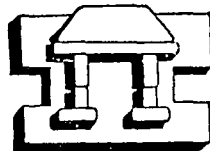


TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

///



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTONOMA DE MEXICO



IZTACALA

FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES IZTACALA

CARRERA DE BIOLOGIA

"REGULACION DE LA EXPRESION DEL GEN GLUR4  
EN CELULAS GLIALES DE BERGMANN"

TRABAJO DE:

**DESEMPEÑO ESCOLAR**

PARA OBTENER EL TITULO DE

**B I O L O G O**

P R E S E N T A

LILIANA MARURI AVIDAL

ASESORES: DR. ARTURO ORTEGA SOTO  
DRA. ESTHER LOPEZ BAYGHEN

REVISORES: DRA. MARTHA MARTINEZ GARCIA  
DR. JORGE E. CAMPOS CONTRERAS  
DR. SERGIO VACA PACHECO

TLALNEPANTLA, MEXICO

DICIEMBRE 2001



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

# PAGINACION DISCONTINUA

***Un agradecimiento infinito  
a mis padres por su cariño  
y apoyo incondicional.  
Gracias***

## AGRADECIMIENTOS

*Al Dr. Arturo Ortega Soto por la dirección de este trabajo, su orientación y apoyo.*

*A la Dra. Esther López Bayghen por haberme brindado su apoyo, asesoría y sugerencias.*

*A los M. en C. Adán Aguirre y M en C. Mónica Espinoza por sus enseñanzas, su ayuda y sugerencias en la realización del presente trabajo.*

*A Guadalupe Aguilar de Unidad de Análisis, Biosecuencias y Estructuras del Departamento de Genética y Biología Molecular por la secuenciación de nuestro fragmento.*

*A Ana María Estrada por su apoyo en la realización de los cultivos primarios.*

*A los miembros de los laboratorios 5 y 23 del Departamento de Genética y Biología Molecular por su amistad y apoyo incondicional.*

## ABREVIATURAS

ácido $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxasolpropiónico	AMPA
Amino ácidos	aa
Células Gliales de Bergmann	CGB
Constante de disociación	$K_o$
Dominios transmembranales	TMDs
Factor de crecimiento básico del fibroblasto	bFGF
Factor de crecimiento neural	NGF
Glutamato	Glu
Kainato	KA
Medio de cultivo Dulbecco modificado	D-MEM
N-metil-D-aspartato	NMDA
Potenciación a largo plazo	LPT
Proteína activadora 1	AP1
Proteína cinasa A	PKA
Proteína cinasa activada por mitógeno	MAPK
Proteína cinasa dependiente de $Ca^{2+}$	PKC
Proteína cinasa dependiente de $Ca^{2+}$ /calmodulina II	CaMKII
Proteína fibrilar ácida de la glia	GFAP
Reacción en cadena de la polimerasa	PCR
Receptores Ionotrópicos	iGuR
Receptores Metabotrópicos	mGluR
Retro Transcripción	RT
Sistema Nervioso Central	SNC
Sistema Nervioso Periférico	SNP
Solución amortiguadora de fosfatos	PBS
Suero fetal bovino	FBS
Temperatura de alineamiento	Tm
Trifosfato de Inositol	IP <sub>3</sub>
Virus de la leucemia de Moloney	MLLV

# INDICE

Agradecimientos.....	I
Abreviaturas.....	II
Indice.....	III
I. RESUMEN.....	1
II. INTRODUCCIÓN.....	2
1. Ácido Glutámico.....	2
2. Receptores Ionotrópicos.....	4
3. GluR4.....	6
4. Células Gliales.....	10
5. Regulación de la expresión genética mediada por receptores al Glutamato.....	13
6. RT-PCR.....	14
III. ANTECEDENTES.....	16
IV. OBJETIVO.....	19
V. MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
1. Cultivo Celular.....	21
2. Estímulo Celular.....	21
3. Extracción de RNA.....	21
4. Diseño de iniciadores.....	22
5. Estandarización de RT-PCR.....	22
6. RT-PCR.....	22
7. Clonación del Fragmento de PCR de 720 pb.....	23
8. Análisis de Resultados.....	25
VI. RESULTADOS.....	26
VII. DISCUSIÓN.....	41
VIII. CONCLUSIONES.....	46
IX. BIBLIOGRAFIA.....	47

## RESUMEN

El glutamato es el neurotransmisor excitador más abundante en el Sistema Nervioso Central de los vertebrados. La expresión de receptores a neurotransmisores en células gliales, ha sugerido un papel regulador de estos en la sinapsis. En la glia radial, los receptores de glutamato activan cascadas de señalización desde la membrana hasta el núcleo y consecuentemente cambios en la expresión genética.

Con la finalidad de conocer la regulación de los niveles de RNA del gen GluR4, nosotros nos propusimos ver si la activación de los receptores AMPA/KA en células gliales de Bergmann mediados por glutamato, promueven cambios en la expresión del mRNA de la subunidad GluR4 del receptor.

Para cuantificar la expresión del mRNA, empleamos la técnica de RT-PCR semicuantitativo, se diseñaron iniciadores y se estandarizaron las condiciones para la amplificación de un fragmento de 720 pares de bases, con el que se evaluaron los mRNAs de las células estimuladas a diferentes tiempos con glutamato 1mM.

Nuestros resultados confirman que los receptores a glutamato en células Gliales de Bergmann modulan la expresión del gen, ya que conforme pasó el tiempo de estimulación se observó una disminución de la expresión del gen GluR4, con esto reforzamos el papel de que las células gliales participan en los cambios adaptativos en el sistema nervioso central.



# INTRODUCCIÓN

## 1. ACIDO GLUTÁMICO

El aminoácido L-glutamato o ácido glutámico (Glu) es el principal neurotransmisor excitador en el Sistema Nervioso Central (SNC) de los vertebrados (Watkins y Evans, 1981; Tanaka, 1994; Inoue et al., 1995). Se almacena en vesículas en la neurona presináptica y cuando se recibe un estímulo, es liberado a la hendidura sináptica activando a diferentes clases de receptores tanto metabotrópicos como ionotrópicos que están situados en las membranas pre y postsinápticas y sobre la astroglia, transduciendo señales integradas mediante el uso de un flujo incrementado de iones y las vías de segundos mensajeros (Gegelashvili y Schousboe, 1997; Bacci et al., 1999). La transmisión glutamatérgica es terminada por una desensibilización de los receptores y por la captura del glutamato, esta función la llevan a cabo proteínas transportadores transmembranales de alta afinidad que se localizan en células gliales y neuronas, estas proteínas usan un gradiente  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  como fuerza electroquímica y son capaces de remover al neurotransmisor contra un gradiente de concentración 100 veces mayor y de esta manera mantener una concentración baja del Glu en la hendidura sináptica ( $<1 \mu\text{M}$ ) que es inocua a las neuronas (Schousboe, 1981; Fonnum, 1984; Nicholls y Attwell, 1990; Rothstein et al., 1994). En células gliales el glutamato es convertido a glutamina por la enzima glutamina sintetasa. La glutamina es un aminoácido no excitador y es liberada al espacio extracelular y capturada por las neuronas en donde es convertida nuevamente a Glu (Pines et al., 1992; Rothstein et al., 1993; Tanaka, 1993; Tanaka, 1994; Gegelashvili y Schousboe, 1997).

El Glu está relacionado con diferentes procesos neurológicos como la plasticidad sináptica, la neurotransmisión, la memoria y el aprendizaje. La plasticidad es la capacidad de responder diferencialmente a un mismo estímulo (Bliss y Collingridge, 1993; Tanaka, 1994). Sin embargo, una concentración elevada de Glu en el medio, puede actuar como una poderosa neurotoxina capaz de inducir daño excitotóxico severo, mecanismo implicado en varias enfermedades neurodegenerativas como esclerosis lateral amiotrópica, enfermedad de Huntington, enfermedad de Alzheimer

y la ocasionada por el Virus de la Inmunodeficiencia Humana. También puede provocar procesos neuropatológicos como isquemia cerebral, epilepsia, hipoxia e hipoglucemia (Gegelashvili y Schousboe, 1997; Rothstein et al., 1993; Condorelli et al., 1993; Gasic y Hollmann, 1992; Ortega et al., 1991; Cunningham et al., 1993). La exposición crónica al Glu puede causar cambios en la morfología de las células gliales que no esta seguido por muerte celular (Gallo y Ghiani, 2000). Por otro lado la remoción excesiva del Glu, puede producir hipofunción glutamatergica, que se cree que es uno de los mecanismos involucrados en esquizofrenia y otras psicosis (Gegelashvili y Schousboe, 1997).

La acción del Glu es mediada por receptores específicos los cuales se clasifican de acuerdo a su modo de acción en receptores metabotrópicos (mGluR) que se encuentran acoplados a proteínas G y cascadas de segundos mensajeros; y los receptores ionotrópicos (GluR) que forman un canal iónico abierto por ligando (Nakanishi, 1992).

A nivel molecular se han caracterizado una gran cantidad de receptores al Glu (Hollmann y Hinemann, 1994), estos se expresan tanto en neuronas como en células gliales (Steinhäuser y Gallo, 1996) e incluso existen reportes de expresión de algunas subunidades en las células  $\beta$  de páncreas (Inagaki et al., 1995). Los receptores al Glu se encuentran presentes a todo lo largo de la escala evolutiva de los metazoarios. La mayoría de las secuencias conocidas de estos receptores se han clonado en vertebrados, sobre todo en mamíferos, pero se conocen también secuencias de insectos, moluscos y nemátodos (Steinhäuser y Gallo, 1996; Maricq et al., 1995). Los receptores al Glu constituyen familias genéticas independientes tanto de los canales iónicos abiertos por ligando como de los receptores de siete segmentos transmembranales acoplados a proteínas G (Hollmann y Hinemann, 1994). En los invertebrados, además de los canales catiónicos que forman esta familia de receptores existen una serie de receptores al Glu que forman canales aniónicos. Los receptores de este tipo no están relacionados con los receptores al Glu anteriormente descritos, y de hecho presentan una mayor homología con los receptores a glicina (Cully et al., 1994).

El glutamato de las neuronas puede activar a los receptores glutamatérgicos de la glia para causar: (1) la modulación de la transmisión que se lleva a cabo en las células gliales, además de afectar la terminación de la transmisión sináptica, (2) modulación de la conductividad de  $K^+$  en las células gliales, con consecuencias sobre el ambiente iónico extracelular, y (3) la relación de las sustancias neuroactivas de la glia puede ser retroalimentada y modular la transmisión sináptica (Araque et al., 1999).

## 2. RECEPTORES IONOTRÓPICOS

Los receptores ionotrópicos de glutamato se han dividido en subfamilias de acuerdo con sus propiedades electrofisiológicas, farmacológicas y a la homología entre sus secuencias. La primera gran división se realiza por un criterio farmacológico, la capacidad de los receptores de ser activados por el análogo N-metil-D-aspartato (NMDA). El criterio farmacológico concuerda perfectamente con el criterio molecular, sin embargo la variedad molecular de los receptores sobrepasa ampliamente su variedad farmacológica. Molecularmente existen tres subfamilias de receptores NMDA y tres de receptores no NMDA (Hollmann y Hinemann, 1994).

Los receptores NMDA son canales iónicos abiertos por ligando y regulados por voltaje. En condiciones de reposo el canal está bloqueado por  $Mg^{2+}$  de una manera dependiente del voltaje. Además el canal requiere de glicina para abrirse eficientemente y puede regularse por poliaminas y  $Zn^{2+}$  (Nicoll et al., 1990). Los receptores NMDA están formados por varias subunidades, la principal de ellas es denominada NMDAR1 (Moriyoshi et al., 1991). Esta subunidad está codificada por un solo gen pero se expresan al menos siete variantes de procesamiento (Zukin y Bennet, 1995), la presencia de NMDAR1 confiere la funcionalidad al canal. Esta subunidad puede coensamblarse con cualquiera de las cuatro subunidades de la familia NMDAR2: NMDAR2A, NMDAR2B, NMDAR2C o NMDAR2D (Ishii et al., 1993). Si bien los miembros de la familia NMDAR2 no forman canales funcionales por sí solos, al coensamblarse con NMDAR1 confieren propiedades novedosas al canal; determinando algunos parámetros como regulación por la proteína cinasa

dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ /diacilglicerol (PKC), farmacología y propiedades biofísicas (Kutsuwada et al., 1992; Stern et al., 1992). Existe otra subfamilia formada por la subunidad NMDARL o chi, esta subunidad no forma canales, pero al coexpresarse produce canales no funcionales (Ciabarra et al., 1995).

Los receptores no NMDA están formados por dos subgrupos, los receptores activados por el ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxasolpropiónico y el kainato (AMPA/KA) y los receptores al kainato (KA) (Hollmann y Hinemann, 1994). Los receptores AMPA/KA se denominan así porque son activados por AMPA con alta afinidad y por KA con baja afinidad. Inicialmente se les consideró como parte de los receptores a KA porque las respuestas a AMPA se desensibilizan muy rápidamente, siendo los de respuesta a KA los de mayor eficiencia. La familia AMPA/KA está formada por cuatro subunidades denominadas GluR1, GluR2, GluR3 y GluR4 (Hollmann et al., 1989; Keinänen et al., 1990). Estas subunidades pueden ensamblarse entre sí produciendo canales con diferentes propiedades, aumentando enormemente la variedad molecular de los receptores (Keinanen et al., 1990). Las propiedades fisiológicas de los receptores de glutamato en glia se pueden predecir basándose en la composición de las subunidades (Patneau et al., 1994; Müller et al., 1992; Jonas et al., 1994). Además cada gen de esta familia puede presentarse en cualquiera de dos variantes de procesamiento denominadas flip o flop, que difieren en 38 aa de la región que precede a la última región transmembranal, y son diferencialmente expresadas en el cerebro (Keinänen et al., 1990; Monyer et al., 1991). La subunidad GluR4 presenta otra forma de procesamiento del carboxilo terminal denominada GluR4c (Sommer et al., 1990; Gallo et al., 1992). La subunidad GluR2 sufre un fenómeno de edición (sitio Q/R), que consiste en una deaminación en el RNA que cambia un codón dentro del segmento transmembranal TMII de glutamina a arginina (Sommer et al., 1991), este cambio determina importantemente las propiedades biofísicas del canal. Cuando está ausente GluR2, los canales son permeables a  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$ , y las curvas corriente - voltaje son doble rectificantes. Pero cuando se encuentra GluR2 en el canal, éste pierde la permeabilidad a  $\text{Ca}^{2+}$  y las curvas corriente - voltaje son lineales (Hollmann et al., 1991). GluR1 y GluR4 son los componentes encontrados mayormente en el cerebelo (Tsuzuki et al., 2001).

La falta de homología entre las secuencias de los receptores de glutamato y los miembros de otros canales iónicos abiertos por ligando (Noda et al., 1983) y también la gran diferencia en tamaño, sugiere una gran distancia o no relación evolutiva (Keinänen et al., 1990).

Los receptores KA están formados por dos subfamilias, los receptores KA de alta y baja afinidad. En los receptores de baja afinidad están incluidas las subunidades GluR5, GluR6 y GluR7. Estas subunidades presentan además varias variantes de procesamiento, en especial GluR5, y tanto GluR5 como GluR6 sufren la edición del sitio Q/R aunque a diferencia de la subunidad GluR2 no siempre se editan. Forman canales abiertos por KA pero no por AMPA, por ensayos de unión de ligando radioactivo se ha medido la  $K_D$  para KA en estos receptores (alrededor de 50 nM). Los receptores de alta afinidad están formados por las subunidades KA-1 y KA-2, estas no forman canales funcionales pero pueden coensamblarse con GluR5 o GluR6 y de esta manera modifican las propiedades del canal. No se han reportado variantes de procesamiento para estas subunidades ni tampoco edición en el sitio Q/R. La  $K_D$  de estos receptores es de alrededor de 5 nM (Hollmann y Hinemann, 1994)

### 3. GLUR4

Cada una de las subunidades GluR1-GluR4 pueden formar complejos heteroméricos con todas las otras subunidades de la subfamilia (Wenthold et al., 1992) y estas combinaciones de las subunidades pueden ensamblarse eficientemente o diferir en las propiedades de los canales con los canales de los complejos homoméricos (Boulter et al., 1990; Keinänen et al., 1990). La función del receptor es mediada por cambios conformacionales inducidos (Jayaraman et al., 2000).

Las cuatro subunidades de los receptores GluR1-GluR4 son de tamaño similar (aproximadamente 900 aa), su secuencia es idéntica de 68% a 73%. El perfil de la topología para los receptores de glutamato consiste de un dominio hidrofóbico en el amino terminal extracelular que representa el péptido señal requerido para la inserción en la membrana, más cuatro dominios hidrofóbicos en la hendidura (tres

regiones hidrofóbicas cerca de la mitad de la proteína y una cerca de la porción del carboxilo terminal de la proteína), que son interpretados como dominios transmembranales (TMDs) y un dominio carboxilo terminal intracelular (Hollmann et al., 1994; Bennett and Dingledine, 1995; Wo y Oswald, 1995). El glutamato y kainato (Figura 1) se unen al dominio extracelular en las subunidades GluR (Stern-Bach et al., 1994; Kuusinen et al., 1995). La unión a los dominios de este ligando ha sido expresada como una fusión proteica soluble por dos subunidades de los receptores AMPA, GluR2 y GluR4 (Kuusinen et al., 1995; Lampinen et al., 1998; Chen y Gouaux, 1997).

En GluR4, todos los sitios consenso de N-glicosilación están localizados en el dominio amino terminal, por lo que se ha propuesto que este dominio es extracelular. Esta topología de largos segmentos entre los dominios TMD III y TMD IV sobre el lado citoplásmico, coincide con la presencia de varios sitios consenso de fosforilación en este dominio. El dominio del carboxilo terminal y hacia abajo de TMD IV es extracelular de acuerdo con este modelo. (Hollmann y Heinemann, 1994) (Figura 2)

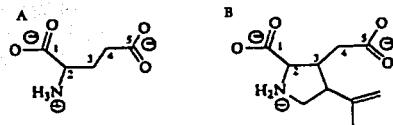


Fig. 1. Estructuras químicas de (A) glutamato y (B) Kainato.

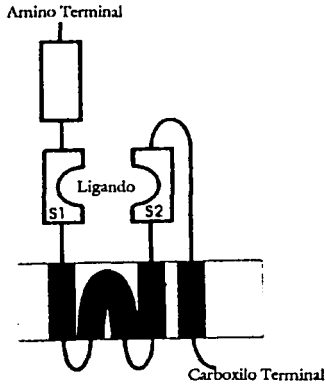


Fig. 2. Representación esquemática de la topología de la subunidad GluR4.

La expresión de los genes GluR1-GluR4 durante el desarrollo inicia en el décimo día embrionario en el SNC y en el SNP de rata, siendo más pronunciado en áreas donde las neuronas se diferencian y se ensamblan dentro de núcleos (Bettler et al., 1990). Postnatalmente, la expresión del RNA de GluR1-GluR4 en general se incrementa gradualmente (Pellegrini-Giampietro et al., 1992).

Los genes para GluR1-GluR4 están localizados sobre cuatro cromosomas diferentes. El GluR4 está localizado en la región del cromosoma 11(q22-23), en un área en la que se encuentra la ataxia telangiectasia, un tipo de esquizofrenia y la esclerosis tuberosa que ha sido mapeada (McNamara et al., 1992).

Estudios de hibridación *in situ* han revelado un esparcimiento con distribución diferencial del RNA de GluR1-GluR4, también su regulación es independiente durante el desarrollo. Existen notables diferencias en la expresión de las subunidades en las células granulares cerebelares, las cuales contienen RNA de GluR2 y GluR4 pero no RNA de GluR3 y de GluR1, la glia cerebelar de Bergmann

contiene GluR1 y GluR4 pero no RNA de GluR2 y GluR3, y el tallo cerebral aparentemente contiene solamente RNA de GluR4 (Hollmann y Heinemann, 1994).

Los receptores AMPA en diferentes circuitos neuronales, así como en diferentes tipos celulares con el mismo circuito, difieren en sus propiedades funcionales (Geiger et al., 1995). Además cada una de las subunidades de GluR1-GluR4 existen en dos formas diferentes creadas por corte y empalme alternativo de un par de bases en 115, región inmediatamente anterior de TMD IV (Sommer et al., 1990). Los dos exones alternativos han sido llamados "flip" y "flop" (aunque flip no es el reverso de flop, como el nombre desafortunadamente lo sugiere). Las dos formas son igualmente abundantes, pero muestran diferentes distribuciones en el cerebro, particularmente en las células piramidales CA3 (solo flip) y en las células granulares del giro dental del hipocampo (mas flop que flip) (Sommer et al., 1990). Su expresión en células cerebelares de Purkinje es regulada diferencialmente (Lambolez et al., 1992), así como su expresión en el desarrollo (Monyer et al., 1991). Las dos variantes de corte y empalme les confieren diferentes propiedades cinéticas a los canales abiertos por glutamato (Sommer et al., 1990), indicando que las propiedades funcionales de los canales del receptor en la célula son definidos por la combinación del tipo de las subunidades y las variantes de corte y empalme.

La diversidad de los receptores se debe también al corte y empalme en el carboxilo terminal, el cual ha sido reportado para GluR4. El cDNA clonado llamado GluR4c, tiene un exon insertado de su par de bases 113 hacia abajo de TMD IV que introduce un codón de paro alternativo y crea una versión corta de GluR4 (Gallo et al., 1992). Esta variante de corte y empalme ha sido identificada con alta homología de aa (72%) con GluR1-GluR3 en el carboxilo terminal, más que con el original GluR4. La variante del carboxilo terminal del GluR4c, la cual puede estar con cada versión de flip y flop del receptor, no parece cambiar las propiedades funcionales del receptor. Sin embargo, las variantes de corte y empalme muestran una distribución en el cerebro que se sobrelapa, pero que es diferente de GluR4 y son reguladas durante el desarrollo en las células granulares cerebelares, donde aparecen para la maduración paralela de estas células (Gallo et al., 1992) por lo que han especulado



que la variante carboxilo terminal podría servir para estabilizar el receptor o localizarlo en una región específica de la célula.

El GluR4 puede generar varias isoformas de corte y empalme y tres transcritos principales (6.2, 4.2 y 3 kb) que son expresados en neuronas cerebrales o corticales (Gallo et al., 1992). El gen GluR4 es procesado de manera diferencial en glia y neuronas (Gallo et al., 1995). Por ejemplo el transcrito de GluR-4 en células gliales de Bergmann, está completamente ineditado en el sitio Q/R (Lomeli et al., 1994).

La subunidad GluR4 promueve el ensamblaje de la unión rápida de los receptores (Geiger et al., 1995), y se ha encontrado que GluR4 es fosforilado sobre serina 842 en el dominio del carboxilo terminal *in vitro* e *in vivo*. Las serina 842 es fosforilada por PKA, PKC y CaMKII *in vitro* y es fosforilada en células transfectadas por PKA. Además se ha identificado a treonina 830 como sitio potencial de fosforilación de PKC. Estos resultados sugieren que GluR4, la cual es la subunidad más rápida de desensibilización de los receptores AMPA, podría ser modulada por fosforilación (Carvalho et al., 1999). GluR4 es fosforilado directamente por lo que la fosforilación de éste puede ser un mecanismo importante en la regulación de sus propiedades funcionales y en la modulación de la transmisión sináptica excitatoria (Carvalho et al., 1999).

#### 4. CELULAS GLIALES

Las neuronas están rodeadas por un tipo celular denominado células gliales, existiendo entre 10 a 50 veces más células de glía que neuronas en el sistema nervioso de vertebrados, en este sistema existen dos grandes grupos de células gliales, las células macrogliales y la microglia. El origen ontogénico de estos dos grupos es diferente, la microglia se desarrolla a partir de mesodermo, mientras que la macroglia es de origen ectodérmico, teniendo un precursor común con las neuronas (Cameron y Rakic., 1991). Existen dos grandes grupos de células macrogliales en el SNC, los oligodendrocitos y los astrocitos. Los oligodendrocitos son células especializadas en la formación de la capa de mielina que rodea los axones de algunas neuronas. Los astrocitos son células que están involucradas en la formación

de la barrera hematoencefálica, la sobrevivencia y la diferenciación neuronal, la regulación de la concentración iónica y el volumen extracelular, la regeneración y la migración neuronal (Martín, 1992; Pfrieder y Barres, 1996).

Durante el desarrollo, una de las primeras formas de células gliales en aparecer es la denominada glía radial, que participa en la determinación de los patrones de migración de las neuronas así como la distribución espacial de éstas. La glía radial es de morfología bipolar y expresa marcadores característicos. Desde los primeros días postnatales la glía radial inicia un proceso denominado conversión astrocítica, pierde su morfología bipolar y adopta la morfología clásica de los astrocitos; además reduce la expresión de marcadores de glía radial como la vimentina y aumenta la expresión de marcadores astrocíticos como la proteína fibrilar ácida de la glía (GFAP). Esta conversión es reversible y está regulada por factores producidos por las neuronas (Cameron y Rakic, 1991).

En la corteza cerebelar de las aves, concretamente en la capa molecular, la población de la glía radial no sufre la conversión astrocítica posterior al nacimiento, se conserva en el adulto y se le denomina glía de Bergmann (Cameron y Rakic, 1991). Las células gliales de Bergmann rodean las sinapsis glutamatérgicas que se forman entre las fibras paralelas y las células de Purkinje, siendo esta la sinapsis más abundante en el SNC. En este tipo celular, se ha descrito por medio de técnicas moleculares y bioquímicas la presencia de receptores al Glu (Ortega et al., 1991; López-Colomé y Romo-de-Vivar, 1991; López et al., 1994; López et al., 1997). Estos receptores son funcionales y se expresan tanto en células en cultivo como *in vivo* (López et al., 1994; López et al., 1997; Burnashev et al., 1992; Muller et al., 1992). Estas células tienen la capacidad de responder a la activación neuronal. Por ejemplo, la activación de la fibra paralela produce en las células gliales de Bergmann una despolarización mediada por receptores AMPA/KA y el transportador  $\text{Na}^+/\text{Glu}$  (Beverly y Barbour, 1997).

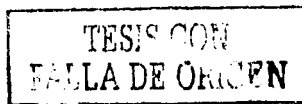
La estimulación de las fibras paralelas causa un incremento en  $\text{Ca}^{2+}$  localizado en pequeños microdominios de glía de Bergmann (Grosche et al., 1999). Los microdominios pueden controlar la entrada de glutamato a las células gliales de

Bergmann por un cambio en el potencial de membrana. Esto provee un mecanismo de influencia en la transmisión sináptica entre las neuronas granulares y las células de Purkinje en sinapsis específicas. Los microdominios pueden regular la relación de sustancias neuroactivas de las células gliales de Bergmann sobre las neuronas. (Gallo y Ghiani, 2000)

En cultivos de estas células derivados de embrión de pollo, el Glu dispara señales de transducción (Cid y Ortega, 1993; López-Colomé et al., 1993; Sánchez y Ortega, 1994; López-Colomé, 1995; López-Colomé y Ortega, 1997; López-Colomé et al., 1997). La ventaja de utilizar cultivos para estudiar los receptores del Glu presentes en éstas células radica, por un lado, en la posibilidad de estudiar las células aisladas de las neuronas, y por otro la posibilidad de tener un cultivo de tipo celular del cual se conoce la localización precisa en el sistema nervioso (López, 1997) y en que la semejanza de las secuencias de los receptores del glutamato entre aves y mamíferos es de alrededor del 90%. (Ottinger et al., 1995; Paperna et al., 1996), lo cual a nivel de nucleótido se convierte en un 85% (Ottinger et al., 1995).

Las células gliales de Bergmann expresan receptores ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxasolpropiónico/kainato (AMPA/KA) y N-metil- D-aspartato (NMDA) y en sus cultivos el Glu induce el influjo de  $Ca^{2+}$  (Ortega et al., 1991; López-Colomé y Romo-de-Vivar, 1991), translocación de la PKC a la membrana (Cid y Ortega, 1993; López-Colomé et al., 1993), aumento en los niveles de trifosfato de Inositol ( $IP_3$ ) (López-Colomé et al., 1993; López-Colomé et al., 1997), activación de la proteína cinasa activada por mitógeno (MAPK) (López-Colomé y Ortega, 1997) y aumento en la actividad de unión al DNA de la proteína activadora I (AP1), lo que sugiere que el glutamato está involucrado en la regulación de la expresión génica en éstas células (López-Colomé et al., 1995; Sánchez y Ortega, 1994). Un sitio atractivo para esta regulación son las propias regiones reguladoras de los genes que codifican para los receptores de glutamato, ya que está bien establecido que el nivel de estos receptores es crítico para la señalización (Geiger et al., 1995).

Puesto que estas células rodean sinapsis glutamatérgicas y tienen receptores para este aminoácido es evidente que durante el proceso de neurotransmisión, son



activados los receptores en las células gliales desencadenando la serie de fenómenos ya descritos. El efecto funcional de esta activación, así como la importancia que pueda tener en la modificación de las sinapsis que rodean, no ha sido evaluado. Se ha propuesto que estas células estarían implicadas en la regulación de la función neuronal liberando sustancias neuroactivas, controlando los niveles extracelulares de  $K^+$  y modificando el curso temporal de la concentración del Glu en la sinapsis (Kettenmann, 1996; Danny et al., 1996).

## **5. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GENÉTICA MEDIADA POR RECEPTORES AL GLUTAMATO**

La expresión de los receptores al Glu es modificada en múltiples modelos de aprendizaje (Kaczmarek, 1993), plasticidad sináptica (Thomas et al., 1994) e isquemia (Eastwood et al., 1995), así como durante el envejecimiento (Pacliusi et al., 1994) y en algunas alteraciones neurológicas como la epilepsia (Eastwood et al., 1995), la esquizofrenia (Pollard et al., 1993) y la enfermedad de Alzheimer (García-Ladona et al., 1994). Durante el desarrollo la expresión de los receptores se ve modificada; por ejemplo, las variantes flip y flop de los receptores AMPA/KA son expresadas diferencialmente durante el desarrollo. En cultivos celulares existe regulación de la expresión de algunas subunidades dependiendo del tiempo en cultivo, la aplicación del Glu o sus análogos o la despolarización con  $K^+$  (López, 1997).

En las células gliales el Glu induce cambios en el patrón de expresión de genes, estas respuestas abren la posibilidad de cambios en las condiciones de las células gliales como una consecuencia de la actividad sináptica, que podría eventualmente inducir cambios duraderos en las funciones: glia-célula, desarrollo, comunicación glia-neurona o interacciones glia-glia a través de la modulación de la expresión génica. Por ejemplo, en cultivos primarios de astrocitos la activación de receptores al Glu induce múltiples factores de transcripción como son: c-Fos, Fos B, c-Jun, Jun B, zif/268 y est-1 (Lerea, 1996; Pechan et al., 1993), así como algunos factores de crecimiento; que es el caso del factor de crecimiento neural (NGF) y el factor de

crecimiento básico del fibroblasto (bFGF); y de receptores como el FGF-R1 (Condorelli et al., 1993; Pechan et al., 1993; Pérez -Otano et al., 1996); inhibe la expresión de MHC clase II, c/EBP  $\delta$ , tiene un efecto regulador de citocinas proinflamatorias sobre la sintasa de óxido nítrico de expresión tipo II (Condorelli et al., 1993; Lee et al., 1992; Lin y Murphy, 1997; Yano et al., 1996); y reprime la expresión como en el caso del receptor mGluR5 (Balazs et al., 1997). Durante algunos procesos de isquemia en la retina y el cerebro anterior existe regulación de la expresión de algunos genes como son las subunidades GluR5, GluR6, GluR7 y NMDAR2, el transportador GLAST o el factor de transcripción NF- $\kappa$ B (Gottlieb y Matute, 1997; Otori et al., 1994; Yano et al., 1996).

Se ha sugerido que los mecanismos de protección contra la neurotoxicidad del Glu involucran, al menos en parte, cambios en el patrón de expresión de algunas subunidades de los receptores (Eastwood et al., 1995). El estudio a nivel molecular de los mecanismos que regulan la expresión de estos receptores será importante para entender los mecanismos involucrados en la plasticidad sináptica y la neurotoxicidad inducida por el Glu. En vista de que el glutamato induce cambios en la actividad transcripcional, decidimos explorar la posible regulación del gen de la subunidad GluR4 del receptor ionotrópico a glutamato.

## 6. RT-PCR SEMICUANTITATIVO

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica para la amplificación *in vitro* de secuencias específicas de DNA por una extensión simultánea de iniciadores de cadenas complementarias al DNA (McPherson et al., 1991).

La PCR ha sido establecida rápidamente como una de las técnicas más usadas en biología molecular y con buena razón; ya que es rápida, poco costosa, puede producir cantidades de microgramos de DNA a partir de diminutas cantidades de material y es relativamente tolerante a la pobre calidad del templado. Muchas variaciones sobre el procedimiento básico han sido descritas y aplicadas a muchas

disciplinas, por lo que se convierte en una estrategia importante para cuantificar la expresión del mensajero.

La utilización de la tecnología conocida como RT-PCR semicuantitativo, es claramente necesaria en el intento de cuantificar una cantidad particular de mRNA en una muestra inicial, y puede ser muy útil para observar una fuerte inducción o una baja abundancia de mRNA en situaciones donde el Northern blot es insuficientemente sensible o dónde las cantidades de material son limitadas (McPherson et al., 1991), por ello es pieza fundamental en la realización de este trabajo.

## ANTECEDENTES

Este estudio se llevó a cabo utilizando como modelo células gliales de Bergmann (CGB) de cerebelo de embriones de pollo de 14 días, ya que las subunidades de los receptores son expresadas muy tempranamente en el desarrollo embrionario (McDonald y Johnston, 1990; Bettler et al., 1990; Bahn et al., 1994). En SNC de los mamíferos los transmisores dan respuestas fisiológicas no solo en neuronas sino también en glía (Murphy y Pearce, 1987; Barres, 1991; Gallo et al., 1994) y es a través de estos que afectan la proliferación y diferenciación de las células durante la neurogénesis (Lauder, 1993).

El analizar el papel que juega el glutamato en los receptores es importante, ya que son conocidos por estar involucrados en migración neuronal (Komuro y Rakic, 1993) y maduración (Mattson et al., 1988), lo que sugiere que los receptores de glutamato pueden estar involucrados en la transducción de señales durante el desarrollo (Gallo et al., 1995). Además de que existe amplia evidencia que indica que los receptores de glutamato juegan un rol importante en un gran número de enfermedades cerebrales y el daño que ocurre después de estas, se ha sabido por décadas que el glutamato es tóxico para las neuronas en cultivo e *in vivo*, por ello muchos experimentos implican a los receptores de glutamato como mediadores de estos efectos tóxicos (Appel, 1993; Hollmann y Heinemann, 1994).

El glutamato y los receptores glutamatérgicos le confieren a la glia radial la habilidad para emitir y recibir señales, sugiriendo esto un rol para estas células en el procesamiento de información en el SCN (Hansson y Rönnbäck, 1995). Para tener un mejor entendimiento del papel de estos en este proceso, es indispensable primero establecer el papel de expresión de los receptores a glutamato (López et al., 1997).

Además, los receptores de glutamato se han convertido en el objetivo de muchos trabajos porque hay varios hallazgos experimentales que sugieren un rol central para los receptores de glutamato en memoria y aprendizaje (Collingridge y Bliss, 1987; Ben-Ari et al., 1992; Hollmann y Heinemann, 1994).

La localización de las subunidades GluR1-GluR4 en células gliales está restringida aparentemente a la glia de Bergmann en el cerebelo (Hampson et al., 1992, Petralia y Wenthold, 1992) y sirven como un modelo excelente para determinar la composición molecular de los receptores de glutamato en tipos específicos de células y el estudio de su expresión durante el desarrollo (Gallo et al., 1992).

Los factores extrínsecos, como en este caso lo es el Glu, podrían jugar un rol clave en la manera en que están compuestas las subunidades de los receptores de glutamato en la glia en los primeros estadios de desarrollo (Gallo y Ghiani, 2000). La composición molecular de los receptores gliales AMPA puede cambiar durante el desarrollo, en términos de la expresión relativa de las diferentes subunidades, las isoformas de corte y empalme, y las formas editadas contra las no editadas (Gallo y Ghiani, 2000), la combinación precisa de estos da diferentes propiedades al receptor (Hollmann et al., 1991).

Los genes de las diferentes subunidades de receptores de glutamato son miembros de una familia y son derivados de un ancestro común (Hollmann y Heinemann, 1994) los genes que codifican para cada una de las subunidades están localizados en diferentes cromosomas en roedores y humanos. Los diferentes genes GluR pertenecen a distintas unidades de transcripción, conformación de la cromatina y estados de metilación que podrían ser regulados independientemente. La expresión observada de algunos mRNAs de las subunidades podría resultar de la presencia de elementos idénticos que respondan en regiones reguladoras de los genes. Esto hace posible que algunos de los genes GluR sean activados en respuesta a la misma combinación transcripcional y factores de desarrollo (Gallo et al., 1995).

Previamente las cuatro subunidades AMPA, designadas como receptores de glutamato GluR1, GluR2, GluR3 y GluR4 han sido caracterizadas por clonación molecular (Hollman y Heinemann, 1994). Y la secuencia para la subunidad GluR4 del receptor ionotrópico de glutamato ha sido reportada (Paperna et al., 1996). Además se han hecho estudios para ver el efecto del glutamato en la activación y expresión de las subunidades GluR1 y GluR4 de los receptores AMPA/KA en cultivos de células gliales de Bergmann de pollo. En ellos se ha establecido que el glutamato



altera la expresión del polipéptido y del mensajero de GluR4 en células gliales de Bergmann (López, 1997).

La técnica de RT-PCR ha sido utilizada antes para correlacionar la presencia de mRNA de cada subunidad con propiedades funcionales de los receptores AMPA originales en el nivel celular, y detectar así los mRNAs expresados en varios tipos de neuronas y células gliales (Lamboloz et al., 1992).

Por todo lo anterior sabemos que el análisis de la regulación y la expresión de genes inducidos por glutamato en células gliales puede proveer información importante para la función neuronal (López et al., 1997).

## **OBJETIVO**

Estudiar la regulación de los niveles del mRNA del gen de GluR4 en células gliales de Bergmann de cerebelo de pollo.

### **Objetivos Particulares**

- Establecer una metodología para la determinación semicuantitativa del mensajero de GluR4
- Establecer el efecto del glutamato en los niveles del mRNA de GluR4

## MATERIALES Y MÉTODOS

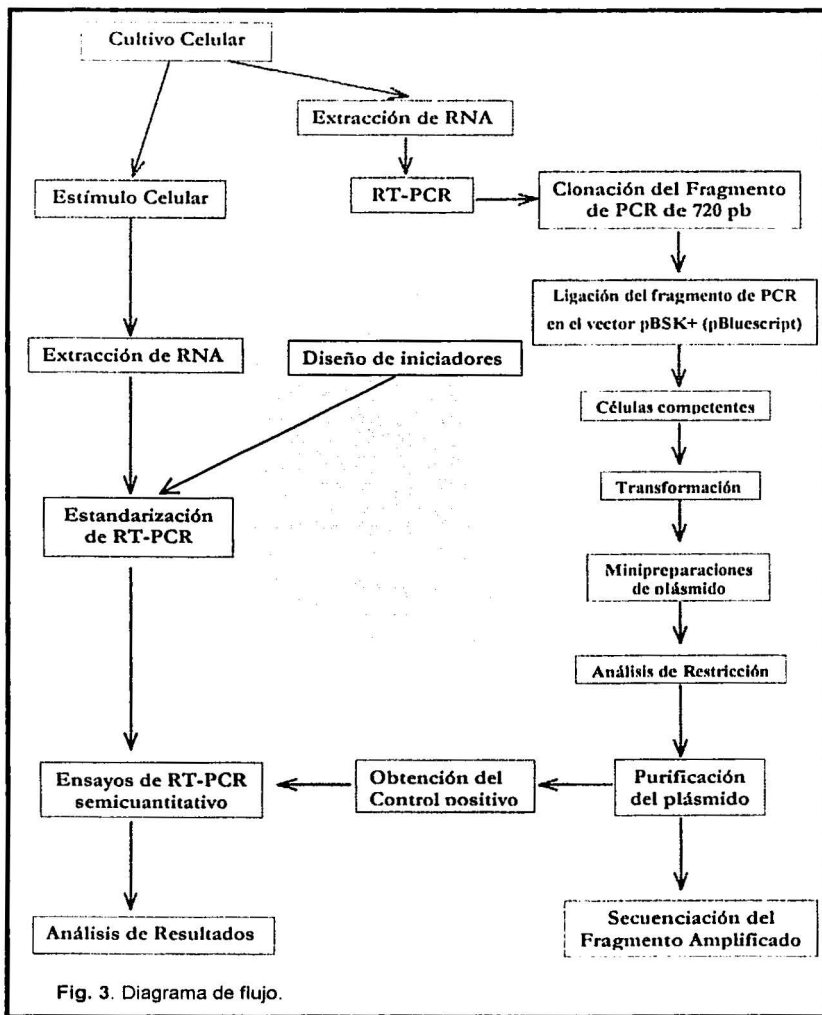


Fig. 3. Diagrama de flujo.

## ***Cultivo Celular***

Los cultivos de células gliales de Bergmann (CGB) se realizaron de acuerdo al método descrito por Ortega et al., (1991). Las células se extrajeron de cerebelos de embrión de pollo de catorce días de incubación, se disectaron los cerebelos y se colocaron en medio de cultivo Dulbecco modificado (D-MEM) con 10% de suero fetal bovino (FBS), 2mM de glutamina y 50µM de gentamicina. El tejido se separó mecánicamente pasándolo a través de agujas de diversos calibres con el fin de disociar las células. Se contó el número de células viables utilizando azul de tripano y se ajustó la concentración celular a  $1 \times 10^6$  células por ml. Una vez que se ajustó el número de células se distribuyeron en placas de cultivo. Las placas se incubaron a 37°C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> (Ortega et al., 1991). Las células se utilizaron después de 4 o 5 días. Estudios de inmunocitoquímica y de flujo de iones inducido por kainato, han demostrado que las células obtenidas a partir de este cultivo son glia de Bergmann.

## ***Estímulo Celular***

Cuando los cultivos celulares alcanzaron una confluencia de 80%, fueron estimuladas con Glu 1mM por diferentes tiempos 3, 6, 12 y 24 horas, para posteriormente hacer la extracción de RNA total.

## ***Extracción de RNA***

El RNA se preparó a partir de los cultivos primarios y de tejido (cerebelo de pollo) usando el método de Chomnzinski y Sachi, 1987. Se retiró el medio de cultivo y se lavó dos veces con solución amortiguadora de fosfatos (PBS) (sin Ca<sup>2+</sup> ni Mg<sup>2+</sup>), posteriormente las células se lisaron agregando 200µl de solución D (tiocianato de guanidina 4M, citrato de Na<sup>+</sup> 25 mM pH 7, Sarkosyl 0.5% y β-mercaptoetanol 300µl/50ml); al lisado celular se agregó una mezcla de fenol-cloroformo-alcohol isoamilico (125:24:1). Esta mezcla se agitó e incubó a 4°C durante 15 min, posteriormente se centrifugó a 13000 r.p.m. durante 20 min, la fase acuosa se

resuspendió en isopropanol por 2 horas y el RNA fue recuperado por centrifugación en agua-DEPC al 0.1%. Cuando fué necesario se efectuó una segunda precipitación, la pureza e integridad del RNA fue evaluada en un gel de agarosa 1.5% teñido con bromuro de etidio. La concentración se determinó en un espectrofotómetro por absorbancia a 260nm.

### ***Diseño de iniciadores***

Se analizó la secuencia para el cDNA de la subunidad GluR4 del receptor AMPA en *Gallus gallus*, reportada por Paperna, et al (1996) en la base de datos GenBank con el número de acceso X89507, en la cual se evaluaron las secuencias de los iniciadores para la amplificación reportados por Abbie, M. et al. (1993), para esto se utilizó el programa OLIGO 4.1 (National Biosciences Inc.) y se construyó el mapa gráfico de restricción de la secuencia utilizando el programa Vector NT1.6.

### ***Estandarización de RT-PCR***

La estandarización de la RT-PCR, se realizó variando las diferentes temperaturas de alineamiento, la primera utilizada fue la reportada por Abbie, M. et al. en 1993 de 56°C, pero como había bandas inespecíficas decidimos aumentar un grado la temperatura de alineamiento quedando esta en 57°C y también fue necesario conocer la Tm de los cebadores o "primers", así como hacer la amplificación bajo diferentes condiciones, primeramente se construyó una curva con diferentes concentraciones de magnesio (1.5 mM, 2.0 mM, 2.5 mM, 3.0 mM y 3.5 mM), posteriormente se realizó la curva de ciclos (20, 25, 30, 35 y 40) y finalmente de la extracción de RNA se tomaron diferentes concentraciones (4µg, 6µg y 8µg) para construir una curva de concentración.

### ***RT-PCR***

La síntesis de cDNA se realizó a partir de 6µg de RNA total en un volumen final de

20µl usando oligo dT (0.0125µg/µl) como iniciador y 200 U de transcriptasa inversa (MMLV). La amplificación de la secuencia del receptor GluR4 se realizó a partir de 6µl de la reacción de reverso-transcripción. Tris HCl 10 mM (pH 8.3), KCl 50 mM, gelatina 0.1%, ATP, CTP, GCT y TTP (cada uno 125 mM), 2.5 U de Taq polimerasa (Gibco), MgCl<sub>2</sub> 3.0 mM y 20 pMol de cada oligonucleótido (ver en resultados). Bajo las siguientes condiciones: desnaturalización a 94°C por 1 min, alineamiento de los iniciadores a 57°C por 1 min, extensión a 72°C por 1 min, durante 28 ciclos. Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa 1.5%, teñidos con bromuro de etidio y las imágenes fueron digitalizadas con el programa Kodak 1D 2.0.2.

### **Clonación del Fragmento de PCR de 720 pb**

#### **a) Ligación del fragmento de PCR en el vector pBSK+ (pBluescript)**

Se preparó al vector pBSK+ para llevar a cabo una clonación directa del producto de PCR. La ligación se hizo directamente en este plásmido ya que tiene una cola de timinas que hibridan con las adeninas del fragmento de PCR. La reacción de ligación se realizó mezclando 1µl del vector, 8µl de la reacción de PCR, 2µl de la enzima T4 ligasa, 3µl del amortiguador de la enzima y 10µl de agua de ampollita, manteniendo la reacción a 22°C por 2 horas.

#### **b) Células competentes**

Para preparar células competentes, se creció un cultivo de *E. coli* DH5α en medio líquido Luria-Bertanni sin ampicilina, toda la noche a 37°C, se tomaron 500µl del precultivo y se adicionó a 50ml de medio SOB complementado con MgSO<sub>4</sub> 10nM y se incubó a 37°C hasta una DO de 0.5 a 550 de absorbancia, posteriormente se incubó 20 min en hielo y se centrifugó a 2500 r.p.m. 12 min a 4°C y se resuspendió la pastilla en 16 ml de RF1 (6g de RbCl, 4.95g de MnCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 1.47g de CH<sub>3</sub>COOK, 0.75g de CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 59.5 ml de Glicerol se aforó a 500ml de H<sub>2</sub>O y se ajustó a pH a 5.8) se incubó 25 min en hielo, se centrifugó y resuspendió la pastilla en 4ml de RF2 (2ml de MOPS 0.5M, 0.12g de RbCl, 1.1g de CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 11.9ml de Glicerol, aforado a 100ml con H<sub>2</sub>O), se incubó 25 min en hielo y se mantuvieron a -80°C.

### c) Transformación

Para introducir el plásmido a las células competentes *E. coli* DH5 $\alpha$ , se puso en contacto a las células competentes con la reacción de ligación y se incubó por 20 min en hielo, posteriormente se les sometió a un choque térmico a 42°C por 45 seg e inmediatamente se colocaron en hielo durante 2 min, para posteriormente agregar medio LB sin antibiótico e incubarlas en agitación una hora a 37°C. Estas células fueron sembradas en medio Luria-Bertani sólido con ampicilina (100 $\mu$ g/ml) e impregnado previamente con 40 $\mu$ l de Xgal al 2% en formamida y 40 $\mu$ l de IPTG (100mM). Posteriormente se incubó toda la noche a 37°C. Se consideraron candidatos las colonias que no degradaron la galactosa, las cuáles tenían una coloración blanca, para sembrarlas en medio Luria-Bertani líquido con ampicilina y realizar minipreparaciones de plásmido.

### d) Minipreparaciones de plásmido

Para la extracción del DNA plasmídico, las células fueron centrifugadas y la pastilla se resuspendió en 200 $\mu$ l de TS (Tris HCl 50mM, Sacarosa 25% a un pH final de 7.5) y se agitó en vortex y después se le agregó 200 $\mu$ l de ELT (EDTA 100mM, lisozima 2 $\mu$ g/ml y tritón X 100 0.1%, pH mayor a 8.0) se incubaron primero a temperatura ambiente por 5 min, posteriormente 10 min a 70°C, una vez transcurrido este tiempo se centrifugaron 15 min a 13000 r.p.m., se eliminaron los restos celulares y se agregaron 400 $\mu$ l de PEG (Polietilenglicol 6000 al 20% en NaCl 1M), se incubó 20 min a temperatura ambiente y se centrifugó 3 min a 10 000 r.p.m., la pastilla de DNA plasmídico se resuspendió en 30 $\mu$ l de agua destilada estéril.

### e) Análisis por Restricción

La restricción se realizó en un volumen final de 4  $\mu$ l en el cual se mezclaron 3  $\mu$ l de DNA plasmídico de las minipreparaciones con 0.5 $\mu$ l de cada una de las enzimas de restricción *HindIII* y *EcoR1*, estas enzimas cortan secuencias que se encuentran en el plásmido y que flanquean el fragmento de 720 pb.

#### **η Purificación del plásmido y secuenciación**

Para la purificación del plásmido se utilizó el protocolo de extracción rápida (BioRad), para obtener el DNA plasmídico con buena pureza para su secuenciación automatizada (Big Dye Terminator).

#### ***Análisis de Resultados***

Los geles de agarosa tras la electroforesis fueron fotografiados digitalmente usando una cámara digital y el programa Kodak 1D 2.0.2. Con este mismo programa fue medida la intensidad neta de las bandas de DNA obtenidas tras la PCR, para posteriormente hacer los cálculos y gráficas con el programa Sigma Plot.



## RESULTADOS

Nuestro objetivo principal durante el presente trabajo fué la estandarización de las condiciones necesarias para determinar la presencia y tratar de cuantificar el RNA mensajero que codifica para la subunidad GluR4 de los receptores AMPA, en células de Glia de Bergmann provenientes de cerebelo de pollo. Decidimos utilizar la técnica de RT-PCR por su sensibilidad y versatilidad para la detección de cantidades variables de los mensajeros eucarióticos. En primer lugar fue necesario analizar la secuencia reportada por Paperna et al., (1996) para el cDNA de la subunidad GluR4 del receptor AMPA en *Gallus gallus*, a fin de diseñar los iniciadores adecuados para la amplificación de una sección del gen. En la figura 4(B) se muestra la secuencia de 2759 pares de bases reportada en la base de datos GenBank con el número de acceso X89507. Para evaluar las secuencias de los iniciadores o "primers" se utilizó el programa OLIGO 4.1 (National Biosciences Inc.) Las secuencias de los iniciadores o "primers" a utilizar para la amplificación fueron los reportados por Abbie, M. et al. en 1993; en este punto es importante señalar que estos iniciadores habían sido reportados para un modelo de rata, sin embargo fueron igualmente útiles para aplicarlos en nuestro modelo de pollo; la secuencia y posición de estos se muestra en la figura 4(A).

A

**GluR4Up**  
 Sentido (1891) 5' TGG TGG TTC TTC ACA CTC ATC ATT ATT TCA TCC  
TGG TGG TTC TTC ACA CTC ATC AT 3' (1913)

TAC ACT GCT AAC CTC GCT GCT TTC TTG ACT GTT GAG CGA ATG GTC TCA CCC ATA  
 GAA AGT GCA GAA GAC CTT GCC AAA CAA ACT GAA ATT GCT TAC GGG ACA CTG GAC  
 TCA GGG TCA ACC AAA GAG TTC TTC AGA AGA TCA AAA ATA GCA GTG TAT GAA AAG  
 ATG TGG ACC TAC ATG AAA TCA GCA GAG CCG TCA GTG TTC ACT AGG ACT ACT GCA  
 GAG GGA GTA GCT CGT GTC CGC AAA TCC AAG GGC AAG TTT GCC TTC CTG CTG GAG  
 TCC ACC ATG AAT GAA TAC ATT GAG CAA CGA AAG CCT TGT GAC ACC ATG AAA GTG  
 GGA GGA AAT CTG GAT TCG AAA GGC TAT GGC GTA GCC ACA CCG AAG GGT TCT CCA  
 TTA GGA AAT GCT GTT AAC CTC GCA GTT TTA AAA CTG AAT GAA CAA GGC CTC TTG  
 GAC AAA TTG AAA AAC AAA TGG TGG TAC GAC AAA GGA GAA TGT GGC AGC GGG GGA  
 GGT GAC TCC AAG GAC AAG ACG AGT GCC TTG AGT CTC AGC AAC GTT GCT GGA GTC  
 TTC TAC ATT CTG GTT GGA GGC TTG GGC TTG GCA ATG CTG GTG GCT TTG ATA GAG  
 TTC TGT TAC AAG TCC AGG GCA GAG GCG AAA CGA ATG AAG CTT ACC TTT TCT GAA  
 GCC ATA CGA AAC AAA GCC AGA TTA TCC ATC ACA GGG AGT **GluR4Low**  
 (2589) 5' G TCT AAT AGG TAG TGT CCC TCA 3' (2610) Antisentido

Fig. 4. A) Fragmento de la secuencia de GluR4 amplificada, con los iniciadores y la posición de éstos en ella. B) Secuencia del cDNA de la subunidad GluR4 del receptor AMPA de *G. gallus*. 2759pb (número de acceso al Genbank: X89507). En esta se subrayan las secuencias de los primers para la amplificación, en cursivas se indica el sitio de inicio de la traducción y en mayúsculas se encuentra el sitio de corte de la enzima *Pst*I utilizada para la restricción que identifica al amplificado.

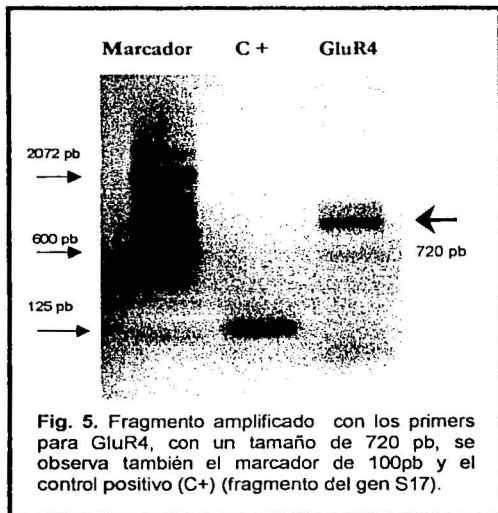
Fig. 4. Continuación

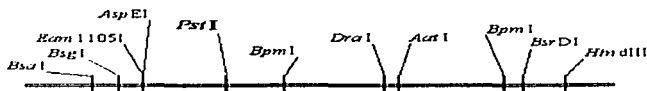
B

1	gcaaaagaga	agatgaggat	aatttgcaga	cagcttgtct	tgttgttttc	tggcttttgg
61	ggactagcaa	tgggagcttt	tcctagcagc	gtgcaaatag	gtggctctct	catcaggaac
121	acagatcagg	aatatacttc	ttttcgatta	gcaatttttc	ttcataaac	cagcccaat
181	gcctcggaag	caaccttttaa	tttggttcct	catgtagaca	acatgaaac	agctaacagc
241	ttcgctgtaa	caaatgcctt	ctgctccocag	tattctagag	gagtttttgc	cattttttgga
301	ctttatgata	agagatcagt	acataacctt	acctcattct	gcagcgcctt	gcacatctcc
361	ctcatcacac	caagtttccc	cactgaggggt	gagagtcagt	ttgtgctgca	gctgcggcca
421	tcactgcggg	gagccctcct	gagcttctgt	gatcactatg	aatggaaccc	ctttgtcttc
481	ctgtatgaca	cagatcgagg	ttattcaata	cttcaagcta	ttatggaaaa	agcaggacaa
541	aatagctggc	aagtctgctg	catctcgcgt	gagaaattca	atgatgccag	ctacaggcgg
601	cttttagaag	acctggaccg	aagacaagaa	aagaaatttg	taatagactg	tgaaatagag
661	aggctgcaga	atctcttaga	acagatgtta	agcgtgggaa	agcatgttaa	aggatccat
721	tacattgttg	ccaacctggg	attcaaagat	atctctctgg	agaggtttat	gcatgggaga
781	gctaatgtga	cgggatttca	gctagtatag	ttcagtaacc	caatggtaac	taagtgtgat
841	cagcgctgga	agaagctgga	ccagagagaa	taccgggat	ccgagacccc	accaaagtat
901	acatctgcat	taacatatga	tggagtgcct	gtgatggctg	aaactttccg	caatcttaga
961	aggcaaaaa	tagatatttc	aagaagagga	aatgctggtg	atgtcttgc	taatcctgct
1021	gtccatctgg	ctcaaggaa	tgatatggag	aggacattga	aacaggttcg	ataacaagga
1081	ttgacaggaa	atgttcaatt	tgaccactat	ggtcgcagag	tcaactcac	tatggatgct
1141	tttgagctga	agaacacagg	tcctcggaa	gttggttact	ggaatgacat	ggataaaata
1201	gttctgattc	agcatgaacc	tacacttgga	aatgacactt	cagccatgga	caacgagact
1261	gtagttgtca	ctacaatttt	ggaagcccca	tatgttatgt	tcaagaaaa	gcatgatcag
1321	tttgaaggga	atgacaagtt	tgaaggatac	tgtgtagatc	tggcgtcaga	aattgcaaaa
1381	catatgtgta	tcaagtacaa	aattgccatt	gttctctgat	gaaaaatg	agcaagggat
1441	ccagagacaa	aaaactggaa	tgggatggtg	ggagaacttg	tttatgggaa	agcagagatt
1501	gctgttcgce	ctctgaccaa	cactttggta	cgagaagagg	tcattgattt	ttctaagcct
1561	tttatgagtt	tggggatctc	cattatgatc	aaaaagcccc	agaaaactaa	accagggatg
1621	ttttcctctc	tggacccttt	ggcgtatgag	atctggatgt	gcatagtctt	tgcctacatt
1681	gggtgacagt	tggtcctggt	octagttagc	aggtttagcc	catcacagtg	gcatacagaa
1741	gaaccagagg	atgggaaaga	aggaccagtt	gatcagctcc	ccaatgaatt	tggcatattc
1801	aacagcctct	ggttttccct	gggtgccttt	atgcaacaag	gatgtgaatt	ttcccacaaga
1861	tcctctcag	gtcgcattgt	tggagttgct	<u>tgggtgctct</u>	<u>tcacactcat</u>	<u>catattttca</u>
1921	tcctcaactg	ctaacctcgc	tgctttcttg	actgttgagc	gaatggtctc	cccataagaa
1981	agtcgagaag	accttgccaa	acaaaactgaa	atgtcttacg	ggcactggga	ctcaggggtca
2041	accaaagagt	ttctcagaag	atcaaaaaata	cgagtgtatg	aaaagatgtg	gactcacatg
2101	aaatcagcag	agccctcagtt	gttcaactagg	acta <b>CTGCAG</b>	agggagtagc	tgctgtccgc
2161	aaatccaagg	gcaagtttgc	cttctctgct	gagtcacca	tgaatgaata	cattgagcaa
2221	cgaaaagcctt	gtgacacca	gaaagtggga	ggaaaactg	atccgaaaag	ctatggcgta
2281	gccacaccca	aggtgtctcc	attaggaaat	ctgtttaa	ttcagatttt	aaaaactgaat
2341	gaacaaagcc	tcttggaaca	atggaaaaac	aaatgggtgt	acgacaagag	agaaatgtgct
2401	agcgggggag	gtgtaccgaa	ggacaagacg	agtcctctga	gtctcagcaa	cgctgtgctga
2461	gtctcttaca	ttctggttgg	aggcttgggc	tgggcaactg	tggtgctctt	gatagagttc
2521	tgttacaagt	ccaggtcaga	ggcgaaacga	atgaagctta	cctttcttga	agccatacga
2581	aaacaaagcca	<u>gatattccat</u>	<u>cacagggagtt</u>	gtgggtgaaa	atggcccgct	atgtgactcc
2641	gactgcgccga	agcgtgtgca	ttccggaact	gcaaatagac	aaagttcagg	atgtgctgta
2701	attgctatcga	acctaccata	aaaaacaaaa	aaataatcga	gtgccttaat	taaacgtgtg

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Para poder amplificar el fragmento, primero fue necesario hacer la extracción de RNA a partir de los cultivos primarios y de tejido usando el método de Chomzinski y Sachi (1987), obtenerlo limpio y en cantidad suficiente, para posteriormente amplificar por RT-PCR el fragmento de la secuencia del gen GluR4 con los iniciadores anteriormente descritos (fig. 4), se usaron las siguientes condiciones: 1 min 94°C, 1 min a 56°C, 1 min a 72°C por 35 ciclos, en un volumen final de reacción de 80 µl; conteniendo, 4 µl del cDNA molde, obtenido a partir de la retrotranscripción de RNA que proviene de Glía de Bergmann, 20 pmol de cada primer, 120µM de cada nucleótido, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 0.1 gelatina y 5 U de Taq DNA polimerasa (Life Technologies); usando como molde el cDNA obtenido de células gliales de cerebelo de pollo, se obtuvo un fragmento de 720 pb (fig. 5) y con la ayuda de la secuencia se construyó el mapa gráfico de restricción (fig. 6) seleccionando a la enzima *Pst*I para realizar la restricción, obteniéndose 2 productos de 249 y 472 pares de bases, para confirmar que el fragmento que estábamos amplificando pertenecía al gen GluR4 (fig.7).





**GluR4**  
720 bp

1	TGTTGGTTC	TCACACTCAT	CATTATTTCA	TCGTACACTG	CTAACCTCGC
	ACCACCAAGA	AGTGTGAATA	GTATAAAGT	AGGATGTGAC	AGTGGAGCC
51	TGCTTTCTTG	ACTGTTGAGC	GAATGGTCTC	ACCCATAGAA	AGTGCGAGAAG
	ACGAAAGAAC	TGACAACCTC	CTTACCAAGG	TGGGTATCTT	TCACGTCTTC
101	ACCTTGCCAA	ACAAACTGAA	ATTGCTTACG	GGACACTGGA	CTCAGGGTCA
	TGGAACGGTT	TGTTTGACTT	TAACGGAATG	CCTGTGACCT	GAGTCCCAAT
151	ACCAAAGAGT	TCTTCAGAAG	ATCAAAAATA	GCAGTGTATG	AAAGATGTG
	TGQTTTCTCA	AGAAGTCTTC	TAQTTTTTAT	CGTCACATAC	TTTTCTCAC
201	GACCTACATG	AAATCAGCAC	AGCCGTCAGT	GTTCACTAGG	ACTACTCGAG
	CTGGATGTAC	TTTAGTCCGC	TCGGCAGTCA	CAAGTGATCC	TGATGACGTC
251	AGGGAGTAGC	TCGTGTCCGC	AAATCCAAGG	GCAAGTTTGC	CTTCTGTGTG
	TCCTCATCGC	AGCACAGGCC	TTTAGGTTCC	CGTTCAAAAG	GAAGGACGAC
301	GAGTCACCA	TGAATGAATA	CATTGAGCAA	CGAAAGCCTT	GTGACACCAT
	CTCAGGTGGT	ACTTACTTAT	GTAACCTGTT	GCTTTCGGAA	CAGTGTGGTA
351	GAAAGTGGGA	GGAAATCTGG	ATTCGAAAAG	CTATGCCGTA	GCCACACCGA
	CTTTCACCCT	CCTTATAGAC	TAACCTTTCC	GATACCGCAT	CGGTGTGGCT
401	AGGGTTCTCC	ATTAGGAAAT	GCTGTAAACC	TCGCAGTTTT	AAAACGTAAAT
	TCCCAAGAGG	TAATCCTTTA	CGACAATTGG	AGCGTCAAAA	TTTTGACTTA
451	GAACAAGGCC	TCTTGGACAA	ATTGAAAAAC	AAATGGTGGT	ACGACAAGGG
	CTTGTTCGGG	AGAACCTGTT	TAACCTTTTTG	TTTACCACCA	TGCTGTTTCC
501	AGAAATGTGC	AGCGGGGGAG	GTGACTCCAA	GGACAAGACG	AGTGCCTTCA
	TCTTACACCG	TCGCCCCCTC	CAGTGAGGTT	CCTGTTCTGC	TCACGGAACT
551	GTCTCAGCAA	CGTTGCTGGA	GTCTCTTACA	TTCTGTTTGG	AGGCTTGCGC
	CAGAGTCGTT	GCAACGACCT	CAGAAGATGT	AAGACCAACC	TCGGAAACCCG
601	TTGGCAATGC	TGQTOGCTT	GATAGAGTTC	TGTTACAAGT	CCAGGGCAGA
	AACCGTTACG	ACCACCGAAA	CTATCTCAAG	ACAATGTTCA	GGTCCCGTCT
651	GGCAAAACGA	ATGAAGCTTA	CCTTTTCTGA	AGCCATACGA	AACAAGGCCA
	CCGCTTTGCT	TACTTCCGAAT	GGAAAAAGCT	TCGGTATGCT	TTGTTTCCGT
701	GATTATCCAT	CACAGGGAGT	CTAATAGGTA	GTGTCCTCA	

Fig. 6. Mapa gráfico de restricción, en que se observa el sitio de corte de la enzima *PstI* que se seleccionó para realizar la restricción, obteniéndose 2 productos de 249 y 472 pb. Obtenido con el programa Vector NT1.6.

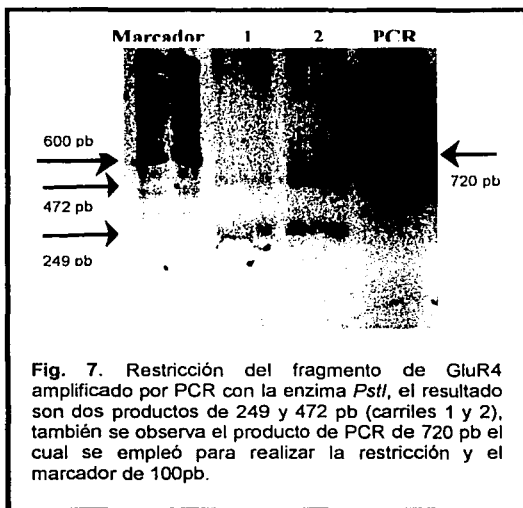
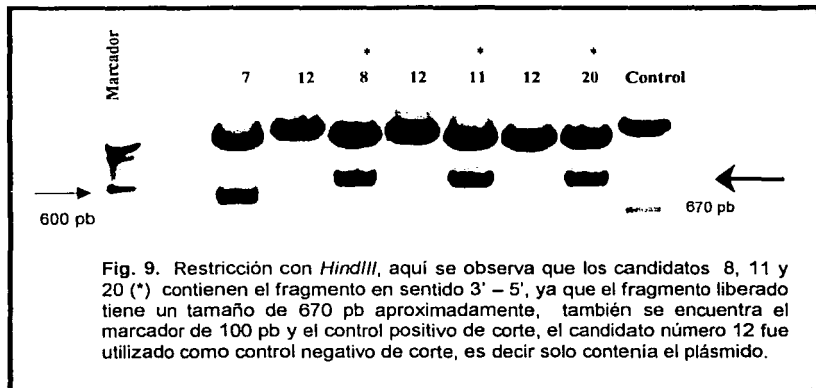
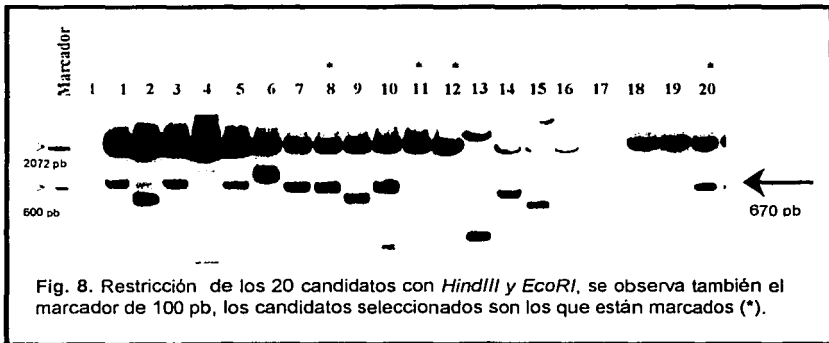
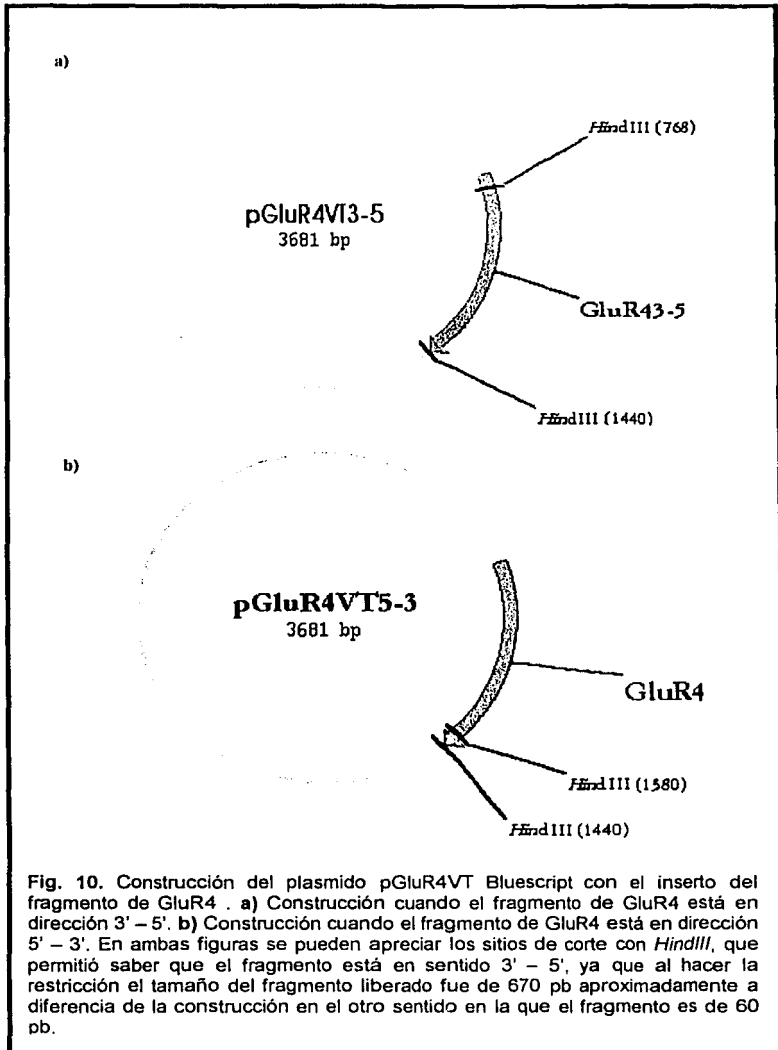


Fig. 7. Restricción del fragmento de GluR4 amplificado por PCR con la enzima *Pst*I, el resultado son dos productos de 249 y 472 pb (carriles 1 y 2), también se observa el producto de PCR de 720 pb el cual se empleó para realizar la restricción y el marcador de 100pb.

Después de amplificar el fragmento del gen de GluR4 se decidió clonar el fragmento para facilitar su posterior secuenciación y eventualmente esta clonación pudiera convertirse en un control positivo en cada grupo de reacciones de PCR. La clonación se realizó en un vector preparado para la clonación directa de productos de PCR, utilizamos el plásmido pBluescript TA(pBSK II+). El fragmento se ligó directamente en el vector usando T4 ligasa y la ligación se transformó en *E. coli* DH5 alfa. Se seleccionaron los posibles candidatos, como aquellas colonias de color blanco y se procedió a la preparación del DNA plasmídico mediante minipreparaciones por el método de lisis alcalina. Se realizó la restricción de los diferentes DNAs con las enzimas de restricción *Hind*III y *Eco*RI (Fig. 8) para liberar el fragmento de 720 pb, y para conocer el sentido en que el fragmento fue clonado se hizo una segunda restricción sólo con *Hind*III de algunos candidatos preseleccionados en la restricción anterior (Fig. 9). Al analizar el patrón de fragmentos obtenidos al restringir con *Hind*III usando el programa Vector NT1 6 (Fig. 6 y Fig. 10), concluimos que el fragmento fue clonado en sentido 3'– 5'. Los DNAs con el inserto fueron purificados por el método

rápido de obtención de DNA plasmídico (BioRad) y analizados en un gel de agarosa (fig. 11). El DNA fue cuantificado, secuenciado y se utilizó como control positivo en las ampliificaciones posteriores.





TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



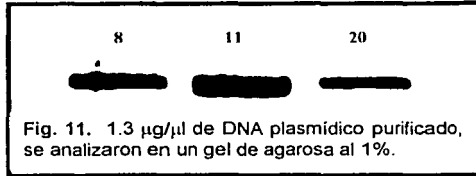


Fig. 11. 1.3 µg/µl de DNA plasmidico purificado, se analizaron en un gel de agarosa al 1%.

Con los plásmidos purificados fue posible hacer la secuenciación del fragmento amplificado para GluR4 (Fig.12). Esta secuencia muestra una homología de 98 % y una identidad de 98% con respecto a la secuencia reportada para GluR4.

**Alineamientos**

A)

gi|987865|emb|X89507.1|GGGLUR4 G.gallus mRNA for AMPA receptor subunit GluR4  
Length = 2759

Score = 789 bits (398), Expect = 0.0  
Identities = 420/425 (98%), Gaps = 3/425 (0%)  
Strand = Plus / Plus

```

Query: 99  tgggtggttcttcacactcatcattatctcatcctacactgtaacctcgctgctttcttg 158
|          |||||||
Sbjct: 1891 tgggtggttcttcacactcatcattatctcatcctacactgtaacctcgctgctttcttg 1950

Query: 159  actggtgagcgaatgggtctcaccctatagaaaagtcagaagaccttgccaacaacctgaa 218
|          |||||||
Sbjct: 1951 actggtgagcgaatgggtctcaccctatagaaaagtcagaagaccttgccaacaacctgaa 2010

Query: 219  attgcttacgggacactggactcagggtcaaccaagagtctctcagaagatcaaaaaa 278
|          |||||||
Sbjct: 2011 attgcttacgggacactggactcagggtcaaccaagagtctctcagaagatcaaaaaa 2070

Query: 279  gcagtgtagaaaagatgtggacctacatgaaatcagcagagcgctcagtgcttctactagg 338
|          |||||||
Sbjct: 2071 gcagtgtagaaaagatgtggacctacatgaaatcagcagagcgctcagtgcttctactagg 2130

Query: 339  actactgcagagggagtagctcgtgtccgcaaatccaagggcaagt ttgccttctctgctg 398
|          |||||||
Sbjct: 2131 actactgcagagggagtagctcgtgtccgcaaatccaagggcaagt ttgccttctctgctg 2190

Query: 399  gagtccaccatgaaatgaaatcatttgagcaacgaaagccttgtgacacatgaaagtggga 458
|          |||||||
Sbjct: 2191 gagtccaccatgaaatgaaatcatttgagcaacgaaagccttgtgacacatgaaagtggga 2250

Query: 459  ggaaatctggattccaaggctatggcgta---cccaccgaagggttct-cattaggaat 515
|          |||||||
Sbjct: 2251 ggaaatctggattcgaaggctatggcgtagccaccacgaagggttctccattaggaat 2310

Query: 516  gctgt 520
|      ||||
Sbjct: 2311 gctgt 2315

```

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

B)

Secuencias que producen alineamientos significativos

X89507.1/GGGLUR4	mRNA para la subunidad GluR4 de los receptores AMPA en <i>Gallus gallus</i>
U59708.1/GGU59708	Alternativo corte y empalme de los receptores glutamatérgicos AMPA en <i>G. gallus</i>
U65993.1/GGU65993	Proteína GluR4d en <i>Gallus gallus</i>
U65992.1/GGU65992	mRNA de la proteína GluR4c en <i>Gallus gallus</i>
U59707.1/GGU59707	Alternativo corte y empalme de los receptores glutamatérgicos AMPA en <i>G. gallus</i>
U65991.1/GGU65991	mRNA (GluR4s) GluR4 la forma corta de <i>Gallus gallus</i>
Z29920.1/CLRGLUR4	mRNA GluR <sup>2</sup> -IV <i>C. livia</i>
XM 006233.31	mRNA del receptor de glutamato, ionotrópico, AMPA 4 (GRIA4) en <i>Homo sapiens</i>
NM 000829.1	mRNA de receptor de glutamato en <i>Homo sapiens</i>
U16129.1/HSU16129	mRNA del receptor de glutamato (GluR4) en humano
S94371.1/S94371	Subunidad 4c del receptor glutamatérgico
NM 017263.1	mRNA receptor glutamatérgico interactúa con (GRIP2) de <i>Rattus norvegicus</i>
M85037.1/GLUR4A	mRNA receptor glutamatérgico no-NMDA subunidad 4 (GluR4) en rata
M38063.1/RATAMPA	mRNA receptor glutamatérgico selectivo AMPA en rata
M36421.1/RATGLUR	mRNA receptor glutamatérgico (GluRD) en rata
NM 019691.1	mRNA receptor glutamatérgico en <i>Mus musculus</i>
AB022913.1/AB022913	mRNA para glur4 en <i>Mus musculus</i>
AF001023.4/AP001023	DNA genómico de <i>Homo sapiens</i>
XM 047335.1	mRNA receptor glutamatérgico de <i>Homo sapiens</i>

Fig. 12. A) Alineamiento del fragmento clonado y secuenciado, contra la secuencia reportada para *Gallus gallus* de mRNA de la subunidad GluR4 de los receptores AMPA, con la cual nos podemos dar cuenta que la que obtuvimos fue precisamente ésta. B) Secuencias reportadas que tienen cierto parecido con el fragmento que secuenciamos.

Para poder llevar a cabo nuestro objetivo general y conocer el efecto del Glu en la expresión del gen GluR4 de las células gliales de Bergmann, necesitábamos estandarizar las condiciones de amplificación por RT-PCR, lo que incluyó obtener primeramente el RNA con una calidad y concentración satisfactorias para su procesamiento, con un grado de pureza aceptable, la cuantificación de los parámetros se llevó a cabo por determinación de su absorbancia a 260nm, la relación 260/280, así como la visualización de su integridad en gel de agarosa al 1% teñido con Bromuro de Etidio como el que se muestra en la figura 13.

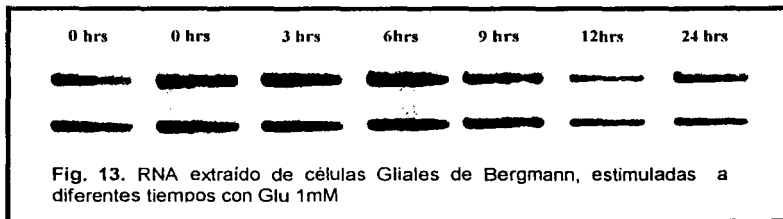
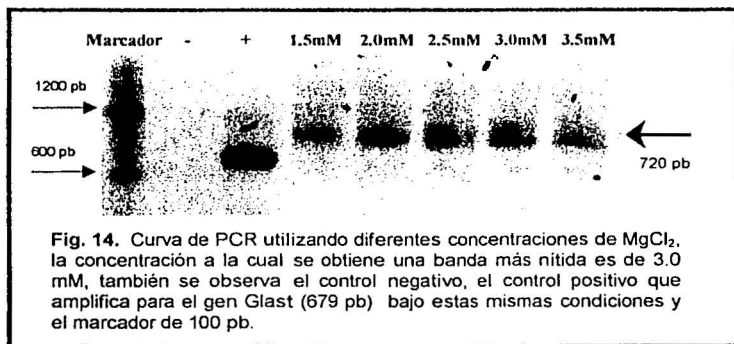


Fig. 13. RNA extraído de células Gliales de Bergmann, estimuladas a diferentes tiempos con Glu 1mM

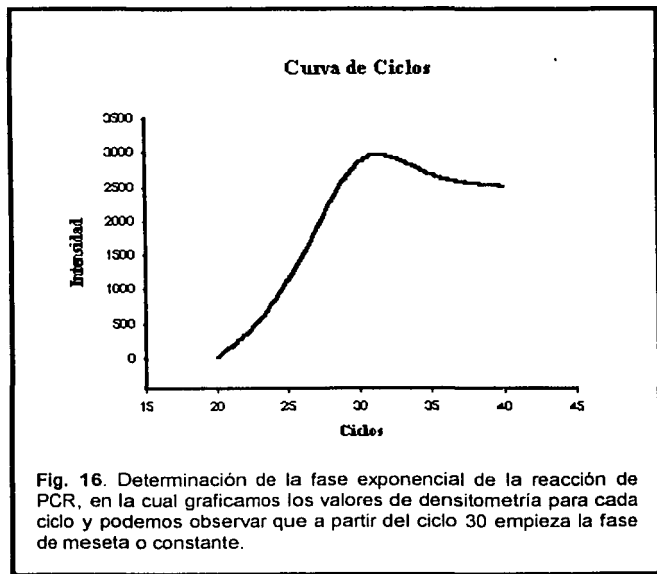
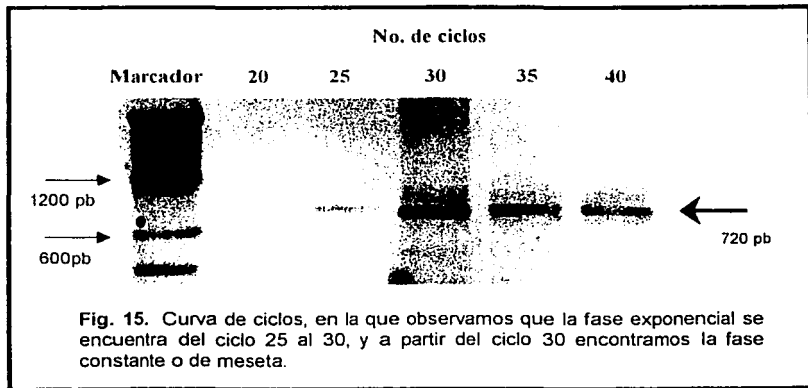
Para continuar con la estandarización se realizaron amplificaciones del fragmento en diferentes concentraciones de  $MgCl_2$  (Fig. 14) de las cuales podemos observar que obtenemos una mejor amplificación a una concentración de 3.0 mM de  $MgCl_2$ .



También se realizaron amplificaciones a 20, 25, 30, 35 y 40 ciclos (Fig. 15), de las cuales podemos ver que el producto de amplificación se hace más intenso conforme se incrementa el número de ciclos, y llega a un punto máximo en el cual se mantiene; los valores de la densitometría en la que se midió la intensidad de las bandas son los siguientes:

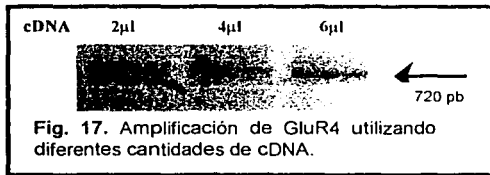
No. de Ciclos	Intensidad Neta
20	0
25	1123.05
30	2868.18
35	2684.71
40	2500.60

Al graficar el número de ciclos contra la intensidad de las bandas, la curva nos indica que al utilizar entre 25 y 30 ciclos la amplificación está en la fase exponencial (Fig. 16).



TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN

Diferentes cantidades de cDNA, contienen diferentes cantidades de los diferentes mensajeros expresados en una célula. Para determinar que la amplificación refleja la abundancia relativa de un mensajero dado, se usaron diferentes cantidades de cDNA como molde. En la fig. 17 se observa que la intensidad de la banda se hace mayor a mayor cantidad de cDNA, lo que sugiere que cuando exista una mayor o menor expresión del mensajero de GluR4, el sistema permitirá detectarlo en base a la intensidad de la banda o producto de amplificación.



Las condiciones finales estandarizadas para la amplificación fueron las siguientes: 28 ciclos del siguiente programa de tiempos y temperaturas: 1 min. 94°C, 1 min. a 57°C, 1 min. a 72°C, en un volumen de reacción de 40 µl; conteniendo, 6 µl del cDNA de reacción de RT como molde, 20 pmol de cada primer, 120µM de cada nucleótido, 3.0 mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 0.1 gelatina y 2.5 U Taq DNA polimerasa (Life Technologies); con estas condiciones se realizaron los ensayos para la determinación semicuantitativa del RNAm del gen GluR4.

Después de establecer las condiciones ideales para la RT-PCR, procedimos a hacer las amplificaciones del RNA extraído de BGC estimuladas con Glu 1mM durante diferentes tiempos de 0, 3, 6, 12 y 24 horas, pero cosechadas todas al mismo tiempo. En estos experimentos se normalizó contra un amplificado del gen de la proteína ribosomal s17 (fig. 18 y 19) (oligonucleótidos s17-upper 5'tac acc cgt ctg ggc aac gac 3' y s17-lower 5' ccg ctg gat gcg clt cat cag 3'). Al realizar la desitometría de las bandas amplificadas se logró determinar que el mensajero de GluR4 disminuye al estimular las células con Glu a mayores tiempos de exposición (fig. 20 y 21).

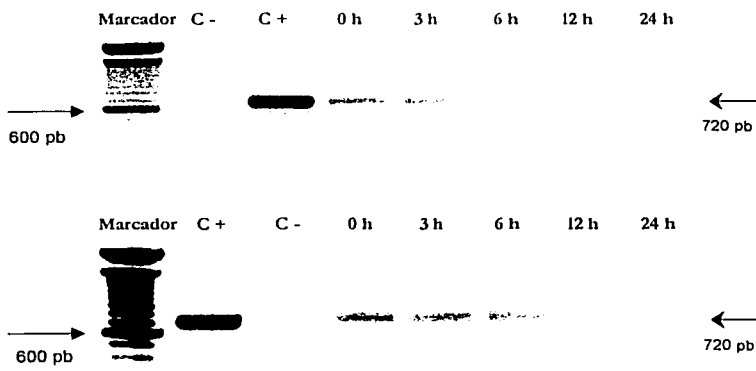


Fig. 20. Electroforesis de los productos de PCR, en el que observamos que las cantidades del mensajero disminuyen conforme aumenta el tiempo de exposición al glu.

### Regulación de la expresión del mRNA de GluR4 por Glu

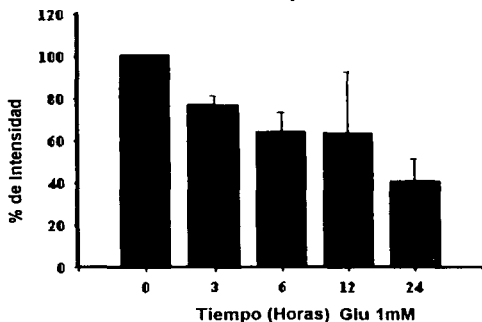
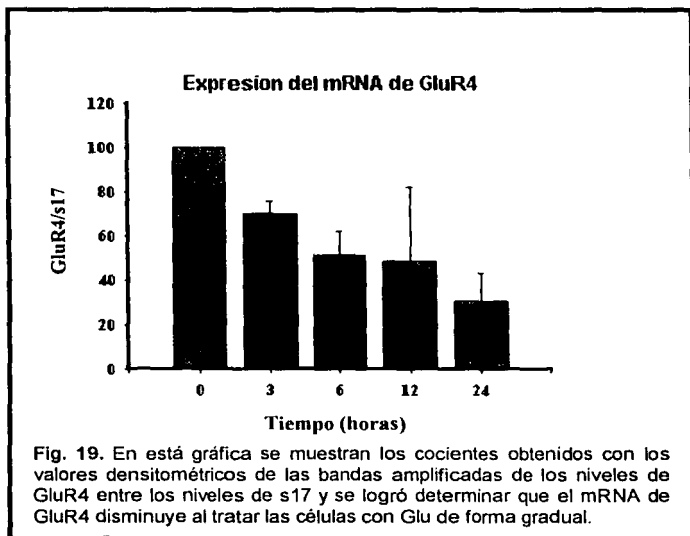
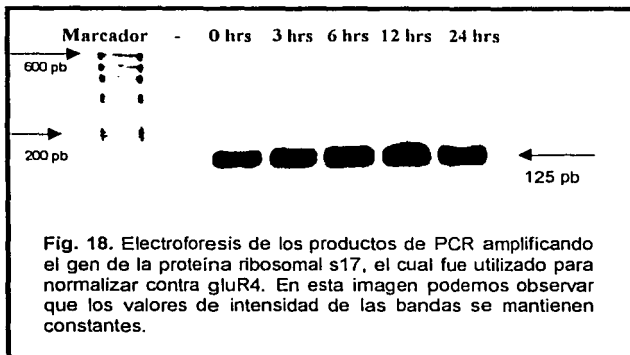


Fig. 21. Regulación de los niveles del mRNA de GluR4 de pollo por Glu. El RNA total de BGC estimuladas con Glu a diferentes tiempos, fue extraído y utilizado en ensayos de RT-PCR. En esta gráfica podemos observar que el RNAm disminuye gradualmente con respecto al tiempo de exposición.



## DISCUSIÓN

La glial radial de Bergmann de cerebelo de pollo fue escogida para este estudio por dos razones principales. Primero, este tipo celular ha sido frecuentemente cultivado ya que es un sistema libre de células neuronales, puede ser obtenido fácilmente y en cantidades suficientes para el análisis de RNA. Segundo, la localización precisa de estas células en el SNC, por ejemplo, en contacto íntimo con las sinapsis glutamatérgicas, provee un sistema único experimental con el cual se ha empezado a elucidar la contribución de los receptores gliales para la actividad eléctrica neuronal (Ortega et al., 1991; Cid y Ortega, 1993; Sánchez y Ortega, 1994; López-Colomé et al., 1995), haciendo imperativo establecer la identidad molecular de los receptores de glutamato involucrados en estas respuestas.

La subunidad GluR4 ha sido identificada en varias especies, rata, humano, sapo, pez y pollo. Es importante señalar que la secuencia de los iniciadores que utilizamos para la amplificación está reportada para la secuencia del gen GluR4 en rata (Abbie, M. et al., 1993), sin embargo resultaron ser buenos candidatos para este estudio, ya que al realizar la alineación de las secuencias del gen de GluR4 de rata y pollo, estas resultaron tener una identidad de 87%, por lo que decidimos utilizar estos iniciadores y probarlos con el programa OLIGO 4.1 (National Biosciences Inc) en la secuencia de mRNA de GluR4 de *G. gallus* para conocer su Tm, estabilidad, y si no había hibridación entre ellos o formaban estructuras secundarias complejas.

Para iniciar el análisis transcripcional de este gen, se amplificó un fragmento del gen GluR4 de pollo con los oligonucleótidos anteriormente descritos, corroborando el origen de este fragmento por corte enzimático y secuenciación, se comparó esta secuencia con las ya reportadas por medio de un análisis Blast, y el fragmento tuvo una identidad de 98% con la reportada para mRNA de GluR4 de *G. gallus*, lo que indica que el fragmento que amplificamos pertenece al gen GluR4 de pollo.

Para tener un sistema semicuantitativo, se estandarizaron las condiciones de amplificación. Cabe señalar que en nuestro sistema el mRNA de GluR4 es poco abundante, su amplificación es escasa. Es importante que al amplificar se presente



una unión eficaz de los iniciadores al DNA ya que de esto dependen las condiciones, específicamente de las concentraciones de  $Mg^{2+}$  y de la temperatura; la especificidad y pureza del producto final de amplificación depende de la frecuencia con que cada iniciador sea extendido y a partir de la posición deseada en el DNA o templado.

A altas concentraciones el  $Mg^{2+}$  estabiliza la doble cadena de DNA y previene la desnaturalización completa del producto en cada ciclo, reduciendo el rendimiento. Un exceso de  $Mg^{2+}$  podría también alinear el iniciador en un sitio incorrecto del templado, dando como resultado un mayor número de productos inespecíficos y con esto baja especificidad de la reacción, esto es lo que notamos en la curva de  $Mg^{2+}$  (fig. 14) que se elaboró, ya que al aumentar la concentración empiezan a aparecer productos inespecíficos.

Los resultados obtenidos de la estandarización de las condiciones nos ayudaron a realizar el PCR semicuantitativo y conseguir una buena amplificación. La cuantificación de mRNA por RT-PCR semicuantitativo es importante por el hecho de que la eficiencia de RT y PCR muestran amplias variaciones de muestra a muestra, dependiendo de muchos factores incluyendo el número de copias iniciales del RNA muestra. Estos problemas pueden ser resueltos en el RT-PCR usando un control interno estándar de RNA (Becker-Andre y Hahlbrock 1989; Kagami et al., 1996; Lambalez y Rossieer 2000), a condición de que el RNA blanco y el control interno de RNA sean reverso transcritos y amplificados con la misma eficiencia, y que las porciones relativas de los productos del blanco y el control interno puedan ser medidas exactamente (Tsuzuki et al., 2001), es por esto que se usó un control interno para normalizar los experimentos, y que sirvió como referencia, en este caso fue un amplificado del gen de la proteína ribosomal s17.

Los resultados del presente trabajo cubrieron el objetivo de determinar si la activación de los receptores puede desencadenar cambios en el patrón de expresión de genes específicos como el de GluR4, en este caso sobre los mismos receptores al Glu. La activación de los receptores en la membrana y la transcripción en el núcleo están acoplados a través del flujo iónico y la formación de segundos mensajeros (Gallo et al., 1995) un fenómeno complejo en el desarrollo neuronal, aprendizaje,

memoria y regeneración de nervios es la habilidad de los estímulos para inducir cambios necesarios para la plasticidad en una célula dada que requiere la regulación transcripcional del gen (Gallo et al., 1995).

Cambios en la asociación del  $Ca^{2+}$  con la activación de los receptores de glutamato pueden afectar la transcripción de genes en glia a través de la modulación de la expresión y actividad de los factores de transcripción (Gallo y Ghiani, 2000). El glutamato imita los efectos de algunos factores de transcripción, lo cual se hace más evidente en los primeros tejidos postnatales comparado con el tejido adulto (Mack et al., 1994).

La composición molecular de los receptores para neurotransmisores incluyendo los del glutamato es controlada al menos en parte a través de la regulación transcripcional de los genes que codifican para las diferentes subunidades proteicas que conforman los canales de los receptores a glutamato (Bettler et al., 1990; Pellegrini-Giampietro et al., 1991; Werner et al., 1991; Bahn et al., 1994; Keinanen et al., 1990).

Al realizar la desitometría de las bandas amplificadas se logró determinar que el RNAm de GluR4 disminuye al estimular las células con glutamato conforme aumenta el tiempo de estimulación, lo que podríamos atribuir a una regulación transcripcional.

Si bien los cambios en la expresión de GluR4 son pequeños, estas alteraciones son tanto cuantitativas como cualitativas. Utilizando una combinación de "patch clamp" y RT-PCR de una sola célula se ha demostrado que existe una correlación inversa entre el tiempo de desactivación y desensibilización y la abundancia relativa de la subunidad GluR4 (Geiger et al., 1995). Los canales formados en células que proporcionalmente a las otras subunidades expresan más GluR4 tienen una cinética de desensibilización más rápida. Esto implica que en las células en las que la expresión relativa de GluR4 aumenta, la corriente que pasa por los receptores AMPA/KA es menor. Mientras que en las células en las que la expresión de GluR4 disminuye, los receptores AMPA/KA median potenciales excitadores de mayor duración.

Los datos presentados en este trabajo proveen evidencia que implica a las células gliales de Bergmann como capaces de cambiar la expresión de genes específicos en respuesta a Glu. Los cambios en la expresión de GluR4 podrían producir alteraciones en las respuestas de Glu en estas células son cuantitativos y podrían ser cualitativos. En neuronas, la desensibilización y la desactivación a tiempos constantes de los receptores AMPA/KA muestra una correlación negativa con la abundancia relativa de mRNA de GluR4 (Geiger et al., 1995) Los receptores AMPA/KA formados con GluR4 se abren rápidamente, reduciendo el tiempo de la potenciación glial evocada por Glu. La entrada de los iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  a través de los receptores AMPA/KA en la glia radial podrían modular la conductancia de  $\text{K}^+$  o el  $\text{Na}^+$  dependiente del transportador Glu/Aspartato (Newman y Reichenbach, 1996; Steinhäuser y Gallo, 1996). Con esto se hace posible que la composición por la subunidad de iGluRs este implicada en la regulación extracelular de la concentración de  $\text{K}^+$  y los efectos de Glu en la hendidura sináptica (Kettenmann, 1996).

Un desarrollo lógico de estos estudios moleculares y un reto para experimentos futuros, es identificar los genes que son regulados por factores transcripcionales mediados por receptores de glutamato asociados con la señalización en la glia. (Gallo y Ghiani, 2000).

Nuestro entendimiento del rol fisiológico de los receptores de Glu en glia dependerá fuertemente de los estudios que modifiquen selectivamente la función de estos receptores en subtipos específicos de células gliales. La identificación de los promotores de los genes que son usados específicamente en diferentes células podría permitir seleccionar genéticamente los receptores de glutamato por el uso de sistemas recombinantes para subpoblaciones específicas de células gliales. (Van der Neut, 1997) Los genes de glia específicamente podrían también ser usados como blanco selectivo de sobreexpresión de receptores dominantes para varios subtipos gliales. El impacto de la modulación de la actividad de los receptores glutamatérgicos de glia sobre la fisiología sináptica y sobre el desarrollo de células gliales podría ser analizado en mutantes transgénicos (Gallo y Ghiani, 2000). La activación de factores de transcripción represores o bien la inactivación de algún o algunos factores de

efecto positivo sobre la transcripción de GluR4, puede ser parte del mecanismo molecular, que debe ser explorado en un futuro cercano. Se hace necesario el estudio de la región promotora del gen, ya que esta no ha sido descrita, aunque la secuencia completa de GluR4 de pollo ha sido reportada (Paperna et al., 1996), por lo que es fundamental clonar y secuenciar la región reguladora de este gen, a fin de realizar el análisis bioquímico y funcional que lleve a describir el mecanismo transcripcional.

## CONCLUSIONES

Se logró uno de los objetivos del presente trabajo, que fue la estandarización de las condiciones necesarias para determinar la presencia del mensajero que codifica para la subunidad GluR4 de los receptores AMPA, en células de Glia de Bergmann provenientes de cerebelo de pollo y a partir de esto estudiar la regulación transcripcional del gen de GluR4.

Amplificamos una región de 720 pb de gen GluR4 de células gliales de Bergmann, se clonó y secuenció, este fragmento se localiza hacia el extremo 3' del gen.

Con la utilización la técnica de RT-PCR semicuantitativo se logró determinar que hay una disminución de la concentración del RNA de GluR4 al estimular a las células gliales de Bergmann con glutamato, que se acentúa a tiempos mayores de exposición al Glu, por lo que en las células gliales de Bergmann el Glu induce cambios en la expresión de la subunidad GluR4.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Abbie, M. Jensen and Chiu, S. Y. 1993. Expression of Glutamate Receptor Genes in White Matter: Developing and Adult Rat Optic Nerve. *J. Neurosci.* 13(4):1664-1675.
2. Appel, S.H. 1993. Excitotoxic neural cell death in amyotrophic lateral sclerosis. *Trends Neurosci.* 16:3-5.
3. Araque, A. Parpura, V. Sanzgiri, R.P. Haydon, P.G. 1999. Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends Neurosci.* 22:208-215.
4. Bacci, A. Verderio, C. Pravettoni, E. Matteoli, M. 1999. The role of glial cells in synaptic function. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* 354:31-39.
5. Bahn, S. Volk, B. and Wisden, W, 1994. Kainate receptor gene expression in the developing rat brain. *J. Neurosci.* 14:5525-5547.
6. Balazs, R. Miller, S. Romano, C. de Vries, A. Chun, Y. and Cotman, C.W. 1997. Metabotropic glutamate receptor mGluR5 in astrocytes: pharmacological properties and agonist regulation. *J. Neurochem.* 69:151-163.
7. Barres, B.A. 1991. New roles for glia. *J. Neurosci.* 11:3685-3694.
8. Becker-André, M. and Hahlbrock, K. 1989. Absolute mRNA quantification using the polymerase chain reaction (PCR). A novel approach by a PCR aided transcript titration assay (PATTY). *Nucleic Acids Res.* 17:9437-9446.
9. Ben-Ari, Y. Aniksztejn, L. and Bregestovski, P. 1992. Protein kinase-C modulation of NMDA currents-an important link for LTP induction. *Trends Neurosci.* 15:333-39.
10. Bennett, J. A. and Dingledine, R. 1995. Topology profile for a glutamate receptor: three transmembrane domains and a channel-lining reentrant. *Neuron.* 14:373-384.
11. Bettler, B. Boulter, J. Hermans-Borgmeyer, I. O'Shea-Greenfield, A. Deneris, E.S. Moll, C. Borgmeyer, U. Hollmann, M. and Heinemann, S. 1990. Cloning of a novel glutamate receptor subunit, GluR5: expression in the system during development. *Neuron.* 5:583-595.
12. Beverly, A. C. and Barbour, B. 1997. Currents evoked in Bergmann glial cells by parallel fibre stimulation in rat cerebellar slices. *J. Physiol.* 502:335-350.
13. Bliss, T. V. P. and Collingridge, G. L. 1993. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature.* 361:31-39.
14. Boulter, J. Hollmann, M. O'Shea-Greenfield, A. Hartley, M. Deneris, E. Maron, C. and Heinemann, S. 1990. Molecular cloning and functional expression of glutamate receptor subunit genes. *Science.* 1033-1037:249.
15. Burnashev, N. Khodorova, A. Jonas, P. Helm, P.J. Wisden, W. Monyer, H. and Seeburg, P. 1992. Calcium-permeable AMPA-KA receptors in fusiform cerebellar glial cells. *Science.* 256:1566-1570.
16. Cameron, R. S. and Rakic, P. 1991. Glial cell lineage in the cerebral cortex: a review and synthesis. *Glia.* 4(2):124-137.
17. Carvalho, A. Kameyama, K. and Huganir, R. L. 1999. Characterization of Phosphorylation sites on the glutamate receptor 4 subunit of the AMPA receptors. *The J. Neurosci.* 19(12):4748-4754.

18. Ciabarra, A. M. Sullivan, J. M. Gahan, L. Pecht, G. Heinemann, S. and Sevarino, K. 1995. Cloning and characterization of chi-1: a developmentally regulated member of a novel class of the ionotropic glutamate receptor family. *J. Neurosci.* 15:498-508.
19. Cid, M. and Ortega, A. 1993. Glutamate stimulates [3H] phorpol 12,13-dibutyrate binding in cultured Bergmann glia cells. *Eur. J. Pharmacol.* 243:51-54.
20. Collingridge, G.L. and Bliss, T.V.P. 1987. NMDA receptors-their role in long-term potentiation. *TINS* 10:288-93.
21. Condorelli, D. F. Dell'Albani, P. Amico, C. Kaczmarek, L. Nicoletti, F. Lukasiuk, K. and Stella, A. M. 1993. Introducción de primary response genes by excitatory astroglial cultures. *J. Neurochem.* 60:877-885.
22. Cully, D. F. Vassilatis, D. K. Liu, K. K. Parens, P. Van der Ploeg, L.H.T. Schaeffer, J. M. and Arena, J. 1994. Cloning of an avremectin-sensitive glutamate gated chloride channel from *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 371:707-711.
23. Cunningham, M. D. Ferkany, J. W. and Enna, S. J. 1993. Excitatory amino acid receptors: a gallery of new targets for pharmacological intervention. *Life Sci.* 54(3):135-148.
24. Chen, G. Q. and Gouaux, E. 1997. Overexpression of a glutamate receptor (GluR2) ligand binding domain in *Escherichia coli*: application of a novel protein folding screen. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94(25):13431-6.
25. Chomczynski, P. and Sacchi, M. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162:156-159.
26. Danny, G. Winder, D.G. and Conn, P.J. 1996. Roles of metabotropic glutamate receptors in glial function and glial-neuron communication. *J. Neurosci. Res.* 46:131-137.
27. Eastwood, S.L. McDonald, B. Burnet, P. W. Beckwith, J.P. Kerwin, R.H. and Harrison, P.J. 1995. Decreased expression of mRNAs encoding non-NMDA glutamate receptors GluR1 and GluR2 in medial temporal lobe neurons in schizophrenia. *Brain. Res. Mol. Brain. Res.* 29:211-223.
28. Fonnum, F. 1984. Glutamate: A neurotransmitter in mammalian brain. *J. Neurochem.* 42:1-11.
29. Gallo, V. and Ghiani, A. C. 2000. Glutamate receptors in glia: new cells, new inputs and new functions. Review. *TIPS.* 21:252-258.
30. Gallo, V. Pende, M. Scherer, S. Molne, M. and Wright, D. 1995. Expression and regulation of kainate and AMPA receptors in uncommitted and committed neural progenitors. *Neurochem. Res.* 20:549-560.
31. Gallo, V. Patneau, D.K. Mayer, M.L. and Vaccarino, F.M. 1994. Excitatory amino acid receptors in glial progenitor cells: molecular and functional properties. *Glia.* 11:94-101.
32. Gallo, V. Upson, L.M. Hayes, W.P. Vyklicky, L.J. and Winters, C.A. 1992. Subunit cloning and developmental analysis of a new glutamate receptor subunit isoform in cerebellum. *J. Neurosci.* 12:1010-23.
33. García-Ladona, F.J. Palacios, J.M. Probst, A. Wieser, H.G. and Menood, G. 1994. Excitatory amino acid AMPA receptor mRNA localization in several regions of normal and neurological disease affected human brain. An in situ hybridization histochemistry study. *Brain. Res. Mol. Brain. Res.* 21:75-84.

34. Gasic, P. G. and Hollman, M. 1992. Molecular neurobiology of glutamate receptors. *Annu Rev Physiol.* 54:507-537.
35. Gegelashvili, G. and Schousboe, A. 1997. High affinity glutamate transporters: Regulation of Expression and activity. *Molecular Pharmacology.* 52:6-15.
36. Geiger, J. Melcher, T. Koh, D. S. Sakmann, B. Seeburg, P. Jonas, P. and Monyer, H. 1995. Relative abundance of subunit mRNAs determines gating and Ca<sup>2+</sup> permeability of AMPA receptors in principal neurons and interneurons in rat SNC. *Neuron.* 15:193-204.
37. Gottlieb, M. and Matute, C. 1997. Expression of ionotropic glutamate receptor subunits in glial cell of hippocampal CA1 area following transient forebrain ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 17:290-300.
38. Grosche, J. Matyash, V. Moller, T. Verkhratsky, A. Reichenbach, A. and Kettenmann, H. 1999. Microdomains for neuron-glia interaction: parallel fiber signaling to Bergmann glial cells. *Nat. Neurosci.* 2:139-143.
39. Hampson, D.R. Huang, X.P. Oberdorfer, M.D., Goh, J.W. Aveyung, A. and Wenthold, R.J. 1992. Localization of AMPA receptors in the hippocampus and cerebellum of the rat using an anti-receptor monoclonal antibody. *Neuroscience.* 50:11-22.
40. Hansson, E. and Rönnbäck, L. 1995. Astrocytes in glutamate neurotransmission. *FASEB J.* 9(5):343-350.
41. Hollman, M. and Heinemann, S. 1994. Cloned glutamate receptors. *Annu Rev Neurosci.* 17:31-108.
42. Hollman, M. O'Shea-Greenfield, A. Rogers, S. W. and Heinemann, S. 1989. Cloning by functional expression of a member for the glutamate receptor family. *Nature.* 342:643-648.
43. Hollmann, M. Hartley, M. and Heinemann, S. 1991. Ca<sup>2+</sup> permeability of KA-AMPA gated glutamate receptor channels depends on subunit composition. *Science.* 252:851-853.
44. Inagaki, N. Kuromi, H. Gonoji, T. Okamoto, Y. Ishida, H. Seino, Y. Kaneko, T. Iwanaga, T. and Seino, S. 1995. Expression and role of ionotropic glutamate receptors in pancreatic islet cells. *FASEB J.* 9:689-691.
45. Inoue, K. Sakaitani, M. Shimada, S. and Tohyama, M. 1995. Cloning and expression of a bovine glutamate transporter. *Mol. Brain Res.* 28:343-348.
46. Ishii, T. Moriyoshi, K. Sugihara, H. Sakurada, H. Kadotani, M. Yokoi, C. Akazawa, R. Shigemoto, N. Mizuno, M. and Masu. 1993. Molecular characterization of the family of the N-methyl-D-aspartate receptor subunits. *J. Biol. Chem.* 268:2836-2843.
47. Jayaraman, V. Keesey, R. and Madden, D. R. 2000. Ligand-Protein Interactions in the Glutamate Receptor. *Biochem.* 39(30):8693-8697.
48. Jonas, P. Racca, C. Sakmann, B. Seeburg, P.H. and Monyer, H. 1994. Differences in the Ca<sup>2+</sup> permeability of AMPA type glutamate receptor channels in neocortical neurons caused by differential GluR-B subunit expression. *Neuron.* 12:1281-1289.
49. Kaczmarek, L. 1993. Glutamate receptor-driven gene expression in learning. *Acta Neurobiol. Exp.* 53:187-196.
50. Kagami, I. Mizunuma, H. Miyamoto, S. Ibuki, Y. and Uchida, T. 1996. Quantification of estrogen receptor messenger RNA by quantitative polymerase



- chain reaction using internal standard fragment. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 228:358-364.
51. Keinänen, K. Wisden, W. Sommer, B. Werner, P. Herb, A. Verdoon, T. A. Sakmann, B. and Seeburg, P. 1990. A family of AMPA-selective glutamate receptors. *Science* 249:556-560.
  52. Kettenmann, H. 1996. Beyond the neuronal circuitry. *Trends Neurosci.* 19:305-306.
  53. Komuro, H. and Rakic, P. 1993. Modulation of neuronal migration by NMDA receptors. *Science.* 260:95-97.
  54. Kutsuwada, T. Kashiwabuchi, N. Mori, H. Sakmura, K. Kushiya, E. Araki, K. Meguro, H. Masaki, H. Kumanishi, T. Arakawa, M. and Mishina, M. 1992. Molecular diversity of the NMDA receptor channel. *Nature.* 358:36-41.
  55. Kuusinen, A. Arvola, M. and Keinänen, K. 1995. Molecular dissection of the agonist binding site of an AMPA receptor. *EMBO J.* 14:6327-32.
  56. Lambolez, B. and Rossier, J. 2000. Quantitative RT-PCR. *Nat. Biotechnol.* 18:5.
  57. Lambolez, B. Audinat, E. Bochet, P. Crépel, F. and Rossier, J. 1992. AMPA receptor subunits expressed by single Purkinje cells. *Neuron.* 9:247-258.
  58. Lampinen, M. Pentikainen, O. Johnson, M. S. and Keinänen, K. 1998. AMPA receptors and bacterial periplasmic amino acid-binding proteins share the ionic mechanism of ligand recognition. *EMBO J.* 17(16):4704-11.
  59. Lauder, J. M. 1993. Neurotransmitters as growth regulatory signals: role of receptors and second messengers. *Trends Neurosci.* 16:233-240.
  60. Lee, S. C. Collins, M. Vanguri, P. and Shin, M. L. 1992. Glutamate differentially inhibits the expression of class II MHC antigens on astrocytes cultured from rat cortex. *J. Immunol.* 148:3391-3397.
  61. Lerea, L.S. 1996. Glutamate receptors and gene induction: signalling from receptors to nucleus. *Cell. Signal.* 9:219-226.
  62. Lin, H. L. and Murphy, S. 1997. Regulation of astrocyte nitric oxide synthase type II expression by ATP and glutamate involves loss of transcription factor binding to DNA. *J. Neurochem.* 64:612-616.
  63. Lomeli, H. Mosbacher, J. Melcher, T. Höger, T. Geiger, J.R.P. Kuner, T. Monyer, H. Higuchi, M. Bach, A. and Seeburg, P.H. 1994. Control of kinetic properties of AMPA receptor channels by nuclear RNA editing. *Science.* 266:1709-1713.
  64. López, T. 1997. Regulación de la expresión de receptores a ácido Glutámico. Tesis Doctoral. CINVESTAV-IPN. México.
  65. López, T. López-Colomé, A. M. and Ortega, A. 1997. NMDA receptors in cultured radial glia. *FEBS Lett.* 405(2):245-248.
  66. López, T. López-Colomé, A. M. and Ortega, A. 1998. Changes in GluR4 expression induced by metabotropic receptor activation in radial glia cultures. *Mol. Brain Res.* 58:40-46.
  67. López, T. López-Colomé, A.M. and Ortega, A. 1994. AMPA/KA receptor expression in radial glia. *NeuroReport.* 5:504-506.
  68. López-Colomé, A. M. Murbartián, J. and Ortega, A. 1995. Excitatory amino acid-induced AP-1 DNA binding activity in Müller glia. *J. Neurosci. Res.* 1:179-184.
  69. López-Colomé, A. M. and Ortega, A. 1997. Activation of p42 mitogen-activated protein kinase by glutamate in cultured radial glia. *Neurochem. Res.* 22:679-685.

70. López-Colomé, A. M. Ortega, A. Fragoso, G. and Trueba, E. 1997. Excitatory amino acid receptors coupled to the phosphoinositide pathway in Bergmann glia. *Neurochem. Res.* 22:305-312.
71. López-Colomé, A. M. Ortega, A. and Romo-de-Vivar, M. 1993. Excitatory amino acid-induced phosphoinositide hydrolysis in Müller glia. *Glia*. 9:127-135.
72. López-Colomé, A. M. and Romo-de-Vivar, M. 1991. Excitatory amino-acid receptors in primary cultures of glial cells from the retina. *Glia*. 4:431-439.
73. Mack, K.J. Krieglner, S. Chang, S. and Chiu, S.Y. 1994. Transcription factor expression is induced by axonal stimulation and glutamate in the glia of the developing optic nerve. *Mol Brain. Res.* 23:73-80.
74. Maricq, A. Peckol, E. Driscoll, M. and Bargmann, C. 1995. Mechanosensory signalling in *C. elegans* mediated by the GLR-1 glutamate receptor. *Nature*. 378:78-81.
75. Matin, D. 1992. Synthesis and release of neuroactive substances by glial cells. *Glia*. 5:81-94.
76. Mattson, M.P. Lee, R.E. Adams, M.E. Guthrie, P.B. and Kater, S.B. 1998. Interactions between entorhinal axons and target hippocampal neurons: a role for glutamate in the development of hippocampal circuitry. *Neuron*. 1:865-876.
77. McDonald, J.W. and Johnston, M.V. 1990. Physiological and pathophysiological roles of excitatory amino acids during central nervous system development. *Brain Res. Rev.* 15:41-70.
78. McNamara, J.O. Eubanks, J.H. McPherson, J.D. Wasmuth, J.J. Evans, G.A and Heinemann, S.F. 1992. Chromosomal localization of human glutamate receptor genes. *J. Neurosci.* 12(7):2555-2562.
79. McPherson, M.J. Quirke, P and Taylor, G.R. PCR: A practical Approach. The practical approach series. Ed. Oirl Press. Oxford University Press. 1991. pp. 253.
80. Monyer, H. Seeburg, P. H. and Wisden, W. 1991. Glutamate-operated channels: developmentally early and mature forms arise by alternative splicing. *Neuron* 6:799-810.
81. Moriyoshi, K. Masu, M. Ishii, T. Shigemoto, R. Mizuno, N. and Nakanishi, S. 1991. Molecular cloning and characterization of the rat NMDA receptor. *Nature*. 354:31-37.
82. Müller, T. Moller, T. Berger, T. Schinitzer, J. and Kettenmann, H. 1992. Calcium entry through kainate receptors and resulting potassium-channel blocked in Bergmann glial cells. *Science*. 256:1563-1566.
83. Murphy, S. and Pearce, B. 1987. Functional receptors for neurotransmitters on astroglial cells. *Neuroscience*. 22:381-394.
84. Nakanishi, S. 1992. Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain function. *Science*. 258:597-603.
85. Newman, E. and Reichenbach, A. 1996. The Müller cell. A functional element of the retina. *Trends Neurosci.* 19:307-312.
86. Nicoll, R. A. Malenka, R. C. and Kauer, J. A. 1990. Functional comparison of neurotransmitter receptor subtypes in mammalian central nervous system. *Physiol. Rev.* 70:513-565.
87. Nicholls, D. and Attwell, D. 1990. The release and uptake of excitatory amino acids. *Pharmacol. Sci.* 11:462-468.

87. Noda, M. Takahashi, H. Tanabe, T. Toyosato, M. Kikuyotani, S. Furutani, Y. Hirose, T. Takashima, H. Inayama, S. Miyata, T. and Numa, S. 1983. Structural homology of *Torpedo californica* acetylcholine receptor subunits. *Nature*. 302(5908):528-32.
88. Ortega, A. Eshhar, N. and Teichberg, V. I. 1991. Properties of kainate receptor / channels on cultured Bergmann glia. *Neuroscience*. 41(2-3):335-349.
89. Otori, Y. Shimada, S. Tanaka, K. Ishimoto, I. Tano, Y. and Tohyama, M. 1994. Marked increase in glutamate-aspartate transporter (GLAST/GLT-1) mRNA following transient retinal ischemia. *Brain Res Mol Brain Res*. 27:310-314.
90. Ottinger, H. P. Gerfin-Moser, A. Del Principe, F. Dutly, F. and Streit, P. 1995. Molecular cloning and differential expression patterns of avian glutamate receptor mRNAs. *J. Neurochem*. 64:2413-2426.
91. Pacliusi, S.R. Gerrard, P. Abdallah, M. Talabot, D. and Catsias, S. 1994. Age-related changes in expression of AMPA-selective glutamate receptors subunits: is calcium-permeability altered in hippocampal neurons. *Neuroscience*. 61:429-433.
92. Paperna, T. Lamed, Y. and Teichberg, V.I. 1996. CDNA cloning of chick brain amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptors reveals conservation of structure, function and post-transcriptional processes with mammalian receptors. *Mol. Brain Res*. 36:101-113.
93. Patneau, D.K. Wright, P.W. Winters, C. Mayer, M.L. and Gallo, V. 1994. Glial cells of the oligodendrocyte lineage express both kainate and AMPA preferring glutamate receptor. *Neuron*. 12:357-371.
94. Pechan, P. A. Chowdhury, K. Gerdes, W. and Seifert, W. 1993. Glutamate induces the growth factors NGF, bFGF, the receptor FGF-R1 and c-fos mRNA expression in rat astrocyte culture. *Neurosci. Lett*. 153:111-114.
95. Pellegrini-Giampietro, D.E. Bennett, M.V.L. and Zukin, R.S. 1991. Differential expression of three glutamate receptor genes in developing rat brain: An in situ hybridization study. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 88:4157-4161.
96. Pérez-Otano, I. McMillian, M.K. Chen, J. Bing, G. Hong, J. S. and Pennypacker, K.R. 1996. Induction of NF- $\kappa$ B-like transcription factors in brain areas susceptible to kainate toxicity. *Glia*. 16:306-315.
97. Petralia, R.S. and Wenthold, R.J. 1992. Light and electron immunocytochemical localization of AMPA-selective glutamate receptors in the rat brain. *J. Comp. Neurol.* 318:329-54.
98. Pffrier, F.W. and Barres, B. 1996. New views on synapse-glia interactions. *Curr Op Neurobiol*. 6:615-621.
99. Pines, G. Danbolt, N. C. Bjaras, M. Zhang, Y. Bendahan, A. Eide, L. Koepsell, H. Storm-Mathisen, J. Seeberg, E. and Kanner, B. 1992. Cloning and expression of a rat brain L-glutamate transporter. *Nature*. 360:464-467.
100. Pollard, H. Heron, A. Moreau, J. Ben-Ari, Y. and Khrestchatskiy, M. 1993. Alterations of the GluR-B AMPA receptor subunit flip-flop expression in kainate-induced epilepsy and ischemia. *Neuroscience*. 57:545-554.
101. Rothstein, J. D. Jin, L. Dykes-Hoberg, M. and Kunczi, R. W. 1993. Chronic inhibition of glutamate uptake produces a model of slow neurotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 90:6591-6595.

103. Rothstein, J. Martin, L. Levey, A. Dykes-Hoberg, M. Jin, L. Wu, D. Nash, N. and Kunczi, R. 1994. Localization of neuronal and glial glutamate transporter. *Neuron*. 13:713-725.
104. Sánchez, G. and Ortega, A. 1994. AMPA/KA receptor induced AP-1 DNA binding activity in cultured Bergmann glia cells. *Neuroreport*. 5(16):2109-12.
105. Schousboe, A. 1981. Transport and metabolism of glutamate and GABA in neurons and glial cells. *Int. Rev. Neurobiol.* 22:1-45.
106. Sommer, B. Keinänen, K. Verdoorn, T.A. Wisden, W. Burnashev, N. Herb, A. Kohler, M. Takagi, T. Sakmann, B. Seeburg, P.H. 1990. Flip and flop: a cell-specific functional switch in glutamate-operated channels of the CNS. *Science*. 249:1580-85.
107. Sommer, B. Kohler, M. Sprengel, R. and Seeburg, P.H. 1991. RNA editing in brain controls a determinant of ion flow in glutamate-gated channels. *Cell* 67:11-19.
108. Steinhäuser, and Gallo, V. 1996. News in glutamate receptors in glial cells. *Trends Neurosci.* 19:339-345.
109. Stern, P. Béhé, P. Schopfer, R. and Colquhoun, D. 1992. Single-channel conductances of NMDA receptors expressed from cloned cDNAs: comparison with native receptors. *Proc. R. Soc. Lond.* 250:271-277.
110. Stern-Bach, Y. Bettler, B. Hartley, M. Sheppard, P. O. O'Hara, P.J. and Heinemann, S.F. 1994. Agonist selectivity of glutamate receptors is specified by two domains structurally related to bacterial amino acid-binding proteins. *Neuron*. 13:1345-57.
111. Tanaka, K. 1993. cloning and expression of a glutamate transporter from mouse brain. *Neuroscience Letters*. 159:183-186.
112. Tanaka, K. 1994. Pharmacological characterization of a cloned rat glutamate transporter (GluT-1). *Mol. Brain Res.* 21:167-170.
113. Thomas, K. L. Davis, S. Laroche, S. and Hunt, S.P. 1994. Regulation of the expression of NR1 NMDA glutamate receptor subunits during hippocampal LTP. *NeuroReport*. 6:119-123.
114. Tsuzuki, K. Lambolez, B. Rossier, J. and Ozawa, S. 2001. Absolute quantification of AMPA receptor subunit mRNAs in single hippocampal neurons. *J. Neurochem.* 77:1650-1659.
115. Van der Neut, R. 1997. Targeted gene disruption: Application to neurobiology. *J. Neuroscience Methods*. 71:19-27.
116. Watkins, J.C. and Evans, R. H. 1981. Excitatory amino acid transmitters. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 11:16204.
117. Wenthold, R. J. Yokotani, N. Doi, K and Wada, K. 1992. Immunohistochemical characterization of the non-NMDA glutamate receptor using subunit-specific antibodies. Evidence for a hetero-oligomeric structure in rat brain. *J. Biol. Chem.* 5:267(1):501-507.
118. Werner, P. Voigt, M. Keinänen, K. Wisden, W. and Seeburg, P.H. 1991. Cloning of a putative high-affinity kainate receptor expressed predominantly in hippocampal CA3 cells. *Nature*. 351:742-44.
119. Wo, Z. G. and Ostwald, E. 1994. Transmembrane topology of two kainate receptor subunits revealed by N-glycosylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91:7154-7158.

120. Yano, S. Fukunaga, K. Takiguchi, M. Ushio, Y. Mori, M. and Miyamoto, E. 1996. Regulation of CCAAT/enhancer-binding protein family members by stimulation of glutamate receptors in cultured cortical astrocytes. *J. Biol Chem.* 271:23520-23527.
121. Zukin, S. and Bennet, M. 1995. Alternatively spliced isoforms of the NMDAR1 receptor subunit. Review. *Trends Neurosci.* 18(7):306-13.