomo tal y como se describe en Material y Métodos. Se eligieron estas tres edades porque la enfermedad de Lafora es neurodegenerativa y se quería comprobar si existía un cambio de expresión de GLT-1 asociado a la edad. Por ello, se eligió una edad representativa de lo que ocurre en el ratón antes de llegar a ser adulto (16 días), otra del adulto joven (3 meses) y otra de adulto de más edad (12 meses). Para cada grupo de edad se tomaron cortes de al menos 3 ratones de cada genotipo y se llevó a cabo la inmunodetección de tipo ABC con anticuerpos anti-EAAT2 (capaz de reconocer también la forma murina GLT-1), una tinción posterior con hematoxilina, fijación y toma de fotos. En el análisis de las imágenes nos centramos solamente en el hipocampo, una región cuya afectación se ha

asociado previamente con epilepsia. Como muestra la **Figura 30**, se observó una mayor expresión de GLT-1 (color marrón) en los ratones *Epm2b*^{-/-} respecto a los ratones *Epm2b*^{+/+} en la región CA3 a todas las edades, aunque era más llamativa cuanto mayor era la edad. La diferencia también aumentaba cuanto más cerca del giro dentado nos encontrábamos. Además, se observa un mayor marcaje de las denominadas *mossy fibers* (MF) del giro dentado en todos los casos, especialmente llamativa en los ratones de 12 meses. La diferencia a nivel del CA1, por el contrario, no resulta relevante en ninguno de los casos. Todo esto nos indica una desregulación en la homeostasis de GLT-1, el cual se encuentra aumentado en el cerebro de los ratones desde edades muy tempranas.

Por otra parte, llevamos a cabo también un análisis mediante qPCR de los niveles de mRNA de GLT-1a y GLT-1b en hipocampo de ratones de 16 días, 3 meses y 12 meses para comprobar si este aumento de los niveles de proteína de GLT-1 en los ratones *Epm2b*^{-/-} se correspondía con una mayor expresión génica. En la **Figura 31** se muestra que no hay cambios en la expresión de GLT-1a a los 16 días o 3 meses, pero sí se observa un incremento en los niveles de mRNA de GLT-1a a los 12 meses. GLT-1b, en cambio, se encuentra a niveles por debajo de los límites de detección a los 16 días. Sin embargo, tanto a los 3 como a los 12 meses los niveles de GLT-1b son detectables y muestran una mayor expresión en ratones *Epm2b*^{-/-} que en *Epm2b*^{+/+}. Estos datos invitan a pensar que la forma de GLT-1 que se encuentra aumentada en los ensayos inmunohistoquímicos es inicialmente GLT-1b. Con la edad, la isoforma GLT-1a también aumentaría.

Resultados



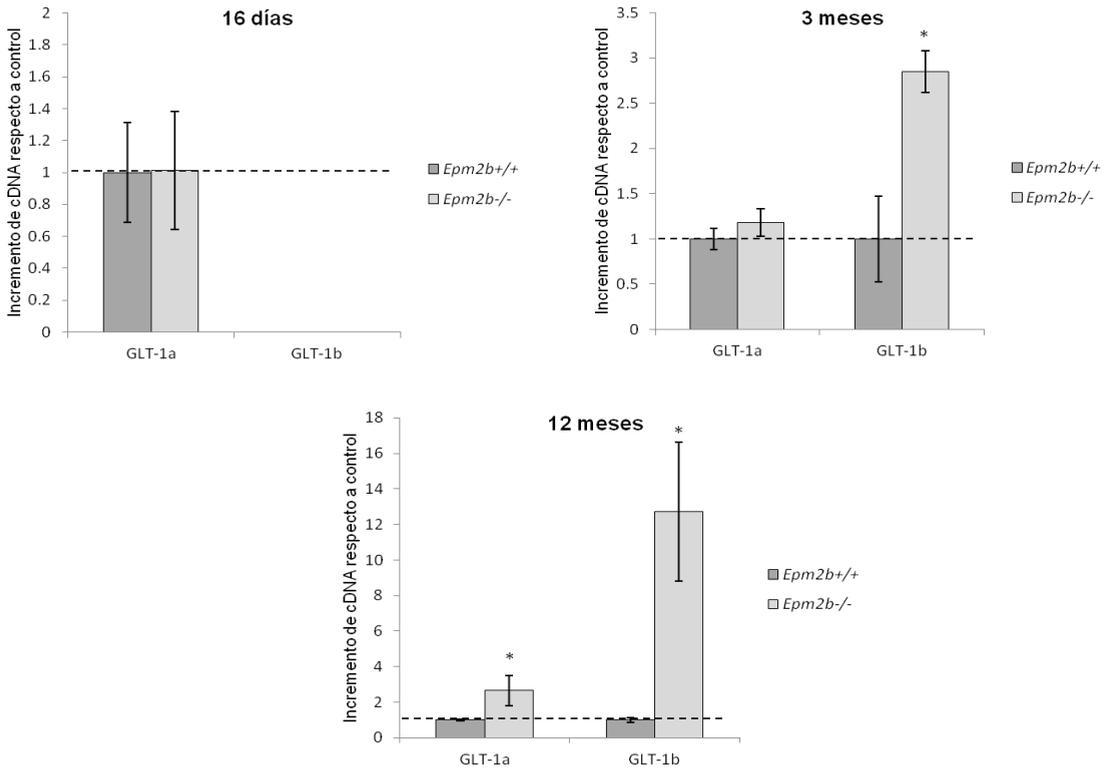


Figura 31. Niveles de cDNA de GLT-1a y GLT-1b de hipocampo de ratones *Epm2b*^{+/+} y *Epm2b*^{-/-} de 16 días, 3 meses y 12 meses. Se extrajo mRNA del hipocampo de ratones de las edades indicadas, se retrotranscribió y se llevó a cabo una qPCR como se describe en Material y Métodos. En las gráficas aparece el valor medio de expresión de GLT-1a o GLT-1b respecto al gen de referencia HPRT y respecto al control, que toma como valor 1, para una n=3-7 ratones y las desviaciones estándar correspondientes. La línea discontinua que aparece en todos los gráficos corresponde al valor de expresión de la isoforma de GLT-1/HPRT del control. El análisis estadístico se hizo con una t-Student de dos colas. (*=p-valor<0,05).

Figura 30. GLT-1 está aumentado en el hipocampo de ratones *Epm2b*^{-/-}. Inmunohistoquímica de GLT-1 en hipocampo de ratones *Epm2b*^{+/+} y *Epm2b*^{-/-} de 16 días, 3 meses y 12 meses de edad. Se llevó a cabo una inmunodetección con el sistema ABC en cortes sagitales de cerebro parafinados utilizando el anticuerpo anti-EAAT2 y contratiñendo con hematoxilina. El color marrón indica la presencia de GLT-1 y el azul marca las estructuras celulares ácidas. El nombre de la región del hipocampo se indica arriba: CA1, CA3 y GD (giro dentado). Barra: 100 μ m. Las flechas negras señalan puntos donde hay diferencias de marcaje de GLT-1 entre ratones *Epm2b*^{+/+} y ratones *Epm2b*^{-/-}.

3.2- El aumento de GLT-1 en hipocampo de ratones *Epm2b*^{-/-} se da en neuronas y no en astrocitos.

El patrón de expresión de GLT-1 que se había observado en la **Figura 30** no parecía seguir el patrón habitual de una proteína astrocitaria, por lo que se decidió analizar en qué tipo celular tenía lugar el aumento de expresión de GLT-1. Para ello, se llevaron a cabo inmunodetecciones de dos proteínas a la vez sobre cerebros de animales *Epm2b*^{+/+} y *Epm2b*^{-/-} de 12 meses, siendo una de ellas un marcador de tipo celular (neuronal o astrocitario) y la otra GLT-1. Como marcador de neuronas se eligió NeuN y como marcador de astrocitos, la glutamina sintetasa (GS). Tras realizar la detección con fluorescencia, se tomaron las fotos utilizando un microscopio confocal y se analizó en qué células se localizaba GLT-1 en la región CA3 del hipocampo, donde se había observado previamente el incremento de GLT-1. Como muestra la **Figura 32**, las células que expresan GLT-1 son aquellas que expresan NeuN (marcador de neuronas). Además, las células que expresan GS, marcador de astrocitos, no colocalizan en su mayoría con GLT-1. Este resultado indica que el incremento de la expresión de GLT-1 observado en ratones *Epm2b*^{-/-}, se da mayoritariamente en neuronas y no en astrocitos.

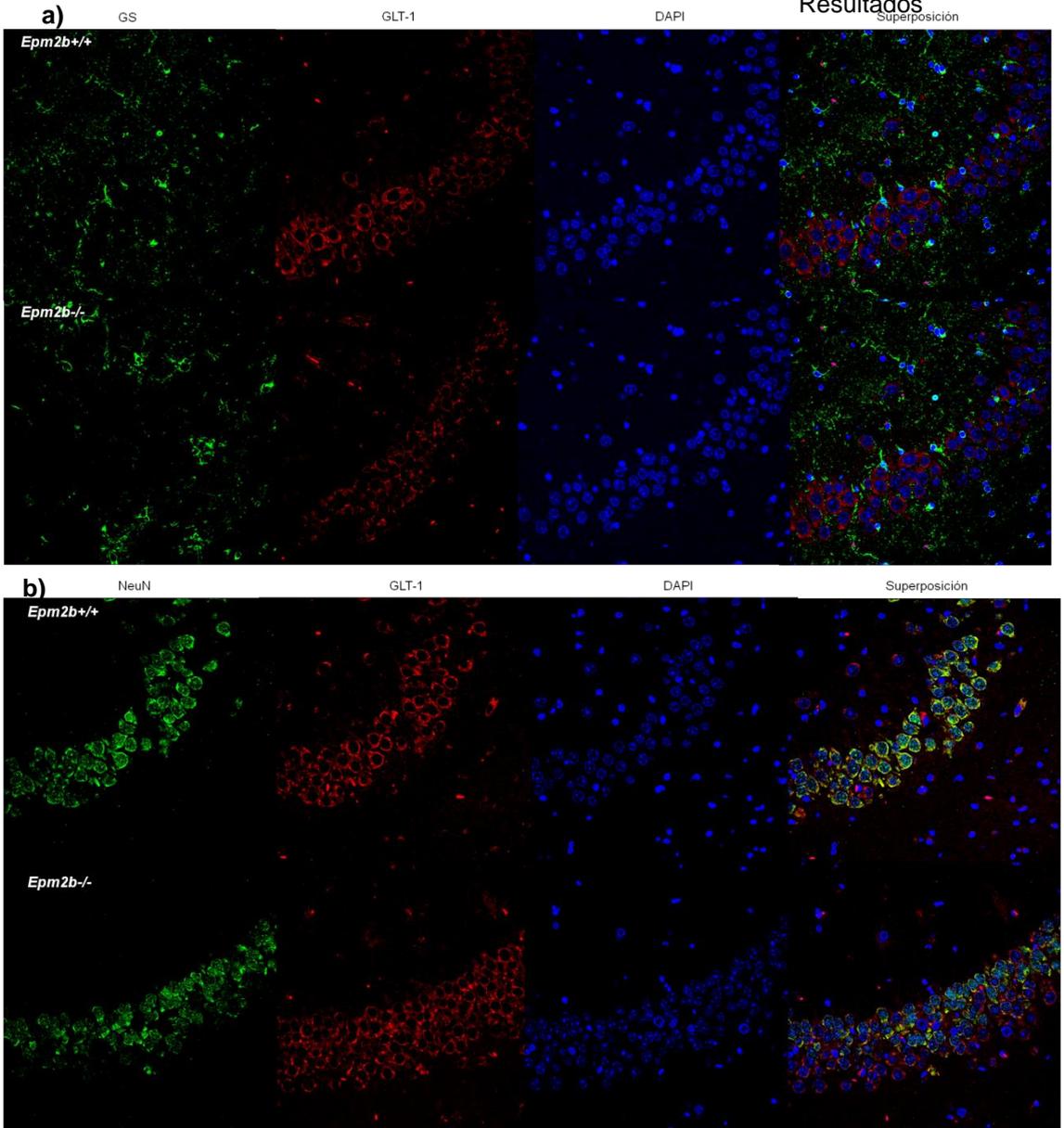


Figura 32. Colocalización de GLT-1 con neuronas (NeuN) y no con astrocitos (GS) en la zona CA3 de ratones *Epm2b*^{+/+} y *Epm2b*^{-/-} de 12 meses. **a)** Inmunodetección con GS (marcador de células gliales) en verde y GLT-1 en rojo. Los núcleos se tiñeron con DAPI en azul. La superposición muestra las tres imágenes combinadas. **b)** Inmunodetección con NeuN (marcador de neuronas) en verde y GLT-1 en rojo. Los núcleos se tiñeron con DAPI en azul. La superposición muestra las tres imágenes combinadas.

3.3- Estado de otros transportadores de glutamato en hipocampo de ratones *Epm2b*^{-/-}.

Aunque GLT-1 es el principal transportador de glutamato presente en el sistema nervioso central y el mayoritario en el hipocampo, existen otras proteínas que cumplen este cometido. Para saber si alguna de éstas podría estar compensando las alteraciones observadas en GLT-1, decidimos analizar la expresión tanto de mRNA como de proteína de GLAST (EAAT1 en humanos), el segundo transportador de glutamato astrocitario en importancia, y EAAC1 (EAAT3 en humanos), un transportador neuronal de glutamato, en el hipocampo de ratones *Epm2b*^{-/-} de 12 meses.

Para analizar los niveles de mRNA se llevó a cabo una qPCR utilizando cDNA procedente de hipocampo para detectar los niveles relativos de GLAST y EAAC1 en ratones *Epm2b*^{-/-} de 16 días, 3 y 12 meses respecto a los niveles de *Epm2b*^{+/+} de ratones de la misma edad.

En la **Figura 33** se muestran los resultados de este ensayo, en los cuales no aparecen diferencias significativas en los niveles de GLAST o EAAC1 en el hipocampo de ratones *Epm2b*^{+/+} y ratones *Epm2b*^{-/-} a 16 días, 3 meses o 12 meses. Sin embargo, a los 12 meses se observa una tendencia a la disminución de los niveles de EAAC1 en ratones *Epm2b*^{-/-} que, aunque no llega a ser significativa, podría correlacionarse con la pérdida de neuronas asociada a la neurodegeneración.

Para valorar la expresión proteica de GLAST y EAAC1 en ratones *Epm2b*^{-/-}, se llevó a cabo una inmunohistoquímica en cortes parafinados de cerebros de ratones de 12 meses, utilizando

anticuerpos anti-EAAT1 o anti-EAAT3, que aunque ambos están diseñados para reconocer a la proteína humana, son capaces de unirse también a la forma murina. A continuación se contratiñeron con hematoxilina y se fotografió el hipocampo para obtener el resultado que se muestra en la **Figura 34**. En esta imagen se ve que ni en el caso de GLAST ni en el de EAAC1 hay diferencias de expresión entre ratones *Epm2b*^{+/+} o ratones *Epm2b*^{-/-}. Además, los patrones de expresión son completamente diferentes a los observados para GLT-1, lo que descarta la posibilidad de que el anticuerpo anti-EAAT2 esté reconociendo otras proteínas parálogas de manera inespecífica.

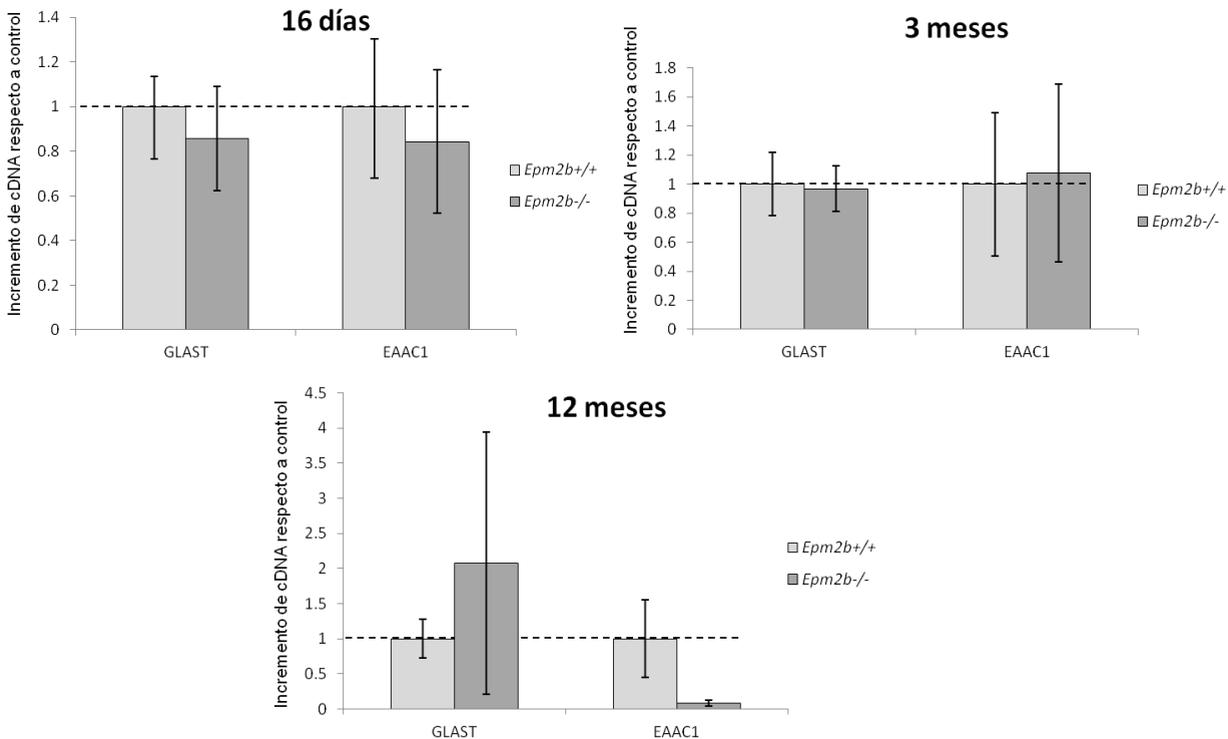


Figura 33. Niveles de cDNA de GLAST y EAAC1 de hipocampo de ratones *Epm2b*^{+/+} y *Epm2b*^{-/-} de 16 días, 3 meses y 12 meses. Se extrajo mRNA del hipocampo de ratones de las edades indicadas, se retrotranscribió y se llevó a cabo una qPCR como se describe en Material y Métodos. En las gráficas aparece el valor medio de expresión de GLAST o EAAC1 respecto al gen de referencia HPRT y respecto al control, que toma como valor 1, para una n=3-7 ratones y la desviación estándar correspondiente. La línea discontinua que aparece en todos los gráficos corresponde al valor medio de expresión del gen de interés en el control y es igual a 1. El análisis estadístico se hizo con una t-Student de dos colas (*p-valor<0,05).

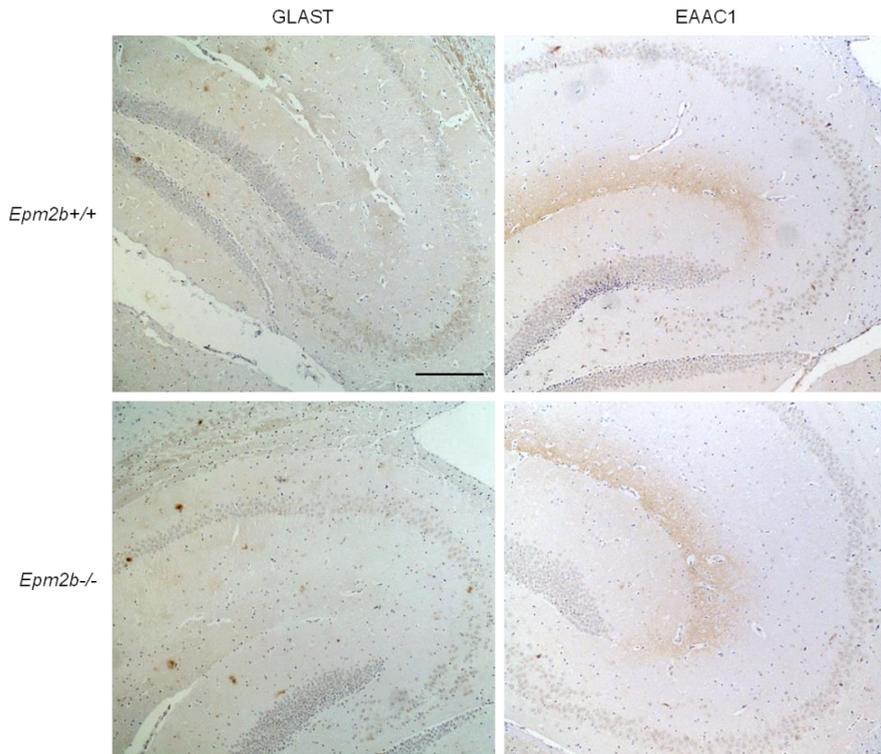


Figura 34. Inmunohistoquímica de GLAST y EAAC1 en hipocampo de ratones *Epm2b*^{+/+} y *Epm2b*^{-/-} de 12 meses de edad. Se llevó a cabo una inmunodetección con el sistema ABC en cortes sagitales de cerebro parafinados utilizando anticuerpos anti-EAAT1 o anti-EAAT3 y contratiñendo con hematoxilina. El color marrón indica la presencia de GLAST en las fotografías de la izquierda y EAAC1 en las de la derecha. El azul marca las estructuras celulares ácidas. Barra: 200 μ m.

3.4- Los niveles de glutamato extracelular se encuentran aumentados en el hipocampo de ratones *Epm2b*^{-/-}.

Todos los resultados obtenidos hasta ahora apuntaban a una desregulación del transportador GLT-1 tanto en astrocitos como en neuronas en ratones *Epm2b*^{-/-}. Sin embargo, hasta este momento no se tenía evidencia de una alteración en los niveles de glutamato en el cerebro de estos ratones. Para poder conocer los niveles de este neurotransmisor *in vivo* en ratones *Epm2b*^{-/-} adultos se llevó a cabo una técnica conocida como microdiálisis. Mediante una sonda implantada en el hipocampo de los ratones, esta técnica permite recoger fracciones de líquido cefalorraquídeo y analizar los niveles de neurotransmisores mediante HPLC (*high performance liquid chromatography* = cromatografía líquida de alta eficacia). El glutamato es una molécula que, además de funcionar como neurotransmisor, tiene importantes funciones metabólicas, por lo que detectar pequeñas diferencias en los niveles de esta molécula supone una limitación técnica. Para solucionar este problema, se utilizan fármacos que afectan a la homeostasis del glutamato y se valoran las diferencias en los niveles de glutamato entre los diferentes genotipos de ratones en presencia de estos fármacos.

En nuestro caso, hemos trabajado con dos fármacos: el dihidrokainato (DHK), un inhibidor selectivo de GLT-1, y el pentilentetrazol (PTZ), un compuesto epileptogénico inhibidor de receptores GABA, para el que nuestro modelo murino muestra una mayor sensibilidad (García-Cabrero et al., 2014).

Para realizar este ensayo, trabajamos en colaboración con el grupo del Dr. Francisco Artigas en el Instituto de Investigaciones Biomédicas de Barcelona-CSIC. Utilizamos ratones adultos de 9

meses de edad (+/- 14 días) a los que implantamos una sonda en el hipocampo como se explica en Material y Métodos y administramos localmente DHK a diferentes dosis (0,1 mM, 0,3 mM, 1 mM y 3mM), mientras se analizaban los niveles de glutamato presentes.

Los resultados obtenidos y mostrados en la **Figura 35** reflejan mayores niveles de glutamato extracelular en el hipocampo de ratones *Epm2b*^{-/-} respecto a los ratones *Epm2b*^{+/+} cuando se administra el inhibidor de GLT-1 DHK, confirmando nuestra hipótesis.

Los mismos ratones utilizados para el ensayo con DHK, fueron utilizados después de un reposo de 24 horas para cuantificar los niveles de glutamato tras la administración intraperitoneal del compuesto epileptogénico PTZ a dos dosis distintas: 10 mg/kg y 30 mg/kg.

La **Figura 36** muestra una tendencia de los ratones *Epm2b*^{-/-} (línea azul) a tener niveles de glutamato superiores al control cuando se induce farmacológicamente la epilepsia con PTZ, tanto con concentraciones inferiores (10 mg/kg) como superiores (30 mg/kg), que resulta significativa sólo en el caso de la dosis inferior (10 mg/kg).

Como conclusión, podemos afirmar que existe una desregulación en los niveles tanto de mRNA como de proteína GLT-1 en el hipocampo de ratones *Epm2b*^{-/-}, de modo que aumentan los niveles de GLT-1 en neuronas del hipocampo. Además, esto se correlaciona con un incremento de los niveles extracelulares de glutamato en el hipocampo de ratones *Epm2b*^{-/-} respecto a los controles *Epm2b*^{+/+} en presencia de DHK y PTZ. Todo esto apunta

a que las alteraciones descritas en modelos celulares a lo largo de la tesis tienen consecuencias también a nivel fisiológico en modelos animales de la enfermedad de Lafora.

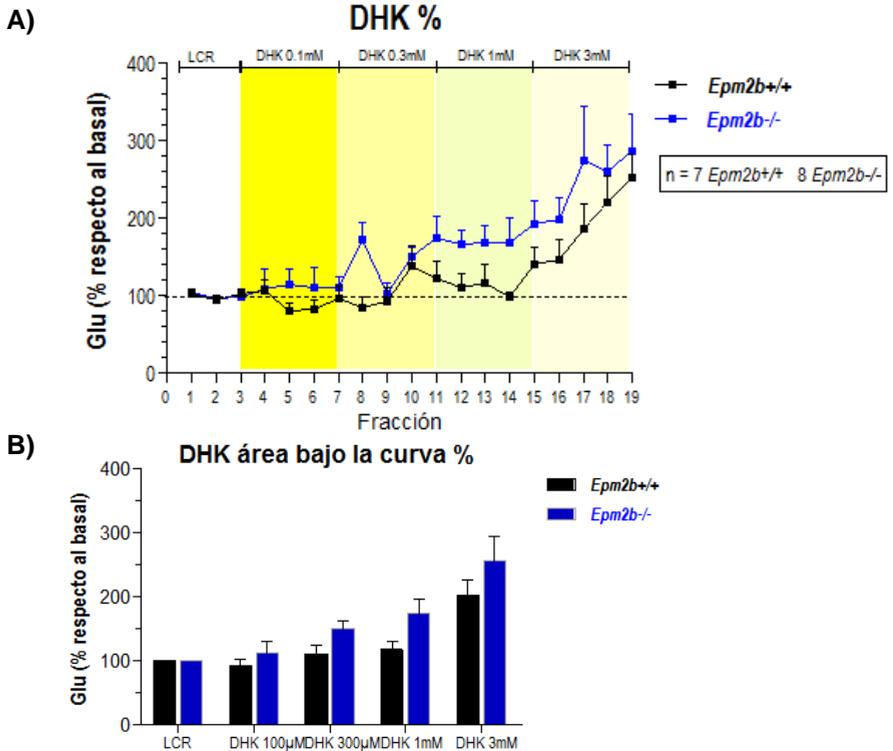


Figura 35. Los niveles de glutamato en hipocampo de ratones *Epm2a*^{-/-} son superiores a los niveles de glutamato de ratones *Epm2b*^{+/+} cuando se administra DHK. **a)** Histograma que muestra los niveles medios de glutamato en porcentaje respecto al basal sin la aplicación del fármaco, estando éste representado como una línea punteada en el 100%. La línea negra corresponde a los valores de glutamato de ratones *Epm2b*^{+/+} y la línea azul a los de ratones *Epm2b*^{-/-}. Cada una de las franjas coloreadas en amarillo representa la concentración de DHK administrada localmente, que va en orden creciente. Los números en el eje de abscisas indican el intervalo de tiempo al cual se tomaban las muestras, donde cada fracción representa 10 minutos. Análisis estadístico: ANOVA de dos factores cruzados. *p-valor<0,05 para *Epm2b*^{+/+} respecto a *Epm2b*^{-/-}. **b)** Gráfico de barras donde se representan los valores medios de glutamato en porcentaje respecto al basal para cada uno de los genotipos a las diferentes concentraciones. Las barras negras representan a los ratones *Epm2b*^{+/+} y las azules a los ratones *Epm2b*^{-/-}. Análisis estadístico: ANOVA de dos factores cruzados con un análisis *post hoc* con el test de Duncan. No se encontraron diferencias significativas a ninguna dosis.

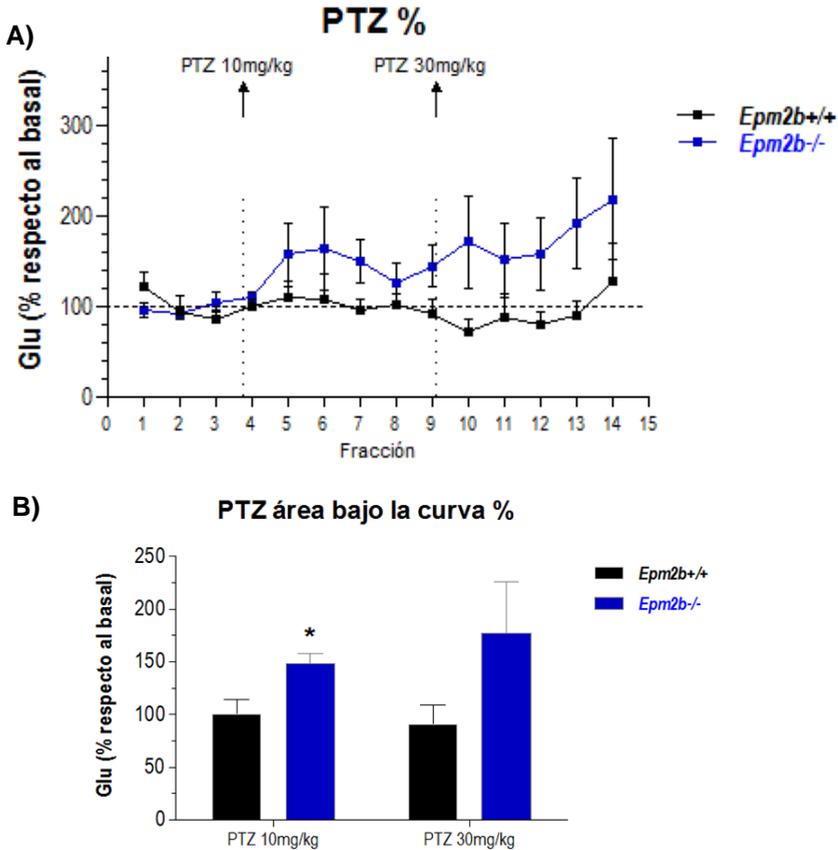


Figura 36. Los niveles de glutamato en hipocampo de ratones *Epm2b-/-* son superiores a los de ratones *Epm2b+/+* a concentraciones bajas cuando se administra PTZ. **a)** Histograma que muestra los niveles medios de glutamato en porcentaje respecto al basal sin la aplicación del fármaco, estando el basal representado como una línea discontinua en el 100%. La línea negra corresponde a los valores de glutamato de ratones *Epm2b+/+* y la línea azul a los de ratones *Epm2b-/-*. La línea vertical discontinua indica el momento de administración intraperitoneal de PTZ y la concentración de fármaco administrada. Los números en el eje de abscisas indican el intervalo de tiempo al cual se tomaban las muestras, donde cada fracción representa 10 minutos. Análisis estadístico: ANOVA de dos factores cruzados. No hay diferencias significativas cuando se comparan *Epm2b+/+* con *Epm2b-/-*. **b)** Gráfico de barras donde se representan los valores medios de glutamato en porcentaje respecto al basal para cada uno de los genotipos a las diferentes concentraciones administradas. Las barras negras representan los ratones *Epm2b+/+* y las azules los ratones *Epm2b-/-*. Análisis estadístico: ANOVA de dos factores cruzados con un análisis *post hoc* con el test Holm-Sidak. * = p-valor<0,05.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

1. Alteración del metabolismo del glutamato en astrocitos *Epm2a*^{-/-} y *Epm2b*^{-/-}.

En este trabajo se ha demostrado la reactividad astrocitaria presente en el hipocampo de ratones modelo para la enfermedad de Lafora. La astrogliosis es un fenómeno ampliamente descrito en diferentes formas de epilepsia (Bedner et al., 2015; Coulter y Eid, 2012) y en diversas enfermedades neurodegenerativas. En ciertas patologías, este proceso puede llevar a afectaciones de las funciones homeostáticas que los astrocitos desempeñan en el sistema nervioso, especialmente cuando la astrogliosis llega a ser crónica (Pekny y Pekna, 2014). Sin embargo, cada proceso fisiopatológico desencadena una respuesta diferente por parte de los astrocitos reactivos y en cada enfermedad se tiene que estudiar qué función de los astrocitos se puede ver comprometida por esta respuesta (Verkhatsky et al., 2016). De hecho, en el caso de la epilepsia existe controversia sobre si existe o no una afectación de la captación de glutamato y de sus transportadores, ya que diferentes autores han hallado resultados contradictorios al respecto (Coulter y Steinhäuser, 2015).

Este estudio constituye por tanto un nuevo ejemplo de epilepsia en el que la reactividad astrocitaria está asociada a una disminución de la capacidad de los astrocitos para captar glutamato. Los ensayos donde se demuestra esta alteración se han realizado en astrocitos primarios cultivados en placa que habitualmente se encuentran ya

en forma reactiva (Lange et al., 2012), por lo que reproducirían con fidelidad este aspecto del estado del astrocito. No obstante, trabajar con cultivos primarios de astrocitos en placa presenta también ciertas limitaciones. Por un lado, se trabaja con un solo tipo celular, el astrocito, cuando el cerebro está formado por muchos tipos celulares diferentes, capaces de comunicarse entre sí e influir en la función de la célula vecina. Así pues, los astrocitos utilizados no están variando su capacidad de captar glutamato en función del glutamato liberado por las neuronas presinápticas, como ocurre en el cerebro, sino que dependen únicamente del estado del propio astrocito y del medio que se le proporcione (Araque et al., 2000; Murphy-Royal et al., 2015). Por otra parte, los astrocitos en placa dejan de tener una estructura tridimensional y pasan a ser bidimensionales disminuyendo sus ramificaciones, especialmente los procesos más finos que son los que suelen estar en las sinapsis (Lange et al., 2012). GLT-1/EAAT2 suele expresarse en estas estructuras del astrocito, por lo que la expresión de GLT-1 suele ser menor en astrocitos en placa, aunque esto se puede compensar con la adición de cAMP al medio, tal y como se describe en Material y Métodos.

En este trabajo se ha determinado la cantidad de GLT-1 en la superficie de astrocitos primarios por citometría de flujo, que ha demostrado ser una metodología eficaz y con ventajas respecto a otras técnicas utilizadas para determinar la presencia de una proteína en la superficie celular, como los ensayos de biotinylación o el fraccionamiento de membranas. Por una parte, se realiza una cuantificación de la proteína presente en cada una de las células en lugar de obtener el resultado medio de un extracto de proteínas como ocurre con otras técnicas. Además, el método de estimación

de la cantidad de GLT-1 es fluorescente y, por tanto, cuantitativo y no semi-cuantitativo como ocurre con el *western blot* que se utiliza en el resto de técnicas. Por otra parte, se evita la contaminación de la muestra con diferentes fracciones distintas de la membrana plasmática y se puede comprobar la integridad de la membrana llevando como control en paralelo una placa que sigue el mismo procedimiento de marcaje y se analiza mediante microscopía confocal. Por último, la citometría permite seleccionar poblaciones según su tamaño y fluorescencia, por lo que podemos seleccionar y separar células que han sido transfectadas con un plásmido que contiene una proteína fluorescente y trabajar con modelos celulares que son más difíciles de transfectar. Por todas estas razones, consideramos que la metodología empleada para cuantificar las proteínas en superficie en cultivo de astrocitos primarios no sólo es válida sino que presenta ventajas respecto a otras metodologías convencionales.

Utilizando esta metodología, hemos podido demostrar que la disminución en la captación de glutamato que se observa en astrocitos *Epm2a*^{-/-} y *Epm2b*^{-/-} respecto a los control se debe a una disminución de GLT-1 en la membrana plasmática de los astrocitos. Puede resultar sorprendente que la disminución de la captación de glutamato no se deba a la disminución de la cantidad total de transportador sino a su cambio de localización. Sin embargo, el fenómeno aquí descrito no es exclusivo de la enfermedad de Lafora, ya que se han descrito alteraciones en la localización y endocitosis de GLT-1 en otras enfermedades neurodegenerativas, como la enfermedad de Alzheimer (Scimemi et al., 2013) o ELA (Vanoni et al., 2004), sin que se vea alterada la cantidad total de proteína o mensajero. Este trabajo es pues una evidencia más de que la

localización de GLT-1 en la superficie celular está finamente regulada y su alteración puede tener consecuencias fisiopatológicas, por lo que resulta esencial conocer en profundidad los mecanismos moleculares que permiten este tráfico del receptor entre la membrana plasmática y orgánulos intracelulares.

A priori podríamos pensar que la disminución de GLT-1 en la membrana se debe exclusivamente al estrés asociado a la activación del programa de respuesta de los astrocitos a condiciones de inflamación en una enfermedad neurodegenerativa y no a que el complejo laforina-malina forme parte de la maquinaria molecular relacionada con el transporte celular de GLT-1. Sin embargo, la complementación de astrocitos *Epm2b*^{-/-} con malina humana permite recuperar los niveles normales de GLT-1 en la superficie, lo que indica que la disminución de GLT-1 en la membrana plasmática de astrocitos *Epm2b*^{-/-} no es únicamente una consecuencia de la reactividad de los astrocitos, sino que malina interviene en el mecanismo de control de la localización de GLT-1. Además, la complementación con mutantes de malina en astrocitos *Epm2b*^{-/-} no fue capaz de revertir el fenotipo observado, por lo que tener una malina funcional resulta esencial para poder localizar GLT-1 con normalidad en la membrana. Igualmente, los ensayos realizados en otros modelos celulares, como neuroblastoma (SH-SY5Y) o células embrionarias de riñón (Hek293), en los que se sobreexpresa el complejo laforina-malina o se silencia laforina, demuestran que la alteración en la localización de GLT-1 depende directamente de la presencia y actividad del complejo laforina-malina en diferentes tipos celulares y no sólo en astrocitos reactivos. Además, el papel de laforina-malina en el proceso se encuentra conservado en ratones y humanos, ya que los resultados son

similares en células de ambos orígenes, lo que sugiere un papel importante en el proceso de regulación.

2. Participación de laforina-malina en la regulación de la endocitosis de GLT-1: nuestra hipótesis.

Conocer la regulación de la endocitosis de GLT-1 ha despertado mucho interés en los últimos años, dada la importancia de este transportador en la regulación de los niveles de glutamato extracelulares e intracelulares, que a su vez se relacionan con la respuesta en la célula postsináptica, la recuperación del glutamato y el GABA en neuronas presinápticas, el metabolismo energético y el estado redox de la célula. Por ello, cada vez se conocen más elementos que forman parte de los mecanismos de control de GLT-1, pero desgraciadamente se sigue sin esclarecer cuál es la relación funcional entre todos ellos. Así, llegar a entender cómo funciona la endocitosis de GLT-1 se ha convertido en un puzzle al cual este trabajo contribuye añadiendo un nuevo elemento: la ubiquitinación de GLT-1 dependiente de laforina-malina. Con todas las piezas de las que disponemos, proponemos un modelo hipotético de regulación de GLT-1.

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran un aumento de ubiquitinación tanto de GLT-1 como de EAAT2 en presencia del complejo laforina-malina. Esta ubiquitinación provoca que GLT-1/EAAT2 pase a ser más insoluble, ya que la proteína ubiquitinada en presencia de laforina-malina no puede extraerse si no hay detergentes no iónicos, como el Nonidet-P40, en el tampón de lisis. Se ha descrito que GLT-1 se puede localizar en *lipid rafts* o balsas

lipídicas, aunque se desconoce las implicaciones fisiológicas que esta localización pueda tener en la funcionalidad de GLT-1 (Zschocke et al., 2005). Los mecanismos moleculares que regulan la inclusión de GLT-1 en las balsas lipídicas se desconocen hasta la fecha. Basándonos en los resultados obtenidos, nosotros proponemos que la ubiquitinación de GLT-1 observada en presencia del complejo laforina-malina promueve la redistribución GLT-1 hacia balsas lipídicas y por ello pasa a ser más insoluble. Este cambio en el subdominio de la membrana plasmática podría relacionarse con la capacidad del transportador para ser endocitado, ya que en otros transportadores de aminoácidos como GLYT2 se ha descrito un mecanismo de regulación de la endocitosis dependiente de su asociación a balsas lipídicas (De Juan-Sanz et al., 2011). En este mecanismo, cuando el transportador se encuentra en las balsas lipídicas tiene lugar una endocitosis constitutiva, mientras que cuando el transportador no está en esta localización, tiene lugar una endocitosis acelerada dependiente de ubiquitinación (De Juan-Sanz et al., 2011). En este mismo ejemplo, la endocitosis constitutiva y la dinámica tienen diferentes destinos. En la endocitosis constitutiva el transportador permanece asociado a las balsas lipídicas en las estructuras subcelulares de reciclaje, permaneciendo en un *pool* cercano a la membrana, donde puede reincorporarse rápidamente si es necesario. La endocitosis acelerada o dinámica, en cambio, destina al transportador a degradación lisosomal o a algún tipo de inactivación. Mecanismos similares de regulación de otros receptores de membrana que son también sustratos de Nedd4, como EGFR, han sido previamente descritos en la bibliografía (Katz et al., 2002; Mineo et al., 1999).

Si el complejo laforina-malina se viese implicado en un mecanismo de regulación de GLT-1 similar como el sugerido, en ausencia de laforina o malina GLT-1 no se redistribuiría en las balsas lipídicas, se endocitaría más rápidamente y habría menos GLT-1 disponible en la membrana, tal y como observamos en los astrocitos *Epm2a*^{-/-} y *Epm2b*^{-/-}. Por el contrario, cuando sobreexpresásemos laforina-malina, GLT-1 pasaría a asociarse a las balsas lipídicas y su tasa de endocitosis sería mucho menor, por lo que quedaría retenido en la membrana, tal y como vemos en las células SH-SY5Y que sobreexpresan el complejo.

Además, este trabajo demuestra que la ubiquitinación inducida por laforina-malina no marca la proteína para degradación, ya que la cantidad de EAAT2/GLT-1 ubiquitinado en presencia y ausencia de inhibidores de la degradación proteica no varía. Este resultado concuerda con nuestra hipótesis de que la ubiquitinación de GLT-1 en presencia de laforina-malina estaría señalizando la inclusión de este transportador en las balsas lipídicas, donde no estaría accesible para ser marcado para la endocitosis dependiente de ubiquitinación por Nedd4.2 y posterior degradación.

Por otra parte, el complejo laforina-malina parece jugar también un papel sobre la proteína β -arrestina 1, una proteína puente que permite la acción de Nedd4.2 sobre GLT-1. Esta modificación de la β -arrestina-1 por el complejo laforina-malina provoca una disminución de la ubiquitinación de GLT-1. No resulta extraño que el complejo laforina-malina esté participando de manera dual en la regulación de la endocitosis de GLT-1, ya que existen otras proteínas que actúan de un modo similar en otros transportadores (De Juan-Sanz et al., 2011). El complejo laforina-malina es capaz de

etiquetar la β -arrestina 1 y esto podría impedir que dicha proteína llevase a cabo su papel de mediar en la interacción entre Nedd4.2 y GLT-1/EAAT2. Por lo tanto, esta modificación de la β -arrestina 1 por parte del complejo laforina-malina estaría disminuyendo la endocitosis de GLT-1/EAAT2 dependiente de Nedd4.2 y su posterior degradación. Por ello, los dos papeles del complejo laforina-malina en el proceso de endocitosis de GLT-1 favorecen que el transportador permanezca de forma estable en la membrana y en estructuras asociadas.

Sin embargo, no se puede descartar que la disminución de la ubiquitinación de GLT-1/EAAT2 en presencia de β -arrestina 1 ubiquitinada se deba a que al ser la β -arrestina 1 y GLT-1/EAAT2 sustratos del complejo laforina-malina, exista una competición entre ambos sustratos. Así, GLT-1/EAAT2 estaría menos ubiquitinada en presencia del complejo laforina-malina porque éste tiene un sustrato más que ubiquitinar y deja de ser tan eficiente en llevar a cabo la ubiquitinación de GLT-1/EAAT2.

En nuestro modelo, la ubiquitinación de GLT-1 en presencia de laforina-malina sería diferente de la ubiquitinación de Nedd4.2 que induce la endocitosis acelerada y que ha sido ampliamente descrita.

Aunque la mayoría de los resultados se explican con el modelo propuesto, faltaría explicar por qué cuando se sobreexpresan GLT-1/EAAT2 y Nedd4.2 se puede apreciar una ubiquitinación muy débil del transportador, en contra de los resultados obtenidos por otros investigadores. Una posibilidad es que esta ubiquitinación sea cuantitativamente menos importante que la que se induce en presencia del complejo laforina-malina. En cualquier caso, lo que

parecen demostrar nuestros resultados es que la relación entre Nedd4.2 y laforina-malina no es directa en nuestro modelo.

En resumen, nuestra hipótesis (**Figura 37**) propone que laforina-malina participan en la ubiquitinación de GLT-1/EAAT2 que conduce a la proteína a situarse en balsas lipídicas, donde es más insoluble y puede reciclarse de forma constitutiva. En ausencia del complejo laforina-malina, GLT-1 se situaría preferentemente fuera de las balsas lipídicas donde, sería sustrato de la ubiquitinación por parte de Nedd4.2 y proteínas auxiliares como la β -arrestina-1, siendo endocitado rápidamente y llevado a degradación o a compartimentos donde se inactiva. El complejo laforina-malina tiene un papel dual en este proceso, ya que también es capaz de ubiquitinar a la β -arrestina-1, lo que podría provocar una disminución en su capacidad para mediar la interacción entre Nedd4.2 y GLT-1/EAAT2, disminuyendo así el ritmo de ubiquitinación de GLT-1/EAAT2 por Nedd4.2 y su endocitosis acelerada. En ausencia del complejo laforina-malina, la β -arrestina-1 estaría libre de modificación y favorecería la endocitosis, por lo que habría menos GLT-1 en la membrana.

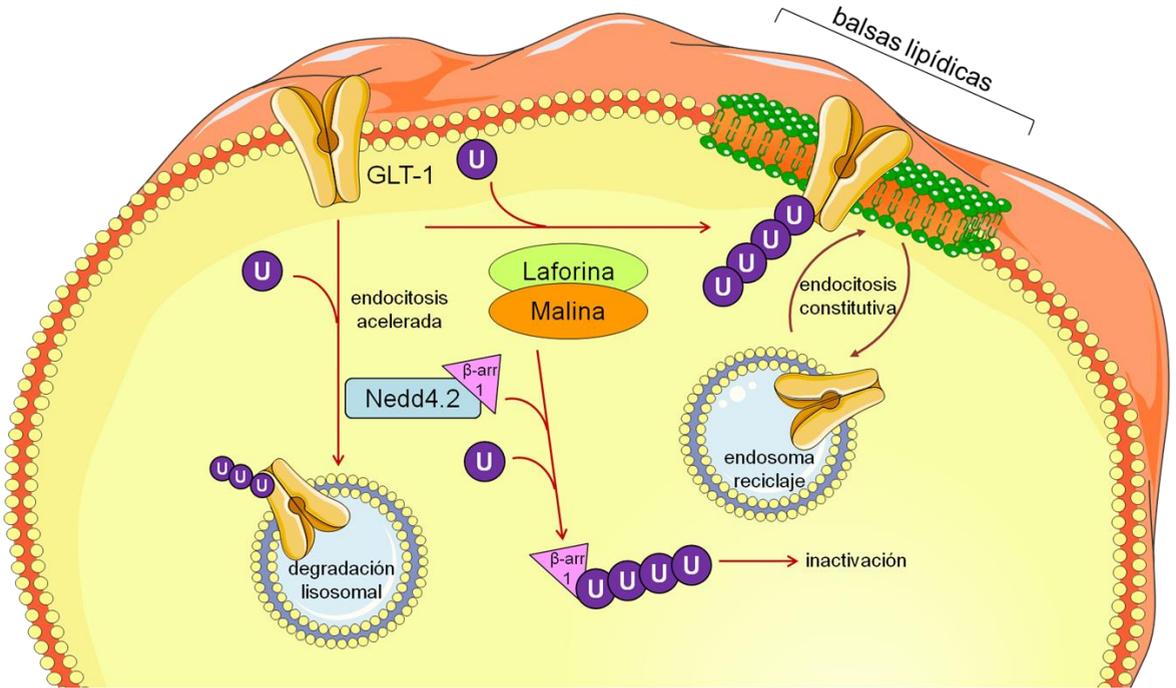


Figura 37. Modelo hipotético de endocitosis de GLT-1 en presencia de laforina-malina. GLT-1 puede situarse fuera de las balsas lipídicas, donde es sustrato de ubiquitinación por parte de Nedd4.2 a través de un anclaje por la β -arrestina 1. Esta señalización favorece la endocitosis que lleva a la proteína a degradación proteica. GLT-1 cambia su localización hacia las balsas lipídicas tras una ubiquitinación por parte del complejo laforina-malina. Desde las balsas lipídicas se favorece la endocitosis constitutiva, en la cual GLT-1 quedaría integrado en membranas de endosomas para retornar a la membrana cuando se necesita una rápida respuesta. El complejo laforina-malina también ubiquitina a la β -arrestina 1 para su inactivación. Símbolos: U = ubiquitina, β -arr 1 = β -arrestina-1. Imagen propia a partir de modelos disponibles en Servier Medical Art.

Por último, hay que comentar que aunque en la tesis la mayoría de ensayos de ubiquitinación se realizan empleando Nedd4-2 como E3-ubiquitín ligasa de GLT-1, es cierto que hasta la fecha no ha sido descartada la ubiquitinación de GLT-1 por el parálogo de Nedd4-2, Nedd4. Ambas E3-ubiquitín ligasas ubiquitinan sustratos etiquetándolos para su endocitosis (Donovan y Poronnik, 2013). Aunque se han descrito sustratos que son ubiquitinados sólo por una de las dos proteínas, también los hay que están sujetos a la regulación por parte de ambas proteínas (Persaud et al., 2009; Yang y Kumar, 2010). Nuestros resultados se han realizado principalmente utilizando Nedd4-2 porque es la E3-ubiquitín ligasa para GLT-1 que se ha descrito en la bibliografía. No obstante, también hemos encontrado un aumento de la expresión de Nedd4 en el hipocampo de ratones *Epm2a*^{-/-} y *Epm2b*^{-/-}, lo que sugiere que una ausencia de cualquiera de los elementos del complejo laforina-malina está influyendo en la homeostasis de esta proteína, algo que debe ser estudiado en más profundidad. Por todo esto, sería interesante comprobar si Nedd4 también es capaz de ubiquitinar a EAAT2/GLT-1.

3. La homeostasis de los transportadores de glutamato en ratones *Epm2b*^{-/-}.

Para completar todos los resultados obtenidos hasta ahora en los que hemos utilizado cultivos celulares de astrocitos primarios o líneas celulares estables, consideramos que el siguiente paso era comprobar en un modelo más complejo el estado de GLT-1 y la homeostasis de glutamato. Para ello, utilizamos ratones *Epm2b*^{-/-} de diferentes edades. La enfermedad de Lafora es un desorden

neurodegenerativo, por lo que se pensó que tener muestras de ratones de diferentes edades permitiría valorar la evolución de los parámetros de estudio a lo largo del tiempo. Se eligieron edades representativas de la etapa juvenil (16 días), adulto joven (3 meses) y adulto de edad avanzada (12 meses). Por otra parte, todos los ensayos se realizaron en machos, aunque sería interesante ampliar los ensayos realizados utilizando también hembras ya que se ha descrito que son más susceptibles a la neuroinflamación (Cole et al., 2016; Pascual et al., 2016) y a que al iniciarse la enfermedad en la adolescencia no se debe descartar un efecto hormonal en el desencadenamiento de la enfermedad. No obstante, por cuestión de tiempo y recursos, se utilizaron machos que presentan menos variabilidad en los niveles hormonales y con los que, por tanto, se obtienen resultados más homogéneos.

Se analizaron los niveles de expresión de proteína de GLT-1 por inmunohistoquímica en hipocampo de ratones de 16 días, 3 meses y 12 meses y se encontró que los ratones presentaban un aumento de expresión de GLT-1 en la zona del CA3 y el giro dentado que se hacía más evidente a una mayor edad del animal. Además, se demostró que este aumento se daba en neuronas y no en astrocitos. Este resultado resultó sorprendente en un principio porque hasta la fecha se ha asociado la epilepsia con una disminución de los niveles de GLT-1 (Proper et al., 2002). Nuestros resultados previos en modelos celulares apuntaban a un mantenimiento de los niveles de GLT-1 y no a un aumento como el que se observaba. El hecho de que las células que sobreexpresan GLT-1 fueran neuronas y no astrocitos, merece una reflexión aparte.

Durante muchos años, se dudó de la posibilidad de que las neuronas expresasen transportadores de glutamato, ya que el marcaje en estas células es mínimo, especialmente si se compara con astrocitos. Sin embargo, había evidencias de que las neuronas podían estar captando glutamato. Finalmente, se describió que existía GLT-1 en los terminales axónicos de neuronas maduras del hipocampo y que éste era capaz de captar glutamato activamente (Chen et al., 2004; Furness et al., 2008). No obstante, se desconoce el papel fisiológico que GLT-1 puede tener en las neuronas, ya que la capacidad de captar glutamato en las sinapsis glutamatérgicas es mínima si se compara con la capacidad de los astrocitos. Además, se han obtenido ratones KO para GLT-1 específicos de astrocitos y específicos de neuronas y mientras los primeros presentan mayor mortalidad, menor peso corporal y convulsiones generalizadas, los segundos tenían una supervivencia normal, una ganancia de peso habitual y no presentaban convulsiones (Petr et al., 2015). Todo ello indica que el papel de GLT-1 en neuronas en condiciones fisiológicas no parece tener mucha relevancia.

El papel que GLT-1 pueda tener en condiciones fisiopatológicas en las neuronas no se conoce en profundidad, ya que no se han hecho ensayos al respecto con el ratón KO de GLT-1 específico de neuronas, aunque hay evidencias que apuntan a que en ciertas condiciones, el GLT-1 neuronal puede ser importante. Se ha descrito que el GLT-1 neuronal puede estar aumentado cuando existe una deficiencia del transporte de glutamato por parte de los astrocitos (Pow et al., 2004; Rimmele and Rosenberg, 2016). Ciertos estudios muestran que en condiciones de estrés o daño cerebral, proteínas típicamente expresadas en astrocitos podían pasar a expresarse en neuronas en un intento por compensar la

falta de captación de glutamato. Entre estas proteínas se encontraría GLT-1, cuyo aumento de expresión en neuronas ya ha sido descrito en enfermedades como Alzheimer (Pow and Cook, 2009; Thal, 2002) o hipoxia cerebral (Pow et al., 2004). Por ello, se plantea un aumento de la expresión de GLT-1 neuronal en condiciones de daño con un papel protector que evita la neurotoxicidad. Esto podría ser lo que ocurre en nuestro modelo animal.

No obstante, tener una sobreexpresión de GLT-1 se ha asociado también con daños neuronales y muerte neuronal. En 2005, Selkirk y colaboradores publicaron un estudio donde, en cultivos organotípicos de hipocampo de ratón, se sobreexpresaba GLT-1 específicamente en neuronas y se sometían a concentraciones agudas de glutamato. Estos autores encontraron que la muerte celular de las neuronas piramidales en la zona CA1 del hipocampo aumentaba de forma dependiente a la concentración de glutamato a través de la activación del receptor de NMDA (Selkirk et al., 2005). Este ensayo evidenciaba el papel dual que puede ejercer GLT-1 en la neurona. La explicación que ofrece la comunidad científica a esta aparente contradicción es que probablemente GLT-1 se exprese en neuronas como respuesta a un daño y un aumento de glutamato en la neurona. Sin embargo, en presencia de un daño continuado, esta aparente protección deja de ser tal y pasa a tener efectos deletéreos para la célula, favoreciendo su muerte por excitotoxicidad.

En nuestro caso, el aumento de expresión que observamos en el hipocampo se explicaría por defectos en la captación de glutamato en astrocitos. Este aumento lo encontramos a edades muy tempranas y se incrementa con la edad. Según esta hipótesis, sería

de esperar que ese aumento mantenido en el tiempo estuviese asimismo favoreciendo la muerte de neuronas por excitotoxicidad. No obstante, esta hipótesis debe ser comprobada todavía.

Por otra parte, no se debe descartar que el GLT-1 que se encuentra aumentado no sea funcional. Las neuronas, al carecer también del complejo laforina-malina funcional, tendrían alterada la homeostasis del transportador, presentando un aumento de la endocitosis dinámica que puede tener como destino la degradación lisosomal. Se ha descrito que los ratones *Epm2b*^{-/-} presentan una autofagia disminuida. Las neuronas se han descrito como células especialmente sensibles a una disminución de la autofagia, por lo que se puede suponer que en la enfermedad de Lafora, las neuronas están más afectadas que los astrocitos por la disminución de la autofagia (Pan and Yue, 2014; Wong and Cuervo, 2010). Así pues, es posible que el aumento de GLT-1 en las neuronas sea consecuencia del aumento de GLT-1 que se internaliza por falta de laforina o malina sin poder llegar a ser degradado, por lo que no es funcional y permanece en los endosomas sin llegar a degradarse por autofagia.

El aumento de GLT-1 que se observa viene acompañado también de un aumento de los niveles de mRNA en el hipocampo. La sensible técnica de la qPCR nos muestra un aumento de los niveles de GLT-1b a los tres meses y un aumento de los niveles de GLT-1a y GLT-1b a los 12 meses, siendo más importante el aumento de la segunda isoforma. Este aumento no se observa en ratones jóvenes (16 días) y parece acrecentarse conforme se desarrolla la enfermedad. Es importante destacar que este aumento del mRNA de GLT-1 se corresponde con el aumento de la cantidad de proteína

encontrado. Debido a que tanto el mRNA de GLT-1a como el de GLT-1b están sometidos a una fina y aún no bien comprendida regulación postranscripcional, se observa frecuentemente que los cambios observados a nivel transcripcional pueden no corresponderse con los cambios a nivel de proteína (Lauriat y McInnes, 2007). De hecho, la expresión de mRNA de GLT-1 en neuronas es común, mientras que la expresión de proteína sólo se da en áreas muy concretas del cerebro o en condiciones fisiopatológicas.

En cualquier caso, este resultado nos invita a pensar que los ratones *Epm2b*^{-/-} presentan inicialmente un aumento de la expresión de GLT1-b y que posteriormente también aumentan los niveles de expresión de GLT-1a. El papel que puede jugar GLT1-b en la homeostasis del glutamato todavía no está claro, aunque sí se sabe que esta isoforma interacciona con proteínas diferentes de las que interaccionan con la proteína GLT-1a. GLT-1b se localiza en el soma y no en los procesos de los astrocitos como GLT-1a (Schmitt et al., 2002) y presenta patrones de expresión diferentes en condiciones fisiopatológicas. O'Donovan y colaboradores describieron un aumento de los niveles de EAAT2b en neuronas piramidales del córtex cingulado anterior de cerebros de pacientes con esquizofrenia que no se observaba para ninguna de las otras isoformas de EAAT1 o EAAT2 (O'Donovan et al., 2015). En ELA se ha descrito que la caída de GLT-1a proteico va acompañada de un aumento de GLT-1b en neuronas (Maragakis et al., 2004). En la enfermedad de Alzheimer se ha encontrado también un aumento de GLT-1b en neuronas y se propone que puede ser un mecanismo de respuesta a un incremento del glutamato extracelular (Pow and Cook, 2009). Todo esto invita a pensar que el aumento de GLT-1b

en neuronas podría estar asociado con una respuesta al estrés que supone una disminución de la captación de glutamato por parte de GLT-1a.

En nuestro caso, no podemos afirmar que el aumento de GLT-1b que se observa se dé en neuronas y no en astrocitos, ya que la qPCR se ha realizado a partir de extracto completo de hipocampo, pero el hecho de que este incremento de GLT-1b vaya aumentando con la edad del ratón y se correlacione con un aumento de los niveles proteicos de GLT-1 neuronal parece indicar que nos encontramos ante un mecanismo de respuesta a estrés por exceso de glutamato extracelular similar al que aparece en otros desórdenes neurológicos. Por ello, consideramos que sería muy interesante estudiar mediante hibridación *in situ* o utilizando anticuerpos específicos contra las diferentes isoformas de GLT-1 si el aumento de GLT-1b se da específicamente en neuronas y si en la enfermedad de Lafora se está desarrollando un proceso patológico similar al de otras enfermedades neurodegenerativas mejor estudiadas. Sin embargo, al no existir anticuerpos comerciales contra las diferentes isoformas de GLT-1, no se ha podido llevar a cabo esta parte del proyecto.

Por último, se comprobó que la expresión tanto de mRNA como de proteína del resto de transportadores de glutamato que encontramos en el cerebro, EAAT1 y EAAT3, no se encontraban alterados. Un cambio en los niveles de estas proteínas podría haber apuntado a una compensación en la homeostasis de glutamato. Aunque la regulación de estos transportadores es independiente (Jiménez et al., 2014) y GLT-1 es el más importante en la recaptación de glutamato, se podría haber encontrado un aumento

de los niveles de GLAST o EAAC1 tratando de compensar los defectos de este transportador, como ya se ha descrito en otras patologías (Beschorner et al. 2007a; Beschorner et al. 2007b). Sin embargo, no se han encontrado cambios significativos en ningún caso. Además, los patrones de expresión son tan diferentes a los que se dan con el anticuerpo GLT-1 que se puede descartar también un marcaje en las neuronas debido a que el anticuerpo reconozca también alguno de estos transportadores parálogos.

4. Los niveles de glutamato extracelular en el hipocampo se encuentran aumentados en ratones *Epm2b*^{-/-}.

Una vez demostrada la disminución de la captación de glutamato en astrocitos, la implicación del complejo laforina-malina en la regulación la localización subcelular de GLT-1 y la alteración en la expresión de este transportador en el hipocampo de ratones *Epm2b*^{-/-} modelo de la enfermedad de Lafora, quedaba por comprobar si todo ello supone una incapacidad de GLT-1 para recaptar el glutamato en las sinapsis. Para ello, se utilizó la técnica de la microdiálisis que permite analizar los niveles de diferentes neurotransmisores *in vivo*. Sin embargo, el glutamato tiene características particulares respecto al resto de neurotransmisores ya que, además de su papel como neurotransmisor, tiene un papel esencial en el metabolismo energético y oxidativo. Por ello, pequeñas diferencias en la sinapsis, que pueden tener consecuencias en la actividad neuronal, pueden pasar inadvertidas utilizando esta técnica. Por esto se decidió utilizar fármacos que

alterasen la homeostasis del glutamato para poder llegar a detectar diferencias.

El DHK es un inhibidor específico de GLT-1, por lo que administrado localmente provoca un aumento de los niveles de glutamato en el espacio sináptico ya que se impide la recaptación del neurotransmisor por este transportador (Arriza et al., 1994; Bridges et al., 1999). Según nuestra hipótesis, la inhibición de GLT-1 por DHK tendría un efecto más severo en los ratones *Epm2b*^{-/-} ya que cuentan con menos transportador funcional en la membrana de los astrocitos, por lo que la utilización de concentraciones bajas de DHK en ratones *Epm2b*^{-/-} tendría consecuencias más severas que su uso en ratones *Epm2b*^{+/+}.

Los resultados obtenidos confirman esta hipótesis al hallarse un mayor aumento en los niveles de glutamato extracelular en el hipocampo de ratones *Epm2b*^{-/-}.

El otro fármaco que se utilizó fue el PTZ, un compuesto epileptogénico de demostrada eficacia a dosis subconvulsivas (inferiores a 50 mg/kg) en ratones modelo de la enfermedad de Lafora (García-Cabrero et al., 2012). Nuestro objetivo era comprobar si cuando el ratón presentaba epilepsia era capaz de mantener los niveles de glutamato similares a los controles. Según nuestra hipótesis, frente a una liberación mayor de glutamato como la que se puede producir en caso de epilepsia, los ratones *Epm2b*^{-/-} serían menos competentes para recaptar el glutamato y volver al estado inicial, quedando entonces los niveles de glutamato aumentados. Nuestros resultados utilizando PTZ apuntan a una tendencia a tener niveles más elevados de glutamato extracelular en ratones *Epm2b*^{-/-}. Sin embargo, sólo existe una diferencia

estadísticamente significativa entre ese genotipo y el control *Epm2b+/+* a dosis bajas (10 mg/kg). Esto puede deberse a que a concentraciones más altas, tanto en el ratón control como en el modelo de la enfermedad se produce una alteración mucho más marcada de la activación de las sinapsis que aumenta la variabilidad de las muestras e impide ver las diferencias con el número de ratones con el que hemos trabajado.

Hay que resaltar además que el PTZ no actúa directamente sobre el sistema glutamatérgico, sino que se une al receptor de GABA-A bloqueándolo. Así, el aumento de glutamato no es por una estimulación de la liberación de glutamato, sino por una inhibición de las neuronas GABAérgicas, que normalmente impiden que se libere el glutamato. Esto nos indica que incluso si la causa primaria de la epilepsia no fuese un exceso de glutamato sino un fallo del sistema inhibitorio GABAérgico, el defecto del transportador GLT-1 favorecería que los niveles de glutamato extracelulares no pudieran volver a su estado inicial y que, por tanto, la excitación neuronal se mantuviera, pudiendo llegar a ocasionar excitotoxicidad a largo plazo.

Una vez demostrada mediante estos experimentos *in vivo* la desregulación de la homeostasis del glutamato, podemos ya tratar de predecir las consecuencias que se pueden derivar de ésta.

Ya se ha comentado en repetidas ocasiones a lo largo de la tesis los problemas de hiperexcitabilidad, aparición de convulsiones y muerte celular por excitotoxicidad que pueden acontecer por exceso de glutamato en el espacio intersináptico (Coulter y Eid, 2012). Sin embargo, los problemas derivados de una recaptación insuficiente de glutamato van mucho más allá.

Como ya se ha descrito en la introducción, el glutamato captado a través de GLT-1 puede tener diferentes destinos: 1) liberación del glutamato como gliotransmisor por el astrocito, 2) entrada en el ciclo de Krebs como α -cetoglutarato en el astrocito, 3) conversión enzimática a glutamina. Esta última vía es esencial para mantener no sólo el correcto funcionamiento de las funciones glutamatérgicas sino también las GABAérgicas. La glutamina es el sustrato que utilizan las neuronas inhibitorias GABAérgicas para producir el principal neurotransmisor inhibitorio, por lo que si el flujo de glutamina se ve interrumpido, las neuronas GABAérgicas tendrán disminuida su actividad (Ortinski et al., 2010). Por tanto, si las neuronas GABAérgicas no pueden funcionar correctamente porque no tienen un aporte de glutamina suficiente desde el astrocito, el sistema de inhibición en el cerebro se verá reducido y aumentará la probabilidad de sufrir convulsiones.

Por otra parte, todas las neuronas necesitan también la glutamina para sintetizar intermediarios del ciclo de Krebs. El mantenimiento correcto de este ciclo en la neurona es esencial, ya que la neurona sintetiza principalmente el ATP a través de la fosforilación oxidativa, la cual depende directamente de los equivalentes reductores que proporciona el ciclo de Krebs. Sin embargo, la neurona no es capaz de aportar nuevos intermediarios al ciclo de Krebs mediante reacciones anapleróticas que deriven directamente de la glucosa o el lactato, ya que carecen de la enzima piruvato carboxilasa (círculo rojo en **Figura 38**), enzima que permite convertir el piruvato en oxalacetato. Por ello, las neuronas obtienen el intermediario del ciclo de Krebs α -cetoglutarato a partir de la glutamina que les llega desde los astrocitos a través del ciclo glutamato-glutamina (**Figura 38**). Por lo tanto, si se disminuye la captación de glutamato por parte del

astrocito, se compromete el aporte de glutamina a la neurona pudiendo llegar a provocar un estrés metabólico con consecuencias deletéreas para el correcto funcionamiento celular.

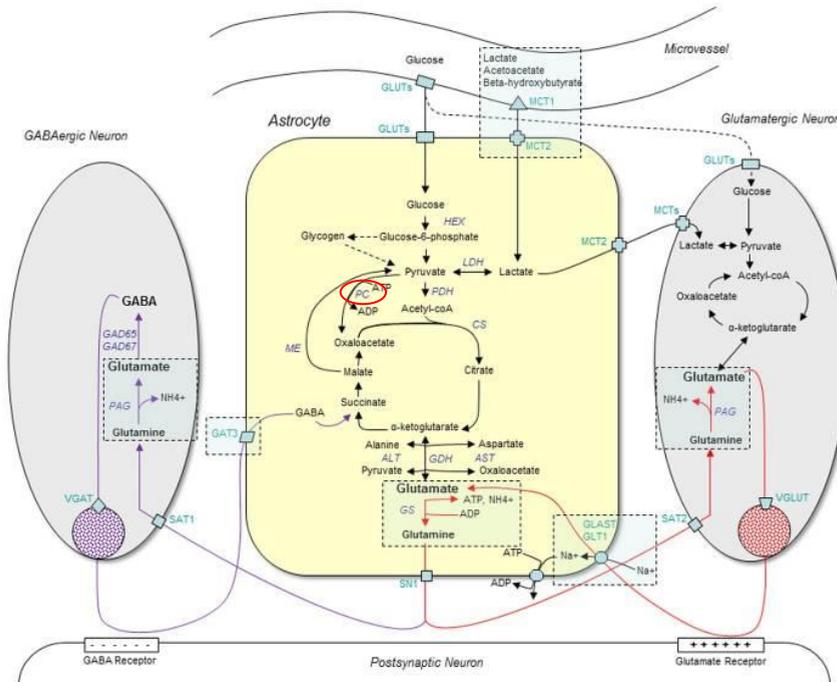


Figura 38. Diagrama que muestra algunas de las principales rutas metabólicas involucradas en la homeostasis del glutamato en el cerebro. Abreviaturas: ADP, adenosín difosfato; ALT, alanina aminotransferasa; AST, aspartato aminotransferasa; ATP adenosín trifosfato; CS, citrato sintasa; GABA, ácido γ -aminobutírico; coA, coenzima A; GAT3, transportador de GABA subtipo 1; GAD65/67, isoformas de la glutamato descarboxilasa; GDH, glutamato deshidrogenasa; GLUTs, transportadores de glucosa; HEX, hexokinasa; LD, lactato deshidrogenasa; MCT1/2, transportadores de monocarboxilato subtipos 1/2; ME, enzima málico; PAG, glutaminasa fosfo-activada; PDH, piruvato deshidrogenasa; SAT1/2, transportadores sistema A subtipos $\frac{1}{2}$; SN1, transportador sistema N subtipo 1; VGAT, transportador vesicular de GABA; VGLUT, transportador vesicular de glutamato. Fuente: Coulter y Eid, 2012.

El glutamato también tiene un importante papel en la detoxificación de la célula. Un defecto en la recaptación de glutamato por parte de los astrocitos puede disminuir la síntesis de glutatión, una de las principales moléculas antioxidantes, y hacer que el cerebro sea vulnerable al daño oxidativo. El antiportador glutamato/cisteína necesita altas concentraciones de glutamato en el astrocito para permitir la entrada de cisteína (uno de los precursores del glutatión) en las células (Albrecht et al., 2010). Además, el glutamato es también necesario para la síntesis de glutatión porque se requiere para la formación de la gamma-glutamilcisteína a partir de glutamato y cisteína.

En la enfermedad de Lafora se ha definido el estrés oxidativo como una característica esencial de la enfermedad (Romá-Mateo et al., 2015b). Nuestros resultados sugieren que este aumento del estrés oxidativo podría deberse en parte a que la disminución en la captación de glutamato por parte de los astrocitos imposibilite a las células para llegar a tener niveles adecuados del antioxidante glutatión.

En cualquier caso, parece claro que los ratones *Epm2b*^{-/-} presentan una menor capacidad de captar glutamato en el hipocampo y que esta se debe a una disminución de la presencia de GLT-1 en la membrana de los astrocitos, probablemente por una endocitosis dinámica acelerada. Una disminución de la captación de glutamato trae aparejada un aumento de la excitabilidad neuronal, la aparición de convulsiones y la muerte neuronal. Estas tres características han sido descritas en la enfermedad de Lafora por lo que proponemos que la epilepsia en la enfermedad de Lafora puede deberse, al

menos en parte, a los mecanismos moleculares, celulares y neurológicos descritos en este trabajo.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. Los ratones *Epm2a*^{-/-} y *Epm2b*^{-/-} de 12 meses de edad presentan reactividad astrocitaria.
2. Los astrocitos primarios de ratones *Epm2a*^{-/-} y *Epm2b*^{-/-} tienen afectada la captación de glutamato.
3. Los niveles del transportador de glutamato GLT-1 están disminuidos en la membrana de astrocitos primarios *Epm2a*^{-/-} y *Epm2b*^{-/-}.
4. La introducción de malina humana en astrocitos *Epm2b*^{-/-} recupera los niveles de GLT-1 en la superficie.
5. La sobreexpresión de laforina y malina en células de neuroblastoma SH-SY5Y aumenta los niveles de EAAT2 en la membrana.
6. El silenciamiento de laforina en células Hek293 que sobreexpresan EAAT2 provoca una disminución de éste en superficie.
7. El complejo laforina-malina favorece la ubiquitinación de EAAT2, lo que provoca una disminución de su solubilidad en detergentes no iónicos.

8. La ubiquitinación de EAAT2 asociada al complejo laforina-malina no etiqueta a la proteína para su degradación proteica.
9. La E3-ubiquitín ligasa Nedd4-2, la única responsable de la ubiquitinación de EAAT2 descrita hasta la fecha, no es capaz de interactuar por CoIP con el complejo laforina-malina ni resultar ubiquitinada por el mismo.
10. El complejo laforina-malina favorece la ubiquitinación de la β -arrestina 1, pero esta modificación no conduce a su degradación.
11. GLT-1 se encuentra aumentado en el hipocampo de ratones *Epm2b*^{-/-} tanto a nivel de proteína como a nivel de mRNA, encontrándose especialmente aumentada la expresión de la isoforma GLT-1b.
12. El aumento de GLT-1 a nivel de proteína observado en el hipocampo de ratones *Epm2b*^{-/-} se localiza en neuronas y no en astrocitos.
13. Los niveles de glutamato extracelular se encuentran aumentados en el hipocampo de ratones *Epm2b*^{-/-}.

REFERENCIAS

REFERENCIAS

- Abousaab, A., Warsi, J., Elvira, B., Lang, F., 2016. Caveolin-1 Sensitivity of Excitatory Amino Acid Transporters. *J. Membr. Biol.* 249, 239–249. doi:10.1007/s00232-015-9863-0
- Adams, M.N., Christensen, M.E., He, Y., Waterhouse, N.J., Hooper, J.D., 2011. The role of palmitoylation in signalling, cellular trafficking and plasma membrane localization of protease-activated receptor-2. *PLoS One* 6, e28018. doi:10.1371/journal.pone.0028018
- Aguado, C., Sarkar, S., Korolchuk, V.I., Criado, O., Vernia, S., Boya, P., Sanz, P., de Córdoba, S.R., Knecht, E., Rubinsztein, D.C., 2010. Laforin, the most common protein mutated in Lafora disease, regulates autophagy. *Hum. Mol. Genet.* 19, 2867–76. doi:10.1093/hmg/ddq190
- Ahmad, A., Dad, R., Ullah, M.I., Baig, T.A., Ahmad, I.N., Nasir, A., Hübner, C.A., Hassan, M.J., 2017. Clinical and genetic studies in patients with Lafora disease from Pakistan. *J. Neurol. Sci.* 373, 263–267. doi:10.1016/j.jns.2017.01.010
- Albrecht, P., Lewerenz, J., Dittmer, S., Noack, R., Maher, P., Methner, A., 2010. Mechanisms of oxidative glutamate toxicity: the glutamate/cystine antiporter system xc- as a neuroprotective drug target. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets* 9, 373–382. doi:10.2174/187152710791292567
- Araque, A., Li, N., Doyle, R.T., Haydon, P.G., 2000. SNARE protein-dependent glutamate release from astrocytes. *J. Neurosci.* 20, 666–73.
- Araque, A., Parpura, V., Sanzgiri, R.P., Haydon, P.G., Araque, A., Parpura, V., Sanzgiri, R.P., Haydon, P.G., 1999. Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends Neurosci.* 22, 208–15. doi:10.1016/S0166-2236(98)01349-6
- Arriza, J.L., Eliasof, S., Kavanaugh, M.P., Amara, S.G., 1997. Excitatory amino acid transporter 5, a retinal glutamate transporter coupled to a chloride conductance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 4155–60.

- Arriza, J.L., Fairman, W.A., Wadiche, J.I., Murdoch, G.H., Kavanaugh, M.P., Amara, S.G., 1994. Functional comparisons of three glutamate transporter subtypes cloned from human motor cortex. *J. Neurosci.* 14, 5559–69.
- Arriza, J.L., Fairman, W.A., Wadiche, J.I., Murdoch, G.H., Kavanaugh, P., Amara, S.G., Kavanaugh, M.P., Amara, S.G., 1994. Functional Comparisons of Three Glutamate Cloned from Human Motor Cortex Transporter. *J. Neurosci.* 14, 5559–5569.
- Autry, A.E., Grillo, C.A., Piroli, G.G., Rothstein, J.D., McEwen, B.S., Reagan, L.P., 2006. Glucocorticoid regulation of GLT-1 glutamate transporter isoform expression in the rat hippocampus. *Neuroendocrinology* 83, 371–9. doi:10.1159/000096092
- Bassan, M., Liu, H., Madsen, K.L., Armsen, W., Zhou, J., DeSilva, T., Chen, W., Paradise, A., Brasch, M.A., Staudinger, J., Gether, U., Irwin, N., Rosenberg, P.A., 2007. Interaction between the glutamate transporter GLT1b and the synaptic PDZ domain protein PICK1. *Eur. J. Neurosci.* 27, 66–82. doi:10.1111/j.1460-9568.2007.05986.x
- Becuwe, M., Herrador, A., Haguenaer-Tsapis, R., Vincent, O., Léon, S., 2012. Ubiquitin-Mediated Regulation of Endocytosis by Proteins of the Arrestin Family. *Biochem. Res. Int.* 2012, 1–12. doi:10.1155/2012/242764
- Bedner, P., Dupper, A., Hüttmann, K., Müller, J., Herde, M.K., Dublin, P., Deshpande, T., Schramm, J., Häussler, U., Haas, C.A., Henneberger, C., Theis, M., Steinhäuser, C., 2015. Astrocyte uncoupling as a cause of human temporal lobe epilepsy. *Brain* 138, 1208–1222. doi:10.1093/brain/awv067
- Ben-Ari, Y., 1985. Limbic seizure and brain damage produced by kainic acid: mechanisms and relevance to human temporal lobe epilepsy. *Neuroscience* 14, 375–403.
- Berkovic, S.F., Andermann, F., Carpenter, S., Wolfe, L.S., 1986. Progressive myoclonus epilepsies: specific causes and diagnosis. *N. Engl. J. Med.* 315, 296–305. doi:10.1056/NEJM198607313150506
- Beschorner, R., Dietz, K., Schauer, N., Mittelbronn, M., Schluesener, H.J., Trautmann, K., Meyermann, R., Simon, P., 2007. Expression of EAAT1 reflects a possible neuroprotective function of reactive astrocytes and activated microglia following human traumatic brain injury. *Histol. Histopathol.* 22, 515–526. doi:10.14670/HH-22.515

- Beschorner, R., Simon, P., Schauer, N., Mittelbronn, M., Schluesener, H.J., Trautmann, K., Dietz, K., Meyermann, R., 2007. Reactive astrocytes and activated microglial cells express EAAT1, but not EAAT2, reflecting a neuroprotective potential following ischaemia. *Histopathology* 50, 897–910. doi:10.1111/j.1365-2559.2007.02703.x
- Biedler, J.L., Roffler-Tarlov, S., Schachner, M., Freedman, L.S., 1978. Multiple neurotransmitter synthesis by human neuroblastoma cell lines and clones. *Cancer Res.* 38, 3751–7.
- Bosco, D.A., LaVoie, M.J., Petsko, G.A., Ringe, D., 2011. Proteostasis and Movement Disorders: Parkinson's Disease and Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 3, a007500–a007500. doi:10.1101/cshperspect.a007500
- Bridges, R.J., Kavanaugh, M.P., Chamberlin, A.R., 1999. A pharmacological review of competitive inhibitors and substrates of high-affinity, sodium-dependent glutamate transport in the central nervous system. *Curr. Pharm. Des.* 5, 363–79.
- Bruno, V., Scapagnini, U., Canonico, P.L., n.d. Excitatory amino acids and neurotoxicity. *Funct. Neurol.* 8, 279–92.
- Buffo, A., Rite, I., Tripathi, P., Lepier, A., Colak, D., Horn, A.-P., Mori, T., Götz, M., 2008. Origin and progeny of reactive gliosis: A source of multipotent cells in the injured brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 3581–6. doi:10.1073/pnas.0709002105
- Calcagno, E., Carli, M., Invernizzi, R.W., 2006. The 5-HT1A receptor agonist 8-OH-DPAT prevents prefrontocortical glutamate and serotonin release in response to blockade of cortical NMDA receptors. *J. Neurochem.* 96, 853–860. doi:10.1111/j.1471-4159.2005.03600.x
- Canafoglia, L., Ciano, C., Visani, E., Anversa, P., Panzica, F., Viri, M., Gennaro, E., Zara, F., Madia, F., Franceschetti, S., 2010. Short and long interval cortical inhibition in patients with Unverricht-Lundborg and Lafora body disease. *Epilepsy Res.* 89, 232–7. doi:10.1016/j.eplepsyres.2010.01.006
- Chan, E.M., Young, E.J., Ianzano, L., Munteanu, I., Zhao, X., Christopoulos, C.C., Avanzini, G., Elia, M., Ackerley, C.A., Jovic, N.J., Bohlega, S., Andermann, E., Rouleau, G.A., Delgado-Escueta, A. V., Minassian, B.A., Scherer, S.W., 2003. Mutations in NHLRC1 cause progressive myoclonus epilepsy. *Nat. Genet.* 35, 125–7. doi:10.1038/hg1238

- Chen, W., Aoki, C., Mahadomrongkul, V., Gruber, C.E., Wang, G.J., Blitzblau, R., Irwin, N., Rosenberg, P.A., 2002. Expression of a variant form of the glutamate transporter GLT1 in neuronal cultures and in neurons and astrocytes in the rat brain. *J. Neurosci.* 22, 2142–52.
- Chen, W., Mahadomrongkul, V., Berger, U. V, Bassan, M., Desilva, T., Tanaka, K., Irwin, N., Aoki, C., Rosenberg, P.A., 2004. The Glutamate Transporter GLT1a Is Expressed in Excitatory Axon Terminals of Mature Hippocampal Neurons. *J. Neurosci.* 24, 1136–1148. doi:10.1523/JNEUROSCI.1586-03.2004
- Cheng, A., Zhang, M., Gentry, M.S., Worby, C.A., Dixon, J.E., Saltiel, A.R., 2007. A role for AGL ubiquitination in the glycogen storage disorders of Lafora and Cori's disease. *Genes Dev.* 21, 2399–409. doi:10.1101/gad.1553207
- Choi, D.W., Hartley, D.M., 1993. Calcium and glutamate-induced cortical neuronal death. *Res. Publ. Assoc. Res. Nerv. Ment. Dis.* 71, 23–34.
- Ciechanover, a, Heller, H., Katz-Etzion, R., Hershko, a, 1981. Activation of the heat-stable polypeptide of the ATP-dependent proteolytic system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 78, 761–765. doi:10.1073/pnas.78.2.761
- Cole, T.B., Coburn, J., Dao, K., Roqué, P., Chang, Y.-C., Kalia, V., Guilarte, T.R., Dziedzic, J., Costa, L.G., 2016. Sex and genetic differences in the effects of acute diesel exhaust exposure on inflammation and oxidative stress in mouse brain. *Toxicology* 374, 1–9. doi:10.1016/j.tox.2016.11.010
- Couarch, P., Vernia, S., Gourfinkel-An, I., Lesca, G., Gataullina, S., Fedirko, E., Trouillard, O., Depienne, C., Dulac, O., Steschenko, D., Leguern, E., Sanz, P., Baulac, S., 2011. Lafora progressive myoclonus epilepsy: NHLRC1 mutations affect glycogen metabolism. *J. Mol. Med.* 89, 915–925. doi:10.1007/s00109-011-0758-y
- Coulter, D.A., Eid, T., 2012. Astrocytic Regulation of Glutamate Homeostasis in Epilepsy. *Glia* 100, 130–134. doi:10.1016/j.pestbp.2011.02.012.Investigations
- Coulter, D.A., Steinhäuser, C., 2015. Role of Astrocytes in Epilepsy. *Cold Spring Harb Perspect Med* 37, 1–16. doi:10.1101/cshperspect.a022434

- Criado, O., Aguado, C., Gayarre, J., Duran-Trio, L., Garcia-Cabrero, A.M., Vernia, S., San Millan, B., Heredia, M., Roma-Mateo, C., Mouron, S., Juana-Lopez, L., Dominguez, M., Navarro, C., Serratos, J.M., Sanchez, M., Sanz, P., Bovolenta, P., Knecht, E., Rodriguez de Cordoba, S., 2012. Lafora bodies and neurological defects in malin-deficient mice correlate with impaired autophagy. *Hum. Mol. Genet.* 21, 1521–1533. doi:10.1093/hmg/ddr590
- Crotti, A., Glass, C.K., 2015. The choreography of neuroinflammation in Huntington's disease. *Trends Immunol.* 36, 364–373. doi:10.1016/j.it.2015.04.007
- D'Ambrosio, R., Maris, D.O., Grady, M.S., Winn, H.R., Janigro, D., 1999. Impaired K(+) homeostasis and altered electrophysiological properties of post-traumatic hippocampal glia. *J. Neurosci.* 19, 8152–62.
- Danbolt, N.C., Furness, D.N., Zhou, Y., 2016. Neuronal vs glial glutamate uptake: Resolving the conundrum. *Neurochem. Int.* 98, 29–45. doi:10.1016/j.neuint.2016.05.009
- Danbolt, N.C., Pines, G., Kanner, B.I., 1990. Purification and reconstitution of the sodium- and potassium-coupled glutamate transport glycoprotein from rat brain. *Biochemistry* 29, 6734–40.
- De Juan-Sanz, J., Zafra, F., López-Corcuera, B., Aragón, C., 2011. Endocytosis of the Neuronal Glycine Transporter GLYT2: Role of Membrane Rafts and Protein Kinase C-Dependent Ubiquitination. *Traffic* 12, 1850–1867. doi:10.1111/j.1600-0854.2011.01278.x
- Delgado-Escueta, A. V., 2007. Advances in lafora progressive myoclonus epilepsy. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* 7, 428–33.
- Dennis, S.C., Lai, J.C., Clark, J.B., 1977. Comparative studies on glutamate metabolism in synaptic and non-synaptic rat brain mitochondria. *Biochem. J.* 164, 727–36. doi:10.1042/BJ1640727
- Deshai, R.J., Joazeiro, C.A.P., 2009. RING domain E3 ubiquitin ligases. *Annu. Rev. Biochem.* 78, 399–434. doi:10.1146/annurev.biochem.78.101807.093809
- Donovan, P., Poronnik, P., 2013. Nedd4 and Nedd4-2: Ubiquitin ligases at work in the neuron. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 45, 706–710. doi:10.1016/j.biocel.2012.12.006
- Earle, K.M., Baldwin, M., Penfield, W., 1953. Incisural sclerosis and temporal lobe seizures produced by hippocampal herniation at

- birth. *AMA. Arch. Neurol. Psychiatry* 69, 27–42.
- Eid, T., Thomas, M., Spencer, D., Rundén-Pran, E., Lai, J., Malthankar, G., Kim, J., Danbolt, N., Ottersen, O., de Lanerolle, N., 2004. Loss of glutamine synthetase in the human epileptogenic hippocampus: possible mechanism for raised extracellular glutamate in mesial temporal lobe epilepsy. *Lancet* 363, 28–37. doi:10.1016/S0140-6736(03)15166-5
- Eisele, Y.S., 2013. From Soluble A β to Progressive A β Aggregation: Could Prion-Like Templated Misfolding Play a Role? *Brain Pathol.* 23, 333–341. doi:10.1111/bpa.12049
- Fairman, W.A., Vandenberg, R.J., Arriza, J.L., Kavanaugh, M.P., Amara, S.G., 1995. An excitatory amino-acid transporter with properties of a ligand-gated chloride channel. *Nature* 375, 599–603. doi:10.1038/375599a0
- Figiel, M., Engele, J., 2000. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP), a neuron-derived peptide regulating glial glutamate transport and metabolism. *J. Neurosci.* 20, 3596–605.
- Fonnum, F., 1984. Glutamate: a neurotransmitter in mammalian brain. *J. Neurochem.* 42, 1–11.
- Foran, E., Rosenblum, L., Bogush, A., Pasinelli, P., Trotti, D., 2014. Sumoylation of the astroglial glutamate transporter EAAT2 governs its intracellular compartmentalization. *Glia* 62, 1241–1253. doi:10.1002/glia.22677
- Franceschetti, S., Gambardella, A., Canafoglia, L., Striano, P., Lohi, H., Gennaro, E., Ianzano, L., Veggiotti, P., Sofia, V., Biondi, R., Striano, S., Gellera, C., Annesi, G., Madia, F., Civitelli, D., Rocca, F.E., Quattrone, A., Avanzini, G., Minassian, B., Zara, F., 2006. Clinical and Genetic Findings in 26 Italian Patients with Lafora Disease. *Epilepsia* 47, 640–643. doi:10.1111/j.1528-1167.2006.00479.x
- Franklin, K.B.J., Paxinos, G., 2012. Paxinos and Franklin's The mouse brain in stereotaxic coordinates.
- Furness, D.N., Dehnes, Y., Akhtar, A.Q., Rossi, D.J., Hamann, M., Grutle, N.J., Gundersen, V., Holmseth, S., Lehre, K.P., Ullensvang, K., Wojewodzic, M., Zhou, Y., Attwell, D., Danbolt, N.C., 2008. A quantitative assessment of glutamate uptake into hippocampal synaptic terminals and astrocytes: New insights into a neuronal role for excitatory amino acid transporter 2 (EAAT2).

- Neuroscience 157, 80–94.
doi:10.1016/j.neuroscience.2008.08.043
- Ganesh, S., Puri, R., Singh, S., Mittal, S., Dubey, D., 2006. Recent advances in the molecular basis of Lafora's progressive myoclonus epilepsy. *J. Hum. Genet.* 51, 1–8. doi:10.1007/s10038-005-0321-1
- García-Cabrero, A.M., Marinas, A., Guerrero, R., de Córdoba, S.R., Serratos, J.M., Sánchez, M.P., 2012. Laforin and malin deletions in mice produce similar neurologic impairments. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 71, 413–21. doi:10.1097/NEN.0b013e318253350f
- García-Cabrero, A.M., Sánchez-Elexpuru, G., Serratos, J.M., Sánchez, M.P., 2014. Enhanced sensitivity of laforin- and malin-deficient mice to the convulsant agent pentylentetrazole. *Front. Neurosci.* 8, 1–7. doi:10.3389/fnins.2014.00291
- García-Tardón, N., González-González, I.M., Martínez-Villarreal, J., Fernández-Sánchez, E., Giménez, C., Zafra, F., 2012. Protein kinase C (PKC)-promoted endocytosis of glutamate transporter GLT-1 requires ubiquitin ligase Nedd4-2-dependent ubiquitination but not phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 287, 19177–87. doi:10.1074/jbc.M112.355909
- Gardier, A.M., 2013. Antidepressant activity: contribution of brain microdialysis in knock-out mice to the understanding of BDNF/5-HT transporter/5-HT autoreceptor interactions. *Front. Pharmacol.* 4, 98. doi:10.3389/fphar.2013.00098
- Garyali, P., Siwach, P., Singh, P.K., Puri, R., Mittal, S., Sengupta, S., Parihar, R., Ganesh, S., 2009. The malin-laforin complex suppresses the cellular toxicity of misfolded proteins by promoting their degradation through the ubiquitin-proteasome system. *Hum. Mol. Genet.* 18, 688–700. doi:10.1093/hmg/ddn398
- Gentry, M.S., Worby, C.A., Dixon, J.E., 2005. Insights into Lafora disease: malin is an E3 ubiquitin ligase that ubiquitinates and promotes the degradation of laforin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 8501–6. doi:10.1073/pnas.0503285102
- Ghosh, M., Yang, Y., Rothstein, J.D., Robinson, M.B., 2011. Nuclear factor- κ B contributes to neuron-dependent induction of glutamate transporter-1 expression in astrocytes. *J. Neurosci.* 31, 9159–69. doi:10.1523/JNEUROSCI.0302-11.2011
- Gibbs, E.L., Gibbs, F.A., 1951. Electroencephalographic evidence of

- thalamic and hypothalamic epilepsy. *Neurology* 1, 136–44.
- Goel, P., Manning, J.A., Kumar, S., 2015. NEDD4-2 (NEDD4L): the ubiquitin ligase for multiple membrane proteins. *Gene* 557, 1–10. doi:10.1016/j.gene.2014.11.051
- Goldring, S., 1972. The role of prefrontal cortex in grand mal convulsion. *Arch. Neurol.* 26, 109–19.
- Gonzalez, M.I., Krizman-Genda, E., Robinson, M.B., 2007. Caveolin-1 Regulates the Delivery and Endocytosis of the Glutamate Transporter, Excitatory Amino Acid Carrier 1. *J. Biol. Chem.* 282, 29855–29865. doi:10.1074/jbc.M704738200
- Grant, B.D., Donaldson, J.G., 2009. Pathways and mechanisms of endocytotic recycling. *Mol. Cell Biol.* 10, 597–604. doi:10.1038/nrm2755.Pathways
- Grewer, C., Gameiro, A., Rauen, T., 2014. SLC1 glutamate transporters. *Pflügers Arch. - Eur. J. Physiol.* 466, 3–24. doi:10.1007/s00424-013-1397-7
- Groarke, D.A., Drmota, T., Bahia, D.S., Evans, N.A., Wilson, S., Milligan, G., 2001. Analysis of the C-terminal tail of the rat thyrotropin-releasing hormone receptor-1 in interactions and cointernalization with beta-arrestin 1-green fluorescent protein. *Mol. Pharmacol.* 59, 375–85.
- Harvey, K.F., Dinudom, A., Cook, D.I., Kumar, S., 2001. The Nedd4-like protein KIAA0439 is a potential regulator of the epithelial sodium channel. *J. Biol. Chem.* 276, 8597–601. doi:10.1074/jbc.C000906200
- Hicke, L., Dunn, R., 2003. Regulation of membrane protein transport by ubiquitin and ubiquitin-binding proteins. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 19, 141–72. doi:10.1146/annurev.cellbio.19.110701.154617
- Huang, K., Kang, M.H., Askew, C., Kang, R., Sanders, S.S., Wan, J., Davis, N.G., Hayden, M.R., 2010. Palmitoylation and function of glial glutamate transporter-1 is reduced in the YAC128 mouse model of Huntington disease. *Neurobiol. Dis.* 40, 207–215. doi:10.1016/j.nbd.2010.05.027
- Hukovic, N., Panetta, R., Kumar, U., Patel, Y.C., 1996. Agonist-dependent regulation of cloned human somatostatin receptor types 1-5 (hSSTR1-5): subtype selective internalization or upregulation. *Endocrinology* 137, 4046–4049.

doi:10.1210/endo.137.9.8756582

- Ibañez, I., Diez-Guerra, F.J., Giménez, C., Zafra, F., 2016. Neuropharmacology Activity dependent internalization of the glutamate transporter GLT-1 mediated by β -arrestin 1 and ubiquitination. *Neuropharmacology* 107, 376–386. doi:10.1016/j.neuropharm.2016.03.042
- Ingham, R.J., Gish, G., Pawson, T., 2004. The Nedd4 family of E3 ubiquitin ligases: functional diversity within a common modular architecture. *Oncogene* 23, 1972–84. doi:10.1038/sj.onc.1207436
- Jennesson, M., Milh, M., Villeneuve, N., Guedj, E., Marie, P.-Y., Vignal, J.-P., Raffo, E., Vespignani, H., Mancini, J., Maillard, L., 2010. Posterior glucose hypometabolism in Lafora disease: early and late FDG-PET assessment. *Epilepsia* 51, 708–11. doi:10.1111/j.1528-1167.2009.02498.x
- Jiménez, E., Núñez, E., Ibañez, I., Draffin, J.E., Zafra, F., Giménez, C., 2014. Differential regulation of the glutamate transporters GLT-1 and GLAST by GSK3 β . *Neurochem. Int.* 79, 33–43. doi:10.1016/j.neuint.2014.10.003
- Jung, N., Haucke, V., 2007. Clathrin-Mediated Endocytosis at Synapses. *Traffic* 8, 1129–1136. doi:10.1111/j.1600-0854.2007.00595.x
- Kanai, Y., Hediger, M.A., 1992. Primary structure and functional characterization of a high-affinity glutamate transporter. *Nature* 360, 467–471. doi:10.1038/360467a0
- Kanelis, V., Rotin, D., Forman-Kay, J.D., 2001. Solution structure of a Nedd4 WW domain-ENaC peptide complex. *Nat. Struct. Biol.* 8, 407–412. doi:10.1038/87562
- Karki, P., Webb, A., Smith, K., Johnson, J., Lee, K., Son, D.-S., Aschner, M., Lee, E., 2014a. Yin Yang 1 Is a Repressor of Glutamate Transporter EAAT2, and It Mediates Manganese-Induced Decrease of EAAT2 Expression in Astrocytes. *Mol. Cell. Biol.* 34, 1280–9. doi:10.1128/MCB.01176-13
- Karki, P., Webb, A., Smith, K., Lee, K., Son, D.-S., Aschner, M., Lee, E., 2013. cAMP response element-binding protein (CREB) and nuclear factor κ B mediate the tamoxifen-induced up-regulation of glutamate transporter 1 (GLT-1) in rat astrocytes. *J. Biol. Chem.* 288, 28975–86. doi:10.1074/jbc.M113.483826

- Karki, P., Webb, A., Zerguine, A., Choi, J., Son, D.-S., Lee, E., 2014b. Mechanism of raloxifene-induced upregulation of glutamate transporters in rat primary astrocytes. *Glia* 62, 1270–83. doi:10.1002/glia.22679
- Kasanov, J., Pirozzi, G., Uveges, A.J., Kay, B.K., 2001. Characterizing Class I WW domains defines key specificity determinants and generates mutant domains with novel specificities. *Chem. Biol.* 8, 231–41.
- Kasper, D.L., Braunwald, E., Fauci, A.S., Stephen, L., Longo, D.L., Jameson, J.L., Isselbacher, K.J., 2005. *Principios de Medicina Interna*, 16ª edició. ed. McGraw-Hill.
- Katz, M., Shtiegman, K., Tal-Or, P., Yakir, L., Mosesson, Y., Harari, D., Machluf, Y., Asao, H., Jovin, T., Sugamura, K., Yarden, Y., 2002. Ligand-independent degradation of epidermal growth factor receptor involves receptor ubiquitylation and Hgs, an adaptor whose ubiquitin-interacting motif targets ubiquitylation by Nedd4. *Traffic* 3, 740–751. doi:tra031006 [pii]
- Kawate, N., Menon, K.M., 1994. Palmitoylation of luteinizing hormone/human choriogonadotropin receptors in transfected cells. Abolition of palmitoylation by mutation of Cys-621 and Cys-622 residues in the cytoplasmic tail increases ligand-induced internalization of the receptor. *J. Biol. Chem.* 269, 30651–8.
- Kettenmann, H., Verkhratsky, A., 2008. Neuroglia: the 150 years after. *Trends Neurosci.* 31, 653–9. doi:10.1016/j.tins.2008.09.003
- Kim, K., Lee, S.-G., Kegelman, T.P., Su, Z.-Z., Das, S.K., Dash, R., Dasgupta, S., Barral, P.M., Hedvat, M., Diaz, P., Reed, J.C., Stebbins, J.L., Pellecchia, M., Sarkar, D., Fisher, P.B., 2011. Role of excitatory amino acid transporter-2 (EAAT2) and glutamate in neurodegeneration: opportunities for developing novel therapeutics. *J. Cell. Physiol.* 226, 2484–93. doi:10.1002/jcp.22609
- Kim, S.-Y., Chao, W., Choi, S.-Y., Volsky, D.J., 2003. Cloning and characterization of the 3'-untranslated region of the human excitatory amino acid transporter 2 transcript. *J. Neurochem.* 86, 1458–1467. doi:10.1046/j.1471-4159.2003.01958.x
- Kivi, A., Lehmann, T.-N., Kovács, R., Eilers, A., Jauch, R., Meencke, H.J., Von Deimling, A., Heinemann, U., Gabriel, S., 2000. Effects of barium on stimulus-induced rises of $[K^+]_o$ in human epileptic non-sclerotic and sclerotic hippocampal area CA1. *Eur. J.*

- Neurosci. 12, 2039–2048. doi:10.1046/j.1460-9568.2000.00103.x
- Knecht, E., Aguado, C., Sarkar, S., Korolchuk, V.I., Criado-García, O., Vernia, S., Boya, P., Sanz, P., Rodríguez de Córdoba, S., Rubinsztein, D.C., 2010. Impaired autophagy in Lafora disease. *Autophagy* 6, 991–3. doi:10.4161/auto6.7.13308
- Knecht, E., Criado-García, O., Aguado, C., Gayarre, J., Duran-Trio, L., Garcia-Cabrero, A.M., Vernia, S., San Millán, B., Heredia, M., Romá-Mateo, C., Mouron, S., Juana-López, L., Domínguez, M., Navarro, C., Serratos, J.M., Sanchez, M., Sanz, P., Bovolenta, P., Rodríguez de Córdoba, S., 2012. Malin knockout mice support a primary role of autophagy in the pathogenesis of Lafora disease. *Autophagy* 8, 701–703. doi:10.4161/auto.19522
- Kumar, S., Tomooka, Y., Noda, M., 1992. Identification of a set of genes with developmentally down-regulated expression in the mouse brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 185, 1155–61.
- Lafora, G.R., Glueck, B., 1911. Beitrag zur Histopathologie der myoklonischen Epilepsie - Bearbeitung des klinischen Teiles. *Zeitschrift für die gesamte Neurol. und Psychiatr.* 6, 1–14. doi:10.1007/BF02863929
- Lange, S.C., Lasse, K.B., Waagepetersen, H.S., Schousboe, A., Norenberg, M.D., 2012. Primary Cultures of Astrocytes: Their Value in Understanding Astrocytes in Health and Disease. *Neurochem. Res.* 37, 2569–2588. doi:10.1007/s11064-012-0868-0.Primary
- Lankiewicz, S., Marc Luetjens, C., Truc Bui, N., Krohn, A.J., Poppe, M., Cole, G.M., Saido, T.C., Prehn, J.H., 2000. Activation of calpain I converts excitotoxic neuron death into a caspase-independent cell death. *J. Biol. Chem.* 275, 17064–71. doi:10.1074/JBC.275.22.17064
- Lauriat, T.L., McInnes, L.A., 2007. EAAT2 regulation and splicing: relevance to psychiatric and neurological disorders. *Mol. Psychiatry* 12, 1065–1078. doi:10.1038/sj.mp.4002065
- Laywell, E.D., Rakic, P., Kukekov, V.G., Holland, E.C., Steindler, D.A., 2000. Identification of a multipotent astrocytic stem cell in the immature and adult mouse brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 13883–8. doi:10.1073/pnas.250471697
- Lee, A., Pow, D. V., 2010. Astrocytes: Glutamate transport and alternate splicing of transporters. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 42, 1901–6.

doi:10.1016/j.biocel.2010.09.016

- Lee, E., Sidoryk-Wegrzynowicz, M., Wang, N., Webb, A., Son, D.-S., Lee, K., Aschner, M., 2012. GPR30 Regulates Glutamate Transporter GLT-1 Expression in Rat Primary Astrocytes. *J. Biol. Chem.* 287, 26817–26828. doi:10.1074/jbc.M112.341867
- Lehre, K.P., Danbolt, N.C., 1998. The number of glutamate transporter subtype molecules at glutamatergic synapses: chemical and stereological quantification in young adult rat brain. *J. Neurosci.* 18, 8751–7.
- Levy, L.M., Warr, O., Attwell, D., 1998. Stoichiometry of the glial glutamate transporter GLT-1 expressed inducibly in a Chinese hamster ovary cell line selected for low endogenous Na⁺-dependent glutamate uptake. *J. Neurosci.* 18, 9620–8.
- Lin, A.W., Man, H.Y., 2013. Ubiquitination of neurotransmitter receptors and postsynaptic scaffolding proteins. *Neural Plast.* 2013. doi:10.1155/2013/432057
- Lin, C.-L.G., Kong, Q., Cuny, G.D., Glicksman, M.A., 2012. Glutamate transporter EAAT2: a new target for the treatment of neurodegenerative diseases. *Future Med. Chem.* 4, 1689–700. doi:10.4155/fmc.12.122
- Liu, Y., Wang, Y., Wu, C., Liu, Y., Zheng, P., 2009. Deletions and missense mutations of EPM2A exacerbate unfolded protein response and apoptosis of neuronal cells induced by endoplasmic reticulum stress. *Hum. Mol. Genet.* 18, 2622–2631. doi:10.1093/hmg/ddp196
- Lohi, H., Ianzano, L., Zhao, X.-C., Chan, E.M., Turnbull, J., Scherer, S.W., Ackerley, C.A., Minassian, B.A., 2005. Novel glycogen synthase kinase 3 and ubiquitination pathways in progressive myoclonus epilepsy. *Hum. Mol. Genet.* 14, 2727–36. doi:10.1093/hmg/ddi306
- López-González, I., Viana, R., Sanz, P., Ferrer, I., 2016. Inflammation in Lafora Disease: Evolution with Disease Progression in Laforin and Malin Knock-out Mouse Models. *Mol. Neurobiol.* 1–12. doi:10.1007/s12035-016-9884-4
- MacAulay, N., Gether, U., Klaerke, D.A., Zeuthen, T., 2001. Water transport by the human Na⁺-coupled glutamate cotransporter expressed in *Xenopus* oocytes. *J. Physiol.* 530, 367–78. doi:10.1111/J.1469-7793.2001.0367K.X

- MacAulay, N., Hamann, S., Zeuthen, T., 2004. Water transport in the brain: Role of cotransporters. *Neuroscience* 129, 1029–1042. doi:10.1016/j.neuroscience.2004.06.045
- Maljevic, S., Krampfl, K., Cobilanschi, J., Tilgen, N., Beyer, S., Weber, Y.G., Schlesinger, F., Ursu, D., Melzer, W., Cossette, P., Bufler, J., Lerche, H., Heils, A., 2006. A mutation in the GABA(A) receptor alpha(1)-subunit is associated with absence epilepsy. *Ann. Neurol.* 59, 983–7. doi:10.1002/ana.20874
- Malthankar-Phatak, G.H., de Lanerolle, N., Eid, T., Spencer, D.D., Behar, K.L., Spencer, S.S., Kim, J.H., Lai, J.C.K., 2006. Differential Glutamate Dehydrogenase (GDH) Activity Profile in Patients with Temporal Lobe Epilepsy. *Epilepsia* 47, 1292–1299. doi:10.1111/j.1528-1167.2006.00543.x
- Maragakis, N.J., Dykes-Hoberg, M., Rothstein, J.D., 2004. Altered Expression of the Glutamate Transporter EAAT2b in Neurological Disease. *Ann. Neurol.* 55, 469–477. doi:10.1002/ana.20003
- Martin, S., Nishimune, A., Mellor, J.R., Henley, J.M., 2007. SUMOylation regulates kainate-receptor-mediated synaptic transmission. *Nature* 447, 321–5. doi:10.1038/nature05736
- Martinez-Hernandez, A., Bell, K.P., Norenberg, M.D., 1977. Glutamine synthetase: glial localization in brain. *Science* 195, 1356–8.
- Martínez-Villarreal, J., García Tardón, N., Ibáñez, I., Giménez, C., Zafra, F., 2012. Cell surface turnover of the glutamate transporter GLT-1 is mediated by ubiquitination/deubiquitination. *Glia* 60, 1356–65. doi:10.1002/glia.22354
- Mathern, G.W., Mendoza, D., Lozada, A., Pretorius, J.K., Dehnes, Y., Danbolt, N.C., Nelson, N., Leite, J.P., Chimelli, L., Born, D.E., Sakamoto, A.C., Assirati, J.A., Fried, I., Peacock, W.J., Ojemann, G.A., Adelson, P.D., 1999. Hippocampal GABA and glutamate transporter immunoreactivity in patients with temporal lobe epilepsy. *Neurology* 52, 453–72.
- Mayor, S., Pagano, R.E., 2007. Pathways of clathrin-independent endocytosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 603–612. doi:10.1038/nrm2216
- Meldrum, B., 1991. Excitotoxicity and epileptic brain damage. *Epilepsy Res.* 10, 55–61.
- Meldrum, B., 1986. Excitatory amino acid antagonists as novel

- anticonvulsants. *Adv. Exp. Med. Biol.* 203, 321–9.
- Meldrum, B.S., Akbar, M.T., Chapman, a G., 1999. Glutamate receptors and transporters in genetic and acquired models of epilepsy. *Epilepsy Res.* 36, 189–204.
- Melki, R., 2015. Role of Different Alpha-Synuclein Strains in Synucleinopathies, Similarities with other Neurodegenerative Diseases. *J. Parkinsons. Dis.* 5, 217–227. doi:10.3233/JPD-150543
- Meyer, T., Münch, C., Knappenberger, B., Liebau, S., Völkel, H., Ludolph, A., 1998. Alternative splicing of the glutamate transporter EAAT2 (GLT-1). *Neurosci. Lett.* 241, 68–70. doi:10.1016/S0304-3940(97)00973-7
- Min, C., Zheng, M., Zhang, X., Guo, S., Kwon, K.J., Shin, C.Y., Kim, H.S., Cheon, S.H., Kim, K.M., 2015. N-linked Glycosylation on the N-terminus of the dopamine D2 and D3 receptors determines receptor association with specific microdomains in the plasma membrane. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1853, 41–51. doi:10.1016/j.bbamcr.2014.09.024
- Minassian, B.A., 2001. Lafora's disease: towards a clinical, pathologic, and molecular synthesis. *Pediatr. Neurol.* 25, 21–9.
- Minassian, B.A., Ianzano, L., Delgado-Escueta, A. V., Scherer, S.W., 2000. Identification of new and common mutations in the EPM2A gene in Lafora disease. *Neurology* 54, 488–90.
- Minassian, B.A., Lee, J.R., Herbrick, J.A., Huizenga, J., Soder, S., Mungall, A.J., Dunham, I., Gardner, R., Fong, C.Y., Carpenter, S., Jardim, L., Satishchandra, P., Andermann, E., Snead, O.C., Lopes-Cendes, I., Tsui, L.C., Delgado-Escueta, A. V., Rouleau, G.A., Scherer, S.W., 1998. Mutations in a gene encoding a novel protein tyrosine phosphatase cause progressive myoclonus epilepsy. *Nat. Genet.* 20, 171–4. doi:10.1038/2470
- Mineo, C., Gill, G.N., Richard, G., Anderson, W., Anderson, R.G.W., 1999. Regulated Migration of Epidermal Growth Factor Receptor from Caveolae Regulated Migration of Epidermal Growth Factor Receptor from Caveolae. *J. Biol. Chem.* 274, 30636–30643. doi:10.1074/jbc.274.43.30636
- Miñana, R., Sancho-Tello, M., Climent, E., Seguí, J.M., Renau-Piqueras, J., Guerri, C., 1998. Intracellular location, temporal expression, and polysialylation of neural cell adhesion molecule in

- astrocytes in primary culture. *Glia* 24, 415–27.
- Miyasaka, M., Kawamura, H., 1963. Effect of reticular and hypothalamic stimulation upon the susceptibility of the neocortex, amygdala and hippocampus to seizure discharges. *Folia Psychiatr. Neurol. Jpn.* 17, 230–42.
- Morel, L., Regan, M., Higashimori, H., Ng, S.K., Esau, C., Vidensky, S., Rothstein, J., Yang, Y., 2013. Neuronal exosomal miRNA-dependent translational regulation of astroglial glutamate transporter GLT1. *J. Biol. Chem.* 288, 7105–16. doi:10.1074/jbc.M112.410944
- Münch, C., Schwalenstöcker, B., Knappenberger, B., Liebau, S., Völkel, H., Ludolph, A.C., Meyer, T., 1998. 5'-heterogeneity of the human excitatory amino acid transporter cDNA EAAT2 (GLT-1). *Neuroreport* 9, 1295–7.
- Murphy-Royal, C., Dupuis, J.P., Varela, J. a, Panatier, A., Pinson, B., Baufreton, J., Groc, L., Oliet, S.H.R., 2015. Surface diffusion of astrocytic glutamate transporters shapes synaptic transmission. *Nat. Neurosci.* 18, 219–26. doi:10.1038/nn.3901
- Nadler, J. V, Cuthbertson, G.J., 1980. Kainic acid neurotoxicity toward hippocampal formation: dependence on specific excitatory pathways. *Brain Res.* 195, 47–56.
- O'Donovan, S.M., Hasselfeld, K., Bauer, D., Simmons, M., Roussos, P., Haroutunian, V., Meador-Woodruff, J.H., McCullumsmith, R.E., 2015. Glutamate transporter splice variant expression in an enriched pyramidal cell population in schizophrenia. *Transl. Psychiatry* 5, e579. doi:10.1038/tp.2015.74
- Oberheim, N.A., Tian, G.F., Han, X., Peng, W., Takano, T., Ransom, B., Nedergaard, M., 2008. Loss of astrocytic domain organization in the epileptic brain. *J Neurosci* 28, 3264–3276. doi:10.1523/JNEUROSCI.4980-07.2008
- Oddi, S., Dainese, E., Sandiford, S., Fezza, F., Lanuti, M., Chiurchiù, V., Totaro, A., Catanzaro, G., Barcaroli, D., De Laurenzi, V., Centonze, D., Mukhopadhyay, S., Selent, J., Howlett, A.C., Maccarrone, M., 2012. Effects of palmitoylation of Cys(415) in helix 8 of the CB(1) cannabinoid receptor on membrane localization and signalling. *Br. J. Pharmacol.* 165, 2635–51. doi:10.1111/j.1476-5381.2011.01658.x
- Olney, J.W., Collins, R.C., Sloviter, R.S., 1986. Excitotoxic mechanisms

- of epileptic brain damage. *Adv. Neurol.* 44, 857–877.
- Olney, J.W., Sharpe, L.G., Feigin, R.D., 1972. Glutamate-induced brain damage in infant primates. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 31, 464–88.
- Ortinski, P.I., Dong, J., Mungenast, A., Yue, C., Takano, H., Watson, D.J., Haydon, P.G., Coulter, D. a, 2010. Selective induction of astrocytic gliosis generates deficits in neuronal inhibition. *Nat. Neurosci.* 13, 584–91. doi:10.1038/nn.2535
- Ortolano, S., Vieitez, I., Agis-Balboa, R.C., Spuch, C., 2014. Loss of GABAergic cortical neurons underlies the neuropathology of Lafora disease. *Mol. Brain* 7, 7. doi:10.1186/1756-6606-7-7
- Osborn, L.M., Kamphuis, W., Wadman, W.J., Hol, E.M., 2016. Astroglialosis: An integral player in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Prog. Neurobiol.* 144, 121–141. doi:10.1016/j.pneurobio.2016.01.001
- Pan, P.Y., Yue, Z., 2014. Genetic causes of Parkinson's disease and their links to autophagy regulation. *Park. Relat. Disord.* 20, S154–S157. doi:10.1016/S1353-8020(13)70037-3
- Parpura, V., Heneka, M.T., Montana, V., Oliek, S.H.R., Haydon, P.G., Jr, R.F.S., Spray, D.C., 2013. Glial cells in (patho)physiology. *J Neurochem* 121, 4–27. doi:10.1111/j.1471-4159.2012.07664.x.Glial
- Pascual, M., Montesinos, J., Marcos, M., Torres, J.L., Costa-Alba, P., García-García, F., Laso, F.J., Guerri, C., 2016. Gender differences in the inflammatory cytokine and chemokine profiles induced by binge ethanol drinking in adolescence. *Addict. Biol.* doi:10.1111/adb.12461
- Pekny, M., Pekna, M., 2014. Astrocyte Reactivity and Reactive Astroglialosis: Costs and Benefits. *Physiol. Rev.* 94, 1077–1098. doi:10.1152/physrev.00041.2013
- Perisic, T., Holsboer, F., Rein, T., Zschocke, J., 2012. The CpG island shore of the GLT-1 gene acts as a methylation-sensitive enhancer. *Glia* 60, 1345–55. doi:10.1002/glia.22353
- Perisic, T., Zimmermann, N., Kirmeier, T., Asmus, M., Tuorto, F., Uhr, M., Holsboer, F., Rein, T., Zschocke, J., 2010. Valproate and amitriptyline exert common and divergent influences on global and gene promoter-specific chromatin modifications in rat primary

- astrocytes. *Neuropsychopharmacology* 35, 792–805.
doi:10.1038/npp.2009.188
- Persaud, A., Alberts, P., Amsen, E.M., Xiong, X., Wasmuth, J., Saadon, Z., Fladd, C., Parkinson, J., Rotin, D., 2009. Comparison of substrate specificity of the ubiquitin ligases Nedd4 and Nedd4-2 using proteome arrays. *Mol. Syst. Biol.* 5, 333.
doi:10.1038/msb.2009.85
- Petr, G.T., Sun, Y., Frederick, N.M., Zhou, Y., Dhamne, S.C., Hameed, M.Q., Miranda, C., Bedoya, E.A., Fischer, K.D., Armsen, W., Wang, J., Danbolt, N.C., Rotenberg, A., Aoki, C.J., Rosenberg, P.A., 2015. Conditional deletion of the glutamate transporter GLT-1 reveals that astrocytic GLT-1 protects against fatal epilepsy while neuronal GLT-1 contributes significantly to glutamate uptake into synaptosomes. *J. Neurosci.* 35, 5187–201.
doi:10.1523/JNEUROSCI.4255-14.2015
- Pitkänen, A., Löscher, W., Vezzani, A., Becker, A.J., Simonato, M., Lukasiuk, K., Gröhn, O., Bankstahl, J.P., Friedman, A., Aronica, E., Gorter, J.A., Ravizza, T., Sisodiya, S.M., Kokaia, M., Beck, H., 2016. Advances in the development of biomarkers for epilepsy. *Lancet Neurol.* 15, 843–856. doi:10.1016/S1474-4422(16)00112-5
- Pow, D. V., Naidoo, T., Lingwood, B.E., Healy, G.N., Williams, S.M., Sullivan, R.K.P., O'Driscoll, S., Colditz, P.B., 2004. Loss of glial glutamate transporters and induction of neuronal expression of GLT-1B in the hypoxic neonatal pig brain. *Dev. Brain Res.* 153, 1–11. doi:10.1016/j.devbrainres.2004.06.019
- Pow, D. V., Cook, D.G., 2009. Neuronal expression of splice variants of “glial” glutamate transporters in brains afflicted by Alzheimer’s disease: Unmasking an intrinsic neuronal property. *Neurochem. Res.* 34, 1748–1757. doi:10.1007/s11064-009-9957-0
- Proper, E.A., Hoogland, G., Kappen, S.M., Jansen, G.H., Rensen, M.G.A., Schrama, L.H., van Veelen, C.W.M., van Rijen, P.C., van Nieuwenhuizen, O., Gispen, W.H., de Graan, P.N.E., 2002. Distribution of glutamate transporters in the hippocampus of patients with pharmaco-resistant temporal lobe epilepsy. *Brain* 125, 32–43.
- Rauen, T., Wießner, M., Sullivan, R., Lee, A., Pow, D. V., 2004. A new GLT1 splice variant: cloning and immunolocalization of GLT1c in the mammalian retina and brain. *Neurochem. Int.* 45, 1095–1106.
doi:10.1016/j.neuint.2004.04.006

- Reagan, L.P., Rosell, D.R., Wood, G.E., Spedding, M., Muñoz, C., Rothstein, J., McEwen, B.S., 2004. Chronic restraint stress up-regulates GLT-1 mRNA and protein expression in the rat hippocampus: reversal by tianeptine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 2179–84. doi:10.1073/pnas.0307294101
- Rimmele, T.S., Rosenberg, P.A., 2016. GLT-1: The elusive presynaptic glutamate transporter. *Neurochem. Int.* 98, 19–28. doi:10.1016/j.neuint.2016.04.010
- Romá-Mateo, C., Aguado, C., García-Giménez, J.L., Ibáñez-Cabellos, J.S., Seco-Cervera, M., Pallardó, F. V., Knecht, E., Sanz, P., 2015a. Increased Oxidative Stress and Impaired Antioxidant Response in Lafora Disease. *Mol. Neurobiol.* 51, 932–946. doi:10.1007/s12035-014-8747-0
- Romá-Mateo, C., Aguado, C., García-Giménez, J.L., Knecht, E., Sanz, P., Pallardó, F. V., 2015b. Oxidative stress, a new hallmark in the pathophysiology of Lafora progressive myoclonus epilepsy. *Free Radic. Biol. Med.* 88, 30–41. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2015.01.034
- Rotin, D., Kumar, S., 2009. Physiological functions of the HECT family of ubiquitin ligases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 398–409. doi:10.1038/nrm2690
- Rotin, D., Staub, O., 2011. Role of the ubiquitin system in regulating ion transport. *Pflugers Arch.* 461, 1–21. doi:10.1007/s00424-010-0893-2
- Rozyczka, J., Engele, J., 2005. Multiple 5'-splice variants of the rat glutamate transporter-1. *Mol. Brain Res.* 133, 157–161. doi:10.1016/j.molbrainres.2004.09.021
- Rubio-Villena, C., Garcia-Gimeno, M.A., Sanz, P., 2013. Glycogenic activity of R6, a protein phosphatase 1 regulatory subunit, is modulated by the laforin-malin complex 45. doi:10.1016/j.biocel.2013.04.019
- Schipke, C.G., Haas, B., Kettenmann, H., 2008. Astrocytes Discriminate and Selectively Respond to the Activity of a Subpopulation of Neurons within the Barrel Cortex. *Cereb. Cortex* 18, 2450–2459. doi:10.1093/cercor/bhn009
- Schipke, C.G., Heidemann, A., Skupin, A., Peters, O., Falcke, M., Kettenmann, H., 2008. Temperature and nitric oxide control spontaneous calcium transients in astrocytes. *Cell Calcium* 43,

285–295. doi:10.1016/j.ceca.2007.06.002

- Schlesinger, D.H., Goldstein, G., 1975. Molecular conservation of 74 amino acid sequence of ubiquitin between cattle and man. *Nature* 255, 423–4.
- Schlesinger, D.H., Goldstein, G., Niall, H.D., 1975. The complete amino acid sequence of ubiquitin, an adenylate cyclase stimulating polypeptide probably universal in living cells. *Biochemistry* 14, 2214–8.
- Schmitt, A., Asan, E., Lesch, K.P., Kugler, P., 2002. A splice variant of glutamate transporter GLT1/EAAT2 expressed in neurons: Cloning and localization in rat nervous system. *Neuroscience* 109, 45–61. doi:10.1016/S0306-4522(01)00451-1
- Schorova, L., Martin, S., 2016. Sumoylation in synaptic function and dysfunction. *Front. Synaptic Neurosci.* 8, 1–24. doi:10.3389/fnsyn.2016.00009
- Schwartzkroin, P.A., 1994. Role of the hippocampus in epilepsy. *Hippocampus* 4, 239–242. doi:10.1002/hipo.450040302
- Scimemi, A., Meabon, J.S., Woltjer, R.L., Sullivan, J.M., Diamond, J.S., Cook, D.G., 2013. Amyloid-beta1-42 slows clearance of synaptically released glutamate by mislocalizing astrocytic GLT-1. *Ann. Intern. Med.* 158, 5312–5318. doi:10.1523/JNEUROSCI.5274-12.2013
- Selkirk, J. V., Stiefel, T.H., Stone, I.M., Naeve, G.S., Foster, A.C., Poulsen, D.J., 2005. Over-expression of the human EAAT2 glutamate transporter within neurons of mouse organotypic hippocampal slice cultures leads to increased vulnerability of CA1 pyramidal cells. *Eur. J. Neurosci.* 21, 2291–6. doi:10.1111/j.1460-9568.2005.04059.x
- Seri, B., García-Verdugo, J.M., McEwen, B.S., Alvarez-Buylla, A., 2001. Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus. *J. Neurosci.* 21, 7153–60.
- Serratos, J.M., Gómez-Garre, P., Gallardo, M.E., Anta, B., de Bernabé, D.B., Lindhout, D., Augustijn, P.B., Tassinari, C.A., Malafosse, R.M., Topcu, M., Grid, D., Dravet, C., Berkovic, S.F., de Córdoba, S.R., 1999. A novel protein tyrosine phosphatase gene is mutated in progressive myoclonus epilepsy of the Lafora type (EPM2). *Hum. Mol. Genet.* 8, 345–52.

- Sheldon, A.L., González, M.I., Krizman-genda, E.N., Bala, T.S., Robinson, M.B., 2008. Ubiquitination-mediated internalization and degradation of the astroglial glutamate transporter, GLT-1. *Neurochem. Int.* 53, 296–308. doi:10.1016/j.neuint.2008.07.010.UBIQUITINATION-MEDIATED
- Sitcheran, R., Gupta, P., Fisher, P.B., Baldwin, A.S., 2005. Positive and negative regulation of EAAT2 by NF-kappaB: a role for N-myc in TNFalpha-controlled repression. *EMBO J.* 24, 510–20. doi:10.1038/sj.emboj.7600555
- Snyder, P.M., Steines, J.C., Olson, D.R., 2003. Relative Contribution of Nedd4 and Nedd4-2 to ENaC Regulation in Epithelia Determined by RNA Interference. *J. Biol. Chem.* 279, 5042–5046. doi:10.1074/jbc.M312477200
- Sogaard, R., Borre, L., Braunstein, T.H., Madsen, K.L., MacAulay, N., 2013. Functional modulation of the glutamate transporter variant GLT1b by the PDZ domain protein PICK1. *J. Biol. Chem.* 288, 20195–20207. doi:10.1074/jbc.M113.471128
- Solaz-Fuster, M.C., Gimeno-Alcañiz, J.V., Ros, S., Fernandez-Sanchez, M.E., Garcia-Fojeda, B., Criado Garcia, O., Vilchez, D., Dominguez, J., Garcia-Rocha, M., Sanchez-Piris, M., Aguado, C., Knecht, E., Serratos, J., Guinovart, J.J., Sanz, P., Rodriguez de Córdoba, S., 2008. Regulation of glycogen synthesis by the laforin-malin complex is modulated by the AMP-activated protein kinase pathway. *Hum. Mol. Genet.* 17, 667–78. doi:10.1093/hmg/ddm339
- Spencer, S.S., McCarthy, G., Spencer, D.D., 1993. Diagnosis of medial temporal lobe seizure onset: relative specificity and sensitivity of quantitative MRI. *Neurology* 43, 2117–24.
- Staub, O., Dho, S., Henry, P., Correa, J., Ishikawa, T., McGlade, J., Rotin, D., 1996. WW domains of Nedd4 bind to the proline-rich PY motifs in the epithelial Na⁺ channel deleted in Liddle's syndrome. *EMBO J.* 15, 2371–80.
- Steinhäuser, C., Grunnet, M., Carmignoto, G., 2016. Crucial role of astrocytes in temporal lobe epilepsy. *Neuroscience* 323, 157–169. doi:10.1016/j.neuroscience.2014.12.047
- Stoffel, W., Müller, R., Binczek, E., Hofmann, K., 1992. Mouse apolipoprotein AI. cDNA-derived primary structure, gene organisation and complete nucleotide sequence. *Biol. Chem. Hoppe. Seyler.* 373, 187–93.

- Striano, P., Zara, F., Turnbull, J., Girard, J.-M., Ackerley, C.A., Cervasio, M., De Rosa, G., Del Basso-De Caro, M.L., Striano, S., Minassian, B.A., 2008. Typical progression of myoclonic epilepsy of the Lafora type: a case report 4. doi:10.1038/ncpneuro0706
- Su, Z., Leszczyniecka, M., Kang, D., Sarkar, D., Chao, W., Volsky, D.J., Fisher, P.B., 2003. Insights into glutamate transport regulation in human astrocytes: cloning of the promoter for excitatory amino acid transporter 2 (EAAT2). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 1955–60. doi:10.1073/pnas.0136555100
- Sullivan, R., Rauen, T., Fischer, F., Wießner, M., Grewer, C., Bicho, A., Pow, D. V., 2004. Cloning, transport properties, and differential localization of two splice variants of GLT-1 in the rat CNS: Implications for CNS glutamate homeostasis. *Glia* 45, 155–169. doi:10.1002/glia.10317
- Takahashi, K., Foster, J.B., Lin, C.-L.G., 2015. Glutamate transporter EAAT2: regulation, function, and potential as a therapeutic target for neurological and psychiatric disease. *Cell. Mol. life Sci.* 72, 3489–3506. doi:10.1007/s00018-015-1937-8
- Tanaka, K., Watase, K., Manabe, T., Yamada, K., Watanabe, M., Takahashi, K., Iwama, H., Nishikawa, T., Ichihara, N., Kikuchi, T., Okuyama, S., Kawashima, N., Hori, S., Takimoto, M., Wada, K., 1997. Epilepsy and exacerbation of brain injury in mice lacking the glutamate transporter GLT-1. *Science* 276, 1699–702.
- Thal, D.R., 2002. Excitatory Amino Acid Transporter EAAT-2 in Tangle-bearing Neurons in Alzheimer ' s Disease. *Brain Pathol.* 12, 405–411.
- Tian, G., Lai, L., Guo, H., Lin, Y., Butchbach, M.E.R., Chang, Y., Lin, C.-L.G., 2007. Translational control of glial glutamate transporter EAAT2 expression. *J. Biol. Chem.* 282, 1727–37. doi:10.1074/jbc.M609822200
- Turnbull, J., Tiberia, E., Striano, P., Genton, P., Carpenter, S., Ackerley, C.A., Minassian, B.A., 2016. Lafora disease. *Epileptic Disord.* 18, S38–S62. doi:10.1684/epd.2016.0842
- Underhill, S.M., Wheeler, X.D.S., Amara, S.G., 2015. Differential Regulation of Two Isoforms of the Glial Glutamate Transporter EAAT2 by DLG1 and CaMKII. *J. Neurosci.* 35, 5260–5270. doi:10.1523/JNEUROSCI.4365-14.2015
- Utsunomiya-Tate, N., Endou, H., Kanai, Y., 1997. Tissue specific

- variants of glutamate transporter GLT-1. *FEBS Lett.* 416, 312–316. doi:10.1016/S0014-5793(97)01232-5
- van der Hel, W.S., Notenboom, R.G.E., Bos, I.W.M., van Rijen, P.C., van Veelen, C.W.M., de Graan, P.N.E., 2005. Reduced glutamine synthetase in hippocampal areas with neuron loss in temporal lobe epilepsy. *Neurology* 64, 326–33. doi:10.1212/01.WNL.0000149636.44660.99
- Vanoni, C., Massari, S., Losa, M., Carrega, P., Perego, C., Conforti, L., Pietrini, G., 2004. Increased internalisation and degradation of GLT-1 glial glutamate transporter in a cell model for familial amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *J. Cell Sci.* 1, 5417–5426. doi:10.1242/jcs.01411
- Verkhatsky, A., Steardo, L., Parpura, V., Montana, V., 2016. Translational potential of astrocytes in brain disorders. *Prog. Neurobiol.* 144, 188–205. doi:10.1016/j.pneurobio.2015.09.003
- Vernia, S., Rubio, T., Heredia, M., Rodríguez de Córdoba, S., Sanz, P., 2009a. Increased endoplasmic reticulum stress and decreased proteasomal function in lafora disease models lacking the phosphatase laforin. *PLoS One* 4, e5907. doi:10.1371/journal.pone.0005907
- Vernia, S., Rubio, T., Heredia, M., Rodríguez de Córdoba, S., Sanz, P., 2009b. Increased endoplasmic reticulum stress and decreased proteasomal function in lafora disease models lacking the phosphatase laforin. *PLoS One* 4, e5907. doi:10.1371/journal.pone.0005907
- Vilchez, D., Ros, S., Cifuentes, D., Pujadas, L., Vallès, J., García-Fojeda, B., Criado-García, O., Fernández-Sánchez, E., Medraño-Fernández, I., Domínguez, J., García-Rocha, M., Soriano, E., Rodríguez de Córdoba, S., Guinovart, J.J., 2007. Mechanism suppressing glycogen synthesis in neurons and its demise in progressive myoclonus epilepsy. *Nat. Neurosci.* 10, 1407–1413. doi:10.1038/nn1998
- Vincent, P., Mulle, C., 2009. Kainate receptors in epilepsy and excitotoxicity. *Neuroscience* 158, 309–23. doi:10.1016/j.neuroscience.2008.02.066
- Wang, J., Stuckey, J.A., Wishart, M.J., Dixon, J.E., 2002. A unique carbohydrate binding domain targets the lafora disease phosphatase to glycogen. *J. Biol. Chem.* 277, 2377–80. doi:10.1074/jbc.C100686200

- Wilson, J.M.B., Khabazian, I., Pow, D. V., Craig, U.K., Shaw, C.A., 2003. Decrease in Glial Glutamate Transporter Variants and Excitatory Amino Acid Receptor Down-Regulation in a Murine Model of ALS-PDC. *NeuroMolecular Med.* 3, 105–118. doi:10.1385/NMM:3:2:105
- Wong, E., Cuervo, A.M., 2010. Autophagy gone awry in neurodegenerative diseases. *Nat. Neurosci.* 13, 805–11. doi:10.1038/nn.2575
- Worby, C.A., Gentry, M.S., Dixon, J.E., 2008. Malin decreases glycogen accumulation by promoting the degradation of protein targeting to glycogen (PTG). *J. Biol. Chem.* 283, 4069–76. doi:10.1074/jbc.M708712200
- Yang, B., Kumar, S., 2010. Nedd4 and Nedd4-2: closely related ubiquitin-protein ligases with distinct physiological functions. *Cell Death Differ.* 17, 68–77. doi:10.1038/cdd.2009.84
- Yernool, D., Boudker, O., Jin, Y., Gouaux, E., 2004. Structure of a glutamate transporter homologue from *Pyrococcus horikoshii*. *Nature* 431, 811–8. doi:10.1038/nature03018
- Yi, J.-H., Pow, D. V., Hazell, A.S., 2005. Early loss of the glutamate transporter splice-variant GLT-1v in rat cerebral cortex following lateral fluid-percussion injury. *Glia* 49, 121–133. doi:10.1002/glia.20099
- Zelenia, O., Schlag, B.D., Gochenauer, G.E., Ganel, R., Song, W., Beesley, J.S., Grinspan, J.B., Rothstein, J.D., Robinson, M.B., 2000. Epidermal growth factor receptor agonists increase expression of glutamate transporter GLT-1 in astrocytes through pathways dependent on phosphatidylinositol 3-kinase and transcription factor NF-kappaB. *Mol. Pharmacol.* 57, 667–78.
- Zerangue, N., Kavanaugh, M.P., Schnuer, J., Pratt, K., Zable, A., Kavanaugh, M., Rosenberg, P., Langmoen, I., Ottersen, O., Kanner, B., 1996. Flux coupling in a neuronal glutamate transporter. *Nature* 383, 634–7. doi:10.1038/383634a0
- Zhang, X., Kim, K.-M., 2017. Multifactorial Regulation of G Protein-Coupled Receptor Endocytosis. *Biomol. Ther. (Seoul)*. 25, 26–43. doi:10.4062/biomolther.2016.186
- Zhang, X., Le, H.T., Zhang, X., Zheng, M., Choi, B.-G., Kim, K.-M., 2016. Palmitoylation on the carboxyl terminus tail is required for the selective regulation of dopamine D2 versus D3 receptors.

Referencias

Biochim. Biophys. Acta 1858, 2152–62.
doi:10.1016/j.bbamem.2016.06.021

Zschocke, J., Bayatti, N., Behl, C., 2005. Caveolin and GLT-1 Gene Expression Is Reciprocally Regulated In Primary Astrocytes : Association of GLT-1 With Non-Caveolar Lipid Rafts. *Glia* 287, 275–287. doi:10.1002/glia.20116

