



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO

**UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS
UNIDAD ACADÉMICA DE MEDICINA
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

**“PARTICIPACIÓN DE mTOR EN LA REGULACIÓN DEL
TRANSPORTADOR EAAC1 EN CÉLULAS C6 DE GLIOMA”**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

P R E S E N T A:

NANCY MARBELLA PARRA TORRES

DIRECTOR DE TESIS: DR. ALFONSO BERNABÉ CARREÑO

CO-DIRECTOR DE TESIS: DR. ARTURO ORTEGA SOTO

CHILPANCINGO, GRO., AGOSTO 2009.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO
UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS
UNIDAD ACADÉMICA DE MEDICINA
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

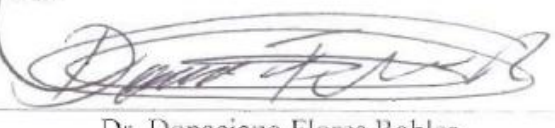
APROBACIÓN DE TESIS


En la ciudad de Chilpancingo, Guerrero, siendo los 10 días del mes de julio de dos mil nueve, se reunieron los miembros del Comité Tutorial designado por la Academia de Posgrado de la Maestría en Ciencias Biomédicas, para examinar la tesis titulada "Participación de mTOR en la regulación del transportador EAAC1 en células C6 de glioma", presentada por la alumna Nancy Marbella Parra Torres, para obtener el Grado de **Maestría en Ciencias Biomédicas**. Después del análisis correspondiente, los miembros del comité manifiestan su aprobación de la tesis, autorizan la impresión final de la misma y aceptan que, cuando se satisfagan los requisitos señalados en el Reglamento General de Estudios de Posgrado e Investigación Vigente, se proceda a la presentación del examen de grado.


El Comité Tutorial

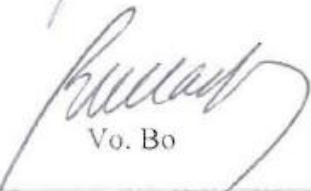

Dr. Alfonso Bernabé Carreño
Dirección de tesis



Dr. Arturo Ortega Soto
Codirección de tesis

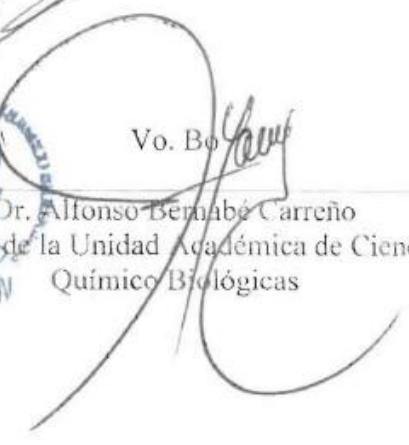

Dr. Donaciano Flores Robles



Dra. Mónica Espinoza Rojo


Dr. Alejandro Millán Vega


Vo. Bo


Dra. Berenice Illades Aguiar
Coordinadora de la Maestría en Ciencias Biomédicas


Vo. Bo


Dr. Alfonso Bernabé Carreño
Director de la Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas

El presente trabajo fue realizado en el laboratorio 23 del Departamento de Genética y Biología Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del I.P.N. bajo la dirección de los Doctores Alfonso Bernabé Carreño y Arturo Ortega Soto y con asesoría de los Doctores Alejandro Millán Vega, Donaciano Flores Robles y Mónica Espinoza Rojo. Durante la realización de este trabajo el autor fue becario del Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología.

AGRADECIMIENTOS

La dedicatoria es lo más difícil de escribir... Nunca sabes cómo iniciar... Además siempre se te olvida mencionar a alguien... Empecemos:

A MI HIJO:

A mi hijo *Karlos Alberto Pastrana Parra* que es lo más valioso que tengo, que me ha inspirado a seguir adelante y a levantarme cada vez que me caigo. Te agradezco porque aunque eres una persona tan pequeña as soportados esas largas ausencias y cada noche en lugar de reclamarme, me esperas con una gran sonrisa, un abrazo y un te amo mamá. *NKB*

A MIS PAPAS:

Gracias por el apoyo que me brindaron siempre y estar ahí cuando los necesitaba, este no es solo un logro mío, también es de ustedes. Los amo. *“Siguen siendo mis súper héroes”*

A MIS HERMANOS:

Mario y Gisela que se que cuento con ustedes en la buenas y en las malas. *“Aunque no lo crean son los mejores, con todos sus defectos”*

A MIS MAESTROS:

Al Dr. Alfonso Bernabé Carreño, Dr. Arturo Ortega Soto, Dr. Alejandro Millán Vega, Dr. Donaciano Flores Robles y la Dra. Mónica Espinoza Rojo.

Por todas sus aportaciones, observaciones y por el tiempo dedicado a este trabajo y sobre todo por ayudarme a salir adelante con este proyecto. Cabe mencionar que esta frase va bien con ustedes *“El carácter lo rige la inteligencia”*.

A MIS AMIGOS

Por toda su comprensión, apoyo y cariño.

A MI MAESTRA Y AMIGA:

La M.C. Judith Elizabeth Bautista Viguri por que ha sido de las pocas personas que desde que me conoció siempre creyó en mí.

PERO SOBRE TODO UN AGRADECIMIENTO ESPECIAL:

A todos aquellos que no creyeron en mí, porque ellos me dieron la fuerza y coraje para demostrarles que estaban equivocados y aquí está la prueba.

ÍNDICE

	Pág.
RESUMEN	ii
ABSTRACT	iii
INTRODUCCIÓN	1
MATERIAL Y MÉTODOS	8
RESULTADOS	12
DISCUSIÓN	19
REFERENCIAS	22

RESUMEN

El glutamato (Glu) es el principal neurotransmisor del sistema nervioso central (SNC) de los vertebrados, el cual se encuentra involucrado en procesos como la memoria, el aprendizaje y la plasticidad sináptica. Los transportadores dependientes de sodio de las neuronas y glia son cruciales para el control de los niveles extracelulares de Glu en el SNC. El blanco de rapamicina en mamíferos (mTOR), integra diferentes señales celulares para el control de crecimiento y proliferación celular, la distribución y síntesis de proteínas. La desregulación de mTOR está implicada en una serie de enfermedades humanas, incluyendo el cáncer. Se ha demostrado que el número de transportadores EAAC1 en la membrana plasmática puede ser regulado por PKC y PI3K, sugiriendo la redistribución de EAAC1 desde un compartimento intracelular. PDGF activa a EAAC1 a través de la activación de PI3K/Akt en las células C6 de glioma, en donde solo se expresa este transportador. Dado que mTOR es activado a través de la vía PI3K/Akt y ésta regula la distribución de algunas proteínas, hipotetizamos, que mTOR podría participar en la activación y redistribución de EAAC1 en las células C6. Nuestros resultados demostraron, mediante análisis de Inmunodetección en fase sólida, que mTOR se fosforila en respuesta a glutamato en células C6, y que la inhibición de esta proteína mediante el uso de rapamicina, disminuye la captura de [³H]-D-aspartato por EAAC1 y por una disminución en su translocación a la membrana. Estos resultados sugieren que mTOR regula al transportador de glutamato/aspartato de alta afinidad dependiente de sodio EAAC1 al modular, vía reorganización del citoesqueleto, su translocación a la membrana plasmática.

Palabras clave: transportadores de glutamato; EAAC1; Aminoácido excitador; translocación; C6 de glioma.

ABSTRACT

Glutamate (Glu) is the major excitatory neurotransmitter in the vertebrate central nervous system (CNS); it is involved in neural plasticity as well in learning and memory. Neuronal and glial sodium-dependent transporters are important for the control of extracellular Glu levels in the CNS. The mammalian target of rapamycin (mTOR) integrates many different cellular signals to control cell growth and proliferation, protein synthesis and breakdown. Disruption of mTOR is implicated in a range of human diseases, including cancers. It has been shown that the surface expression of EAAC1 can be rapidly up-regulated by PKC and PI3K, suggesting that the redistribution of EAAC1 from an intracellular compartment is modified. PDGF regulates EAAC1 through Akt/PI3K activation in C6 glioma cells. Since mTOR is activated through the PI3K/PKB/Akt pathway and this event regulates the distribution of some proteins, we hypothesized that mTOR could be regulating the activation and redistribution of EAAC1 in gliomaC6 cells. Our results demonstrated by Western blot analysis that mTOR is phosphorylated in response to glutamate in C6 cells and that inhibition of this protein by rapamycin, an mTOR blocker, decreases the D-[³H]-aspartate uptake due to a decrement in EAAC1 translocation to the plasma membrane. These results demonstrate that mTOR is involved in EAAC1-dependent glutamate uptake through the modulation of the translocation rate of the transporter to the plasma membrane, event that might depend on the cytoskeletal reorganization.

Key words: glutamate transport; EAAC1; excitatory amino acid; translocation; C6 glioma.

INTRODUCCIÓN

El cerebelo es la estructura más pequeña del sistema nervioso central (SNC) de los vertebrados; constituye el 10% del volumen total del cerebro y está situado en la fosa craneal posterior. Controla la ejecución de los movimientos finos por lo que está íntimamente relacionado con la corteza motora y la médula espinal. Se divide en dos compartimentos anatómicos: la corteza y el núcleo; y presenta tres capas: molecular, intermedia (o de las células de Purkinje) y granular (Ghez y Thach, 2000). La corteza cerebelosa está constituida por cinco tipos de neuronas: granulares, de Purkinje, de Golgi, estrelladas y de canasta (Kandel, 1995).

El glutamato (Glu) es el principal neurotransmisor excitador del SNC de los vertebrados (Watkins, 2000; Zerangue *et al.*, 1995; Fonnum, 1984; Nedergaard *et al.*, 2002). Se almacena en neuronas presinápticas y cuando éstas reciben un estímulo, el neurotransmisor es liberado a la hendidura sináptica activando a diferentes clases de receptores tanto ionotrópicos como metabotrópicos, transduciendo señales integradas mediante el uso de un flujo incrementado de iones y segundos mensajeros (Gegelashvili y Schousboe, 1997). La transmisión glutamatérgica termina por la desensibilización de los receptores y por la captura del Glu; esta función la llevan a cabo proteínas transportadoras transmembranales de alta afinidad que se localizan en células gliales y neuronas. Los transportadores de Glu usan el gradiente sodio y potasio como fuerza electroquímica y son capaces de remover al neurotransmisor y, de esta manera, mantener una concentración basal de Glu en la hendidura sináptica ($<1 \mu\text{M}$; Fonnum, 1984).

La transmisión glutamatérgica participa en funciones importantes tanto en el desarrollo como en el cerebro adulto, tales como el proceso de memoria–aprendizaje y la plasticidad neuronal (Bliss y Collingridge, 1993). Un desequilibrio en sus acciones puede llevar a procesos excitotóxicos que contribuyen a una gran variedad de condiciones neurodegenerativas (Redel *et al.*, 2003).

La variedad de las acciones del Glu al parecer corresponde a la diversidad y elevada complejidad de las estructuras moleculares de sus receptores, que se distribuyen en todo el cerebro de mamíferos, donde constituyen el sistema transmisor excitador principal (Danbolt, 1994; Ottersen *et al.*, 1992). Tales efectos son producidos a través de la activación de dos clases generales de receptores, caracterizados farmacológica y fisiológicamente, es decir, desde el punto de vista de los análogos que los activan y del mecanismo que emplean para la transducción de las señales. En el primer tipo se agrupa a los receptores metabotrópicos; aunque formados por un solo péptido de siete segmentos transmembranales, son capaces de formar dímeros para adquirir propiedades físicas y funcionales distintas (Palmada y Centelles, 1998; Gomes *et al.*, 2001). Estos se encuentran acoplados a proteínas que unen GTP (proteínas G), que son intermediarias en la activación de diversas proteínas efectoras. En un segundo grupo están los receptores ionotrópicos formados por varios péptidos o subunidades, que forman un canal iónico de permeabilidad selectiva (Palmada y Centelles, 1998). En estos receptores, los sitios de unión al agonista y el canal iónico asociado se encuentran localizados en el mismo complejo macromolecular. La permeabilidad iónica del canal depende de las subunidades presentes en su estructura. Ambas clases de receptores son capaces de transducir señales empleando múltiples sistemas de segundos mensajeros, tales como Ca^{2+} , nucleótidos cíclicos y especies reactivas de oxígeno, entre otros. Los receptores ionotrópicos de Glu se clasifican en tres subtipos basados en sus características farmacológicas y electrofisiológicas: receptores α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxasol-propionato (AMPA), N-metil-D-aspartato (NMDA) y kainato (KA); tiene la capacidad de excitar neuronas del SNC activando en sus membranas receptores específicos (Michaelis, 1998). Se conocen 22 genes dentro de la familia de los receptores ionotrópicos y 6 genes dentro de la familia de los receptores metabotrópicos (Hollmann y Heinemann, 1994).

El sistema de transporte de Glu está integrado a la liberación, captura y reciclamiento de éste, debido a la ausencia de enzimas que lo degraden en el

espacio extracelular. Tanto las neuronas como las células gliales son capaces de transportar al Glu, pero la captura por los astrocitos es cuantitativamente superior a la captura de Glu por las neuronas glutamatérgicas. Los transportadores regulan las concentraciones extracelulares de Glu para mantener la señalización dinámica entre las membranas pre- y postsinápticas, así como para regular los niveles tóxicos de Glu (Rothstein *et al.*, 1996; Nedergaard *et al.*, 2002).

La captura desde el espacio sináptico es el proceso por el cual los aminoácidos excitadores son removidos e inactivados (Kanai y Hediger, 2003; Maragakis y Rothstein, 2004)). Este transporte es un proceso electrogénico que depende de los gradientes electroquímicos de iones extra e intracelulares. La energía electroquímica usada para el transporte intracelular de Glu se deriva del flujo de sodio (Na^+). La internalización de Glu está acoplada al cotransporte de 3Na^+ , 1H^+ , 1Glu por 1K^+ que sale (Kanai y Hediger, 2003; Watkins y Evans, 1981).

Se han identificado cinco miembros de la familia de transportadores de alta afinidad a Glu en cerebro de mamíferos: GLAST (EAAT1 en humanos), GLT-1 (EAAT2), EAAC1 (EAAT3), EAAT4 y EAAT5 (Maragakis y Rothstein, 2004; Storck *et al.*, 1992; Kanai y Hediger, 2003; Conradt y Stoffel, 1997). Estos transportadores exhiben patrones de distribución y propiedades cinéticas diferentes en regiones del cerebro, tipos celulares y sistemas de reconstitución. Los EAATs, transportadores humanos clonados, homólogos a los de rata y conejo forman, homomultímeros (principalmente trímeros), en los que cada una de las subunidades funcionan de manera independiente (Koch y Larsson, 2005). Cada subunidad tiene 8 dominios transmembranales, con dos “loops” o asas, que son clave en la función de los transportadores (Yernool *et al.*, 2004). Presentan un requerimiento absoluto de Na^+ extracelular y de K^+ intracelular. Este gradiente electroquímico es mantenido por la ATPasa de Na^+/K^+ y su reducción conduce a la reversión del transporte de Glu, es decir, de dentro hacia fuera (Nedergaard *et al.*, 2002; Koch y Larsson, 2005). Es un hecho que los tres subtipos de

transportadores: GLAST, GLT1 y EAAC1, llevan a cabo casi la totalidad de la captura de Glu, tanto en las neuronas pre- y postsinápticas como en las células gliales (Schmitt *et al.*, 1996). GLAST y GLT1 son los transportadores principales en astrocitos (Worral y Williams, 1996), mientras que EAAC1/EAAT3 está generalmente presente en neuronas (Danbolt, 2001). La delección de los genes de GLAST y GLT1 incrementa las concentraciones extracelulares de Glu y conduce a muerte celular; en cambio, la eliminación del gen de EAAC1 no causa acumulación crítica de Glu extracelular, aunque provoca un cuadro clínico de tipo epiléptico, lo cual sugiere un papel más específico para este transportador de Glu en la transmisión sináptica (Rothstein *et al.*, 1996). Existen evidencias de que la expresión de EAAC1 se altera en diferentes condiciones patológicas (Crino *et al.*, 2002; Rossi *et al.*, 2002). El transportador EAAT3, es una proteína de 524 aminoácidos con un peso molecular de 57 kDa y un 96% de homología con la secuencia de conejo llamada EAAC1, la cual es de origen neuronal y epitelial (Kanai y Hediger, 1992; Rothstein *et al.*, 1994), es abundante en el cerebro, aunque también se ha detectado significativamente en riñón, corazón, hígado, pulmón, placenta y músculo liso; sin embargo, la proteína y el mensajero se han localizado principalmente en la corteza cerebral (Arriza *et al.*, 1994; Rothstein *et al.*, 1994; Nakayama *et al.*, 1996). Las células C6 de glioma exhiben varias características bioquímicas de las células gliales normales, como la expresión de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP; Backhevens *et al.*, 1987). Las células C6 de glioma expresan solamente al transportador EAAC1 y no a GLAST, GLT1, EAAT4 y EAAT5 (Dowd *et al.*, 1996; Palos *et al.*, 1996). Existen evidencias que sugieren que GLT1 también se expresa en esta línea celular (Casado *et al.*, 1993). Se ha propuesto que la falta de asimilación de Glu en las células de glioma puede contribuir a la progresión de ciertos tumores cerebrales, a causa de daños a las neuronas adyacentes a través de un mecanismo excitotóxico (Takano *et al.*, 2001). La expresión de EAAC1 en la membrana plasmática es de aproximadamente el 20% del total de EAAC1 intracelular en condiciones normales. Cuando se activa, EAAC1 se transloca a la membrana celular sin cambio en la síntesis *de novo* (Fournier *et al.*, 2004; Davis *et al.*, 1998). EAAC1 es regulado por la cinasa de

respuesta a glucocorticoides y suero (SGK1) y por la cinasa dependiente de fosfoinositol (Rexhepaj *et al.*, 2006): por la proteína 3-18 asociada al transportador de glutamato (GTRAP3-18; Glenn *et al.*, 2001) y por el inhibidor de PI3K, Wortmanina (*Davis et al.*, 1998). El factor de crecimiento derivado de plaquetas también (PDGF) activa a EAAC1 a través de PI3K/Akt en células C6 de glioma (Fournier *et al.*, 2004; Krizma-Genda *et al.*, 2005; Sheldon *et al.*, 2006). La familia de proteínas PKC, particularmente el subtipo α , regula positivamente la expresión de EAAC1 en la superficie celular y la activación de la captura de Glu, mientras que PKC ϵ aumenta la actividad de la captura del transportador sin translocarlo a la membrana (Gonzalez *et al.*, 2002). PMA es un activador de PKC que incrementa tanto la expresión en la superficie celular y como la actividad de EAAC1 (*Davis et al.*, 1998), mientras que disminuye los niveles de GLT1 (Kalandadze *et al.*, 2002). El dominio carboxilo terminal de EAAC1 juega un papel crítico en el tráfico a la superficie de la membrana. La fosforilación de la serina 465 en EAAC1, por la activación de PKC α , incrementa tanto la actividad como la redistribución de EAAC1 (Huang *et al.*, 2006). Otro estudio mostró que un motivo corto de EAAC1, $^{502}\text{YVN}^{504}$, es necesario para que PDGF induzca la redistribución a la membrana plasmática de EAAC1 (Sheldon *et al.*, 2006). A pesar de que los residuos de tirosina, en estos motivos no se fosforilan, la arginina 445 resulto importante para el acoplamiento entre Glu y los cationes de EAAC1 (Borre y Kanner, 2004). La pérdida de Ca^{2+} del retículo endoplásmico por tapsigargina, un inhibidor de la ATPas de Ca^{2+} , aumenta el transporte de [^3H]-D-aspartato en células C6 de glioma, dependiente de la entrada de Ca^{2+} al citosol. Además, se han aportado pruebas de que en ausencia de Ca^{2+} extracelular, la tapsigargina produce una inhibición de la red de transporte de [^3H]-D-aspartato (Murphy *et al.*, 2009).

El blanco de rapamicina en mamíferos (mTOR), es una proteína serina/treonina altamente conservada, miembro de la familia de las fosfatidilinositol 3 cinasas cinasa (PIKK). Es activada en respuesta a factores de crecimiento, aminoácidos y glucosa, además de que es un regulador central de la biogénesis ribosomal, síntesis de proteínas, crecimiento celular y plasticidad neuronal (Harris y Lawrence, 2003; Wang y Proud, 2006; Hanks *et al.*, 1998). La cinasa mTOR

controla la maquinaria de traducción celular en respuesta a aminoácidos y factores de crecimiento, vía activación de la proteína ribosomal p70^{S6K} y de la inhibición de la proteína de unión al factor eucariótico de iniciación de traducción 4E (eIF-4E) (Ciang y Abraham, 2005). Esta cinasa Ser/Thr de 298 kDa es inhibida por rapamicina, un potente inmunosupresor y una droga anticancerígena, que bloquea la síntesis proteica e interrumpe el ciclo celular en la fase G1 (Asnaghi *et al.*, 2004; González-Mejía *et al.*, 2006). Forma parte de dos complejos estructural y funcionalmente distintos. El complejo mTORC1 que es sensible a rapamicina, formado por mTOR, GβL/mSTL8 y Raptor, regula la fosforilación de S6K y 4EBP-1, controlando así el inicio de la traducción de proteínas, la biogénesis ribosomal y otros eventos relacionados con el crecimiento celular (Hay y Sonenberg, 2004). El segundo complejo de mTOR fue descrito recientemente; mTORC2 está constituido por mTOR, GβL/mSTL8 y Rictor/mAVO3. Este complejo fosforila AKT/PKB, un importante mediador de la sobrevivencia celular y que también puede regular el citoesqueleto de actina a través de las GTPasas de la familia de Rho. La deficiencia de nutrientes o de ATP conduce a la inactivación de mTOR, incluso en presencia de factores de crecimiento e insulina. mTOR está regulada de manera positiva por la vía PI3K/Akt/TSC (Gingras *et al.*, 2004).

Los receptores, al igual que los transportadores de Glu, son expresados en la gran mayoría de las células gliales del cerebro y es evidente que son activados durante la transmisión sináptica. La activación de los receptores glutamatérgicos resulta en cambios en la fisiología celular a corto, mediano y largo plazo, activando múltiples vías de señalización. La disfunción del sistema de captura está involucrada en la etiología de la mayoría de los desórdenes neurológicos y psiquiátricos. Por lo tanto establecer las bases moleculares de la regulación de este neurotransmisor es necesario para lograr un avance significativo en cualquier estrategia en la lucha contra las enfermedades del SNC. Dado que la actividad sináptica está ligada a la regulación de la expresión génica, tanto en neuronas como en células gliales, y que estos patrones constituyen la base molecular de las funciones superiores, se determinó la participación de mTOR en la regulación de la actividad de EAAC1 en células C6 de glioma. En este estudio proponemos que

la proteína mTOR se fosforila en respuesta a Glu y que además, regula el transporte de [³H]-D-aspartato mediado por el transportador endógeno EAAC1, a través de la traslocación a la membrana de este transportador expresado en la línea celular C6 de glioma.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Las células C6 de glioma fueron obtenidas de la ATCC. El [³H]-D-aspartato se obtuvo de New England Nuclear (Boston, MA, USA). El ácido glutámico fue obtenido de Tocris-Cookson (St. Louis, MO, USA). El DMEM y el Suero fetal bovino, fueron obtenidos de GIBCO^{MR} (Gaithersburg, MD, USA). El reactivo Bradford fue obtenido de Bio-Rad (Hercules, CA, USA). La Rapamicina fue obtenida de Roche Molecular Biochemicals (Indianapolis, IN). Los demás reactivos se obtuvieron de Sigma (St. Louis, MO, EE.UU.)

Cultivo celular

Las células C6 de glioma fueron cultivadas en DMEM (Medio Eagle modificado por Dulbecco), complementado con suero fetal bovino al 10% (GIBCOTM) y 50 µg/mL de gentamicina y 10,000 U de penicilina sódica, a 37°C en 95% de O₂ y 5% de CO₂. Las células fueron crecidas a una densidad de 1 x 10⁶ células/mL y se incubaron de 3 a 4 días, hasta alcanzar una confluencia del 80%.

Ensayo de captura en células C6 de glioma

La captura de [³H]-D-aspartato, un análogo no metabolizable de Glu, fue realizada como se ha descrito anteriormente (Ruiz y Ortega, 1995). El medio de cultivo fue intercambiado por la solución A (Hepes-Tris 25mM, NaCl 130Mm, KCl 5.4mM, MgCl₂0.8Mm, glucosa 33.3Mm y NaHPO₄ 1Mm, se ajusto el pH a 7.4 cerca del volumen final con Tris base 1.0M y se adicionó CaCl₂ 1.8mM) y las células fueron preincubadas por 30 min a 37°C. Por otro lado los cultivos de C6 fueron sometidos a un tratamiento de supresión, con medio DMEM, en ausencia de suero fetal bovino, por dos horas. Se trataron a diferentes tiempos (30, 60, 120 y 180 min) con Rapamicina (Rapa) 100nM. Subsecuentemente, este medio fue

intercambiado por solución A con [³H]-D-aspartato (0.4μCi/ml) e incubadas a diferentes tiempos a 37°C. Posteriormente el medio fue removido mediante aspiración rápida por vacío y las monocapas fueron lavadas 3 veces con solución A fría (4°C) y solubilizadas con NaOH 0.1M. Se cuantificó la concentración de proteínas por el método de Bradford y la radioactividad incorporada por las células mediante conteo por centelleo líquido (Beckman LS 6000SC). Los datos obtenidos fueron analizados mediante regresión no lineal con el programa PRISM 5.0 (GraphPad).

Inmunodetección en fase sólida

Los extractos totales de proteína fueron diluidos en concentraciones 1:3 con solución amortiguadora de muestra (187.5mM Tris-HCl, pH 6.8; 5% β-mercaptoetanol, 6% SDS, 30% Glicerol, 0.03% Azul de bromofenol), posteriormente fueron desnaturalizados a 95°C por 5min. Los extractos fueron analizados en geles de poliacrilamida al 6%, a 100V, por 240min. Las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa en cámara húmeda a 170mA, por 3.5hrs, en baño de hielo, usando un amortiguador de transferencia adicionado con 10% de metanol (28mM Tris-base, 39mM Glicina, 10% Metanol). Las membranas fueron teñidas con el colorante rojo de Ponceau para comprobar la efectividad de la transferencia y fueron desteñidas con PBS. Las membranas se bloquearon por 30min con una solución salina de Tris-base (0.2M Tris-base, 1.36M NaCl, 0.1% Tween-20 (TBST), conteniendo 5% de leche descremada. La membrana se incubó toda la noche a 4°C con anticuerpo primario anti-mTOR a una dilución 1:1000 en TBS (Albúmina de suero bovino 0.25%, 0.1% Tween, 0.1% Timerosal). Posteriormente se realizaron dos lavados con TBST y un lavado con TBS, cada uno de 5 min. La membrana fue incubada con el anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con peroxidasa de rábano, por 2hrs, a temperatura ambiente, seguido por dos lavados con TBST y un lavado con TBS; ambas soluciones a 4°C. Las membranas previamente tratadas con reactivos de quimioluminiscencia (ECL) fueron reveladas en placas autoradiográficas (Kodak).

Ensayos de unión del [³H]-D-aspartato dependiente de Na⁺

Los experimentos de unión al equilibrio fueron realizados para cuantificar el número de transportadores en la membrana plasmática. Las monocapas confluentes de células C6 se lavaron dos veces con solución A y se incubaron con Rap 50nM por 1h. Las células intactas fueron lavadas y expuestas a D-[³H]-aspartato (0.4μCi/ml en solución A en presencia de Na⁺ o colina) por 60min a 4°C. Posteriormente, las monocapas se lavaron rápidamente tres veces con solución A fría y fueron solubilizadas con 0.1N de NaOH. Las alícuotas del material solubilizado fueron usadas para determinar la concentración de proteínas y el recuento de reactividad por centelleo líquido. La unión no específica fue determinada en presencia de 100μM de ácido aspártico no marcado. Las uniones específicas de D-[³H]-aspartato a EAAC1 se definieron como la diferencia entre la unión en la solución A normal menos la unión en el amortiguador que contiene 100μM de ácido D-aspártico.

Determinación de la concentración de proteína

La cuantificación de la concentración total de proteínas se llevó a cabo mediante el método de Bradford. Se preparó una solución estándar de γ-globulina y, a partir de esta, se realizó una curva de patrón de proteínas (1,2,3,6 y 12μg/μl), por duplicado, se adicionaron 20μl de cada dilución en pozos de placas de lector de ELISA y se mezclaron con 180μl del reactivo de Bradford, el cual previamente fue disuelto con agua bidestilada en proporción 1: 4; las muestras se dejaron en reposo por 5min, protegidas de luz directa, a temperatura ambiente, posteriormente las muestras fueron agitadas por 30s y su absorbancia fue determinada a 630nm. Los datos de las absorbancias se graficaron colocando la concentración de γ-globulina en el eje de las abscisas y en el eje de las ordenadas la longitud de onda obtenida a 630nm. Las muestras problema se prepararon de la misma manera que las de la curva patrón y las absorbancias respectivas fueron

interpoladas con los datos de la curva patrón para determinar la concentración de proteínas de cada muestra.

Análisis estadístico

Los datos son expresados como la media (promedio) \pm error estándar (SE). El análisis de varianza *one-way* (ANOVA) se realizó para determinar si existe diferencia significativa entre las condiciones (PRISM 5.0, GraphPad).

RESULTADOS

Dependencia de sodio del transportador EAAC1 en células C6 de glioma

En el presente trabajo usamos una línea celular; células C6 de glioma de rata Wistar, como sistema para evaluar los efectos de la regulación del transportador EAAC1.

Posteriormente se determinó la dependencia de sodio del sistema de captura presente en la línea celular C6 de glioma y para ello se realizaron ensayos de captura de [³H]-D-aspartato, análogo de Glu no metabolizable, en presencia de cloruro de sodio o de cloruro de colina. Como se observa en la figura 1, existe transporte dependiente de sodio y del tiempo, el cual se abate al sustituir el cloruro de sodio por cloruro de colina.

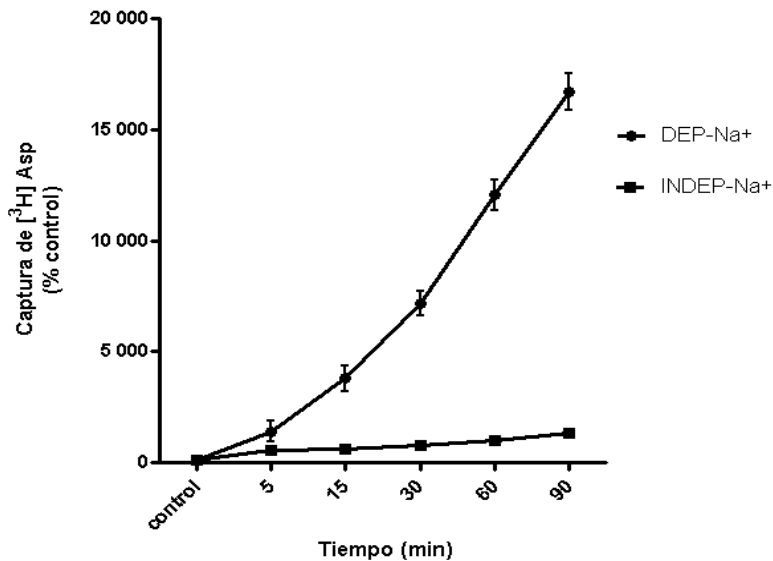


Fig.1. Dependencia de sodio del proceso de captura de [³H]-D-aspartato en la línea celular C6 de glioma. Las células fueron preincubadas por 30 min en solución A, en presencia de sodio o colina y la actividad de captura fue medida por los periodos de tiempos indicados. Para la captura se agregaron 0.4µM del ligando radiactivo, realizándola como se establece en el apartado de material y métodos. Se presentan los valores promedio ± EMS de tres experimentos diferentes realizados cada uno por triplicado.

Captura de [³H]-D-aspartato por EAAC1 en células C6 de glioma.

Se ha demostrado que las células C6 de glioma expresan solamente al transportador EAAC1, pero existen evidencias que sugieren que GLUT1 también es expresado en esta línea celular (Casado *et al.*, 1993). Para comprobar que el transporte de Glu en las células C6 se lleva a cabo por EAAC1 y no por GLUT1, las células fueron incubadas por 30min con tres bloqueadores de EAATs: L-serina-O-sulfato, L-SOS (150µM), Dihidroquinato, DHK (100µM) y DL-treo-3-hidroxiaspartato, DL-THA (100µM), previamente a los ensayos de captura. Se observó una reducción en los niveles de captura en comparación con el control, del 63.33% con L-SOS, de 16.87% con DHK y de 80% con DL-THA (Figura 2). Estos resultados sugieren que el transportador dependiente de sodio EAAC1, es responsable de llevar a cabo el transporte de Glu en células C6 de glioma y no GLUT1.

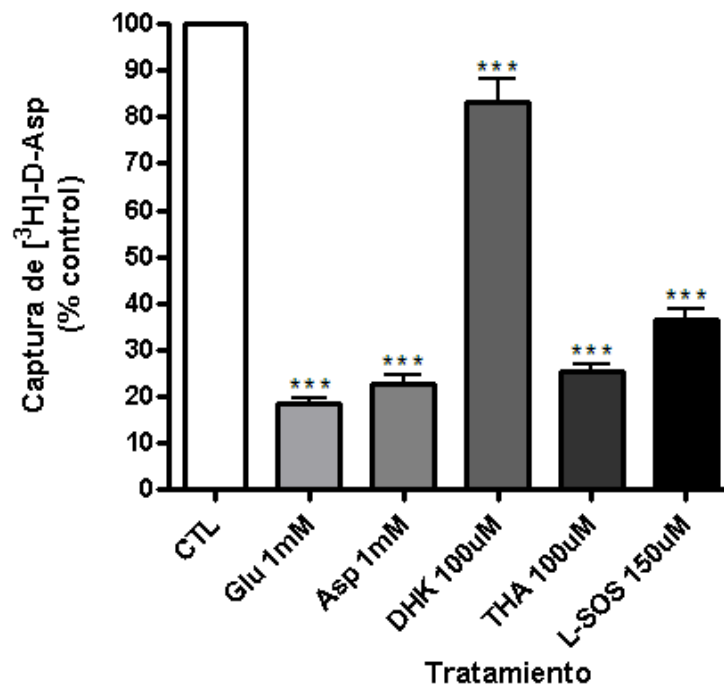


Fig. 2. Captura de [³H]-D-aspartato por EAAC1 en células C6 de glioma. Las células fueron incubadas por 30 min en solución A, con [³H]-D-aspartato y con uno de tres bloqueadores de los EAATs: L-serina-O-sulfato, L-SOS (150µM), Dihidroquinato, DHK (100µM) y DL-threo-3-hidroxiaspartato, DL-THA (100µM) y se a cabo ensayos de captura. Se presentan los valores promedio ± EMS de tres experimentos realizados por triplicado. *P<0.05 (prueba de Dunnett's).

Glutamato incrementa la fosforilación de mTOR en Ser 2448 en células C6 de glioma

Con el propósito de comprobar que mTOR se activa en respuesta al estímulo con Glu en las células C6 de glioma, el cultivo se expuso a una concentración de 1mM de Glu, por 30min y, mediante Inmunodetección en fase solida, se determinó que mTOR se fosforila en respuesta a Glu. Como era de esperar, los niveles de mTOR, detectados con anti-mTOR, en las células no estimuladas no tuvieron ningún cambio (Figura 3).

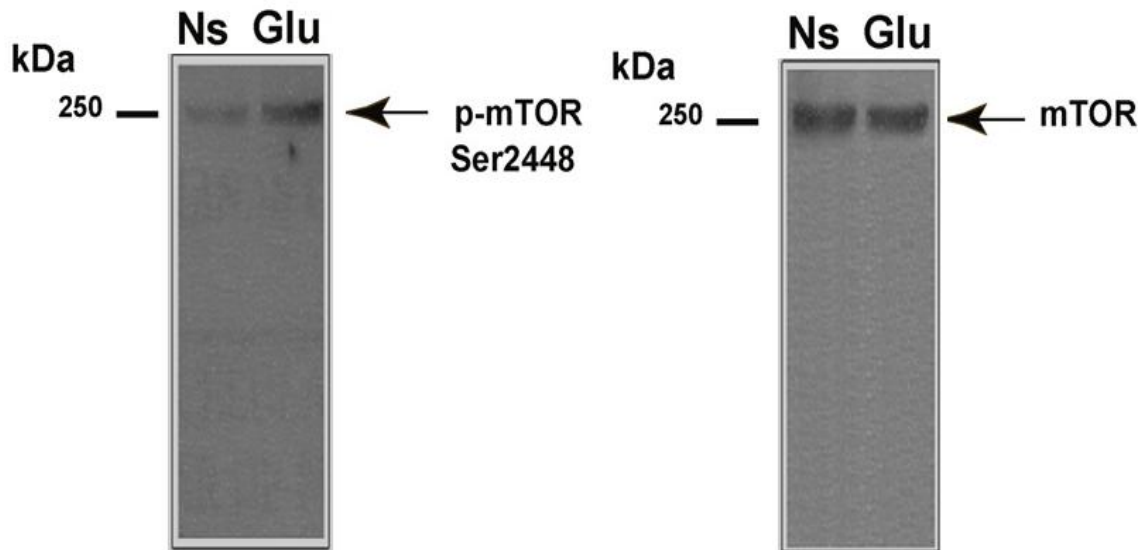


Fig. 3. Glutamato induce la fosforilación de mTOR en células C6 de glioma. Las células C6 de glioma confluentes fueron expuestas a Glu 1mM por 30 min. El total de los extractos de proteínas de las células C6 fueron sometidas a un análisis de Western blot. Las membranas fueron incubadas con un anticuerpo policlonal anti-pmTOR (Ser 2448) diluido 1:1000 (Izquierda) o un anticuerpo policlonal anti-mTOR (1:1000; derecha). Posteriormente se incubó con un anticuerpo secundario acoplado a HRP y se reveló por ECL. Ns: No estimulado.

Rapamicina disminuye la captura de [³H]-D-aspartato mediada por el transportador EAAC1.

Una vez que se demostró que mTOR es fosforilado en las células C6 de glioma, se procedió a determinar si mTOR regulaba el transporte de EAAC1. Para ello, las células fueron preincubadas a diferentes concentraciones con un bloqueador de mTOR, rapamicina (5, 50, 100 y 1000nM), previamente a los ensayos de captura. Los resultados mostraron que rapamicina ejerce un efecto sobre el transporte de Glu, con una IC₅₀ de 50nM. Además, a una concentración de 100nM ejerce un mayor efecto de inhibición. Para los siguientes experimentos se utilizó esta última concentración (Figura 4).

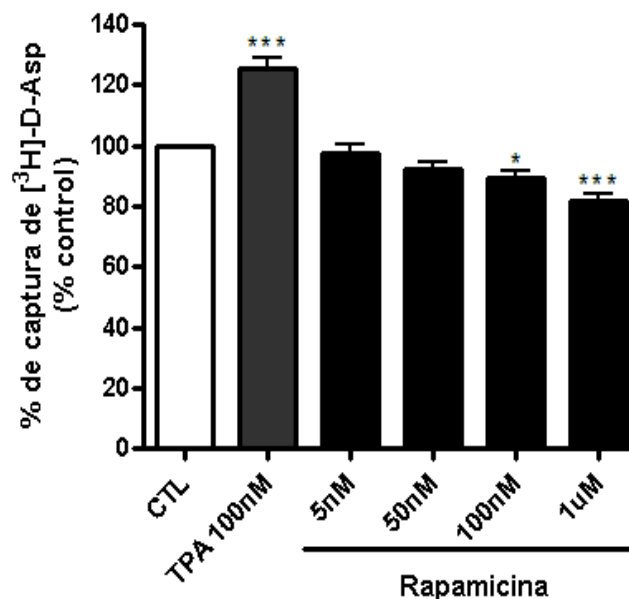


Fig. 4. Efecto de concentraciones crecientes de Rapamicina en la captura dependiente de sodio en las células C6 de glioma. Las células fueron incubadas en DMEM (medio mínimo modificado de Dulbecco) con diferentes concentraciones de rapamicina (5, 50, 100 y 1000nM) durante 30min a 37°C, seguido de la captura de [³H]-D-aspartato por 30min. Se muestra el promedio ± EMS de tres experimentos realizados por triplicado. *P<0.05 (prueba de Dunnett's).

Posteriormente las células fueron tratadas con rapamicina 100nM a diferentes tiempos (30, 60,120 y 180min), previamente a los ensayos de captura.

Se observó que rapamicina disminuye la captura aproximadamente del 20% a las 2h del tratamiento (Figura 5).

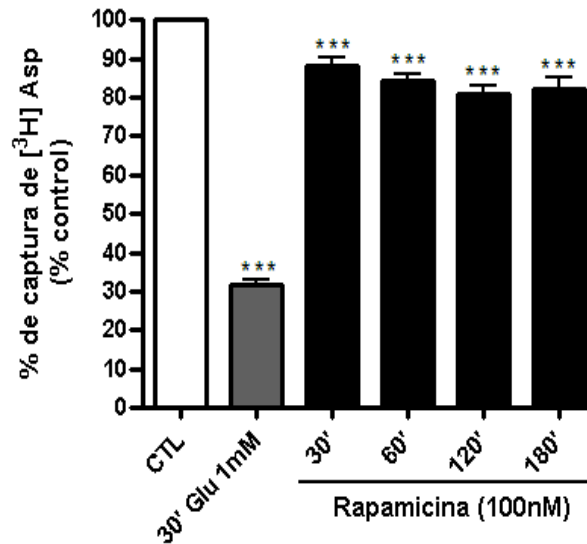


Fig. 5 Curso temporal de la captura de [3H]-D-aspartato en presencia de 100nM de rapamicina. Las células fueron incubadas con una concentración fija de rapamicina y 0.4μM/ml de [3H]-D-aspartato por los tiempos indicados (30, 60, 120 y 180min), y se determinaron las DPMs (desintegraciones por minuto) en un contador de centelleo líquido. Se presenta el promedio ± EMS de tres experimentos realizados por triplicado. *P<0.05 (prueba de Dunnett's).

Rapamicina afecta la morfología de las células C6 de glioma

Para observar si rapamicina ejerce algún efecto sobre la morfología de las células, se tomaron micrografías de las células tratadas a la misma concentración y tiempos de los ensayos de captura anteriores (Figuras 6 y 7).

Estas imágenes muestran que rapamicina ejerce un efecto sobre la morfología de las células C6 de glioma a partir de los 30min, y que a tiempos prolongados, como 3h pareciera que las células estuviesen experimentando muerte celular.

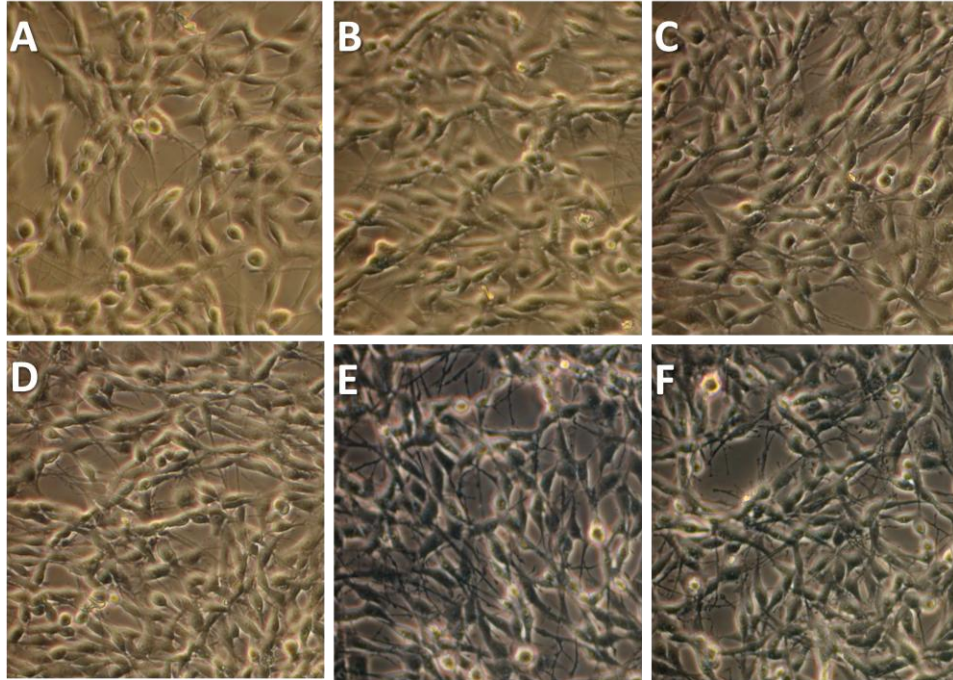


Fig. 6. Efecto de Rapamicina sobre la morfología de las células C6 de glioma. Las células C6 de glioma fueron tratadas con Rapamicina 100nM a diferentes tiempos (30, 60,120 y 180min). **A.** Control; **B.** Células tratadas con Glu 1mM por 30min; **C, D, E y F.** Células tratadas con Rapamicina 100nM por 30, 60, 120 y 180min respectivamente.

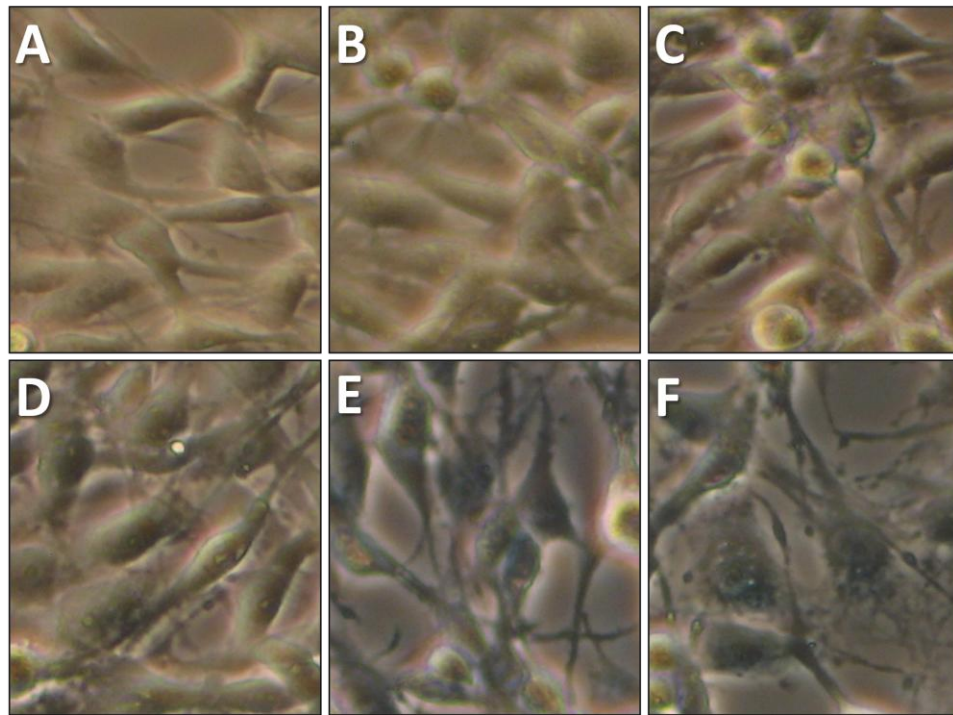


Fig. 7. Amplificación de una región de las micrografías de la figura 6. **A.** Control; **B.** Células tratadas con Glu 1mM por 30min; **C, D, E y F.** Células tratadas con Rapamicina 100nM por 30, 60, 120 y 180min respectivamente.

Rapamicina disminuye la traslocación de EAAC1 en la membrana plasmática

Para demostrar que mTOR participa en la translocación del transportador EAAC1 a la membrana, se realizaron ensayos de unión del [³H]-D-aspartato, en presencia de Na⁺, para cuantificar el número de transportadores en las membrana plasmática. Las células confluentes fueron tratadas con rapamicina a diferentes tiempos (60, 120 y 180min). Los datos mostraron que el número de transportadores en la membrana disminuyó a las 2h del tratamiento con rapamicina aproximadamente en un 20% (Figura 8).

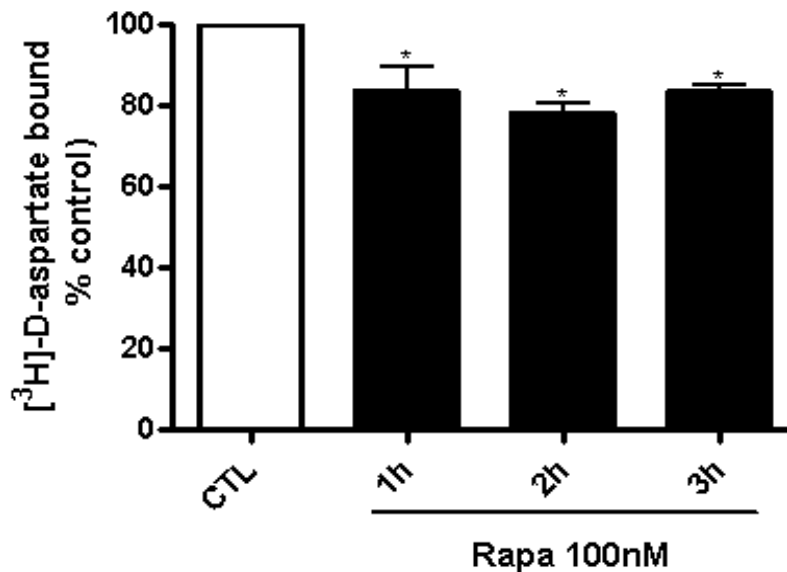


Fig. 8. Rapamicina disminuye la traslocación de EAAC1 a la membrana plasmática. La unión específica de [³H]-D-aspartato se realizó a 4°C, en células C6 confluentes preincubadas con 100nM Rapamicina por 1,2 y 3h. Se determinaron las DPMs en un contador de centelleo líquido. Se presenta el promedio ± EMS de tres experimentos realizados por triplicado. *P<0.05 (prueba de Dunnett's).

Estos resultados sugieren que mTOR regula la traslocación de EAAC1 a la membrana plasmática.

DISCUSIÓN

Los resultados presentados en este trabajo proporcionan información importante sobre la capacidad de respuesta de las células C6 de glioma a rapamicina y la regulación de la actividad del transporte de glutamato por este bloqueador de mTOR.

Varios subtipos de transportadores de alta afinidad a Glu han sido farmacológicamente diferenciados en tejido nervioso. Recientemente cinco distintos cDNAs que codifican transportadores de glutamato (EAAC1, GLT1, GLAST, EAAT4 y EAAT5), dependientes de sodio, han sido clonados. EAAC1/EAAT3, además de ser expresado en cerebro, hipocampo, riñón, placenta, intestino y corazón (Rothstein *et al.*, 1994; Danbolt, 2001). También es expresado en las células C6 de glioma de rata (Palos *et al.*, 1996). Demostramos la disminución del transporte, aún manteniendo las mismas condiciones de osmolaridad con cloruro de colina y la dependencia de sodio para que se lleve a cabo, lo que sugiere que el sistema de transporte presente en el cultivo de células C6 de glioma corresponde a las características de los transportadores de Glu de alta afinidad dependientes de sodio (Figura 1). Aunque se ha demostrado que las células C6 de glioma expresan solamente EAAC1 y no GLAST, GLT1, EAAT4 y EAAT5, existen evidencias que sugieren que GLT1 también es expresado en esta línea celular (Dowd *et al.*, 1996; Palos *et al.*, 1996; Casado *et al.*, 1993). La exposición de los cultivos de células C6 de glioma al efecto de L-SOS, un inhibidor de EAAC1 y GLAST en el cerebelo, produce una caída del transporte del 63.33%, lo que sugiere que el transporte en células C6 de glioma se lleva a cabo por EAAC1 y no por GLT1. Esto se debe a que el tratamiento con DHK, un antagonista de GLT1, no afecta la captura de [³H]-D-aspartato en esta línea celular (Figura 2). Los receptores, al igual que los transportadores de Glu, son expresados en la gran mayoría de las células gliales del cerebro y es evidente que son activados durante la transmisión sináptica. La activación de los receptores glutamatérgicos resulta en cambios de la fisiología celular a corto, mediano y largo

plazo activando múltiples vías de señalización. El objetivo blanco de rapamicina, considerado como el regulador central de la síntesis de proteínas (Proud, 2007), forma dos principales complejos. El primer complejo denominado mTORC1, está involucrado en la transcripción, traducción y dinámica de microtúbulos (Sarbasov *et al.*, 2004). El segundo mTORC2, participa en la dinámica del citoesqueleto de actina y la actividad de dos importantes cinasas: la proteína cinasa B (Akt) y una isoforma dependiente de Ca^{2+} y Diacilglicerol (DAG), PKC α (Sarbasov *et al.*, 2005). El factor de crecimiento derivado de plaquetas activa EAAC1 a través de la vía PI3K/Akt en células C6 de glioma, además de que altera la actividad y la expresión de este transportador que es bloqueado por wortmanina (Davis *et al.*, 1998). En esta misma línea celular la activación de PKC por PMA causa un rápido incremento de la actividad de EAAC1 a través de la isoforma PKC α , lo que sugiere que dos vías independientes regulan a este transportador (Sims *et al.*, 2000). En cultivos de CGB (Células Gliales de Bergmann) de pollo mTOR se fosforila en Ser2448 en respuesta a la estimulación con Glu al igual que en células C6 de glioma (Figura 3) (Zepeda *et al.*, 2009). Rapamicina, un potente inmunosupresor y una droga anticancerígena; inhibe el complejo sensible de rapamicina mTORC1, bloqueando la síntesis de proteínas, la dinámica de microtubulos e interrumpe el ciclo celular en la fase G1 (Sarbasov *et al.*, 2004; Asnaghi *et al.*, 2004; González-Mejía *et al.*, 2006). En células C6 de glioma rapamicina produce citotoxicidad y altera su morfología celular (Figura 6 y 7). En cambio en cultivos de neuronas de hipocampo rapamicina no produce neurotoxicidad ni altera significativamente el número y morfología de las neuronas (Rüegg *et al.*, 2007). La captura de Glu es un proceso que se encuentra altamente regulado a diferentes niveles: control transcripcional, traslocación de los transportadores a la membrana y probablemente por modificaciones post-traduccionales como la fosforilación. La alteración de la captura de Glu puede resultar en efectos neurotóxicos, y enfermedades neurodegenerativas. En células C6 de glioma el tratamiento con rapamicina disminuye la captura de [^3H]-D-aspartato (Figura 4 y 5); resultados que son opuestos a los reportados anteriormente por Sims *et al.*, 2000. Esto se debe a que el tratamiento con rapamicina empleado fue por un periodo de tiempo

relativamente corto (5min) y que la inhibición de mTORC1 por rapamicina es alrededor de los 30min (Chung-Han *et al.*, 2006). La disminución observada en la captura por el tratamiento con rapamicina fue dependiente de la dosis (Figura 5), mostrando que a las 2h de pretratamiento con rapamicina la captura disminuyó significativamente un 20% a comparación del control, lo que corresponde a la disminución de la translocación de este transportador a la membrana en las células C6 de glioma (Figura 8). En este contexto nosotros demostramos que mTOR participa en la regulación de la actividad del transportador. Una posible explicación de cómo participa podría ser que al bloquear la fosforilación de mTOR en Ser 2448, inhibe la fosforilación de proteínas como p70^{S6K} y la inhibición de la proteína de unión a eIF-4E impidiendo así la síntesis de nuevos mRNAs que codifique para el transportador o por la activación del transportador y su consiguiente translocación a la membrana, ya que también mTOR también regula funciones como: reorganización del citoesqueleto y dinámica de los microtúbulos, que probablemente están involucrados en la traslocación del transportador EAAC1.

En conclusión, la proteína blanco de rapamicina en mamíferos (mTOR), regula al transportador de glutamato/aspartato de alta afinidad dependiente de sodio EAAC1, presente en células C6 de glioma. Los resultados obtenidos en este trabajo, se refuerzan la hipótesis de que los sistemas gliales de transporte de neurotransmisores desempeñan un papel importante en la modulación de la transmisión sináptica.

REFERENCIAS

1. Ghez C, Thach W. The cerebellum. In Kandel ER, Schwartz J, Jessell T. eds. Principles of neural science. New York: Elsevier; 2000: 832-54.
2. Kandel E, Schwartz J y Jessell T. Principles of Neural Science. U.S.A. Appleton and Lange. Tercera edición; 1995: 5-32.
3. Watkins J. L-Glutamate as a central neurotransmitter; looking-back. Biochemical Society 2000; 28 (4): 297-310.
4. Zerangue N, Arriza J, Amaras S y Kavanaugh M. Differential modulation of human glutamate transporter subtypes by arachidonic acid. Biological Chemistry 1995; 270 (12): 6433-6435.
5. Fonnum F. Glutamate; a neurotransmitter in mammalian brain. Neurochemistry 1984; 42 (1): 1-11.
6. Nedergaard M, Takano T y Hansen A. Beyond the role of glutamate as a neurotransmitter. Nature Rev Neuroscience 2002; 21 (3): 748-755.
7. Gegelashvili G and Schousboe A. High affinity glutamate transporters: and regulation of expression and activity. Molecular Rev Pharmacology 1997; 52: 6-15.
8. Bliss T and Collingridge G. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. Nature Rev 1993; 361: 31-39
9. Redel G, Platt B and Micheau J. Glutamate receptor function in learning and memory. Behavioural Brain Research 2003; 40 (1-2): 1-47.
10. Danbolt N. The high affinity uptake system for excitatory amino acids in the brain. Progress in Neurobiology 1994; 44 (4): 377-396.
11. Ottersen O, Zhang N and Walberg F. Metabolic compartmentation of glutamate and glutamine: morphological evidence obtained by quantitative immunocytochemistry in rat cerebellum. Neuroscience 1992; 46 (3): 519-534.
12. Palmada M and Centelles J. Excitatory amino acid neurotransmission pathways for metabolism, storage and reuptake of glutamate in brain. Frontiers Bioscience 1998; 20 (3): 1-18.
13. Gomes I, Jordan B, Gupta A, Rios C, Trapaidze N and Devil L. G protein coupled receptor dimerization: implications in modulating receptor function. Molecular Medicine 2001; 79 (5-6): 226-242.
14. Michaelis E. Molecular biology of glutamate receptors in the central nervous system and their role in excitotoxicity, oxidative stress and aging. Progress in Neurobiology 1998; 54 (4): 369-415.
15. Hollmann M and Heinemann S. Cloned glutamate receptors. Annu Rev Neuroscience 1994; 17: 31-108.

16. Rothstein J, Dyke-Hoberg M, Pardo C, Bristol L, Jin L, Kuncl R *et al.* Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate. *Neuron* 1996; 16 (3): 675-686.
17. Kanai Y and Hediger M. The glutamate and neutral amino acid transporter family: physiological and pharmacological implications. *Pharmacology* 2003; 479 (1-3): 237-247.
18. Maragakis N and Rothstein J. Glutamate transporter: animal models to neurologic disease. *Neurobiology of Disease* 2004; 15 (3): 461-473.
19. Watkins J and Evans R. Excitatory amino acid transmitters. *Pharmacology Rev Toxicology* 1981; 21: 165-204.
20. Storck T, Schulte S, Hofmann K and Stoffel W. Structure, expression and functional analysis of a Na⁺-dependent glutamate/aspartate transporter from rat brain. *Neurobiology* 1992; 89 (22): 10955-10959.
21. Conradt, M and Stoffel W. Inhibition of the high-affinity brain glutamate transporter GLAST-1 via direct phosphorylation. *Neurochemistry*. 1997; 68. 1244-1251.
22. Koch H and Larsson H. Small-scale molecular motions accomplish glutamate uptake in human glutamate transporters. *Neuroscience* 2005; 25 (7):1730–1736.
23. Yernool D, Boudker O, Jin Y and Gouaux E. Structure of a glutamate transporter homologue from *Pyrococcus horikoshii*. *Nature* 2004; 431(7010): 811–818.
24. Schmitt A, Asan E, Puschel B, Joens T and Kugler P. Expression of the glutamate transporter GLT1 in neural cells of the rat central nervous system: non-radioactive in situ hybridization and comparative immunocytochemistry. *Neuroscience* 1996; 71(4): 989-1004.
25. Worrall D and Williams D. Sodium ion-dependent transporters for neurotransmitters: a review of recent developments. *Biochemistry* 1994; 297 (3): 425-436.
26. Danbolt N. Glutamate uptake. *Progress in Neurobiology*. 2001; 65 (1):1-105.
27. Crino P, Jin H, Shumate M, Robison M, Coulter D and Brooks. Increased expression of the neuronal glutamate transporter (EAAT3/EAAC1) in hippocampal and neocortical epilepsy. *Epilepsia* 2002; 43 (3): 211-218.
28. Rossi D, Oshima T and Attwell D. Glutamate release in severe brain ischaemia is mainly by reversed uptake. *Nature* 2000; 403: 316-321.
29. Arriza J, Fairman W, Chejl L, Murdoch G, Kavanaugh M and Amara S. Functional comparisons of three glutamate transporter subtypes cloned from human motor cortex. *Neuroscience* 1994; 14: 5559-5569.

30. Rothstein J, Martin L, Levey AI, Dykes-Hoberg M, Jin L, Wu D, et al. Localization of neuronal and glial glutamate transporters. *Neuron*. 1994; 13: 713–725.
31. Nakayama T, Kawakami H, Tanaka K and Nakamura S. Expression the three glutamate transporter subtype mRNAs in human brain regions and peripheral tissues. *Molecular Brain Research* 1996; 36: 189-192.
32. Backhevens H, Ghevens J and Slegers H. Expression of gliafibrillary acid protein in rat C6 gliomarelates to vimentin and is independent of Cell-cell contact. *Neurochemistry* 1987; 49 (2): 348-354.
33. Dowd L, Coyle A, Rothstein D, Pritchett D and Robinson M. Comparasion of Na⁺-dependent glutamate transport activity in synaptosomes, C6 glioma and *Xenopus* oocytes expressing excitatory amino acid carrier 1 (EAAC1). *Molecular Pharmacology* 1996; 49 (3): 465-473.
34. Palos T, Ramachandra B, Boado R and Howard B. Rat C6 and human astrocytic tumor cells express a neuronal type glutamate transporter. *Molecular Brain Research* 1996; 37 (1-2): 297-303.
35. Casado M, Bendahan A, Zafra F, Danbolt N, Aragon C, Gimenez C and Kanner B. Phosphorylation and modulation of brain glutamate transporters by protein kinase C. *Biological Chemistry* 1993; 268 (36): 27313-27317.
36. Takano T, Lin J, Arcuino G, Gao Q, Yang J and Nedergaard M. Glutamate release promotes growth of malignant gliomas. *Nature Medicine* 2001; 7 (9): 1010-1015.
37. Fournier K, Gonzalez M and Robinson M. Rapid trafficking of the neuronal glutamate transporter, EAAC1. *Biological Chemistry* 2004; 279 (33):34505-34513.
38. Davis K, Straff D, Weinstein E, Bannerman P Correale D, Rothstein J and Robinson M. Multiple signaling pathways regulate cell surface expression and activity of the excitatory amino acid Carrier 1 subtype of Glu transporter in C6 glioma. *Neuroscience* 1998; 18 (7): 2475-2485.
39. Rexhepaj R, Grahammer F, Volklt H, Remy C, Wagner C, Sandulache D, et al. Reduce intestinal and renal amino acid transport in PDK1 hypomorphic mice. *Faseb* 2006; 20: 2214-2222.
40. Glenn C, Orlvo I, Ruggiero A, Dykes- Horberg M, Lee A, et al. Modulation of the neuronal glutamate transporter EAAC1 by the interacting protein GTRAP3-18. *Nature* 2001; 410: 84-88.
41. Krizman-Genda E, Gonzales M, Zeleniaia O, Robinson M. Evidence that Akt mediates platelet-derived growth factor-dependent increases in activity and surface expression of the neuronal glutamate transporter, EAAC1. *Neuropharmacology* 2005; 49 (6): 872-882.
42. Sheldon A, Kazanietz M, Robinson M. A carboxyl-terminal determinant of the neuronal glutamate transporter, EAAC1, is required for platelet-derived growth factor-dependent trafficking. *Biological Chemistry* 2006; 281 (8): 4876-4886.

43. Gonzales M, Azanietz M and Robinson M. Regulation of the neuronal glutamate transporter excitatory amino acid carrier-1 (EAAC1) by different protein kinase C subtypes. *Molecular Pharmacology* 2002; 62 (4): 901-910.
44. Kalandadze A, Wu Y, Robinson M. Protein kinase C activation decreases cell surface expression of the GLT-1 subtype of glutamate transporter. Requirement of a carboxyl-terminal domain and partial dependence on serine 486. *Biological Chemistry* 2002; 277 (48): 45741-45750.
45. Huang Y, Feng X, Sando J and Zuo Z. Critical role of serine 465 in isoflurane-induce increase of cell-surface redistribution and activity of glutamate transporter type 3. *Biological Chemistry* 2006; 281 (50): 38133-38138.
46. Borre I and Kanner B. Arginine 445 controls the coupling between glutamate and cations in the neuronal transporter EAAC1. *Biological Chemistry* 2004; 279 (4): 2513-2519.
47. Murphy A, Vines A and McBean G. Stimulation of EAAC1 in C6 glioma cell by store-operated calcium influx. *Biochimica et Biophysica* 2009; 1778 (2):551-558.
48. Harris T and Lawrence J. TOR signaling. *Science STKE* 2003 (212): 1-17.
49. Wang X and Proud C. The mTOR pathway in the control of protein synthesis. *Physiology* 2006; 21 (5): 362-369.
50. Hanks S, Quinn A and Hunter T. The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of catalytic domains. *Science* 1998; 241(4861):42-45.
51. Ciang G and Abraham R. Phosphorylation of mammalian target of rapamycin (mTOR) at ser 2448 is mediated by p70S6 kinase. *Biological Chemistry* 2005; 280 (27): 25485-25490.
52. Asnaghi L, Bruno P, Priulla M and Nicolini A. mTOR: a protein kinase switching between life and death. *Pharmacological Research* 2004; 50 (6): 545-549.
53. Gonzales-Mejia M, Morales M, Hernandez-Kelly L, Zepeda R, Bernabe A and Ortega A. Glutamate-dependent translational regulation in cultured Bergmann glia cells: involvement of p70S6K. *Neuroscience* 2006; 141(3): 1389-1398.
54. Hay N and Sonenberg N. Upstream and downstream of mTOR. *Genes Rev Development* 2004; 18: 1926-1945.
55. Schmelzle T and Hall M. TOR, a central controller of cell growth. *Cell* 2000; 103: 253-262.

56. Gringas A, Raught B and Sonenberg N. mTOR signaling to translation. *Curr Top Microbiology and Immunology* 2004; 279: 169-197.
57. Proud C. Signalling to translation: how signal transduction pathways control the protein synthetic machinery. *Biochemistry* 2007; 403 (2):217-234.
58. Sarbassov D, Ali S, Kim D, Guertin D, Latek R, Erdjument-Bromage, *et al.* Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor independent pathway that regulates the cytoskeleton. *Neurochemistry International* 2004; 14: 1296-1302.
59. Sarbassov D, Ali S and Sabatini D. Growing roles for the mTOR pathway. *Cell Biology* 2005; 17: 596-603.
60. Sims K, Straffs D and Robinson M. Platelet-derived growth factor rapidly increases activity and cell surface expression of the EAAC1 subtype of glutamate transporter through activation of phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biological Chemistry* 2000; 274 (7): 5228-5327.
61. Zepeda R, Barrera I, Castelán F, Suárez-Pozos E, Melgarejo Y, Gonzales-Mejia E, *et al.* Glutamate-dependent phosphorylation of the mammalian target of rapamycin (mTOR) in Bergmann glia cells. *Neurochemistry* 2009; 55: 282-287.
62. Rüegg S, Baybis M, Juul M and Crinno P. Effects of rapamycin on gene expression, morphology, and electrophysiological properties of rat hippocampal neurons. *Epilepsy Research* 2007; 77: 85-92.
63. Chung-Han L, Inoki K and Guan L. mTOR pathway as a target in tissue hypertrophy. *Annu. Rev. Pharmacological Sciences*. 2007; 47: 443-467.