

Hipótesis glutamatérgica de la esquizofrenia: mecanismos moleculares del transporte de glicina en las sinapsis glutamatérgicas

Recibido el 6 de febrero de 2006

BEATRIZ CUBELOS*, CECILIO GIMÉNEZ Y FRANCISCO ZAFRA
*Centro de Biología Molecular «Severo Ochoa», Facultad de Ciencias,
Universidad Autónoma de Madrid, Consejo Superior de
Investigaciones Científicas, Madrid, España*

RESUMEN

Durante los últimos años, se han obtenido evidencias que relacionan la hipofunción del receptor de glutamato tipo NMDA (NMDAR) con la esquizofrenia. Los receptores NMDA necesitan para su estimulación la unión conjunta tanto de glutamato como de glicina, ya que ambos poseen en el receptor un sitio de unión específico. Puesto que la inhibición farmacológica de GLYT1 aumenta los niveles de glicina en los alrededores del receptor de glutamato tipo NMDA estimulando su función, el transportador de glicina GLYT1 representa una de las dianas terapéuticas más prometedoras para el desarrollo de nuevos fármacos antipsicóticos. Previamente hemos demostrado que GLYT1 se encuentra físicamente asociado con NMDAR a través de la proteína de adaptadora PSD-95 en neuronas glutamatérgicas. El objetivo de este trabajo se centra en el estudio de la interacción de GLYT1 con otras proteínas, especialmente con aquellas que también interaccionan con el

* Extracto del trabajo de investigación original que obtuvo el Premio de la Real Academia Nacional de Farmacia del año 2005.

Dirección de correo electrónico: bcubelos@cnb.uam.es

Abreviaturas utilizadas: GLYT1, Transportador de glicina 1; GST, glutathione-S-Transferase; MAGUK, membrana-associated guanylate kinase; NFPS, N-(3-4'-fluorofenil)-3-(4'-fenilfenoxi)propil-sarcosina; PBS, phosphate-buffered-saline; PDZ, PSD95/Dlg/ZO-1 homology domain; SDS-PAGE, sodium dodecyl sulphate-polyacilamide gel electrophoresis; WB, western blot.

receptor de glutamato tipo NMDA. Hemos encontrado que GLYT1 interacciona con el tricomplejo heterotrimérico Mint-MALS-CASK. Este complejo está implicado en el transporte polarizado del receptor del glutamato tipo NMDA al terminal postsináptico. Puesto que GLYT1 interacciona simultáneamente con NMDAR y con el complejo Mint-MALS-CASK, proponemos que NMDAR y GLYT1 son cotransportados al terminal sináptico, así en todo momento NMDAR puede ser regulado por GLYT1. Estos resultados refuerzan la importancia de GLYT1 en la regulación de NMDAR y su potencial como blanco de acción de fármacos antipsicóticos.

Palabras clave: Tráfico intracelular.—NMDAR.—Dominios PDZ.—Interacción proteína-proteína.

ABSTRACT

Glutamatergic hypothesis of schizophrenia: molecular mechanisms of glycine transport in glutamatergic synapses

During the last few years, evidence has been obtained for a relationship between hypofunction of the NMDA type of glutamate receptor and schizophrenia. The glycine binding site on NMDAR and the glycine transporter GLYT1 represent some of the most promising therapeutic targets for developing new anti-schizophrenic drugs. Pharmacological inhibition of GLYT1 increases glycine levels in the surrounding of NMDAR and stimulates its function. Previous studies performed indicated that GLYT1 is physically associated with NMDAR, through the scaffolding protein PSD-95, due to the common interaction of both GLYT1 and NMDAR with PDZ domains of PSD-95. The objective of this research was centred on the study of the interaction of GLYT1 with other PDZ proteins, in special those that also interact with NMDAR. Particularly, we were interested the heteromeric tricomplex Mint-MALS-CASK. We analyzed the structural basis of these interactions and the functional consequence on GLYT1 in aspects such as the intracellular traffic, the turnover on the cell surface and the inclusion in specific microdomains of the membrane. In this way we analyzed the possible existence of common steps in GLYT1 and NMDAR processing. To do that we used molecular and cellular biology techniques, such as cotransfections in cellular systems of DNA constructs obtained by site directed mutagenesis and immunoprecipitations.

Key words: Intracellular traffic.—NMDAR.—PDZ domains.—Protein-protein interactions.

INTRODUCCIÓN

Regulación de los niveles de glicina en la sinapsis glutamatérgica: Transportador de glicina de alta afinidad.

La glicina es necesaria, junto con el glutamato, para la activación de los NMDARs, pero durante mucho tiempo ha existido una polémica importante sobre el papel fisiológico de la misma en la sinapsis glutamatérgica. Esto se debió al hecho de que la afinidad del sitio de glicina es tan alta que muchos autores pensaron que estaría tónicamente saturado a las concentraciones de glicina habituales en la hendidura sináptica (1). Sin embargo, cálculos teóricos basados en las propiedades electrofisiológicas de los transportadores de glicina indicaban que estas proteínas podrían reducir la concentración de glicina en el emplazamiento local del NMDAR hasta una concentración de 1 μM o menos, es decir, hasta niveles no saturantes (2). Esta posibilidad se ha visto reforzada por estudios funcionales recientes que muestran que el compuesto N-(3-4'-fluorofenil)-3-(4'-fenilfenoxi) propil-sarcosina (NFPS), un inhibidor específico del transportador de glicina GLYT1, potencia las respuestas mediadas por NMDA tanto *in vitro* como *in vivo* (3, 4).

El transportador de glicina GLYT1 se encuentra óptimamente localizado para regular la concentración de glicina en el microentorno de NMDAR, puesto que en cerebro de rata se ha observado una colocalización de la forma neuronal de GLYT1 con marcadores de las sinapsis glutamatérgicas (5). De hecho, GLYT1 está físicamente asociado a NMDAR como han demostrado experimentos de inmunoprecipitación.

En vista de esta asociación entre GLYT1 y la función de NMDAR, no es sorprendente el que este transportador se haya convertido en una diana importante para el desarrollo de fármacos antiesquizofrénicos. La idea básica de estos estudios es la de incrementar la actividad del receptor de NMDA, disminuida en los pacientes esquizofrénicos, mediante el incremento de la concentración extracelular de glicina que ha de producirse tras la inhibición del transportador. De hecho, varios estudios preclínicos recientes con los inhibidores de GLYT1 NFPS y ORG 24598 apuntan en esa dirección (6). Además, un estudio clínico con el inhibidor de GLYT1 sarcosina ha revelado

una mejora sustancial tanto de los síntomas positivos como de los negativos y cognitivos de los pacientes esquizofrénicos (7).

De lo anteriormente expuesto se desprende que el conocimiento de los mecanismos moleculares que regulan la llegada de GLYT1 a las sinapsis glutamatérgicas y su interacción con NMDAR (por ejemplo, tráfico intracelular, reciclaje en la superficie celular e inclusión en microdominios en los que reside NMDAR) pueden ser de gran interés en la comprensión de la regulación no sólo de GLYT1 sino también de NMDAR y, por tanto, de interés en el contexto de la esquizofrenia.

Papel de las proteínas con dominios PDZ en la organización de la sinapsis

Las uniones sinápticas son estructuras altamente especializadas para poder transmitir eficientemente la señal de la neurona presináptica a la postsináptica. En el botón postsináptico existe una zona activa electrodensa denominada densidad postsináptica (PSD) formada por diversas proteínas, como los filamentos de actina y las proteínas de «andamiaje» que juegan un papel importante en la organización, estructura y función de las uniones sinápticas. Muchas de las proteínas de este complejo multiproteico poseen un motivo estructural común: los dominios PDZ (Figura 1).

Un importante ejemplo de este tipo de proteínas PDZ es el tricomplejo heteromérico descrito por primera vez en *C. Elegans* formado por LIN2, LIN7 y LIN10 y sus homólogos en mamíferos, denominados CASK/PALS, VELI/MALS y Mint/X11, respectivamente (8). Todas ellas tienen dominios PDZ y están implicadas en otros procesos celulares como la distribución polarizada de proteínas o la endocitosis y el reciclaje de las mismas. El tricomplejo está implicado en funciones tales como el transporte de vesículas y la localización subcelular del receptor NMDA (9). En dendritas, el dominio PDZ de MALS se une a través del extremo Ct de la subunidad NR2B del receptor de NMDA, mientras que el dominio PDZ de MINT1 se une a la proteína KIF17, de la superfamilia de las kinesinas que gracias a su interacción con los microtúbulos, actuaría como motor para llevar a las vesículas cargadas con NMDAR hasta las espinas dendríticas (10).

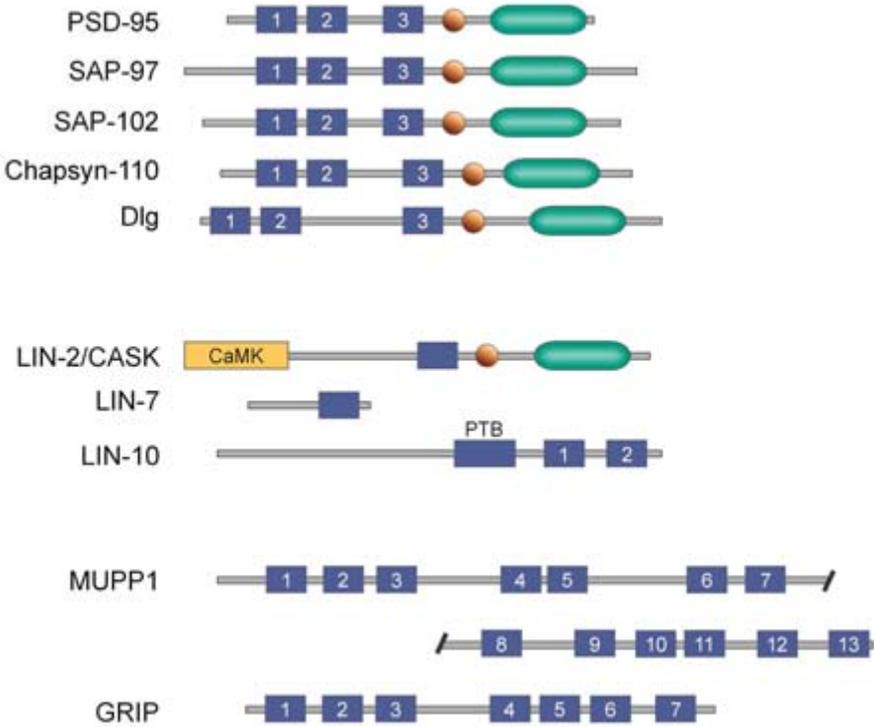


FIGURA 1. Esquema de algunas proteínas sinápticas que poseen dominios PDZ.

MATERIALES Y MÉTODOS

Construcciones de ADNc

Las construcciones de ADNc se llevaron a cabo mediante el método de mutagénesis dirigida por técnicas de PCR.

Detección de las interacciones de GLYT1 con dominios PDZ

La detección de las interacciones de GLYT1 con dominios PDZ de diferentes proteínas, se realizó utilizando una membrana comercial (TranSignal PDZ Domain Arrays de BioCat, Panomics, Alemania).

El extracto bacteriano que contenía la proteína His-GLYT1_{Ct} obtenido según lo indicado en el apartado anterior, se diluyó 1:1 en solución de resuspensión y se incubó con una membrana de Inmovilon que previamente había sido bloqueada. Tras una incubación de una hora con el extracto proteico, la membrana se lavaba y pasaba a ser incubada con un anticuerpo secundario dirigido contra la cola de histidinas. Tras los oportunos lavados, la presencia de His-GLYT1_{Ct} se visualizó mediante un procedimiento de quimioluminiscencia (ECL). Las soluciones de bloqueo, resuspensión y lavado utilizadas en el ensayo, fueron proporcionadas por el fabricante.

Cultivo y transfección de células COS-7

La línea celular COS-7 se cultivaban en DMEM suplementado con suero de ternera fetal al 10% y se mantenían a 37° C y 7 % de CO₂. Las células se plaqueaban al 50% de confluencia un día antes de ser transfectadas. La transfección se realizaba con Lipofectamina Plus (Gibco, USA). Las células eran incubadas con los complejos de lípidos y ADN en DMEM sin suero durante tres horas a 37° C y 7% de CO₂. Transcurrido este tiempo se añadía más medio de cultivo y suero bovino fetal hasta el 10%. Las células se utilizaban a las 48 horas de la transfección.

Ensayo de inmunoprecipitación

Las células COS-7 transfectadas o los sinaptosomas de cerebro de rata fueron solubilizadas en una solución de lisis (50 mM tris- HCl, pH 7,5, 1% Triton X-100, 100 mM NaCl y 1 mM EDTA) durante 30 minutos a 4° C. Tras la centrifugación, el precipitado insoluble fue eliminado y los sobrenadantes incubados con los anticuerpos correspondientes durante dos horas, luego se adicionó 40 µl de una suspensión de bolas unidas a proteína A (Sigma) y la mezcla se incubó durante una hora a temperatura ambiente y con agitación rotatoria. Las bolas fueron lavadas con PBS frío cinco veces. Finalmente se añadieron 50 µl de tampón de carga Laemmli. Las muestras se hirvieron durante cinco minutos para disociar la unión de las proteínas a las bolas y posteriormente se sometieron a electroforesis seguida inmunotransferencia como se ha describirá más adelante.

Ensayo de *Pull Down*

Las células COS-7 transfectadas con los vectores de expresión de las proteínas (PSD-95, MALS o Mint) se solubilizaron en 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 0,5% Triton X-100, 100 mM NaCl y 1 mM EDTA durante 30 minutos a 4° C. El material solubilizado obtenido tras centrifugación a 14.000 rpm durante 15 minutos fue preincubado con 100 µl de bolas de glutatión agarosa al 50% (v/v) durante una hora con rotación en la noria a 4° C. Tras una centrifugación los sobrenadante se transferían a un tubo limpio y se incubaban con GST, GST-GLYT1Ct o GST-GLYT1Ctdel durante la noche con rotación constante a 4° C. Posteriormente, las bolas fueron lavadas con PBS frío tres veces y se les añadió 50 µl de tampón de carga Laemmli. Las muestras se hirvieron durante cinco minutos para romper la unión de las proteínas a las bolas y luego se sometieron a una electroforesis seguida de inmunotransferencia.

Electroforesis y *Western Blot*

Tras la determinación de la concentración de proteínas en las muestras. La electroforesis se llevaba a cabo en gel de poliacrilamida y SDS, en condiciones reductoras, en presencia de 2-mercaptoetanol. Los geles se corrían lentamente durante la noche mediante una corriente constante de 30V. Tras la electroforesis, las muestras eran transferidas a una membrana de nitrocelulosa por el sistema de electroblotting semi-seco (LKB) a 1,2 mA/cm² durante dos horas. La solución de transferencia que se usaba contenía 192 mM glicina y 25 mM Tris-HCl, pH 8,3.

La unión inespecífica a la membrana se bloqueó por incubación con 5% leche desnatada en 150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, durante cuatro horas a 25° C. Posteriormente la membrana se incubó con el antisuero o anticuerpo purificado a la concentración idónea durante toda la noche a 4° C. Tras lavados con PBS la membrana se incubó con el anticuerpo secundario unido a peroxidasa y la banda se visualizó por el método de detección por quimioluminiscencia (ECL).

Producción de anticuerpos ANTI-GLYT1

Los anticuerpos policlonales se produjeron inmunizando conejos con la proteína de fusión Glutation-S-Transferasa que contenía los 37 aminoácidos del extremo amino terminal de GLYT1b para el anticuerpo número 224. La inmunización se realizó en conejos MDL Nueva Zelanda (Navarra, España), con proteína de fusión y el coadyuvante de Freund completo. Los conejos fueron reinmunizados cada dos semanas con la proteína de fusión que en esta ocasión había sido emulsionada con el adyuvante de Freund incompleto. Tras varias inmunizaciones se extrajeron los sueros y los anticuerpos se purificaron por columnas de afinidad (11). La proteína de fusión unida a GST y la propia proteína GST en una solución de Na-HEPES, pH 8,0 se acoplaron a columnas de Affi-Gel 15 siguiendo las instrucciones del fabricante. El suero generado por el conejo contra la proteína de fusión se pasó en primer lugar por la columna que tenía adsorbida la proteína GST y posteriormente por la columna que contenía la proteína de fusión.

Biotinilación del anticuerpo ANTI-GLYT1

El anticuerpo anti-GLYT1 (número177) se biotiniló con 250 µg de éster de succinimida-biotina (Pierce, USA) por mg de anticuerpo.

Anticuerpos comerciales y cedidos

Los anticuerpos secundarios unidos a biotina o peroxidasa eran de Amersham y los unidos a fluoróforos eran de Molecular Probes. El anticuerpo anti-HA era de DABCO (Berkeley Antibody Company) y el anticuerpo anti-Myc fue cortésmente cedido por el laboratorio del Dr. Balbino Alarcón (CBM-SO). La detección de los miembros del complejo Mint/MALS/CASK se realizó mediante anticuerpos monoclonales de BD Transduction.

Experimentación con animales

En este estudio se ha trabajado con animales de acuerdo con los criterios resaltados en «Guía para el Cuidado y Empleo de Animales de Laboratorio» preparada por la National Academy of Sciences y publicada por National Institutes of Health (NIH 1985: 86-23).

RESULTADOS

GLYT1 interacciona *in vitro* con una variedad de dominios PDZ

Dado que el extremo carboxilo terminal de GLYT1 posee un motivo de interacción con dominios PDZ, se decidió buscar nuevas proteínas que pudieran interactuar con el transportador. Para ello ensayamos la capacidad de interacción del extremo carboxilo terminal de GLYT1 con una matriz de dominios PDZ de diversas proteínas. Previamente se había preparado una construcción con los 77 aminoácidos del extremo C_t de GLYT1 clonados en fase con un péptido de seis histidinas. A esta construcción se le denominó His-GLYT1_{Ct}. La proteína se expresó en bacterias *E. Coli* (BL21). El extracto derivado de estas bacterias se incubó con la membrana en la que el fabricante había colocado por duplicado una serie de dominios PDZ (Figura 2A). Los puntos a los que se unió His-GLYT1_{Ct} fueron visualizados gracias a un anticuerpo dirigido contra la cola de histidinas, seguido de detección por quimioluminiscencia (Figura 2B). La intensidad de las señales se cuantificó mediante un análisis digital de las películas fotográficas (Figura 2C).

La interacción más fuerte se produjo con el tercer dominio PDZ de la proteína SAP-97. Sin embargo, no hubo reacción con el primer dominio PDZ de dicha proteína. Otras proteínas con las que se observó interacción fueron la Chapsina 110, a través de su segundo dominio, y MPP2 mediante su único dominio PDZ. La interacción también fue intensa con los dominios PDZ de RIL (reversion induced LIM protein) y moderada con OMP25 (Mitochondrial outer membrane protein 25). Únicamente el tercer dominio de PSD-95 estaba representado en la matriz comercial y presentó una interac-

ción específica pero débil. Se encontró también una interacción con los dominios PDZ de los miembros de la familia de proteínas Mint; en concreto, con el primer y segundo dominio de Mint1 y Mint3.

A

Mint2 D1	Mint3 D1	Mint3 D2	Mint1 D1	Mint1 D2	CSKP	SAP97 D1	SAP97 D3
Ch110 D2	PSD95 D3	DVL1	DVL3	DVLL	GIPC	HtrA2	LIMK2
MPP2	NEB1	OMP25	CLIM1	PTPH1	ZO2 D1	PTP1E D1	PTP1E D5
RSG12	RIL	ZO1 D3	ZO2 D3	GST			

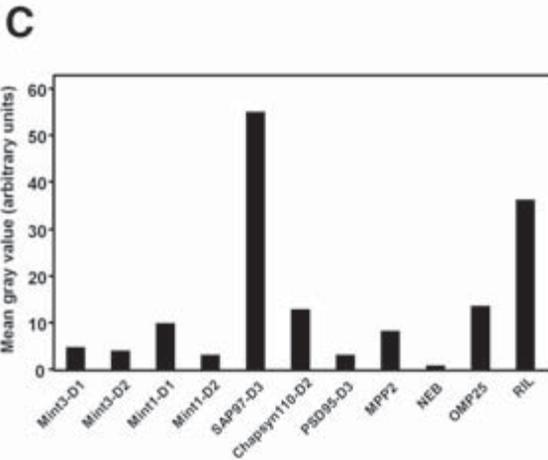
FIGURA 2. Interacción del extremo carboxilo terminal de GLYT1 con dominios PDZ.

A) Esquema de la distribución de los dominios PDZ sobre la membrana de inmobilon. Cada dominio PDZ está representado por duplicado.



B) La membrana se incubó con un extracto de bacterias que expresan His-GLYT1ct. La unión de His-GLYT1ct a la membrana se detectó mediante un anticuerpo contra la cola de histidinas seguido de detección por quimioluminiscencia.

C) Cuantificación de la imagen obtenida en B mediante análisis digital con el programa «Scion Image».



Los valores se expresan como porcentajes de la interacción más fuerte, que correspondió al tercer dominio de SAP-97.

Para examinar con más detalle la posible interacción de GLYT1 con miembros de la familia Mint se transfectaron células COS con los vectores de expresión de las diferentes isoformas de Mint y con el vector de expresión de GLYT1, usándose como control el mismo vector sin inserto. De esta manera se observó que GLYT1 coimmunoprecipitaba con Mint2 y Mint3, no observándose banda en los controles de especificidad (Figura 3).

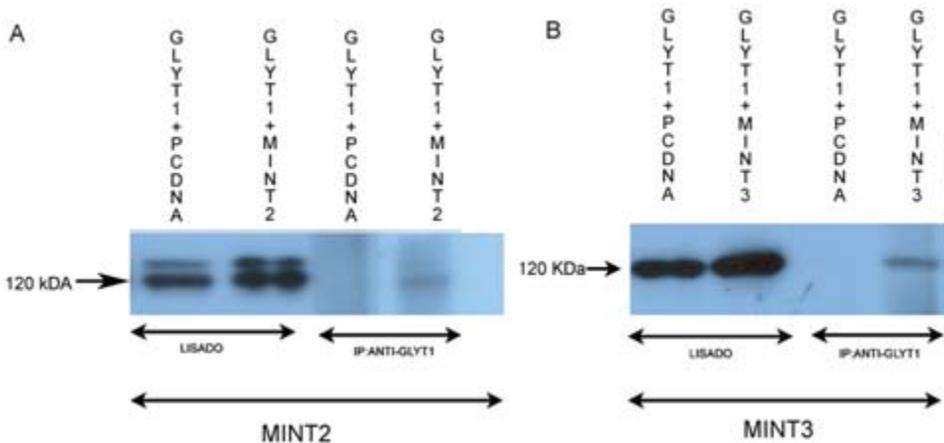


FIGURA 3. Co-inmunoprecipitación de miembros de la familia MINT y GLYT1. Células COS fueron transfectadas con los vectores de expresión de HA-Mint2, HA-Mint3, GLYT1 y/o vector de expresión pCDNA sin inserto como se indica en la figura. Sobre la fracción solubilizada en 0,5% Triton X-100 se realizó una inmunoprecipitación con anti-GLYT1. Los inmunoprecipitados se corrieron en un gel de electroforesis y se sometieron a inmunodetección con anticuerpos contra el epítipo HA, identificándose una banda de 120kDa, correspondiente a HA-Mint2 o HA-Mint3.

Estas interacciones se confirmaron mediante experimentos de «pull down» en los que la proteína de fusión que contiene los 74 aminoácidos finales del extremo carboxilo de GLYT1 unidos a GST había sido incubada con un lisado de células COS transfectadas con el vector de expresión de Mint2 o de Mint3. La proteína de fusión GST-GLYT1 precipitó tanto a Mint2 como a Mint3. El control de GST no fue capaz de precipitar a ninguno de los miembros de la familia Mint. También mediante este ensayo de «pull down» se caracterizó la importancia de la secuencia -SRI de GLYT1 en la interacción con Mint2 y Mint3, ya que al truncar la secuencia de interacción con dominios PDZ se produjo la desaparición de la interacción (Figura 4).

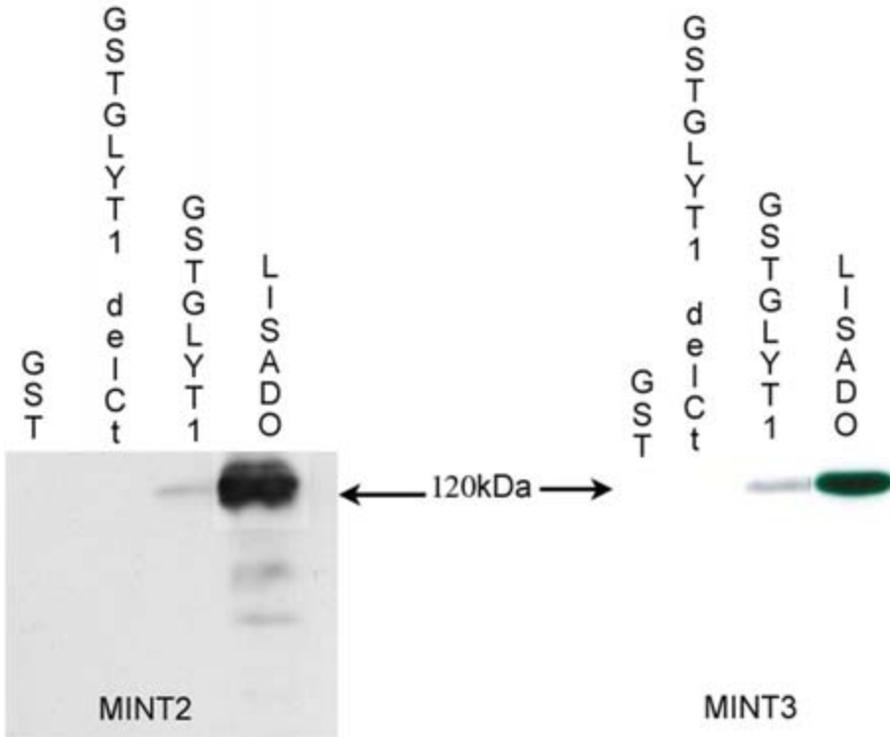


FIGURA 4. Ensayo de «pull down». Extractos de células COS transfectadas con los vectores de expresión para HA-Mint2 o HA-Mint3 fueron incubadas con GST (carril 1), con GST-GLYT1del-Ct (carril 2) o con GST-GLYT1-Ct (carril 3) durante una hora. Posteriormente se añadieron 50 μ l de glutatión agarosa durante una hora. La proteína acomplejada a las bolas se separó por centrifugación y tras lavados exhaustivos se analizó por electroforesis e inmunotransferencia. Como control de la eficiencia de transfección se analizaron en paralelo los lisados celulares correspondientes.

Una de las proteínas Mint, Mint-1, forma parte de un tricoplejo formado por Mint/MALS/CASK que ha sido implicado en el transporte polarizado de proteínas, en procesos de exocitosis de vesículas sinápticas y en la formación de complejos estables entre proteínas de andamiaje en las que participan dominios PDZ. Por este motivo decidimos estudiar también la posible interacción de GLYT1 con las distintas isoformas de MALS y con CASK. En el caso de MALS, se realizaron transfecciones en células COS con el vector de expresión de GLYT1 y los vectores de las diferentes isoformas de MALS.

Posteriormente, se realizó una inmunoprecipitación con anti-GLYT1 sobre la porción solubilizada en 0,5% Triton X-100 del extracto celular (Figura 5) y tras la inmunotransferencia se obtuvieron bandas inmunorreactivas para MALS1 y MALS2. Esta interacción no se observaba en controles que se habían transfectado con las isoformas de MALS junto con el vector de expresión carente de inserto. De igual modo, realizamos una inmunoprecipitación sobre el lisado de células COS que habían sido transfectadas con MALS y con una forma truncada de GLYT1 carente de los últimos tres aminoácidos en su extremo C_t. Tras un análisis por inmunotransferencia no se identificó coimmunoprecipitación, lo que confirma que la interacción ocurre a través del extremo Ct de GLYT1, que probablemente interaccione con el dominio PDZ de las proteínas MALS (Figura 6).

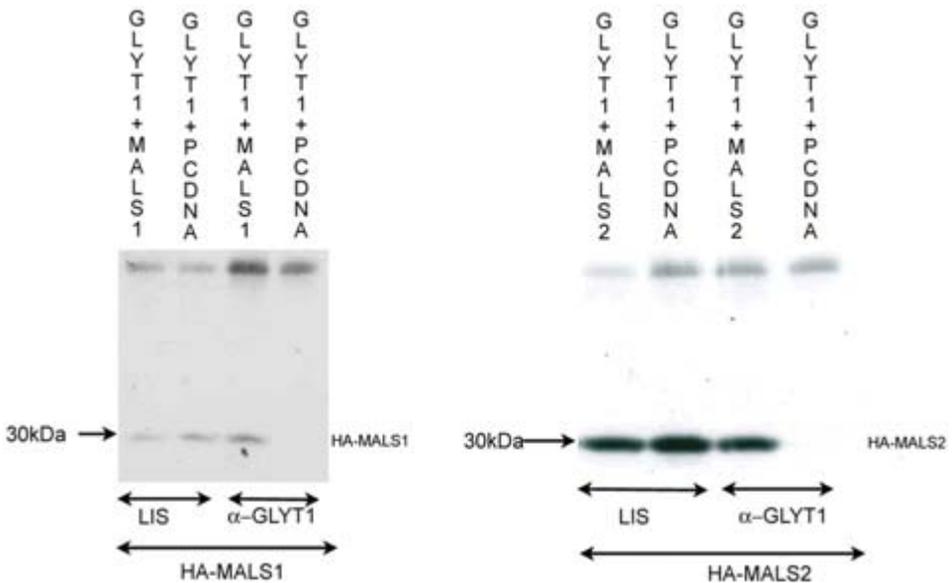


FIGURA 5. Co-inmunoprecipitación de MALS con GLYT1. Células COS fueron transfectadas con los vectores de expresión para HA-MALS1, HA-MALS2, GLYT1 y/o pCDNA como se indica en la figura. Posteriormente fueron lisadas e inmunoprecipitadas con anticuerpo anti-GLYT1. Los inmunoprecipitados se analizaron en un gel de electroforesis y se sometieron a inmunodetección con anticuerpos que reconocen el epítipo HA. Los carriles primero y segundo muestran los lisados, mientras que el tercero y cuarto muestran las inmunoprecipitaciones. Las proteínas MALS1 y MALS2 aparecen como bandas de 30 kDa que inmunoprecipita con anti-GLYT1 únicamente cuando se coexpresaron con el transportador.

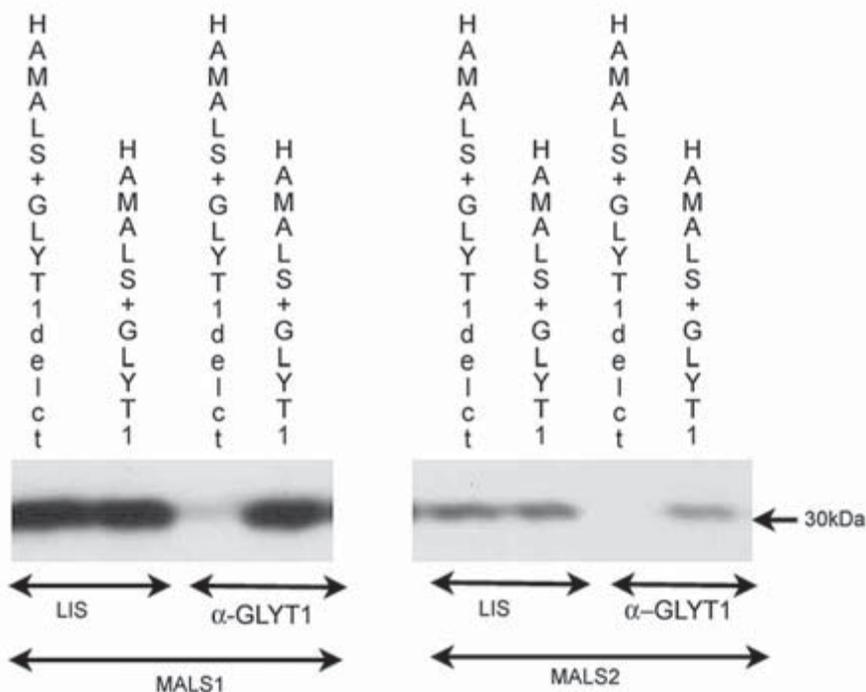


FIGURA 6. Co-inmunoprecipitación de miembros de la familia MALS con GLYT1. Células COS fueron transfectadas con los vectores de expresión para HA-MALS1, HA-MALS2, GLYT1 o GLYT1delCt (delección en la secuencia —SRI del extremo Ct de GLYT1—) como se indica en la figura. Posteriormente fueron lisadas e inmunoprecipitadas con anticuerpo anti-GLYT1. Los inmunoprecipitados se analizaron por electroforesis e inmunofluorescencia con anticuerpos que reconocen el epítipo HA. Los carriles primero y segundo muestran los lisados, mientras que el tercer y cuarto carril muestran las inmunoprecipitaciones. Las interacciones de HA-MALS1 y HA-MALS2 con GLYT1 desaparecen cuando se enfrentan con GLYT1 del Ct.

Sin embargo, en el caso de CASK, que pertenece a la familia MAGUK, no encontramos interacción directa, ya que cuando se coexpresó con GLYT1 no pudimos inmunoprecipitarla con anti-GLYT1. Para analizar la posible relevancia de la interacción de GLYT1 con estas proteínas en tejido cerebral realizamos experimentos de inmunoprecipitación en sinaptosomas derivados de cerebro de rata. Dichos sinaptosomas fueron solubilizados en 0,5% de Triton X-100, desechándose la parte insoluble e incubando la fracción soluble con anti-GLYT1. Los inmunoprecipitados se analizaron por

inmunotransferencia, identificándose una banda inmunorreactiva que se correspondía con el tamaño de Mint1 y Mint2 que no aparecía en el preinmune (Figura 7 A, B). También siguiendo la misma metodología se identificó la interacción entre GLYT1 y CASK (Figura 7 C). Estos datos apoyan la existencia de una interacción entre el transportador de glicina GLYT1 y el tricompuesto formado por Mint/MALS/CASK, que parece estar implicado en el proceso de tráfico intracelular de diversas proteínas y en su distribución asimétrica en células polarizadas.

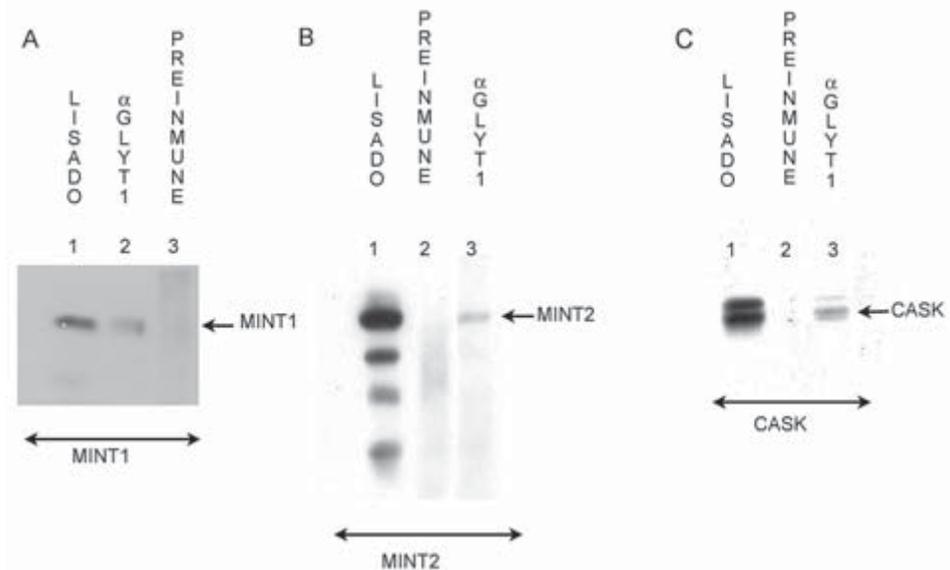


FIGURA 7. Co-inmunoprecipitación en sinaptosomas de MINT1, MINT2 y CASK con GLYT1. Sinaptosomas de cerebro de rata fueron solubilizados en 0,5% Triton X-100. La fracción solubilizada fue sometida a inmunoprecipitación con anticuerpo anti-GLYT1 (carril 3) o con suero preinmune (carril 2). Los inmunoprecipitados se analizaron por electroforesis e inmunodetección con anticuerpos frente a MINT1 o a MINT2 o a CASK. Se observa que el anticuerpo anti-GLYT1 pero no el preinmune precipita una banda de 120kDa, en todos los casos coincide con la movilidad de la banda en los correspondientes lisados (carril 1).

DISCUSIÓN

El dominio PDZ es un motivo central en la organización de proteínas en la membrana plasmática. Las proteínas con dominios PDZ constituyen andamiajes moleculares en lugares específicos de las neuronas sobre las que se anclan tanto proteínas de membrana como proteínas reguladoras. GLYT1 posee en su extremo C₁ la secuencia Ser-Arg-Ile que se ajusta al tipo I de los motivos de interacción con PDZ (12, 13). Por ello, analizamos la interacción del extremo Ct de GLYT1 con una matriz de dominios PDZ de diferentes proteínas. Encontramos algunas proteínas que potencialmente podrían interactuar con GLYT1. De entre estas proteínas destacan los miembros de la familia Mint (Mint1, Mint2 y Mint3). La interacción de GLYT1 con miembros de la familia Mint se reprodujo en un sistema de expresión heterólogo en eucariotas y se confirmó la implicación del extremo C₁ de GLYT1 en la interacción.

Mint forma parte del complejo heterotrimérico Mint/MALS/CASK que desempeña un papel importante en el tráfico polarizado de proteínas en neuronas y en otras células polarizadas.

La interacción de GLYT1 con este complejo trimérico podría ser importante en la distribución asimétrica del transportador en células polarizadas. Este movimiento organizado del transportador podría estar controlado por las proteínas del complejo heterotrimérico que regulan el tráfico intracelular hasta la membrana plasmática.

En este estudio hemos presentado evidencias de la asociación de GLYT1 con miembros de la familia MINT y con CASK en sinaptosomas de cerebro de rata. Además hay que destacar la interacción *in vitro* detectada con los miembros de MALS.

Así confirmamos que GLYT1 es capaz de interactuar con los miembros del tricoplejo Mint/MALS/CASK. Estas interacciones sugieren que las proteínas con dominios PDZ pueden jugar un papel importante en aspectos básicos de la biología celular y molecular del transportador, como puede ser su distribución polarizada en las neuronas, su anclaje a las densidades postsinápticas o a otro tipo de microdominios multiproteicos en donde entraría en contacto de manera selectiva con los sistemas de transducción de señal que modularían su función.

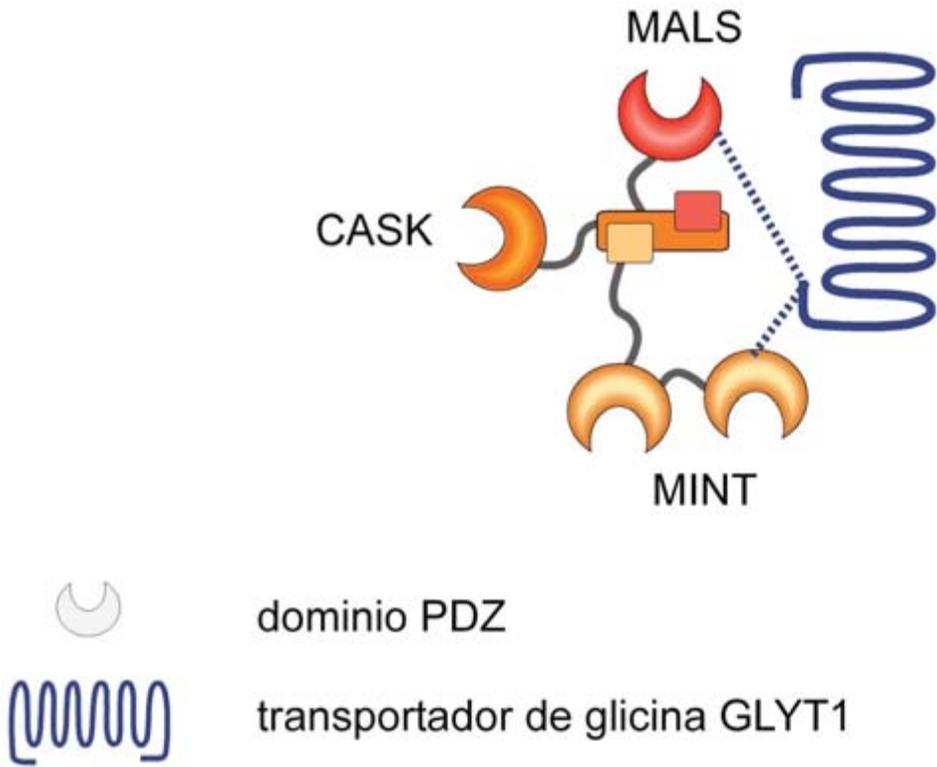


FIGURA 8. Representación del complejo trimérico Mint/MALS/CASK y de la interacción con GLYT1.

Se ha propuesto que el complejo heterotrimérico está implicado en el transporte, localización y anclaje del receptor de glutamato tipo NMDA; ya que se ha descrito una interacción entre el dominio PDZ de MALS y el extremo carboxilo terminal de una de las subunidades del receptor de glutamato tipo NMDA. Estos datos sustentan la existencia de mecanismos comunes para el tráfico intracelular de GLYT1 y el receptor de NMDA. El conocimiento de estos procesos puede ser importante para la comprensión de la función de los receptores de NMDA y del papel regulador que desempeña el transportador de glicina GLYT1 en la sinápsis glutamatérgicas, de forma que el transportador puede conseguir una posición óptima en la membrana plasmática para regular la concentración de glicina en el microentorno del receptor de glutamato tipo NMDA y modular así su función.

Además, recientemente se ha publicado que la glicina no solamente regularía la función del receptor de glutamato sino también su internalización desde la superficie celular (14). Aunque los NMDARs tienen tasas de internalización más lentas que otros receptores ionotrópicos, también sufren procesos de recambio que afectan a las propiedades de la neurotransmisión (15). Aparentemente, la internalización dependiente de glicina requiere mayores concentraciones del aminoácido de las que son necesarias para la apertura del canal. Así, mediante su capacidad para modular la concentración de glicina extracelular, el transportador de glicina GLYT1 podría regular no sólo la función del canal sino también los niveles de receptor NMDA en la superficie celular.

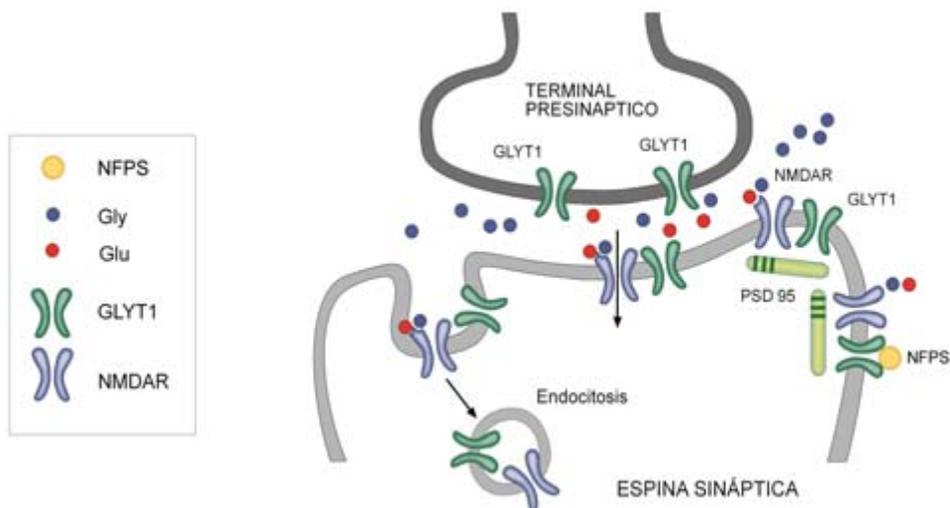


FIGURA 9. Representación de la asociación entre NMDAR y GLYT1

El estudio y la comprensión de la relación que existe entre el transportador de glicina GLYT1 y el receptor de glutamato tipo NMDA es de vital importancia para el esclarecimiento de la esquizofrenia.

Teniendo en cuenta la presencia de un motivo de interacción con dominios PDZ en el extremo carboxilo de GLYT1, es posible que GLYT1 interacte con otras proteínas PDZ con las que también

interacciona NMDAR, como hemos demostrado para el complejo heterotrimérico Mint/MALS/CASK. Nosotros proponemos que es la interacción con el tricomplejo Mint/MALS/CASK la responsable de aspectos tales como el tráfico intracelular, el recambio en la superficie celular y la incorporación al transportador de glicina GLYT1 a microdominios específicos de membrana. Además proponemos para este tricomplejo la responsabilidad de puntos comunes de regulación en procesos tales como su tráfico intracelular, su internalización o su interacción con vías de señalización para GLYT1 y NMDAR.

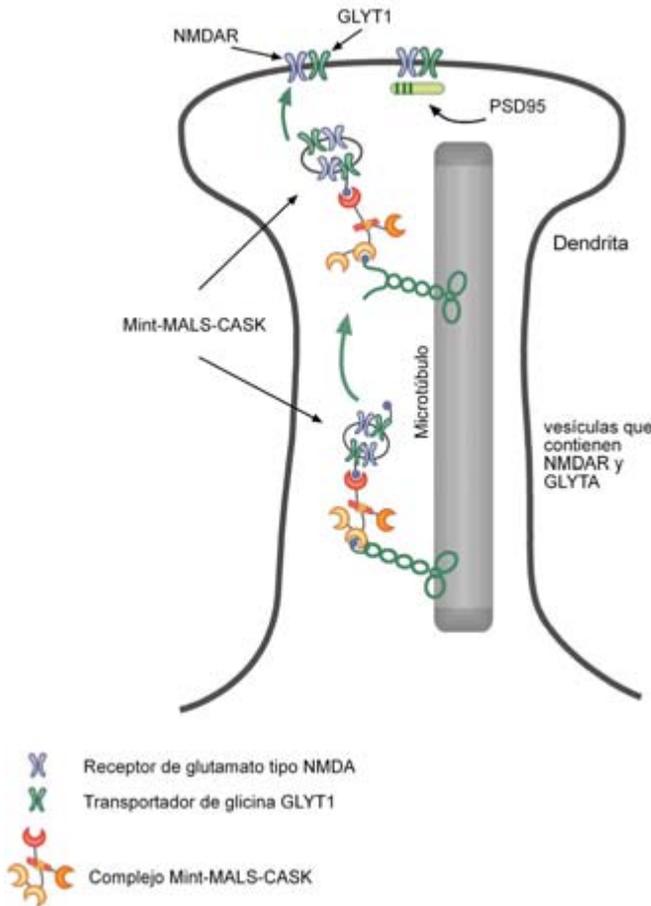


FIGURA 10. Hipótesis del tráfico intracelular común para GLYT1 y NMDAR.

AGRADECIMIENTOS

Deseamos agradecer a E. Núñez y G. Esteban su valiosa ayuda técnica. Este trabajo se ha realizado con el soporte económico de la Dirección General Española de Investigación Científica y Técnica (BMC2002-03502), Fondo de Investigaciones Sanitarias, Comunidad Autónoma de Madrid y Fundación Ramón Areces.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) WESTERGREN, I.; NYSTROM, B.; HAMBERGER, A.; NORDBORG, C. y JOHANSSON, B. (1994): Concentrations of amino acids in extracellular fluid after opening of the blood-brain barrier by intracarotid infusion of protamine sulfate. *J. Neurochem.* 62: 159-165.
- (2) BERGERON, R.; MEYER, T. M.; COYLE, J. T. y GREENE, R. W. (1998): Modulation of N-methyl-D-aspartate receptor function by glycine transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 15730-15734.
- (3) CHEN, L.; MUHLHAUSER, M. y YANG, C. R. (2003): Glycine transporter-1 blockade potentiates NMDA-mediated responses in rat prefrontal cortical neurons *in vitro* and *in vivo*. *J. Neurophysiol.* 89: 691-703.
- (4) KINNEY, G. G.; SUR, C.; BURNO, M.; MALLORGA, P. J.; WILLIAMS, J. B.; FIGUEROA, D. J.; WITTMANN, M.; LEMAIRE, W. y CONN, P. J. (2003): The glycine transporter type 1 inhibitor NFPS potentiates NMDA receptor-mediated responses *in vivo* and produces an antipsychotic profile in rodent behavior. *J. Neurosci.* 23: 7586-7591.
- (5) CUBELOS, B.; GIMÉNEZ, C. y ZAFRA F. (2005): Localization at glutamatergic synapses of the glycine transporter GLYT1. *Cerebral Cortex* 15: 448-459.
- (6) LE PEN, G.; KEW, J.; ALBERATI, D.; BORRONI, E.; HEITZ, M. P.; MOREAU, J. L. (2003): Prepulse inhibition deficits of the startle reflex in neonatal ventral hippocampal-lesioned rats: reversal by glycine and a glycine transporter inhibitor. *Biol. Psychiatry.* 54: 1162-70.
- (7) TSAI, G.; RALPH-WILLIAMS, R. J.; MARTINA, M.; BERGERON, R.; BERGER-SWEENEY, J.; DUNHAM, K. S.; JIANG, Z.; CAINE, S. B. y COYLE, J. T. (2004b): Gene knockout of glycine transporter 1: characterization of the behavioral phenotype. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101: 8485-90.
- (8) BORG, J. P.; STRAIGHT, S. W.; KAECH, S. M.; DE TADDEO-BORG, M.; KROON, D. E.; KARNAK, D.; TURNER, R. S.; KIM, S. K. y MARGOLIS, B. (1998): Identification of an evolutionarily conserved heterotrimeric protein complex involved in protein targeting. *J. Biol. Chem.* 273: 31633-31636.
- (9) MAXIMOV, A. y BEZPROZVANNY, I. (2002): Synaptic targeting of N-type calcium channels in hippocampal neurons. *J. Neurosci.* 22: 6939-6952.

- (10) SETOU, M.; NAKAGAWA, T.; SEOG, D. H. y HIROKAWA, N. (2000): Kinesin superfamily motor protein KIF17 and mLin-10 in NMDA receptor-containing vesicle transport. *Science* 288: 1796-1802.
- (11) ZAFRA, F.; ARAGÓN, C.; OLIVARES, L.; DANBOLT, N. C.; GIMÉNEZ, C. y STORM-MATHISEN, J. (1995): Glycine transporters are differentially expressed among CNS cells. *J. Neurosci.* 15: 3952-3969.
- (12) SHENG, M. y SALA, C. (2001): PDZ domains and the organization of supramolecular complexes. *Annu. Rev. Neurosci.* 24: 1-29.
- (13) TOMITA, S.; NICOLL, R. A. y BREDT, D. S. (2001): PDZ protein interactions regulating glutamate receptor function and plasticity. *J. Cell Biol.* 153: F19-24.
- (14) NONG, Y.; HUANG, Y. Q.; JU, W.; KALIA, L. V.; AHMADIAN, G.; WANG, Y. T. y SALTER, M. W. (2003): Glycine binding primes NMDA receptor internalization. *Nature* 422: 302-307.
- (15) ROCHE, K. W.; STANDLEY, S.; MCCALLUM, J.; DUNE LY, C.; EHLERS, M. D. y WENTHOLD, R. J. (2001): Molecular determinants of NMDA receptor internalization. *Nat. Neurosci.* 4: 794-802.

