



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

ANÁLISIS MOLECULAR DE UN POSIBLE SITIO
DE FOSFORILACIÓN POR CASEÍNA CINASA II
(CK2) EN LA SUBUNIDAD NR1 DEL RECEPTOR
NMDA EN LA RETINA DEL POLLO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G O

P R E S E N T A :

ALEJANDRO PARRALES BRIONES



DIRECTORA DE TESIS: DRA. ANA MARÍA LÓPEZ COLOMÉ

2007



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ
Jefe de la División de Estudios Profesionales
Facultad de Ciencias
Presente.

Por este medio hacemos de su conocimiento que hemos revisado el trabajo escrito titulado:

“Análisis molecular de un posible sitio de fosforilación por Caseína Cinasa II (CK2) en la subunidad NR1 del receptor NMDA en la retina del pollo”

realizado por **Parrales Briones Alejandro**, con número de cuenta **09710203-6**, quien opta por titularse en la opción **Tesis** en la licenciatura en **Biología**. Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Propietario	Dra.	María Luisa Fanjul Peña	
Propietario	Dra.	Mónica Lamas Gregori	
Tutor(a) Propietario	Dra.	Ana María López Colomé	
Suplente	Dr.	Roberto Coria Ortega	
Suplente	Dr.	León Cintra McGlone	

Atentamente
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Ciudad Univeritaria, D. F., a 5 de marzo del 2007
CONSEJO DEPARTAMENTAL DE BIOLOGIA

DR. ZENÓN CANO SANTANA

FACULTAD DE CIENCIAS



UNIDAD DE ENSEÑANZA
DE BIOLOGIA

Señor sinodal: antes de firmar este documento, solicite al estudiante que le muestre la versión digital de su trabajo y verifique que la misma incluya todas las observaciones y correcciones que usted hizo sobre el mismo.

Esta tesis se llevo a cabo en el departamento de Neurociencias de Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección de la Dra. Ana María López Colomé.

Este trabajo fue parcialmente financiado por los donativos otorgados por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT, proyecto 42640-Q), y por el programa de Apoyo a Proyectos de Investigación en Innovación Tecnológica (PAPIIT, proyecto IN-228203).

Agradecimientos

A la Dra. Ana María López Colomé por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio y por su tiempo dedicado en mi formación profesional.

A la Dra. María Luisa Fanjul Peña, a la Dra. Mónica Lamas Gregori, al Dr. León Cintra McGlone y al Dr. Roberto Coria Ortega por sus valiosas sugerencias y comentarios a este trabajo.

A la Q. F. B. Edith Catalina López Hernández por su excelente apoyo técnico.

Al M. en C. José Prisco Palma Nicolás por su excelente apoyo técnico.

A la Dra. Irene Lee Rivera por su excelente apoyo técnico.

A todos mis compañeros de laboratorio por la excelente convivencia, comprensión y apoyo durante los momentos de trabajo.

Dedicatorias

A mis padres, Abel y Amalia, quienes han compartido conmigo locuras, dificultades, alegrías y mucho amor. Gracias por apoyarme, comprenderme, guiarme y tolerarme, pero sobretodo por darme un hogar y una familia de verdad, ustedes son las columnas de mi persona.

A mi hermano David por mostrarme, muy a su manera, todo el cariño y apoyo que un hermano necesita, gracias por compartir un hogar conmigo y por ser mi amigo.

A Carolina González, por ser un soporte moral y profesional, así como un modelo a seguir; pero más aún por todo el amor, tolerancia y comprensión que me has dado durante los momentos más duros de este trabajo, gracias por ser mi amor.

A mis hermanos de vida Esteban, Omar, Lulú, Erika Arriola y Kika Parrales, ya que todos ustedes han compartido su vida y han estado en algún momento importante conmigo, solo puedo decirles que estoy feliz de “tropezarme” con todos ustedes.

A mi tío Porfirio, quien disfrutará tanto como yo este momento, gracias por ser más que un tío, gracias por ser un segundo padre para mí, por compartir mis locuras y alegrías y sobretodo gracias por ser el Durito.

A mis tíos y primos, todos son parte de lo que soy, todos son mi ejemplo de unión, respeto y alegría por la vida, gracias por ser mi familia.

A la comunidad del anillo (sin mencionar nombres, todos por igual), ya que he crecido profesional y emocionalmente con todos ustedes durante estos últimos años, gracias por incluirme en su/nuestro grupo, solo debo decirles que son estupendos seres humanos.

A todos ustedes muchas gracias por formar parte de mí, todos han generado maravillosas cicatrices en mi memoria, esto es tan suyo como mío, después de todo este choro solo queda decir: ¡por fin lo logramos! Y para la comunidad, ¡hasta yo lo logre!

Índice

Resumen	1
Introducción	2
Estructura de la retina	2
Receptores de Glutamato	4
Receptor de NMDA	5
a) Subunidades de los receptores NMDA	6
b) Subunidad NR1	7
c) Subunidad NR2	7
d) Subunidad NR3	8
e) Diferencias en la composición oligomérica del receptor de NMDA	8
Caseína Cinasa 2 (CK2)	9
Sistemas de señalamiento intracelular acoplados al receptor NMDA	11
Secuencia consenso de reconocimiento para la CK2 en el receptor NMDA	12
Objetivo	14
Materiales y métodos	16
Extracción de ARN de células de retina de pollo	16
RT-PCR de las variantes de NR1	16
Separación, extracción y purificación de los productos de PCR	17
Ligaciones y construcciones	17
Transformación y amplificación de las construcciones	18
PCR de colonia	18
Cultivo de células HEK293	19
Transfección y expresión de las proteínas de fusión Xpress-NR1CT	19
Expresión de CK2 en células HEK293	20
Inmunoprecipitación y coinmunoprecipitación	20
Ensayo de fosforilación de las proteínas de fusión Xpress-NR1CT por CK2	21
Inmunodetección de NR1 y NR2B	21

Resultados	23
1. Obtención de las variantes de expresión del extremo CT de NR1	23
Variantes de expresión del extremo CT de NR1	23
Variantes de expresión ligadas al vector pGEM	23
Liberación de los insertos del vector pGEM	25
2. Construcción de los plásmidos PcDNA-C2 y PcDNA-C3	25
Apertura y linearización del vector PcDNA4	25
Extracción y análisis de las construcciones	26
3. Expresión de las proteínas de fusión Xpress-NR1CT en células HEK293	27
Las células HEK293 expresan CK2 y no expresan NR1	27
Transfección de las construcciones en células HEK293	28
Expresión de las proteínas de fusión Xpress-NR1CT	29
4. Análisis de la interacción entre la secuencia consenso en el cassette C3 de la subunidad NR1 y la CK2	29
Inmunoprecipitación de las proteínas de fusión Xpress-NR1CT	29
Fosforilación	30
Discusión	32
Conclusión	36
Referencias	37

Resumen

El glutamato es el principal neurotransmisor excitador en la retina de los vertebrados y tiene distintos efectos sobre las células postsinápticas debido a la gran variedad de receptores en las membranas neuronales. Entre los receptores ionotrópicos para glutamato, los de N-Metil-D-Aspartato (NMDA) tienen un papel central en la transmisión sináptica en la retina.

Recientemente, nuestro grupo identificó un nuevo cassette producto de empalme alternativo expresado en la región CT de NR1 en el receptor NMDA de la retina de pollo, el cual no está presente en los receptores de mamíferos. Este cassette formado por seis aminoácidos (EETSEH) constituye una secuencia consenso para Caseína Cinasa 2 (CK2). La CK2 es una cinasa de serina/treonina altamente conservada en organismos eucariontes que está presente en gran variedad de tejidos y ampliamente distribuida en el SNC. La CK2 puede interactuar con el receptor NMDA (particularmente con la subunidad NR2B). La CK2 está implicada en los ritmos biológicos, donde la retina tiene un papel central, ya que constituye el nexo entre la señal luminosa externa y el reloj circadiano maestro; esta información es esencial para el correcto funcionamiento de los ritmos endógenos.

En este trabajo se desarrolló un modelo que permite analizar, *in vitro*, la fosforilación de CK2 en proteínas que cuentan con una secuencia consenso para dicha cinasa, tales como el cassette C3 de la subunidad NR1 del receptor NMDA en la retina de pollo. Con el objetivo de analizar la interacción entre la CK2 y el cassette C3 de NR1 se generaron proteínas de fusión que contienen el CT de NR1 con y sin el cassette C3 y un epítipo que permitió inmunoprecipitarlas (Xpress). Las proteínas de fusión se sobreexpresaron en células HEK293 y se probó si coimmunoprecipitan con la CK2 y si esta cinasa las fosforila. El resultado de este estudio demuestra que no existe relación funcional entre la CK2 y el cassette C3 de la subunidad NR1 del receptor NMDA de la retina de pollo, lo que podría deberse principalmente a dos razones: un aminoácido básico (histidina) presente en el cassette C3 y un codón de término después de la secuencia, características que contrastan con lo descrito para sustratos de la CK2.

Introducción

Estructura de la retina

La región fotosensible del ojo es la retina que se localiza en la parte posterior del ojo, a través del cual pasa la luz para proyectar una imagen sobre ella. La córnea y el cristalino enfocan la luz que atraviesa el humor vítreo y llega hasta la retina que se encuentra adosada al Epitelio Pigmentado de la Retina (EPR) que recubre el fondo del ojo.

La retina es un tejido nervioso estratificado, formado por un número reducido de tipos celulares, por lo que se considera un buen modelo para el estudio del sistema nervioso. En la retina existen cinco tipos neuronales: fotorreceptores, células bipolares, células ganglionares, células horizontales y células amacrinas, además de dos clases de células gliales: las células de Müller y los astrocitos. La información se transmite en sentido vertical desde los fotorreceptores hasta las células ganglionares cuyos axones forman el nervio óptico que conduce la información visual hasta los centros superiores de integración. La retina es estratificada y tiene dos capas llamadas plexiforme externa, donde se pasa la información de los fotorreceptores a las células bipolares y plexiforme interna, en la que establecen sinapsis las células bipolares con las ganglionares. Las células horizontales y amacrinas modulan la información que se transmite en las capas plexiforme externa e interna respectivamente. Estos dos tipos celulares son interneuronas inhibitoras que emplean principalmente al ácido γ -aminobutírico (GABA) y a la glicina como neurotransmisores (Rev López-Colomé, 1994; Rev López-Colomé, 1998).

Los fotorreceptores se dividen en dos clases: los conos y los bastones. Los conos se activan sólo con luz brillante e intensa; son los responsables de la visión en color y se subdividen en tres tipos dependiendo el pigmento que poseen, confiriéndoles cada uno de ellos la sensibilidad específica a la luz de cierta longitud de onda. Los bastones poseen un solo pigmento visual, la rodopsina y son los responsables de la visión en la oscuridad. En los fotorreceptores se distinguen dos regiones: el segmento externo que contiene discos de membrana

formados, principalmente, por pigmentos fotosensibles, y el segmento interno, en el que se localizan los organelos celulares así como las terminales sinápticas que conectan con las células bipolares y horizontales. En los conos y bastones se lleva a cabo el fenómeno de la fototransducción que es la transformación de la energía luminosa en energía química que se traduce en la liberación de un neurotransmisor de la terminal sináptica.

Las células ganglionares son las únicas neuronas de la retina que tienen canales de Na^+ sensibles al voltaje y que, por tanto, transmiten su información a larga distancia en forma de potenciales de acción. Los fotorreceptores, las células bipolares, horizontales y amacrinas no poseen canales de Na^+ sensibles al voltaje, y transmiten su información de manera pasiva a través de potenciales graduales; sin embargo, la información alcanza la terminal sináptica sin atenuarse debido a que sus procesos son muy cortos.

Las células gliales de la retina son los astrocitos, semejantes a los de otras regiones del sistema nervioso, y la glía de Müller, un tipo de glía radial que interviene en el mantenimiento del ambiente iónico, en interacciones metabólicas, en la barrera hematorretiniana y en la modulación de la transmisión sináptica entre las neuronas (Rev López-Colomé, 1994; Rev López-Colomé, 1998).

La retina del pollo y de las aves en general, tiene como único tipo de glía la glía de Müller y, a diferencia de la retina de los mamíferos, no contiene astrocitos, los principales participantes en la barrera hematorretiniana, dado que en estas especies la retina es avascular, a diferencia de la de los mamíferos (Rodieck, 1973).

En cuanto al tipo de fotorreceptores, la retina de las aves pertenece al tipo 2 o Pleomórfica (Marc 1982). Las retinas de este tipo son particularmente ricas en conos y presentan dos diferentes morfologías de conos llamadas conos simples y conos dobles. Los conos dobles están formados por dos conos funcionalmente individuales, sujetos por adhesión intracelular, que sólo existen en este tipo de retina. Otra característica de las retinas pleomórficas son las unidades en mosaico, formadas por arreglos de pequeños grupos de conos en unidades repetitivas (Marc, 1982).

Receptores de Glutamato

El L-glutamato es el principal neurotransmisor excitador en el Sistema Nervioso Central de los vertebrados y los efectos que puede provocar en las células post-sinápticas son muy diversos. La gran variedad de acciones que son consecuencia de la liberación del glutamato en la hendidura sináptica están mediadas por la diversidad de receptores presentes en las membranas neuronales y la alta afinidad de los mismos por el glutamato. Los receptores de glutamato se dividen en dos familias principales de acuerdo con su sistema de transducción de señales: los ionotrópicos, forman un canal iónico que permite el paso de cationes a través de la membrana plasmática, mientras que los metabotrópicos están acoplados a proteínas G y activan vías de segundos mensajeros (Rev Michaelis, 1998; Rev Thoreson and Witkovsky, 1999).

Los receptores ionotrópicos se subdividen en tres categorías de acuerdo con su agonista preferente: los que son activados por α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropionato (AMPA), los que tienen como agonista al kainato (KA) y los sensibles a N-metil-D-aspartato (NMDA). Los receptores de las primeras dos categorías se conocen como no-NMDA y su principal característica es ser sólo permeables a cationes monovalentes, aunque ciertas combinaciones de subunidades pueden permitir el paso de Ca^{2+} (Rev López-Colomé, 1998). La activación de estos canales tiene como consecuencia la despolarización de la membrana mediante la entrada de Na^+ y, a diferencia de los NMDA, su actividad es independiente de voltaje. Genera una respuesta rápida pero de corta duración. Los receptores de tipo AMPA tienen como agonista preferente al AMPA pero también responden al quisqualato (QA); sus antagonistas competitivos son el dietil éster del glutamato (GDEE), la ciano-nitroquinoxalina (CNQX) y la dinitroquinoxalina (DNQX), mientras que los no competitivos son la toxina de la araña Joro (JSTX) y las 2,3-benzodiazepinas GYKI 52466 y GYKI 53655, siendo estos dos últimos compuestos inhibidores específicos de los receptores de AMPA. Los receptores de KA tienen como agonista preferente al KA aunque también son activados por el domoato y los ácidos acromélicos A y B; los inhibidores CNQX y

DNQX también bloquean los receptores de KA (Rev Michaelis, 1998; Rev Thoreson and Witkovsky, 1999).

Los receptores metabotrópicos de glutamato, los cuales están acoplados a proteínas unidas a GTP, poseen siete segmentos transmembranales y el sitio de unión específica para el glutamato se localiza en el extremo amino terminal extracelular (Rev Yang, 2004). Actualmente se reconocen ocho diferentes subtipos, agrupados en tres grupos de acuerdo con la homología de su secuencia, su mecanismo de transducción y sus agonistas selectivos (Rev Nakanishi et al., 1998). Los receptores del primer grupo están acoplados a la fosfolipasa C (PLC), cuya activación lleva a la formación de inositol-1,4,5-trifosfato (IP_3) y diacilglicerol (DAG) a partir de L-3-fosfatidilmioinositol-4,5-biofosfato (PIP_2): el IP_3 aumenta los niveles de Ca^{2+} intracelular mediante su liberación del retículo endoplásmico, mientras que el DAG activa a la proteína cinasa C (PKC); el agonista más potente para este grupo es el quisqualato. Los receptores del segundo grupo activan a la adenilil ciclasa (AC) y por lo tanto aumentan la síntesis de 3'5'-adenosin monofosfato cíclico (cAMP), un importante mensajero intracelular; al parecer no están acoplados directamente a proteínas G y su agonista general es el trans-1-aminociclopentano-1,3-dicarboxilato (ACPD). Un tercer grupo se caracteriza por inhibir la actividad de la AC por medio de la interacción directa con las proteínas G sensibles a la toxina pertusis (PTX) y causar la disminución en los niveles de cAMP; su agonista mas potente es el L-2-amino-4-fosfonobutirato (2-AP4) (Rev Michaelis, 1998; Rev Yang, 2004).

Receptor de NMDA

Los receptores del tipo NMDA, además de permitir el paso de cationes monovalentes, son permeables al Ca^{2+} . El receptor de NMDA provee una ruta importante de entrada de Ca^{2+} , el cual puede interactuar con enzimas intracelulares y juega un papel clave en las funciones neuronales tales como la potenciación a largo plazo y la regulación génica (Rev Michaelis, 1998); su respuesta es dependiente del voltaje y, por tanto, lenta y sostenida. El complejo del receptor de NMDA tiene seis sitios de regulación específicos: el sitio de unión

para el L-glutamato, su agonista NMDA y sus antagonistas competitivos el ácido 2-amino-7-fosfonoheptanoico (AP7) y el ácido 2-amino-5-fosfonopentanoico (AP5); un sitio alostérico positivo para glicina y su agonista D-serina; un sitio de unión para un catión divalente en el interior del canal al que fisiológicamente une el Mg^{2+} y que confiere al receptor la actividad dependiente de voltaje; otro sitio de unión para un catión divalente en el exterior del canal que funciona como modulador positivo ocupado comúnmente por el Zn^{2+} ; un sitio en el canal con el que interactúan los anestésicos disociativos fenilciclidina y ketamina además del 5-metil-10,11-dehidro-5H diibenzo ciclohepten-5,10-imina (MK801) como inhibidores; y un sitio alostérico intracelular al que se unen las poliaminas como la espermidina, el cual se inhibe con ifenprodil (Rev Thoreson and Witkovsky, 1999).

a) Subunidades de los receptores NMDA

Los receptores de NMDA son proteínas hetero-oligoméricas formadas por cuatro subunidades: dos subunidades NR1 en combinación con al menos un tipo de la subunidad NR2, mientras que la recientemente descrita NR3 puede unirse con el complejo formado por NR1/NR2 y parece ser la responsable de regular su función (Rev Thoreson and Witkovsky, 1999).

Se conocen ocho variantes postranscripcionales de la subunidad NR1 (a-h) codificadas por un solo gen, y cuatro subtipos de la subunidad NR2 (A-D), codificadas por cuatro genes distintos. Existen además dos variantes de NR3 (A y B) que son producto de dos genes distintos. La expresión diferencial de variantes de NR1 por corte y empalme alternativo, la expresión de los distintos tipos de NR2, así como el ensamble del complejo del receptor tiene como consecuencia la composición regional específica de los distintos receptores de NMDA en el Sistema Nervioso, sus propiedades funcionales y la gama de respuestas diferenciales al L-glutamato identificadas en los diferentes tipos neuronales y períodos del desarrollo (Das et al., 1998; Herin and Aizenman, 2004; Rev Michaelis, 1998). Las propiedades del receptor de NMDA más afectadas por su composición oligomérica son: la afinidad por ligandos exógenos y endógenos, la inhibición por protones y el bloqueo por cationes divalentes. El tipo de

subunidades incluidas en los receptores del tipo NMDA afecta, asimismo, su interacción con proteínas intracelulares con función metabólica y estructural y por lo tanto, su anclaje, estabilidad y permanencia en la membrana (Rev Cull-Candy et al., 2001).

b) Subunidad NR1

Aunque la influencia del tipo de subunidad NR2 sobre las propiedades del complejo del receptor de NMDA han sido más estudiadas, las propiedades producto de las distintas variantes de corte y empalme alternativo de NR1 influyen de manera importante en la función del receptor. Un ejemplo de esto es la sensibilidad al pH, que está determinada por la presencia del exón 5 en el extremo amino terminal de NR1. La presencia del exón 5 genera que los receptores que contienen estas isoformas no puedan ser inhibidos por el Zn^{2+} y tampoco potenciados por poliaminas (Traynelis et al., 1998; Traynelis et al., 1995). Las propiedades de inactivación del receptor parecen relacionarse, asimismo, con la presencia del exón 5 en esta subunidad (Rumbaugh et al., 2000). Los receptores homoméricos formados por subunidades NR1 forman un canal funcional cuyas propiedades difieren de las observadas “*in vivo*” o en un receptor heteromérico; principalmente, son menos sensibles al bloqueo del canal por el Mg^{2+} .

Otra propiedad importante relacionada con las subunidades NR1 es la afinidad por el coagonista glicina, ya que las moléculas de este aminoácido se unen a la subunidad NR1, mientras que el glutamato se une con alta afinidad a NR2 (Anson et al., 1998; Anson et al., 2000; Kuryatov et al., 1994; Laube et al., 1998).

c) Subunidad NR2

Los receptores homoméricos formados únicamente por subunidades NR2 no son funcionales, sin embargo esta subunidad influye de forma importante en algunas propiedades del receptor NMDA, como la afinidad por el glutamato y el tiempo de decaimiento de la corriente post-sináptica excitadora mediada por el receptor de NMDA (Anson et al., 1998; Anson et al., 2000; Laube et al., 1998).

Las propiedades que se relacionan más directamente con el tipo de subunidad NR2 incluida el receptor de NMDA son la conductancia y el bloqueo por Mg^{2+} extracelular; los receptores que contienen NR2A o NR2B son más sensibles al bloqueo por Mg^{2+} , mientras que los receptores NMDA que contienen NR2C o NR2D son menos sensibles al Mg^{2+} extracelular (Rev Cull-Candy et al., 2001).

Las propiedades farmacológicas del receptor de NMDA también dependen del tipo de subunidad NR2 contenida en el complejo. Estudios recientes demuestran que existen numerosos agonistas y antagonistas que son selectivos para la composición del receptor, principalmente influidos por el tipo de NR2 que contenga el receptor (Rev Cull-Candy et al., 2001).

d) Subunidad NR3

La subunidad NR3 fue identificada recientemente y parece regular la función de los receptores de NMDA, ya que al unirse al complejo formado por NR1 y NR2, tiene efectos directos sobre la conductancia del receptor, afectando principalmente la permeabilidad al Ca^{2+} (Rev Cull-Candy et al., 2001).

d) Diferencias en la composición oligomérica del receptor de NMDA

Las subunidades que componen el receptor de NMDA varían en los diferentes estadios del desarrollo embrionario. Los cambios en la expresión de los distintos tipos de NR2 a lo largo del desarrollo del Sistema Nervioso Central demuestran la importancia funcional que tienen los diferentes ensamblajes de subunidades del receptor de NMDA. Está bien establecido que en estados tempranos del desarrollo embrionario (DE) las subunidades NR2B y NR2D se expresan más ampliamente en las regiones del cerebro, mientras que en estados más avanzados del DE predomina la expresión de NR2A y NR2C, lo cual se ha propuesto como un mecanismo para el establecimiento de redes sinápticas (inicialmente) y el posterior refinamiento en la comunicación sináptica (Rev Cull-Candy et al., 2001).

La expresión diferencial de los subtipos de receptores NMDA no es exclusiva de los distintos estados del desarrollo embrionario, ya que difiere entre

las distintas áreas del Sistema Nervioso así como en distintas regiones de una misma célula y se modifica en procesos como la plasticidad neuronal y la Potenciación a Largo Plazo (LTP). La composición heteromérica (y por lo tanto su función) de los receptores NMDA varía tanto en el tiempo como en el espacio; más aún, se sabe que los receptores que contienen NR2B son más permeables a Ca^{2+} (requerido para proliferación, crecimiento axonal, plasticidad, etc.) y predominan en estadios tempranos del desarrollo, mientras que los receptores con NR2A son menos permeables a Ca^{2+} y se inactivan rápidamente, lo cual es consecuente con la idea de que los receptores que contienen NR2A permiten una comunicación más refinada y se localizan mayoritariamente en la región sináptica (Cull-Candy et al., 1998).

Caseína cinasa 2 (CK2)

La caseína cinasa 2 es una fosfotransferasa de serina y treonina multifuncional, ampliamente conservada entre los organismos eucariontes, que fosforila, preferentemente, a proteínas ácidas como la caseína y la fosvitina. Una propiedad sumamente importante y característica de la CK2 es que puede utilizar ATP, además de GTP como donadores de fosfato, lo cual permite distinguirla de la caseína cinasa I y de la mayoría de las cinasas (Rev Blanquet, 2000; Rev Pinna, 1990; Sarno et al., 2002).

La CK2 es una enzima oligomérica de peso molecular entre 130 y 150 kDa, formada por cuatro subunidades llamadas α , α' , β y β' , producto de cuatro genes distintos con un alto grado de conservación evolutiva. Las subunidades α son catalíticas y tienen una actividad constitutiva alta, mientras que las β no son activas y regulan la actividad de las subunidades α por medio de la autofosforilación de la holoenzima, además de que confieren especificidad a la subunidad α , ψ estabilidad al complejo enzimático (Rev Blanquet, 2000).

En la actualidad se conocen más de 200 proteínas blanco para la fosforilación por CK2, implicadas en una amplia variedad de funciones celulares. La actividad de la CK2 se considera vital para la célula, por lo que la visión general en torno a esta enzima es que siempre está activa. La CK2 se localiza

predominantemente en el núcleo, aunque también se ha identificado en el citoplasma. Su localización nuclear y su elevada concentración en células desdiferenciadas y tumorales sugiere una función importante de esta cinasa en la proliferación celular. La función de la CK2 se inhibe específicamente por la heparina y el 2,3-difosfoglicerato (Rev Blanquet, 2000; Sarno et al., 2002).

La CK2 es más abundante en el tejido nervioso que en cualquier otro tejido y su ubicación dentro de las neuronas va desde el núcleo hasta la terminal sináptica por lo que se ha sugerido que tiene importantes implicaciones en el desarrollo del sistema nervioso, la plasticidad neuronal, la transmisión sináptica y la sobrevivencia. La estimulación por las neurotrofinas sobre la CK2, nuevamente sugiere que esta cinasa juega un papel muy importante en el sistema nervioso. La fosforilación de otras cinasas de gran importancia en sistema nervioso como la PKC y la PKA por la CK2 sugiere que, de manera indirecta, podría estar implicada en la regulación de la neurotransmisión y potenciación a largo plazo.

Recientemente se ha observado que la liberación de Ca^{2+} de compartimentos intracelulares favorece la activación de la CK2; aunque aún no se conoce el mecanismo, esto sugiere que variaciones de la concentración intracelular de Ca^{2+} podrían determinar una compartimentalización y un control microambiental de la actividad de la CK2 (Rev Blanquet, 2000).

Una prueba más de que la CK2 tiene gran importancia en el sistema nervioso es su capacidad para regular la transmisión sináptica mediante la fosforilación de receptores ionotrópicos. La fosforilación por la CK2 potencia la actividad de los receptores de NMDA, y aumenta el tiempo de apertura del canal mediante la inhibición de la calcineurina, la principal enzima implicada en la desfosforilación del receptor (Lieberman and Mody, 1999). Asimismo la CK2 puede regular la función de los canales de K^+ del subtipo Kv3.1 y potencia la amplitud y disminuye el rango de desensibilización en la respuesta del receptor-canal de serotonina ($5\text{-HT}_3\text{R}$) (Jones and Yakel, 2003; Macica and Kaczmarek, 2001).

Especial interés ha recibido la participación de la CK2 en la regulación de proteínas elementales en el control del ciclo celular y los ritmos circadianos, en

los que la retina juega un papel sumamente importante en la entrada de la información externa hacia el reloj maestro que, a pesar de presentar oscilaciones endógenas, requiere de información externa (generalmente luz) para sincronizar el reloj interno con los ciclos ambientales y mantener el funcionamiento correcto del reloj.

Al respecto, se ha demostrado la gran importancia de la CK2 en el mantenimiento de los ritmos circadianos en varias especies. Se ha sugerido que la CK2 puede actuar en el citoplasma y en el núcleo y que su participación en el mantenimiento de los ritmos circadianos se lleva a cabo a través de la fosforilación de factores de transcripción claves para el reloj, lo que podría promover su translocación al núcleo y la permanencia en el mismo (Akten et al., 2003).

Sistemas de señalamiento intracelular acoplados al receptor NMDA

La activación del receptor de NMDA tiene una gran cantidad de efectos diversos debido no sólo a la entrada de Ca^{2+} a través del canal sino también a la activación de varios sistemas de señalamiento intracelular, acoplados al receptor mediante la interacción con un gran número de proteínas. Alrededor de 70 proteínas han sido relacionadas con el receptor de NMDA (Husi et al., 2000), entre las cuales se cuentan subunidades de otros receptores, proteínas que forman parte de vías de señalamiento intracelular o proteínas de anclaje a la membrana, así como adaptadores al citoesqueleto.

Las interacciones del receptor de NMDA con proteínas de anclaje y señalamiento en el interior de la célula se establecen mediante el extremo carboxilo terminal que se localiza en el compartimiento intracelular de la membrana en todas las subunidades que conforman este receptor. Algunas de estas interacciones son a través de dominios PDZ (PSD95/Discs large/Zona occludens-1(Husi et al., 2000).

Entre las proteínas que interactúan directamente con el receptor NMDA a través de los dominios PDZ se conocen PSD-95 (densidad post-sináptica 95), PSD-93 y SAP102 (proteína asociada a la sinapsis con peso molecular de 102 KDa). PSD-95, PSD-93 y SAP102 se unen directamente a secuencias específicas

en el extremo carboxilo terminal de la subunidad NR2 que pueden interactuar con los dominios PDZ y reciben el nombre de ligandos PDZ. Esto permite la intervención de las proteínas de la familia PSD-95 en la regulación del tráfico del receptor NMDA, su localización, la potenciación de su expresión en la superficie de la membrana y la inhibición de su internalización, lo que favorece el anclaje del receptor en la membrana plasmática (Chung et al., 2004); además, son responsables de llevar a la proximidad del receptor una importante cantidad de proteínas implicadas en rutas de segundos mensajeros (quinasas, fosfatasas y GTPasas; (Husi et al., 2000).

Una de las vías acopladas al receptor de NMDA que más atención ha recibido en los últimos años es la de Ras y sus efectores, los componentes de la vía de las MAPK (cinasa de proteínas activadas por mitogenos), los cuales están implicados en el control de la embriogénesis, diferenciación y proliferación celular, así como apoptosis. Además de la vía de las MAPKs existen otras vías de segundos mensajeros que están acopladas a la activación del receptor NMDA, entre las que destacan cinasas de Serina/Treonina como la PKA (proteína cinasa A), PKC (proteína cinasa C), CamKII (cinasa dependiente de Ca²⁺-Calmodulina II), así como la cinasa de Tirosina Src (Husi et al., 2000; Rev Pearson et al., 2001); fosfatasas como la Calcineurina y las fosfatasas 1 y 2A (PP1 y PP2A); la producción de Oxido Nítrico debido a la activación de la NOS (sintasa del oxido nítrico) y la regulación de factores transcripcionales como CREB (proteína de unión al elemento de respuesta cAMP; (Rev Hardingham and Bading, 2003; Husi et al., 2000; Rev Pearson et al., 2001; Rameau et al., 2003).

Secuencia consenso de reconocimiento para la CK2 en el receptor NMDA

Una de las interacciones de mayor importancia del receptor NMDA es la que tiene con PSD-95. Sorpresivamente, esta interacción está mediada por la CK2, una cinasa que hasta hace poco tiempo no se relacionaba directamente con el complejo del receptor. La subunidad NR2B tiene una secuencia consenso de reconocimiento para la CK2, la cual promueve la fosforilación de la serina 1480 de NR2 por CK2. La serina 1480 se ubica en la región del ligando PDZ del extremo

carboxilo terminal de NR2. La fosforilación en la serina 1480 evita la unión del dominio PDZ de las proteínas de la familia de PSD-95 con el ligando PDZ de NR2B. Dado que la interacción entre PSD95 y NR2B inhibe la internalización del receptor NMDA, la fosforilación de la serina 1480 de la subunidad NR2B promueve la internalización de los receptores NMDA. Esta secuencia constituye el primer sitio de fosforilación descrito para la CK2 dentro de las subunidades del receptor NMDA (Chung et al., 2004).

Recientemente, nuestro grupo ha identificado la expresión de una nueva variante de empalme alternativo de la subunidad NR1 del receptor de NMDA en la retina de pollo, que contiene una secuencia consenso de reconocimiento para la CK2, formada por seis aminoácidos (EETSEH (Lee-Rivera et al., 2003). Estudios anteriores han demostrado que la CK2 puede fosforilar al receptor de NMDA en el hipocampo de rata y de esta manera potenciar el tiempo de apertura del canal (Lieberman and Mody, 1999).

La evidencia descrita anteriormente permite proponer la existencia, en la retina, de nuevos mecanismos de transducción de señales acoplados al receptor NMDA, que no han sido descritos en otras regiones del Sistema Nervioso.

Objetivo

La heterogeneidad de los receptores sinápticos existentes en la retina juega un papel preponderante en la generación y mantenimiento de las funciones de las neuronas; entre ellos, los receptores NMDA juegan un papel fundamental debido a que el glutamato es el principal neurotransmisor excitador empleado por las neuronas en el SNC. Los receptores de NMDA son fundamentales tanto durante el desarrollo del sistema visual como en el procesamiento de la información visual en la retina diferenciada. Los receptores de NMDA son proteínas hetero-oligoméricas formadas por distintos tipos de las subunidades NR1, NR2 y NR3. La inclusión de los distintos subtipos de subunidades puede afectar las propiedades del receptor, así como la interacción de éste con distintas proteínas intracelulares que regulan su localización, anclaje y mantenimiento en la membrana celular.

Recientemente en nuestro laboratorio se identificó un variante de empalme alternativo que contiene un cassette (C3) con una secuencia consenso para la CK2 que es expresada en la retina de pollo, la cual no está presente en el ratón ni en ningún otro mamífero. Dicha secuencia consenso esta formada por seis aminoácidos (EETSEH).

La CK2 es una cinasa de serina/treonina altamente conservada en organismos eucariontes que puede usar ATP y GTP como donadores de fosfato. La CK2 es altamente expresada en el SNC y puede fosforilar la subunidad NR2 del receptor de NMDA afectando el tráfico y expresión en la membrana del receptor. La CK2 esta implicada en distintos fenómenos tales como los ritmos circadianos, en los que la retina tiene un papel central debido a que es el nexo entre la señal externa (fótica principalmente) y el reloj circadiano maestro.

La presencia de esta secuencia consenso para la CK2 en el extremo CT de la subunidad NR1 difiere de lo previamente descrito en el CNS y sus implicaciones fisiológicas son desconocidas. Es posible que esta secuencia recientemente descrita este implicada en una vía no descrita previamente, la cual regule de manera circadiana la transducción de la información fótica de la retina al CNS dependiente de los receptores NMDA.

Por todo lo anterior es importante determinar si la secuencia consenso para CK2 presente en el extremo CT de la subunidad NR1 del receptor NMDA delimita un sitio de fosforilación y, de ser así, que repercusiones podría tener dicha fosforilación en las propiedades del receptor; es por esto que el objetivo de este trabajo fue:

Desarrollar un modelo que permita evaluar si, en condiciones fisiológicas, existe una relación funcional entre la Caseína Cinasa 2 (CK2) y la secuencia consenso para reconocimiento de esta cinasa incluida en el extremo carboxilo terminal de la subunidad NR1 en el receptor NMDA de la retina de pollo.

Materiales y métodos

Extracción de ARN de células de retina de pollo

Para la extracción del ARN total se utilizó Trizol (Invitrogen) de acuerdo con las especificaciones del fabricante. Se extrajo la retina de pollos de tres días post-eclosión y se colocó en un homogenizador con Trizol. Se recolectó el homogenizado de las retinas y se procesó de acuerdo con el protocolo del fabricante. El ARN se almacenó a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso.

RT-PCR de las variantes de NR1

La retrotranscripción de las variantes del extremo carboxilo terminal (CT) de NR1 se realizó utilizando hexámeros de nucleótidos al azar. El ARN total se incubó con los hexámeros a $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 10 minutos y la síntesis del ADN copia se realizó con 100 Unidades de la transcriptasa reversa del Virus de Leucemia Murina de Moloney (MMLV-RT, Invitrogen), 1mM de cada dNTP, 10 U de inhibidor de RNAsas (RNase out, Invitrogen) y el buffer recomendado por el fabricante (Tris-HCl 50 mM, pH 8.3, KCl 75 mM, MgCl_2 3 mM, ditioneitol 10 mM, DTT); todo esto se incubó por 60 minutos a $42\text{ }^{\circ}\text{C}$. La MMLV-RT se inactivó incubando la reacción a $75\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 15 minutos. Después de la síntesis del ADN copia las muestras se incubaron a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 30 minutos con 0.2 U de RNasa H (Invitrogen). El ADN copia producto de la reacción se utilizó para llevar a cabo la PCR con los oligonucleótidos específicos para el extremo CT de NR1 (5'-GAUGGAUGGCAGUACGUCAG-3' y 5'-CTTGGGTGAGGTATCAGGAGTG-3'). Para la reacción de PCR se utilizó 2.5 U de Taq Polimerasa recombinante (Invitrogen), 0.4 mM de cada oligonucleótido, 0.4 mM de cada dNTP, 1.66 mM de MgCl_2 y el buffer recomendado por el fabricante (Tris-HCl 20 mM, pH 8.4, KCl 50 mM). Para la amplificación las muestras se sometieron a $94\text{ }^{\circ}\text{C}$, 2 minutos y posteriormente a 35 ciclos con el protocolo siguiente: $94\text{ }^{\circ}\text{C}$, 30 segundos; $56\text{ }^{\circ}\text{C}$, 30 segundos y $72\text{ }^{\circ}\text{C}$, 45 segundos y finalmente a una elongación de 10 minutos a $72\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Separación, extracción y purificación de los productos de PCR.

Los productos de PCR se separaron en un gel de agarosa y las variantes se cortaron, se extrajeron del gel y se purificaron con el Kit III GeneClean (Q-Biogen) de acuerdo con las indicaciones del fabricante. Las variantes del extremo CT de NR1 se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

Ligaciones y construcciones.

El vector seleccionado para la clonación de las variantes del extremo carboxilo terminal fue pGEM-T Easy Vector Systems (Promega, figura 1A). La ligación del vector y las variantes del extremo CT de NR1 se llevó a cabo según las indicaciones del fabricante. Las dos variantes de expresión mostradas en la figura 2B fueron seleccionadas para ser clonadas. Las construcciones se almacenaron a -20 °C hasta su uso. Posteriormente los insertos (CT de NR1) se extrajeron del vector pGEM mediante una digestión con la enzima de restricción Not I (Invitrogen). La digestión se hizo según el protocolo del fabricante. Los insertos se separaron en un gel de agarosa y se purificaron con el Kit III GeneClean (Q-Biogen). Los insertos se clonaron posteriormente en el vector PcDNA4 His Max (Invitrogene, figura 1B). Las construcciones se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

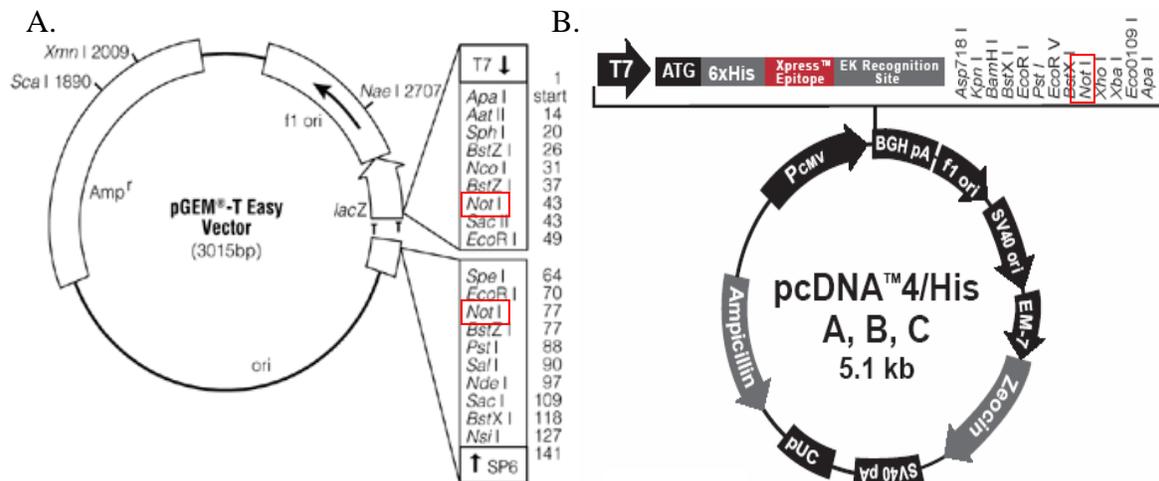


Fig. 1. Mapas de los vectores usados para clonar las variantes del extremo carboxilo terminal de la subunidad NR1. En los mapas se muestran las enzimas de restricción utilizadas para extraer el inserto del vector pGEM y clonarlo en el vector PcDNA (recuadros rojos).

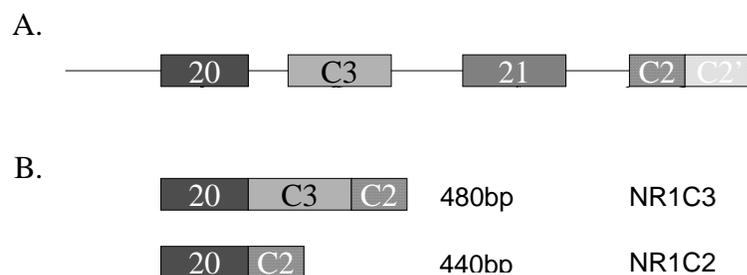


Fig. 2. Variantes de Expresión del extremo Carboxilo Terminal de la Subunidad NR1 clonadas en el vector PcDNA4. A. Cassettes presentes en la región que codifica para la subunidad NR1 en el ADN de pollo. B. Variantes clonadas en el vector PcDNA4 en este trabajo.

Transformación y amplificación de las construcciones

La transformación de las bacterias competentes *Escherichia coli* de la cepa DH5 α con las construcciones se llevó a cabo por choque térmico (20 segundos a 42 °C y 2 minutos a 4 °C). Las bacterias transformadas se incubaron en medio Luria-Bertani líquido (LB Lenox, Invitrogen) durante 60 minutos a 37 °C con movimiento constante. Posteriormente las bacterias se incubaron en placas de medio LB sólido (Invitrogen) con ampicilina (50 μ g/ml) durante 14 horas a 37 °C. Las colonias resultantes se sometieron a PCR de colonia y se eligieron las colonias positivas para las variantes del extremo CT de NR1. Las colonias positivas se incubaron con movimiento constante en medio líquido LB (50 ml) con ampicilina (50 μ g/ml) durante 14 horas a 37 °C, y se extrajeron las construcciones de las bacterias con el paquete Plasmid Purification Kit 25 (Quiagen). Las construcciones purificadas se alicuotaron y almacenaron a -20 °C para su uso posterior.

PCR de colonia

Las colonias resultantes de las transformaciones se subcultivaron en medio LB líquido y se tomó una alícuota (0.5 ml), de la cual se aislaron las bacterias por centrifugación. Las bacterias se resuspendieron en agua (0.1 ml) y se hirvieron por 1 minuto, posteriormente las muestras fueron sometidas a 4 °C durante 2 minutos, esto se repitió en tres ocasiones y la solución resultante fue utilizada

como sustrato para PCR. La PCR se hizo de acuerdo con el protocolo de amplificación de las variantes del extremo CT de NR1, descrito anteriormente.

Cultivo de células HEK293

Se cultivaron células de la línea HEK293 (ATCC) en placas de cultivo multipozos de 6 (Corning) con Dubelco's Modified Eagle Médium (D-MEM, Invitrogen), complementado con 10 % de suero fetal bovino (GibcoBRL), Gentamicina (0.25%), PNS (0.25%) y Nistatina (0.1%) a 37°C y 5% de CO₂.

Transfección y expresión de las proteínas de fusión Xpress-NR1CT

Las construcciones (PcDNA4-NR1CT) se transfectaron en células HEK293 con Lipofectamina Plus (GibcoBRL) de acuerdo con las indicaciones del fabricante. Después de la transfección las células se incubaron durante 48 hrs. a 37°C con 5% de CO₂.

La expresión del mensajero de las proteínas de fusión Xpress-NR1C2 y Xpress-NR1C3 se observó por medio de la técnica de RT-PCR. Se extrajo el ARN total de las células HEK293 transfectadas y no tratadas (control) usando Trizol (Invitrogen). La retrotranscripción de los mensajeros de las proteínas de fusión se realizó con el protocolo utilizado para la retrotranscripción de las variantes del extremo Carboxilo Terminal de la subunidad NR1. Después de la obtención del ADN copia de las proteínas de fusión, se llevó a cabo la PCR con el protocolo de amplificación ya descrito para las variantes del extremo NR1CT.

La expresión de las proteínas de fusión Xpress-NR1C2 y Xpress-NR1C3 en las células HEK293 se demostró por Western Blot. Las células se lisaron en buffer de lisis (Tris-HCl 50mM; pH 7.4, NaCl 150 mM, EDTA 10 mM, Triton X-100 al 1%, Chaps al 1%, sulfato dodecil de sodio al 0.1%, NP-40 al 0.5% y Albúmina de suero bovino 0.1%) y se cuantificó la proteína por el método de Bradford. Para cada muestra se tomaron 2 µg de proteína y se les agregó buffer Laemmli (Tris-HCl 0.75 mM; pH 8.8, SDS al 5%, glicerol al 20% y Azul de bromofenol al 0.01%), posteriormente se hirvieron 5 minutos y se separaron por electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 15 % seguida de electrotransferencia de la proteína

a membranas de PVDF (Hybond-P, Amersham). La unión inespecífica de los anticuerpos se bloqueó con una solución de leche al 5 % en PBS-T (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄ 4.3 mM, KH₂PO₄ 1.47 mM; pH 7.4, Tween 20 al 0.05%) por 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente la membrana conteniendo la proteína se incubó con el anticuerpo primario diluído en solución de bloqueo (dilución 1:1000) (anti-Xpress, Invitrogen) durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de 3 lavados con PBS-T la membrana se incubó por 1 hora con un anticuerpo anti-IgG de ratón acoplado a Peroxidasa de rábano (HRP, Zymed). La membrana se lavó tres ocasiones con PBS-T. Para el revelado se utilizó sustrato quimioluminiscente para la Peroxidasa de rábano (Immobilon Western, Millipore) finalmente las membranas se expusieron a película fotográfica (Kodak) y se procesó su revelado.

Expresión de CK2 en células HEK293.

La expresión de CK2 en células HEK293 se verificó por medio de la técnica de inmunodetección (Western Blot), utilizando la misma membrana con la que se demostró la expresión de las proteínas de fusión Xpress-NR1CT. El bloqueo de la unión inespecífica de los anticuerpos se realizó con leche 5 % en TBS-T (Tris-HCl 20mM, pH 7.5; NaCl 50 mM, Twenn 20 al 0.05%). Después del bloqueo se diluyó el anticuerpo primario (1:2000) (anti-CK2 α , Zymed) en solución de bloqueo y se incubó por 1 hora a temperatura ambiente. La membrana se lavó tres veces y se incubó a temperatura ambiente con un anticuerpo anti-IgG de conejo acoplado a Peroxidasa de rábano (HRP, Zymed). Después de lavar la membrana en 5 ocasiones con TBS-T se reveló de acuerdo al protocolo descrito anteriormente.

Inmunoprecipitación y coinmunoprecipitación

Las células HEK293 transfectadas se lisaron con el buffer RIPA (Tris-HCl 50mM; pH 7.4, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, NP-40 al 1%, Deoxicolato 0.5%, SDS al 0.1%). Posteriormente, se llevó a cabo la inmunoprecipitación. Para prevenir pegado inespecífico, las muestras se incubaron con perlas acopladas a proteína A Sefarosa (Immunoprecipitated Stater Pack; Amersham) a 4 °C con agitación

constante durante 1 hr. Para formar los complejos inmunes se incubó el anticuerpo correspondiente (dilución 1:500) con las perlas en buffer de lisis durante 1 hora a 4 °C con agitación constante. Para la inmunoprecipitación los complejos inmunes y las muestras se incubaron en buffer de lisis durante 3 horas a 4 °C con agitación constante. Después del tiempo de inmunoprecipitación las perlas se lavaron 3 veces en buffer de lisis y se agregó a las muestras buffer Laemmli antes de hervirlas durante 5 min. Las proteínas inmunoprecipitadas y coimmunoprecipitadas se detectaron por Western Blot de acuerdo al protocolo descrito anteriormente para cada proteína.

Ensayo de fosforilación de las proteínas de fusión Xpress-NR1CT por CK2

Las células HEK293 transfectadas con las construcciones (PcDNA4-C2 y PcDNA4-C3) y las no tratadas (control) fueron homogenizadas en buffer de lisis y se cuantificó la concentración de proteína total por la técnica de Bradford. Para observar la fosforilación de las proteínas de fusión Xpress-NR1CT se tomaron 2 mg de proteína total y se les agregó buffer de cinasas (Hepes 20 mM, MgCl 10 mM, DTT 1 mM, EGTA 0.5 mM, ATP 40 μ M; pH 7.4) complementado con 1 μ Ci por tubo de [γ ³²P] ATP (Perkin Elmer Life and Analytical Science). Las muestras se incubaron por 20 minutos a 30 °C para permitir la activación de la CK2. La reacción fue detenida agregando buffer Laemmli y las muestras se hirvieron por 5 minutos. Como control positivo de la actividad de CK2 se observó la fosforilación de la subunidad NR2B proveniente de Hipocampo de rata (Chung et al., 2004). Posteriormente las muestras se separaron por electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 15% (para las proteínas Xpress-NR1CT) y al 6.5% (para NR2B) seguida de electrotransferencia a membranas de PVDF. Las membranas fueron expuestas a película fotográfica y se procesó su revelado.

Inmunodetección de NR1 y NR2B

Para la detección de NR1 y NR2B se bloqueó el pegado inespecífico con una solución de leche al 5% en TBS, posteriormente el anticuerpo primario (dilución 1:1000 y 1:200, respectivamente) (anti-NR1 y anti-NR2B, Zymed) se

incubó durante 3 horas a temperatura ambiente en una solución de leche al 5% en TBS-T, seguido de cinco lavados con TBS-T y se incubó 1 hora con el anticuerpo secundario (dilución 1:2000 y 1:400, respectivamente) (anti-ratón y anti-conejo, Zymed) acoplado a Peroxidasa. El revelado se hizo con sustrato quimioluminescente para la Peroxidasa (Millipore).

Resultados

1. Obtención de las variantes de expresión del extremo CT de NR1

Variantes de expresión del extremo CT de NR1

La amplificación de las variantes de expresión del extremo CT de NR1 mostró tres isoformas, las cuales son resultantes de empalme alternativo de los cassettes 20, 21, C3 y C2 (figura 3).

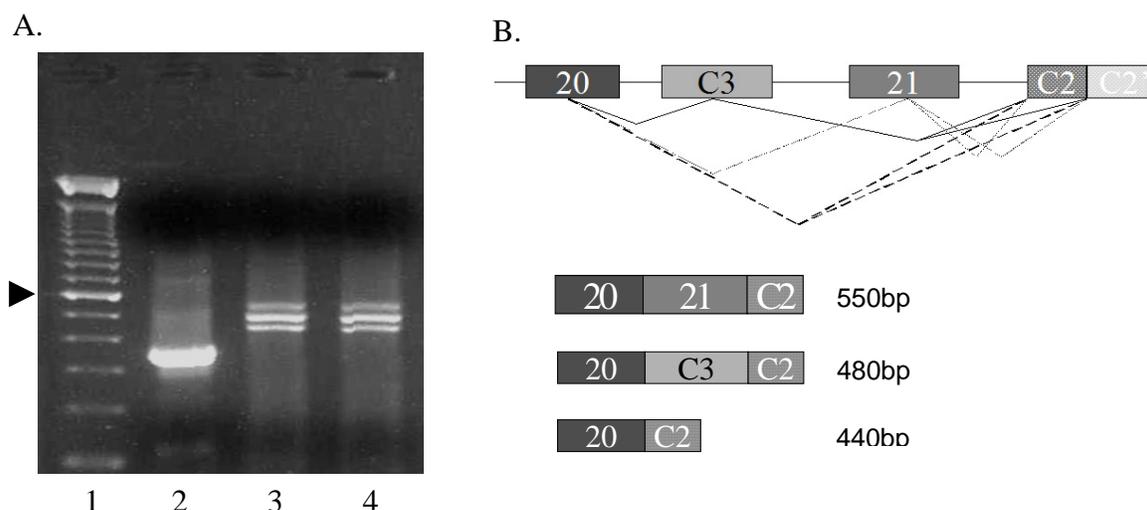


Fig. 3. Variantes de expresión del extremo Carboxilo Terminal de la Subunidad NR1. A. Productos de RT-PCR para el extremo CT de NR1 a partir de ARN total de retina de pollo (1, marcador de peso molecular de 100 pb; 2, NR1 de pato como control positivo; 3 y 4, productos de RT-PCR). B. Esquema de los cassettes presentes en el gen que codifica para el CT de NR1 de pollo (arriba) y de las variantes expresadas en la retina de pollo (abajo). ► Banda correspondiente a 600 pb.

Variantes de expresión ligadas al vector pGEM

Las variantes de expresión del extremo CT fueron aisladas y dos fueron seleccionadas para ser clonadas (figuras 2B y 4, carriles 3 y 4). Las variantes fueron clonadas en el vector pGEM (figura 4, carril 2), el cual es un plásmido diseñado para clonar productos de PCR, dicha clonación se hizo debido a que no existen dianas para enzimas de restricción dentro de las variantes del extremo CT que permitieran llevar a cabo la clonación en el vector PcDNA4. La clonación en

dicho vector permitió adicionar dianas para la enzima de restricción Not I que flanquearan las variantes de expresión.

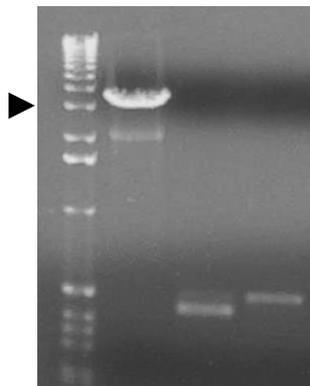


Fig. 4. Variantes de expresión del extremo Carboxilo Terminal de NR1 aisladas. Se observa el marcador de peso molecular de 1Kb (1), el vector pGEM (2) y las dos variantes de expresión seleccionadas para ser clonadas, C2 de 440 pb (3) y C3 de 480 pb (4). ► Banda correspondiente 3000 pb.

La ligación de las variantes de expresión del extremo CT de NR1 y el vector fue comprobada mediante PCR de colonia en la que se observó la amplificación de los fragmentos insertados en el vector (figura 5).

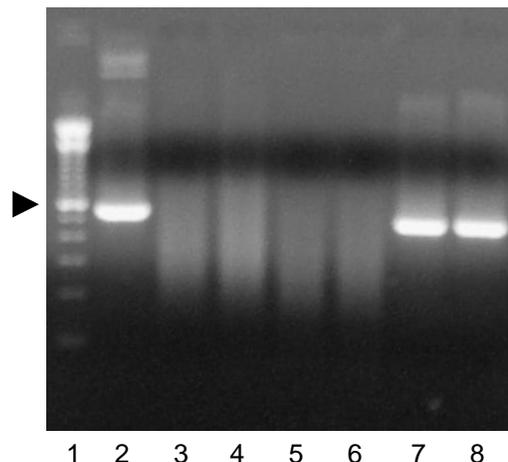


Fig. 5. Variantes de expresión del extremo Carboxilo Terminal de la Subunidad NR1 clonadas en el vector pGEM . Productos de PCR de colonias transformadas con el producto de la ligación entre el vector pGEM y la variante de expresión C3. (1, marcador de peso molecular de 100 pb; 2 control positivo; 3-8 productos de PCR de distintas colonias). ► Banda correspondiente a 600 pb.

Liberación de los insertos del vector pGEM

Los plásmidos que resultaron positivos para la amplificación por PCR de colonia fueron aislados y purificados, posteriormente los insertos fueron liberados mediante la digestión con la enzima de restricción Not I (figura 6).

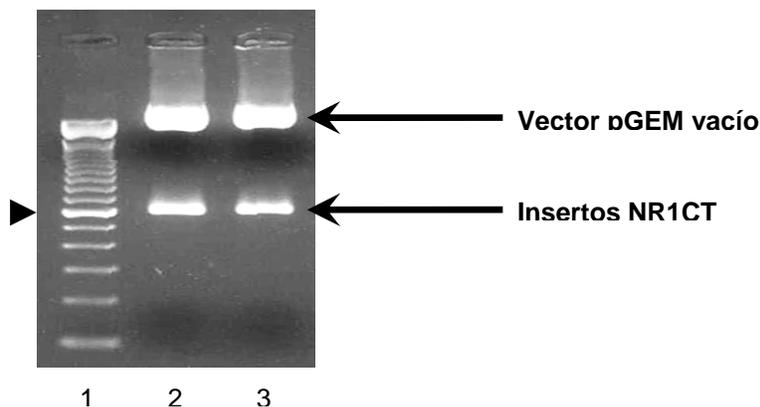


Fig. 6. Variantes de expresión del extremo Carboxilo Terminal de la Subunidad NR1 liberadas del vector pGEM. Se observan los insertos C2 (2) y C3 (3) flanqueados por dianas para la enzima de restricción Not I (abajo) y el vector pGEM vacío (1, peso molecular de 100 pb). \blacktriangleright Banda correspondiente a 600 pb.

2. Construcción de los plásmidos PcDNA4-C2 y PcDNA-C3

Apertura y linearización del vector PcDNA4

Con la finalidad de preparar el vector PcDNA4 para la clonación de los insertos se digirió con la enzima Not I lo que permitió abrir el vector y generar extremos cohesivos concordantes con los extremos de los insertos (figura 7).



Fig. 7. Vector PcDNA4 linearizado. A. Se observan el marcador de peso molecular de 100 pb y 1 Kb (1 y 5, respectivamente), el vector PcDNA4 A (2), PcDNA4 B (3), PcDNA4 C (4). B. Esquema de la digestión con Not I (arriba) y de los extremos cohesivos del vector y del inserto (abajo); (\blacktriangle) sitio de corte. \blacktriangleright Banda correspondiente a 600 pb.

Extracción y análisis de las construcciones

Los insertos liberados del vector pGEM y el vector PcDNA4 digerido se ligaron y se extrajo el plásmido de las bacterias transformadas con el producto de dicha ligación. Con la finalidad de observar un retraso debido a la inclusión de los insertos en el plásmido extraído, se corrió en un gel de agarosa al 1% usando como control el vector vacío (figura 8A). Posteriormente los plásmidos que presentaron retraso en el gel se sometieron a digestión con la enzima Apa I (figura 8B), la cual tiene sólo un sitio de corte dentro del plásmido. La digestión con Apa I permitió observar con mayor claridad los plásmidos que contenían el inserto.

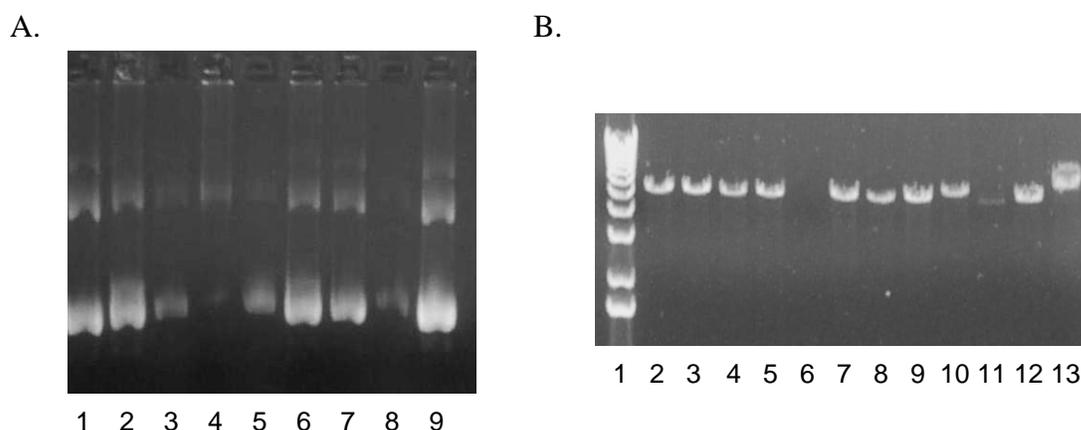


Fig. 8. Plásmidos conteniendo el inserto. A. Se observan los plásmidos extraídos de las bacterias transformadas con la ligación PcDNA4-NR1CT (2-9) y el vector PcDNA4 vacío (control, 1). B. Plásmidos extraídos (3-13), vector vacío (control, 2) digeridos con Apa I y marcador de peso molecular de 1 Kb (1). Los plásmidos 10 y 13 presentan retraso en el gel por la presencia del inserto.

Los plásmidos que contenían el inserto se sometieron a la digestión con la enzima Sma I que tiene 3 sitios de corte en el vector PcDNA4 y 1 en el inserto NR1CT (figura 9B), esta digestión permitió corroborar que el retraso en el gel correspondía a la presencia del inserto y conocer la orientación de los insertos presentes en los plásmidos.

Los productos de las digestiones se corrieron en un gel de agarosa al 1.5% y se analizó el tamaño de los fragmentos producto de la digestión (figura 9A).

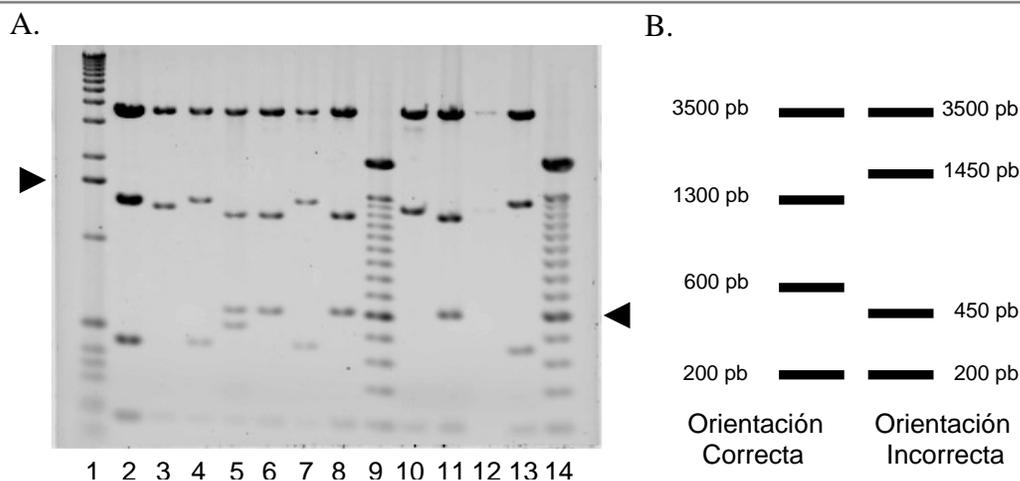


Fig. 9. Digestión de los plásmidos con la enzima *Sma* I. La presencia y la orientación de los insertos se determinó debido al tamaño de los fragmentos en los que son cortados los plásmidos. A. Se observan los marcadores de peso molecular de 1 Kb (1) y de 100 pb (9 y 14) y los plásmidos extraídos (2-8 y 10-13). B. Esquema del patrón de corte esperado para los plásmidos. ► Banda correspondiente a 1500 pb. ◀ Banda correspondiente a 600 pb.

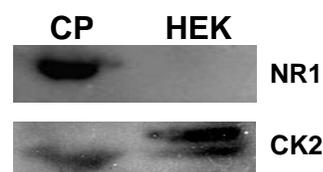
El análisis de los fragmentos producto de la digestión de los plásmidos mostró la existencia de construcciones con el inserto en orientación correcta (figura 9A). Se eligió un plásmido por cada construcción (PcDNA4 A, B, C-NR1CT). Los plásmidos elegidos fueron secuenciados y las secuencias obtenidas fueron comparadas con la secuencia de la subunidad NR1 del receptor NMDA de pollo (Genebank, número de acceso NM_206979), dicha comparación mostró que los plásmidos tenían los insertos sin mutaciones y se eligieron los dos plásmidos que presentaban el marco de lectura correcto para generar las proteínas de fusión Xpress-NR1C2 y Xpress-NR1C3.

3. Expresión de las proteínas de fusión *Xpress-NR1CT* en células *HEK293*

Las células HEK293 expresan CK2 y no expresan NR1

La inmunodetección de la subunidad NR1 del receptor NMDA en células de la línea HEK293 demostró que no expresan esta proteína, sin embargo, si expresan la proteína CK2 (figura 10).

Fig. 10 Las células HEK293 expresan CK2 y no expresan NR1. Se observa la detección de NR1 en el cerebro de pollo (CP) y no en células HEK293 (HEK) (arriba). Detección de CK2 en CP y en HEK (abajo).



Transfección de las construcciones en células HEK293

Los plásmidos elegidos con base en la secuenciación fueron transfectados en células de la línea HEK293 (figura 12A) y se utilizó como reportero para la transfección el vector PadTRACK (Clontech), el cual codifica para la proteína verde fluorescente (Green Florescein Protein, GFP) y posee el mismo promotor que el vector PcDNA4.

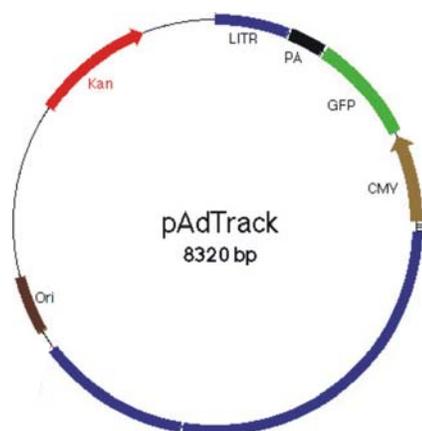
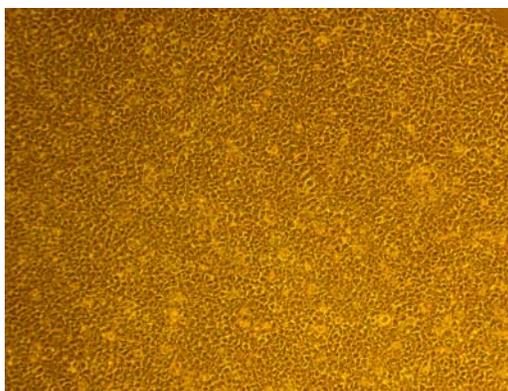


Fig. 11. Vector PadTRACK. El vector PadTRACK tiene el promotor del CMV (cytomegalovirus), mismo promotor del vector PcDNA4, además de contener el que expresa la proteína verde fluorescente (GFP).

Las células transfectadas se incubaron durante 48 horas y posteriormente se observaron al microscopio para corroborar la eficiencia de transfección por medio de la expresión de la GFP (figura 12B).

A.



B.

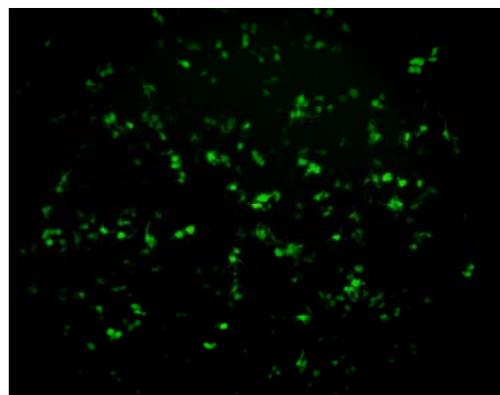


Fig. 12. Eficiencia de transfección en células HEK293. La eficiencia de transfección se observó mediante la expresión de GFP. Células HEK293 transfectadas con el vector PadTRACK vacío observadas en microscopía de campo claro (A, 10x) y en microscopía de fluorescencia (B, 10x).

Expresión de las proteínas de fusión Xpress-NR1C2

La expresión de las proteínas de fusión Xpress-NR1C2 y Xpress-NR1C3 fue comprobada por medio de la inmunodetección del epítipo Xpress (D, L, Y, D, D, D, D y K; Invitrogen). La inmunodetección de dos proteínas de 15 KDa demuestra la presencia de las proteínas Xpress-NR1C2 y Xpress-NR1C3 (figura 13).

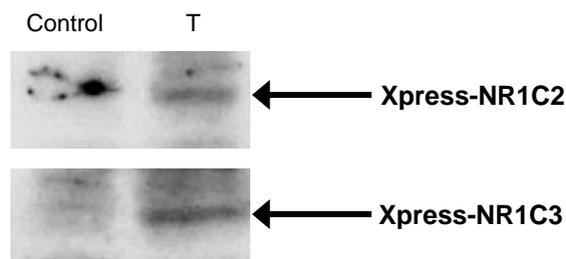


Fig. 13. Expresión de las proteínas de fusión Xpress-NR1C2 y Xpress-NR1C3 en células HEK293. Se observa la inmunodetección de las proteínas de fusión Xpress-NR1C2 y Xpress-NR1C3 en células HEK293 sin transfectar (control) y transfectadas (T) con las construcciones PcDNA4-NR1C2 (arriba) y PcDNA4-NR1C3 (abajo).

4. Análisis de la interacción entre la secuencia consenso en el cassette C3 de la subunidad NR1 y la CK2

Inmunoprecipitación de las proteínas de fusión Xpress-NR1C2

Las proteínas de fusión Xpress-NR1C2 y Xpress-NR1C3 se inmunoprecipitaron y se hizo la inmunodetección de las proteínas precipitadas. La detección del epítipo Xpress en las células transfectadas con los plásmidos PcDNA4-NR1C2 y PcDNA4-NR1C3 corrobora su expresión en las células HEK293 y demuestra la eficacia de la inmunoprecipitación (figura 14).

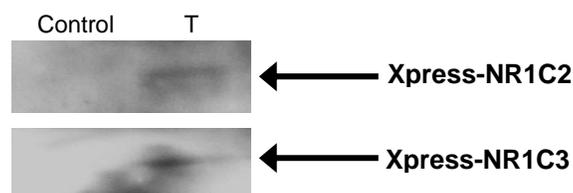


Fig. 14. Inmunoprecipitación de las proteínas de fusión Xpress-NR1C2 y Xpress-NR1C3 en células HEK293. Inmunodetección de las proteínas de fusión Xpress-NR1C2 y Xpress-NR1C3 en inmunoprecipitado de células sin transfectar (control) y transfectadas (T) con las construcciones PcDNA-NR1C2 y PcDNA-NR1C3.

Posteriormente se hizo la inmunodetección de la CK2 en las muestras de proteínas inmunoprecipitadas. Como se observa en la figura 15 no hay detección de CK2 en los inmunoprecipitados con el anticuerpo que reconoce el epítipo Xpress.



Fig. 15. La CK2 no se coimmunoprecipita junto con las proteínas de fusión Xpress-NR1C2 y Xpress-NR1C3 en células HEK293. Inmunodetección de CK2 en inmunoprecipitados (IP) y proteína total (PT) de células HEK sin transfectar (control) y transfectadas con las construcciones PcDNA4-NR1 (C2 y C3).

Fosforilación

Con la finalidad de determinar si la CK2 fosforila o no al extremo CT de NR1 se llevó a cabo la activación *in vitro* de la CK2. La presencia del cassette C3 que contiene la secuencia consenso para la CK2 no promueve la fosforilación de la proteína de fusión Xpress-NR1C3 (figura 16).

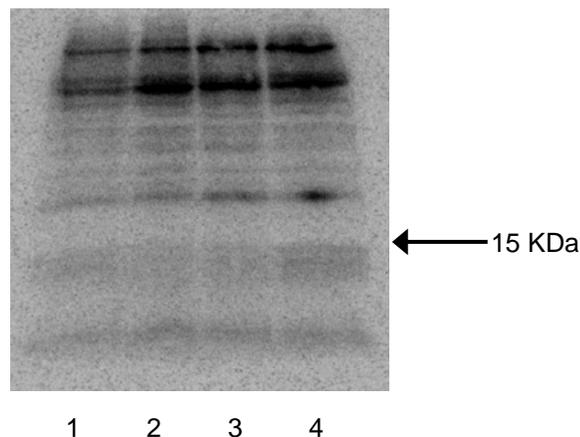


Fig. 16. La CK2 no fosforila la proteína de fusión Xpress-NR1C3 en células HEK293. Se observa la fosforilación de la proteína total de las células HEK293 sin transfectar (1), transfectadas con el vector PadTRACK (2) o con los plásmidos PcDNA4-NR1C2 (3) y PcDNA4NR1C3 (4). No se observa fosforilación de la proteína de Xpress-NR1C3 de 15 KDa.

Para demostrar que la CK2 extraída de las células HEK293 puede funcionar en condiciones *in vitro* se probó la actividad de esta cinasa con la fosforilación de la subunidad NR2B (figura 17), la cual es un sustrato conocido para dicha enzima y se expresa solo en hipocampo de rata adulta.

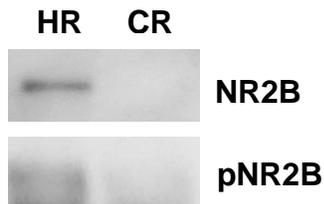


Fig. 17. La CK2 de células HEK293 fosforila la subunidad NR2B en Hipocampo de rata. La subunidad NR2B presente en el lisado de hipocampo de rata (HR) es fosforilada por la CK2 de células HEK293. Se utilizó lisado de cerebelo de rata (CR) como control negativo.

Discusión

En los vertebrados el núcleo supraquiasmático (NSQ) es considerado el marcapaso o reloj maestro, ya que posee la capacidad tanto de generar oscilaciones endógenas, como de recibir la información necesaria para poner en fase al organismo con el tiempo externo por medio de señales electro-bioquímicas a otros tipos celulares y coordinar por medio de dichas señales la periodicidad de otros órganos (Whitmore et al., 2000). La retina constituye la principal entrada de información fótica al SNC. La información luminosa llega al NSQ por medio del tracto retinohipotalámico (TRH) formado por las proyecciones axonales de las células ganglionares de la retina. La transmisión de la información de la retina al NSQ se lleva a cabo en mayor medida gracias a la liberación de glutamato y la activación de los receptores de éste (Whitmore et al., 2000).

El receptor para glutamato del tipo NMDA juega un papel central en la transmisión sináptica en la retina (Lee-Rivera et al., 2003). La activación independiente de luz de los receptores del tipo NMDA en el NSQ puede mimetizar sus efectos sobre la expresión de genes reloj implicados en la regulación del ritmo circadiano tales como *Period 1* y *2* (*Per 1* y *Per 2*). Las proteínas PER 1 y PER 2 son factores transcripcionales que regulan la expresión de una gran cantidad genes mediando su represión (Moriya et al., 2000).

La expresión y el aumento en citoplasma de PER están regulados por la activación del receptor NMDA, sin embargo, su translocación al núcleo es necesaria para su función como factores de transcripción. En *Drosophila* la translocación al núcleo de PER está mediada por la unión a la proteína TIM, la cual mantiene su nivel de expresión constante. La unión entre las dos proteínas se regula mediante una serie de fosforilaciones, una de las cuales depende de CK2 (Blau, 2003). La CK2 puede fosforilar directamente a PER (Lin et al., 2002) y con ello inhibir su unión a TIM y su translocación al núcleo.

En los vertebrados también está presente la proteína PER, sin embargo, se ha demostrado que para su translocación al núcleo requiere unirse con la proteína Cryptochrome (CRY; Lee et al., 2001). La participación de la CK2 en los ritmos

biológicos no ha sido explorada en vertebrados, sin embargo, la evidencia existente hasta el momento hace pensar que esta enzima podría tener un papel importante en la regulación de estos fenómenos en los vertebrados.

La presencia de una secuencia consenso para la CK2 en la subunidad NR1 que se expresa en la retina de pollo podría implicar la existencia de una vía (dependiente de CK2) que regule la información luminosa que llega al NSQ a través del TRH. Esto implicaría que la CK2 podría regular por una parte la translocación al núcleo de PER en las células del NSQ y por otra parte la expresión de PER por medio de la regulación de actividad de los receptores NMDA en el TRH. Por esta razón es importante desarrollar un modelo que permita analizar si existe una relación funcional entre la CK2 y la subunidad NR1.

Durante el desarrollo de este modelo se pudo constatar la presencia del cassette C3 y de la secuencia consenso para la CK2 en una variante de expresión de NR1 (Lee-Rivera et al., 2003).

La adición de dianas de restricción flanqueando las secuencias clonadas (NR1C2 y NR1C3) por medio de la inclusión de estas secuencias en el plásmido pGEM resultó ser una estrategia adecuada debido a que permitió la ligación entre los insertos y el vector de expresión (PcDNA4) gracias a la presencia de extremos cohesivos. Esta ligación no se pudo hacer de manera directa con extremos romos.

Las células de la línea HEK293 fueron un buen sistema para la expresión de las variantes del extremo CT de NR1 y el análisis funcional de la secuencia presente en el cassette C3, debido a que, como se demostró en este trabajo, no expresan de forma endógena la subunidad NR1 del receptor NMDA y sí expresan la CK2.

El modelo desarrollado en este trabajo es eficaz para observar la interacción entre proteínas que tienen secuencias consenso para la CK2 y esta cinasa, ya que la coimmunoprecipitación de la proteína de fusión Xpress-NR1C3 y la CK2 permite deducir que la CK2 no interactúa con el cassette C3 en un sistema vivo como las células HEK293. Así mismo el ensayo de fosforilación por CK2 permitió observar la fosforilación por CK2 de un sustrato conocido de dicha cinasa (subunidad NR2B del hipocampo de rata) y demostró que dicha cinasa no

fosforila la serina de la posición 886 presente en el cassette C3 de la subunidad NR1 de pollo.

Lo anterior demuestra que el modelo desarrollado en este trabajo es una herramienta adecuada para evaluar la relevancia funcional de secuencias consenso para la CK2 presentes en proteínas que no han sido descritas como sustratos de dicha cinasa.

Nuestro modelo demostró que no existe interacción entre la CK2 endógena de las células HEK293 y el extremo CT de la subunidad NR1 del receptor NMDA de pollo y, por lo tanto, la CK2 no tiene un sitio de fosforilación en el cassette C3 a pesar de la presencia de una secuencia consenso para esta cinasa. Lo anterior puede deberse a que los sustratos conocidos de la CK2 tienen características independientes de la secuencia consenso que aumentan su interacción con esta enzima y que pudieran funcionar como “sitios posicionadores” de sustrato.

El reconocimiento de algunos sustratos por la CK2 depende no sólo de la presencia de la secuencia consenso, sino también de elementos estructurales que circunden el sitio fosfoceptor del sustrato (Boldyreff et al., 1994a; Boldyrem et al., 1994b). La mayoría de las cinasas de Serina/Treonina reconocen secuencias consenso que contienen principalmente residuos básicos, sin embargo, la CK2 tiene una marcada afinidad por las cadenas ácidas (Meggio et al., 1994).

Algunos autores (Boldyrem et al., 1994; Meggio et al., 1994; Meggio et al., 1984) han propuesto que la fosforilación de un sustrato por la CK2 aumenta en relación con la cantidad y características de los residuos que se encuentran hacia el extremo carboxilo de la Serina fosforilada.

Se ha reportado que otros sustratos conocidos de la CK2 (Glicógeno Sintetasa y Troponina T) tienen cadenas de residuos ácidos alrededor del sitio de fosforilación; dichos residuos promueven las uniones ácidas adyacentes a la posición del residuo fosfoceptor (Meggio et al., 1984).

Trabajos previos han propuesto que la CK2 aumenta su unión a un sustrato de manera directamente proporcional a la cantidad de residuos ácidos existentes alrededor de la secuencia consenso, y que requiere la presencia de tres aminoácidos ácidos hacia el extremo carboxilo cuando menos. Por el contrario,

Marchiori y colaboradores (1988) demostraron que un péptido sintético que tiene sólo un residuo ácido hacia el extremo carboxilo del sitio de fosforilación es reconocido y fosforilado por la CK2.

De acuerdo con lo anterior, la secuencia consenso para la CK2 del cassette C3 (EETSEH) es un buen candidato que podría constituir un sitio de fosforilación por dicha cinasa; sin embargo, posee dos características que podrían explicar lo observado en este trabajo: primera, el cassette C3 tiene un residuo de Histidina próximo al sitio de fosforilación (posición 2+). Dado que la Histidina es un aminoácido básico, su presencia se contrapone con la preferencia por residuos ácidos de la CK2. Segundo, numerosos sustratos para la CK2 contienen largas cadenas de aminoácidos (preferentemente ácidos) hacia el extremo carboxilo del sitio fosfoceptor, a diferencia del cassette C3 que esta en el extremo CT de la subunidad NR1, es decir, solo existe una cadena pequeña de dos residuos posterior al sitio de fosforilación.

Conclusión

El resultado del presente estudio es el desarrollo de un modelo que permite analizar, *in vitro*, la fosforilación por la CK2 de proteínas que cuentan con una secuencia consenso para esta cinasa. Nuestro modelo permitió investigar la interacción de la secuencia consenso para la CK2 presente en el cassette C3 de NR1 con dicha cinasa, y demostró que no existe ninguna relación funcional entre la CK2 y la subunidad NR1 del receptor NMDA de la retina de pollo, lo anterior puede deberse a que las variantes de expresión de NR1 que contienen la secuencia consenso para la CK2 tienen dos características que, en conjunto, podrían evitar la interacción entre estas dos proteínas: un residuo básico (Histidina) incluido en la secuencia consenso, y un codón de término inmediatamente después de dicha secuencia. Ambas características contrastan con lo reportado para los sustratos de la CK2 en estudios previos, en los que se ha demostrado que la CK2 se une preferentemente a sustratos que contienen cadenas largas de aminoácidos ácidos flanqueando a la secuencia consenso, que permiten el anclaje de la cinasa a su sustrato y su posterior fosforilación.

Referencias

- Akten B, Jauch E, Genova GK, Kim EY, Edery I, Raabe T, Jackson FR. 2003. A role for CK2 in the *Drosophila* circadian oscillator. *Nature neuroscience* 6(3):251-257.
- Anson LC, Chen PE, Wyllie DJ, Colquhoun D, Schoepfer R. 1998. Identification of amino acid residues of the NR2A subunit that control glutamate potency in recombinant NR1/NR2A NMDA receptors. *J Neurosci* 18(2):581-589.
- Anson LC, Schoepfer R, Colquhoun D, Wyllie DJ. 2000. Single-channel analysis of an NMDA receptor possessing a mutation in the region of the glutamate binding site. *J Physiol* 527 Pt 2:225-237.
- Blanquet PR. 2000. Casein kinase 2 as a potentially important enzyme in the nervous system. *Prog Neurobiol* 60(3):211-246.
- Blau J. 2003. A new role for an old kinase: CK2 and the circadian clock. *Nature neuroscience* 6(3):208-210.
- Cull-Candy S, Brickley S, Farrant M. 2001. NMDA receptor subunits: diversity, development and disease. *Curr Opin Neurobiol* 11(3):327-335.
- Cull-Candy SG, Brickley SG, Misra C, Feldmeyer D, Momiyama A, Farrant M. 1998. NMDA receptor diversity in the cerebellum: identification of subunits contributing to functional receptors. *Neuropharmacology* 37(10-11):1369-1380.
- Chung HJ, Huang YH, Lau LF, Huganir RL. 2004. Regulation of the NMDA receptor complex and trafficking by activity-dependent phosphorylation of the NR2B subunit PDZ ligand. *J Neurosci* 24(45):10248-10259.
- Das S, Sasaki YF, Rothe T, Premkumar LS, Takasu M, Crandall JE, Dikkes P, Conner DA, Rayudu PV, Cheung W, Chen HS, Lipton SA, Nakanishi N. 1998. Increased NMDA current and spine density in mice lacking the NMDA receptor subunit NR3A. *Nature* 393(6683):377-381.

- Hardingham GE, Bading H. 2003. The Yin and Yang of NMDA receptor signalling. *Trends Neurosci* 26(2):81-89.
- Herin GA, Aizenman E. 2004. Amino terminal domain regulation of NMDA receptor function. *Eur J Pharmacol* 500(1-3):101-111.
- Husi H, Ward MA, Choudhary JS, Blackstock WP, Grant SG. 2000. Proteomic analysis of NMDA receptor-adhesion protein signaling complexes. *Nature neuroscience* 3(7):661-669.
- Jones S, Yakel JL. 2003. Casein kinase ii (protein kinase ck2) regulates serotonin 5-ht(3) receptor channel function in ng108-15 cells. *Neuroscience* 119(3):629-634.
- Kuryatov A, Laube B, Betz H, Kuhse J. 1994. Mutational analysis of the glycine-binding site of the NMDA receptor: structural similarity with bacterial amino acid-binding proteins. *Neuron* 12(6):1291-1300.
- Laube B, Kuhse J, Betz H. 1998. Evidence for a tetrameric structure of recombinant NMDA receptors. *J Neurosci* 18(8):2954-2961.
- Lee-Rivera I, Zarain-Herzberg A, Lopez-Colome AM. 2003. Developmental expression of N-methyl-D-aspartate glutamate receptor 1 splice variants in the chick retina. *J Neurosci Res* 73(3):369-383.
- Lee C, Etchegaray JP, Cagampang FR, Loudon AS, Reppert SM. 2001. Posttranslational mechanisms regulate the mammalian circadian clock. *Cell* 107(7):855-867.
- Lieberman DN, Mody I. 1999. Casein kinase-II regulates NMDA channel function in hippocampal neurons. *Nature neuroscience* 2(2):125-132.
- Lin JM, Kilman VL, Keegan K, Paddock B, Emery-Le M, Rosbash M, Allada R. 2002. A role for casein kinase 2alpha in the Drosophila circadian clock. *Nature* 420(6917):816-820.

- López-Colomé AM. 1994. El Glutamato en la Retina de los Vertebrados: De los Receptores Membranales a la Regulación Génica. *Rev Soc Mex Hist Nat* 45:101-112.
- López-Colomé AM. 1998. Los receptores para aminoácidos excitadores y sus segundos mensajeros en la retina. *Mensaje Bioquímico* 22:163-189.
- Macica CM, Kaczmarek LK. 2001. Casein kinase 2 determines the voltage dependence of the Kv3.1 channel in auditory neurons and transfected cells. *J Neurosci* 21(4):1160-1168.
- Marc RE. 1982. Chromatic organization of the retina. In: Mc. Devitt D, editor. *Cell Biology of the eye*: Academic Press. p 435-473.
- Michaelis EK. 1998. Molecular biology of glutamate receptors in the central nervous system and their role in excitotoxicity, oxidative stress and aging. *Prog Neurobiol* 54(4):369-415.
- Moriya T, Horikawa K, Akiyama M, Shibata S. 2000. Correlative association between N-methyl-D-aspartate receptor-mediated expression of period genes in the suprachiasmatic nucleus and phase shifts in behavior with photic entrainment of clock in hamsters. *Molecular pharmacology* 58(6):1554-1562.
- Nakanishi S, Nakajima Y, Masu M, Ueda Y, Nakahara K, Watanabe D, Yamaguchi S, Kawabata S, Okada M. 1998. Glutamate receptors: brain function and signal transduction. *Brain Res Brain Res Rev* 26(2-3):230-235.
- Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu BE, Karandikar M, Berman K, Cobb MH. 2001. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev* 22(2):153-183.
- Pinna LA. 1990. Casein kinase 2: an 'eminence grise' in cellular regulation? *Biochim Biophys Acta* 1054(3):267-284.

- Rameau GA, Chiu LY, Ziff EB. 2003. NMDA receptor regulation of nNOS phosphorylation and induction of neuron death. *Neurobiol Aging* 24(8):1123-1133.
- Rodieck RW. 1973. *The Vertebrate Retina. Principles of structure and function*. San Francisco, U.S.A.: W. H. Freeman and Company. 1044 p.
- Rumbaugh G, Prybylowski K, Wang JF, Vicini S. 2000. Exon 5 and spermine regulate deactivation of NMDA receptor subtypes. *J Neurophysiol* 83(3):1300-1306.
- Sarno S, Ghisellini P, Pinna LA. 2002. Unique activation mechanism of protein kinase CK2. The N-terminal segment is essential for constitutive activity of the catalytic subunit but not of the holoenzyme. *J Biol Chem* 277(25):22509-22514.
- Thoreson WB, Witkovsky P. 1999. Glutamate receptors and circuits in the vertebrate retina. *Prog Retin Eye Res* 18(6):765-810.
- Traynelis SF, Burgess MF, Zheng F, Lyuboslavsky P, Powers JL. 1998. Control of voltage-independent zinc inhibition of NMDA receptors by the NR1 subunit. *J Neurosci* 18(16):6163-6175.
- Traynelis SF, Hartley M, Heinemann SF. 1995. Control of proton sensitivity of the NMDA receptor by RNA splicing and polyamines. *Science* 268(5212):873-876.
- Whitmore D, Cermakian N, Crosio C, Foulkes NS, Pando MP, Travnickova Z, Sassone-Corsi P. 2000. A clockwork organ. *Biological chemistry* 381(9-10):793-800.
- Yang XL. 2004. Characterization of receptors for glutamate and GABA in retinal neurons. *Prog Neurobiol* 73(2):127-150.