



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES  
"IZTACALA"

BO 1264/96  
ej: 3

EXPRESION DE RECEPTORES A GLUTAMATO EN  
PARAMECIUM

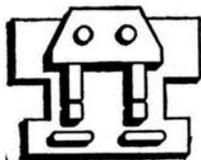
**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

**B I O L O G O**

P R E S E N T A :

**ALICIA CRUZ LOPEZ**





Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

Esta tesis se llevó a cabo en el Departamento de Genética y Biología Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del I.P.N. bajo la dirección del Dr. Arturo Ortega Soto.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. Arturo Ortega Soto, por su apoyo y comentarios, por dirigir la presente tesis y sobre todo por darme la oportunidad de llevar a cabo este trabajo en su laboratorio.

Al M. en C. Tomas D. López Díaz, por su apoyo incondicional, por compartir conmigo sus conocimientos, por su importante colaboración y valiosos comentarios durante el desarrollo de esta tesis, y sobre todo por ser un excelente compañero de laboratorio.

Al Dr. Diego Arenas, M. en C. Roberto Velazco, M. en C. Ismael Ledesma y al M. en C. Sergio Vaca, por sus comentarios y aprobación de esta tesis.

A mis Padres: Mary y Eliceo, por el apoyo que siempre me han brindado para seguir adelante, por su sacrificio de muchos años, por su comprensión y cariño.

**A mis Hermanos: Javier, Pedro, Jorge, José Luis e Isabel; por su cariño, por estar conmigo en todos los momentos difíciles y de alegría, además de motivarme a seguir siempre adelante.**

A mis amigos de la carrera: Tere Pardo S., Horacio V. L., Luis Antonio C. y Manuel Cordova; por su amistad a lo largo de la carrera, por compartir conmigo todos los momentos alegres y difíciles, por alentarme a seguir adelante y por ser excelentes amigos.

A Tere Monzón R., por su amistad de muchos años, por sus consejos, por ser excelente amiga.

A Anita, Martha R., Martha G., Tony, Maru, Blanquita, Lety, Elena y Lino; por su amistad, confianza y compañía, por sus consejos y compañerismo en el laboratorio, por su apoyo en los momentos alegres y no tan alegres.

A Manuel, Marco, Penélope, Jannete, Eduardo, por su compañerismo en el laboratorio y a quienes admiro por su trabajo.

## INDICE GENERAL

<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	i
<b>INDICE GENERAL</b> .....	ix
<b>INDICE DE TABLAS Y FIGURAS</b> .....	xi
<b>ABREVIATURAS</b> .....	xiii
<b>RESUMEN</b> .....	xviii
<b>INTRODUCCION</b>	
TRANSMISION DE SEÑALES EN LAS SINAPSIS QUIMICAS.....	1
ACIDO GLUTAMICO COMO NEUROTRANSMISOR.....	2
CLONACION DE SECUENCIAS DE RECEPTORES A ACIDO GLUTAMICO.....	5
RECEPTORES A ACIDO GLUTAMICO IONOTROPICOS	
Receptores de alta afinidad a AMPA (GluR1-GluR4).....	7
Receptores de baja afinidad a KA (GluR5-GluR7).....	8
Receptores de alta afinidad a KA (KA1 y KA2).....	9
Receptores NMDAR1.....	9
Receptores NMDAR2A Y NMDAR2D.....	10
RECEPTORES A ACIDO GLUTAMICO METABOTROPICOS.....	11
SECUENCIAS DE R <sub>Glu</sub> CLONADAS EN OTRAS ESPECIES.....	12
ANTECEDENTES.....	13
<i>Paramecium</i> como célula excitable.....	14
<b>OBJETIVOS</b> .....	17
<b>MATERIAL Y METODOS</b>	
Cultivo de <i>Paramecium</i> .....	18
Extracción de ARN total.....	19
Cuantificación de ácidos nucleicos.....	20
Ensayos Dot-blot.....	21
Ensayos Northern-blot.....	22

Ensayos Southern-blot.....	23
Ensayos de hibridación	
Dot-blot y Northern-blot (método radiactivo).....	23
Southern-blot (método no radiactivo).....	23
Ensayos de inmunodetección por digoxigenina.....	23
Marcaje de sondas	
Oligos-Transferasa terminal.....	24
Plásmidos.....	24
Preparación de columnas Sephadex-G50.....	25
Amplificación de la biblioteca de ADNc de <i>P. tetraurelia</i> .....	25
Purificación de ADN del fago.....	26
Minipreparación de ADN plasmidico (lisis alcalina).....	26
Amplificación-PCR.....	27
Diseño de oligonucleótidos.....	28
<b>RESULTADOS</b>	
Dot-blot.....	30
Northern-blot.....	31
Amplificación por PCR.....	32
Southern-blot.....	33
Diseño de oligonucleótidos para <i>P. tetraurelia</i> .....	35
<b>DISCUSION</b> .....	40
<b>CONCLUSIONES</b> .....	44
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	45

## INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

### TABLAS

Tabla I (Medios de cultivo).....	18
Tabla II (Amortiguadores).....	20
Tabla III (Soluciones).....	21
Tabla IV (Oligonucleótidos para ensayos de Dot-blot y Northern-blot, GluR1-GluR4).....	25
Tabla V (Oligonucleótidos para PCR, GluR1-GluR4).....	27
Tabla VI (Uso de codones en <i>P. tetraurelia</i> ).....	36
Tabla VII (Oligonucleótidos para PCR, no NMDA, en <i>P. tetraurelia</i> ).....	38
Tabla VIII (Oligonucleótidos para PCR, NMDA, en <i>P. tetraurelia</i> ) .....	39

### FIGURAS

Fig 1(Representación esquemática de los tipos de receptores a Glu).....	3
Fig 2 (Estructura de algunos aminoácidos excitadores y análogos estructurales de Glu).....	4
Fig 3 (Representación esquemática de tres modelos representativos propuestos para la topología transmembranal de los iRGlu).....	6
Fig 4 ( <i>Paramecium calkinsi</i> ).....	15
Fig 5 (Ilustración esquemática de oligonucleótidos para PCR de secuencias AMPA/KA).....	29
Fig 6 (Resultados Dot-blot).....	30
Fig 7 (Resultados Northern-blot).....	31
Fig 8 (Resultados PCR).....	32
Fig 9 (Resultados Southern-blot).....	34

## ABREVIATURAS

### -INTRODUCCION

a.a (amino ácidos)

AAE (Aminoácidos excitadores)

ACh (Acetilcolina)

ACPD (1-amino-cyclopentyl-1,3-dicarboxylic acid)

ADN (ácido desoxirribonucleico)

ADNc (ácido desoxirribonucleico complementario)

ADNss (ADN de esperma de salmón)

AMPA ( $\alpha$ -Amino-3-Hidroxi-5-metil-4-Isoxazole propionato)

[ $^3$ H] AMPA ( $\alpha$ -Amino-3-Hidroxi-5-metil-4-Isoxazole propionato, marcado radiactivamente con tritio)

Arg (Arginina)

ARNm (Acido ribonucleico mensajero)

Asp (Asparagina)

ASP (Acido aspártico)

C (Carboxilo)

Ca<sup>+2</sup> (Ión calcio)

CCG [2-(carboxiciclopropil) glicina]

CGS19755 ( 3-[( $\pm$ )-2-carboxipeperazin-4-yl]-propil-1-fosfonato)

CIS (Acido cisteico)

Cl<sup>-</sup> (Ión cloro)

CNQX (6-cyano-7-nitroquinoxaline)

3C4HPG [(S)-3-carboxi-4-hidroxifenilglicina]

4C3HPG [(S)-4-carboxi-3-hidroxifenilglicina]

4CPG [(S)-4-carboxi-fenilglicina]

D-AP5 (D-2-amino-5-ácido fosfopentanoico)

DGluR-I (Receptor a glutamato en *Drosophyla* de tipo I)

DGluR-II (Receptor a glutamato en *Drosophyla* de tipo II)

DOM (Acido domoico)

GABA ( $\gamma$ -ácido aminobutírico)

Glu (Glutamato)

[<sup>3</sup>H] Glu (Glutamato marcado radiactivamente con tritio)

L-Glu (Glutamato en su forma L)

RGlu (Receptor a glutamato)

Gln (glutamina)

GluRs (Receptores a glutamato)

Gly (Glicina)

GlyR (Receptor de glicina)

Ibo (Ibotenato)

iRGlu (Receptor a glutamato ionotrópico)

K<sup>+2</sup> (Ión potasio)

KA (Kainato)

[<sup>3</sup>H] KA (Acido kaínico marcado radiactivamente con tritio)

KBP (proteína unidora de ácido kaínico)

KBPc (proteína unidora de ácido kaínico de pollo)

KBPf (proteína unidora de ácido kaínico de rana)

$K_D$  (Constante de disociación)

L-AP3 (L-2-amino-3-fosfopropionato)

L-AP4 (L-2-amino-4-fosfonobutirato)

L-AP5 (L-2-amino-5-fosfonopentanoato)

L-SOP (L-serina-O-fosfato)

LTD (Depresión a largo plazo)

LTP (Potenciación a largo plazo)

LymGluR (Receptor a glutamato en *Lymnea*)

MCPG ( $\alpha$ -metil-4-carboxifenilglicina)

Mg<sup>+2</sup> (Ión magnesio)

MK-801 (5-methyl-10,11-dihydro-5H-dibenzocyclohepten-5,10-imine maleate)

mRGlu (Receptor a glutamato metabotrópico)

N (Amino)

Na<sup>+2</sup> (Ión Sodio)

nAChR (Receptor Acetilcolina nicotínica)

NMDA (N-Metil-D-Aspartato)

pb (pares de bases)

PCP [1-(1-fenilciclohexil) piperidina]

PKA (Proteína cinasa A)

PLC (fosfolipasa C)

Proteínas G (Proteínas de unión a GTP)

Q (formas ineditadas)

QA (Quisqualato)

R (formas editadas)

RAAsE (Receptores Aminoácidos Excitadores)

SNC (Sistema Nervioso Central)

TCP [N-(1-[2-thienyl] ciclohexil)-3,4-piperidina]

TMs (Segmentos transmembranales)

Trans-ACPD (1-Aminociclopentano-Trans-1,3-Acido dicarboxílico)

Zn<sup>+2</sup> (Ión zinc)

#### -MATERIAL Y METODOS

ARN (Acido ribonucleíco)

BSA (Albumina Serica de Bovino)

dATP (2'-Deoxyadenosine 5'-triphosphate)

<sup>32</sup>P- α- dATP (2'-Deoxyadenosine 5'-triphosphate marcado radiactivamente con fosforo)

dCTP (2'-Deoxycytidine 5'-triphosphate)

DEPC (Dietil pirocarbonato)

dGTP (2'-Deoxyguanosine 5'-triphosphate)

DIG (Digoxigenina)

dTTP (2'-Deoxythymidine 5'-triphosphate)

EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid)

H<sub>2</sub>O-DEPC (Agua tratada con dietil pirocarbonato)

HEPES (N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid)

LB (medio luria)

Luz UV (Luz ultra violeta)

MOPS (4-Morpholinepropane sulfonic acid)

PBS (Amortiguador de fosfatos salino)

Pc (*Paramecium calkinsi*)

PCR (reacción en cadena por polimerasas)

PEG-80 (Polyethylene glycol-80)

Pt (*Paramecium teraurelia*)

RT (Reverso transcriptasa)

-UNIDADES DE MEDICION

°C (Grados centigrados)

D.O. (Densidad Optica)

hr (horas)

kDa (Kilo daltones)

λ (longitud de onda)

M (Molar)

μl (Micro litros)

μm (Micro molar)

μM (Micro metro)

mg (Micro gramos)

min (Minutos)

ml (mililitros)

mmHg (milímetros de mercurio)

nm (nanómetros)

nM (nanomolar)

rpm (Revoluciones por minuto)

seg (segundos)

U (Unidades)

## RESUMEN

El ácido glutámico (Glu) es el principal neurotransmisor excitador del sistema nervioso central (SNC) de los vertebrados y efectúa sus acciones al interactuar con receptores membranales específicos (Hollmann, 1994). Los receptores a ácido glutámico (RGlu) se han definido por el sistema de transducción por ellos empleado. Así tenemos receptores ionotrópicos (iRGlu) y receptores metabotrópicos (mRGlu) (Boulter, 1990). Se les ha involucrado en procesos como son aprendizaje y memoria, enfermedades neurodegenerativas y neurotoxicidad (Advokat, 1992 y Bliss, 1993). Los iRGlu constan de por lo menos tres tipos definidos molecularmente y farmacológicamente: 1) Receptores N-Metil-D-aspartato (NMDA), 2) Receptores  $\alpha$ -Amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propionato (AMPA) y 3) Receptores Kainato (KA) (Cunningham, 1993).

Los ciliados del genero *Paramecium* son un modelo biológico de célula excitable (Hinrichsen, 1988). Como tales, han sido empleados en el estudio de canales iónicos y receptores (Preston, 1988A; Preston, 1988B; Bernal y Ortega, 1994). Ninguno de los RGlu ha sido caracterizado a nivel molecular en especies no animales.

El objetivo de este trabajo fue el de determinar si en *Paramecium tetraurelia* y *Paramecium calkinsi*; se expresa algún homólogo de RGlu. Se llevaron a cabo ensayos de Dot-blot, Northern-blot y de amplificación en cadena por polimerasa (PCR). Como alternativa al uso de oligonucleótidos de secuencias conocidas para PCR, se llevó a cabo el diseño de oligonucleótidos específicos a *P. tetraurelia* que pudieran codificar RGlu de tipo NMDA y no NMDA. Por ensayos de Dot-blot, PCR y Southern-blot, se detectó un posible homólogo a GluR3 en ambas especies de *Paramecium*. Por otro lado, por ensayos de PCR con las secuencias diseñadas en *P. tetraurelia* que pudieran codificar RGlu de tipo NMDA y no NMDA, no se logró la amplificación de fragmentos para este tipo de receptores.

## INTRODUCCION

### TRANSMISION DE SEÑALES EN LAS SINAPSIS QUIMICAS

El Sistema Nervioso Central (SNC) de los animales superiores permite a los organismos recibir y actuar bajo estímulos internos y externos con velocidad y de manera coordinada. La actividad del sistema nervioso se ve reflejada en una variedad de señales eléctricas y químicas que aparecen en los órganos receptores, células nerviosas y órganos efectores; incluyendo músculos y glándulas secretoras (Siegel, 1981).

La membrana neuronal al igual que la membrana de otros tejidos posee proteínas que según su función son: canales iónicos, bombas, acarreadores y receptores (Pasantes, 1991). La transmisión de señales en las sinápsis químicas está mediada por una variedad de neurotransmisores que interactúan específicamente con receptores y transmiten la información a las células blanco (Kandel, 1991).

Los receptores son proteínas capaces de reconocer específicamente una determinada molécula, en este caso un neurotransmisor, y como resultado de la interacción con ella generar la apertura de un canal para un ión específico o bien la activación de cascadas de segundos mensajeros (Pasantes, 1991). En términos generales, de acuerdo a estos dos sistemas efectores, se puede hablar de receptores ionotrópicos y metabotrópicos respectivamente (Alberts, 1994).

De los compuestos identificados como neurotransmisores pueden identificarse tres grupos principales: 1) Aminoácidos neuroactivos, 2) Aminas biogénicas, 3) Péptidos y la Acetilcolina (ACh). Los aminoácidos neuroactivos se agrupan en: 1) Aminoácidos excitadores (AAE) entre los que se encuentran el ácido aspártico (Asp), ácido glutámico y ácido glutámico (Glu); y 2) Aminoácidos inhibidores como son glicina,  $\beta$ -alanina, taurina y  $\gamma$ -ácido aminobutírico (GABA) (Pasantes, 1991).

Los AAE son ampliamente reconocidos como los principales mediadores de la excitación sináptica en el SNC de vertebrados (Gasic, 1992). La mayoría de las sinapsis en el sistema nervioso usa Glu como neurotransmisor para producir una excitación neuronal rápida. La neurotransmisión glutamatérgica también participa en la plasticidad sináptica, enfermedades neurodegenerativas y neurotoxicidad (Boulter, 1990; Nakanishi, 1992).

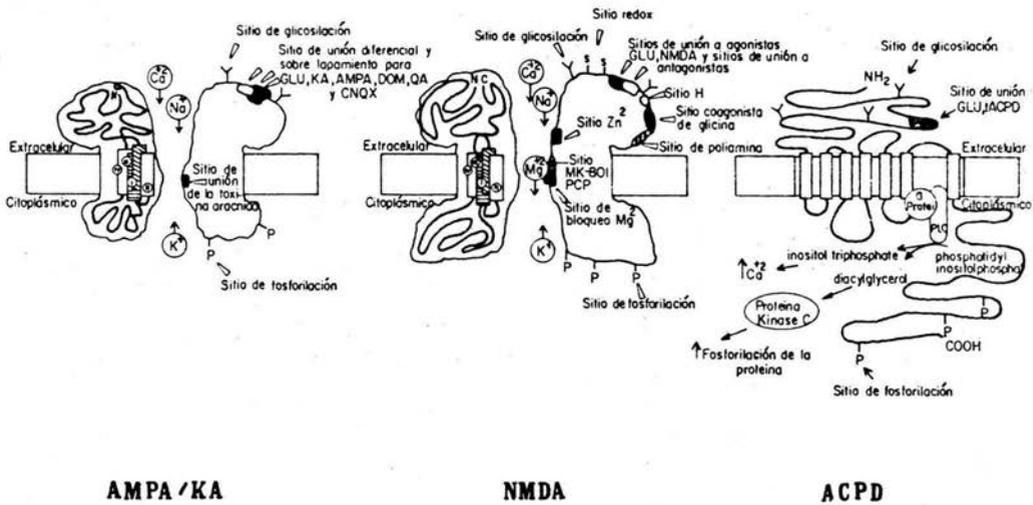
## **ACIDO GLUTAMICO COMO NEUROTRANSMISOR**

El Glu cumple cuatro criterios para su clasificación como neurotransmisor, 1) se localiza presinápticamente, 2) por estímulos fisiológicos hay liberación específica en altas concentraciones capaces de llevar a una respuesta postsináptica, 3) tiene una acción idéntica a los transmisores endógenos incluyendo respuestas a antagonistas y 4) tiene mecanismos para terminar la acción neurotransmisora en forma rápida -sistemas de captura- (Gasic, 1992). El Glu, se piensa, está involucrado en procesos como son aprendizaje y memoria, enfermedades neurodegenerativas y neurotoxicidad (Advokat, 1992 y Bliss, 1993).

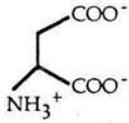
Las acciones de Glu en el SNC son mediadas por receptores (RGlu), estos receptores se han agrupado de acuerdo al sistema de transducción por ellos empleado (**Fig.1**) (Boulter, 1990). De esta manera los receptores ionotrópicos (iRGlu), se caracterizan por ser canales iónicos abiertos por ligando y los receptores metabotrópicos (mRGlu), por estar acoplados a proteínas de unión a GTP (proteínas G) (Nakanishi, 1992). El Glu media la neurotransmisión excitatoria rápida por la activación de canales selectivos a cationes. Los diferentes subtipos de estos canales tienen diferente cinética, permeabilidad, conductancia a iones, y propiedades farmacológicas (Wisden, 1993). Son parte obligada del ordenamiento que da la plasticidad sináptica, aprendizaje y memoria. Se piensa son los mediadores de la toxicidad por liberación en exceso de Glu en las células en condiciones patológicas, tales como isquemia (Wisden, 1993).

Farmacológicamente los RGlu se han definido de acuerdo al análogo de Glu que los

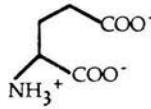
activa: 1) NMDA, 2) KA, 3) AMPA, 4) 2-amino-4-fosfobutirato (L-AP4) y 5) ACPD (Fig.2). Para cada subtipo farmacológico se han definido antagonistas específicos, por ejemplo, D-2-amino-5-ácido fosfopentanoico (D-AP5) funciona como antagonista competitivo para el subtipo NMDA, L-2-amino-3-fosfopropionato (L-AP3) para ACPD y, CNQX para los subtipos KA y AMPA (Gasic, 1992).



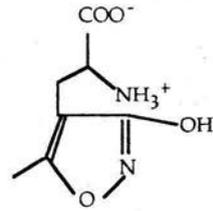
**Fig 1. Representación esquemática de los tipos de receptores a Glu.** Los receptores AMPA/KA y NMDA muestran solo dos de las cinco probables subunidades requeridas para la formación de un canal iónico, la subunidad del lado izquierdo indica esquemáticamente el enrollamiento hipotético de la proteína para producir cuatro segmentos transmembranales (TMs) como también los extremos amino (N) y carboxilo (C) terminales. Los receptores metabotrópicos (receptor ACPD) se representan como una sola subunidad peptídica con siete segmentos transmembranales.



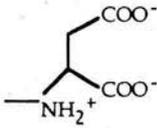
ASPARTATO



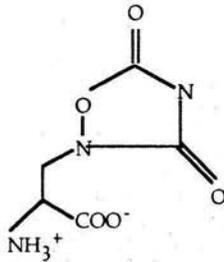
GLUTAMATO



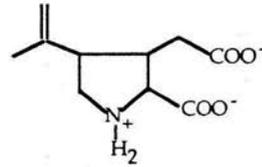
AMPA



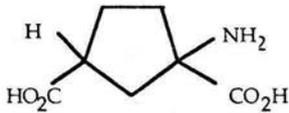
NMDA



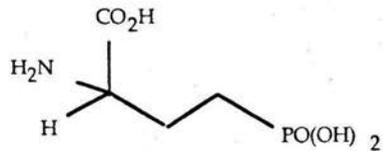
QUISQUALATO



KAINATO



trans-ACPD



L-AP4

Fig 2. Estructura de los aminoácidos excitadores: L-Glutamato y L-Aspartato y algunos de sus análogos empleados para definir los subtipos de RGlu.

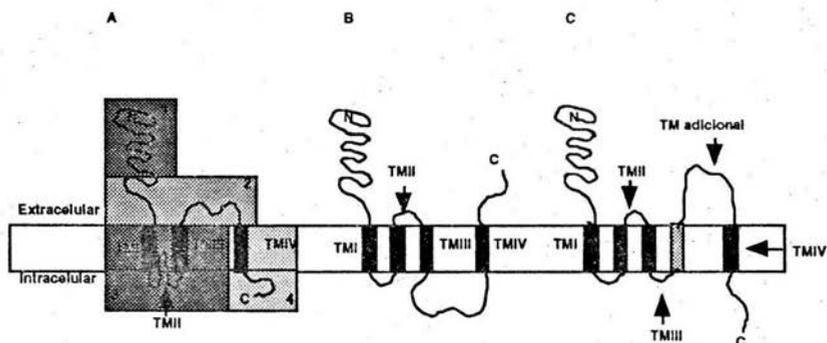
De estos subtipos farmacológicos los que responden a L-AP4 y ACPD resultan ser del tipo mRGlu; y los que responden a NMDA, AMPA y KA (selectivos a  $N^+$ ,  $K^+$  y en algunos casos a  $Ca^{+2}$ ) son iRGlu (Jahr, 1992). Los subtipos AMPA y KA son difíciles de distinguir farmacológicamente ya que, no se conoce algún antagonista que pueda diferenciarlos (Gasic, 1992). Además, KA puede activar a los receptores AMPA con baja afinidad, por ello a estos receptores se les ha denominado AMPA/KA o no NMDA (por no responder a la aplicación de NMDA) (Hollmann, 1994). La clara distinción entre receptores AMPA y KA surgió cuando se obtuvieron secuencias que codifican para estos receptores, y se les pudo caracterizar en sistemas heterólogos de expresión.

### **CLONACION DE SECUENCIAS DE RECEPTORES A ACIDO GLUTAMICO**

Algunos vertebrados como aves y anfibios tienen estructuras en las que los sitios de unión a KA se encuentran enriquecidos. Esto permitió la purificación de estos sitios y su clonación por métodos convencionales (Henley, 1994). Las dos primeras secuencias de este tipo que se obtuvieron fueron clonadas de pollo y rana, se les denominó proteína unidora de KA de pollo (KBPC) y proteína unidora de KA de rana (KBPF). Ambas KBPs son proteínas pequeñas de 43 kDa y 48 kDa respectivamente; topológicamente parecían tener una estructura similar a la de otros canales iónicos abiertos por ligando, aunque su homología a nivel de aminoácidos no es muy grande (Gregor, 1989; Wada, 1989). A nivel funcional no se ha podido demostrar que estas proteínas formen un canal iónico abierto por ligando, de hecho se había propuesto que pudieran constituir un nuevo tipo de receptor acoplado a proteínas G (Henley, 1994). Sin embargo por ensayos de unión, inmunodetección y de fosforilación, se ha sugerido que el sitio de unión de nucleótidos de guanina es diferente del sitio de unión a KA (Ibarra y Ortega, 1995).

Utilizando una estrategia de clonación por expresión se pudo obtener una secuencia que codifica para un canal iónico que responde a KA (Hollmann, 1989). Utilizando esta secuencia y

las de las KBP, se han podido clonar otras ocho secuencias de genes relacionados. Estas secuencias han sido ampliamente caracterizadas en sistemas de expresión heteróloga. Utilizando los datos de esta caracterización, así como los de su homología a nivel de aminoácidos, los RGlu han sido agrupados en tres subfamilias: familia AMPA/KA, familia de receptores KA de baja afinidad, y familia de receptores KA de alta afinidad (Gasic, 1992). Los receptores NMDA fueron clonados utilizando la misma estrategia de expresión. De estos existen dos subfamilias, la familia NMDAR1 y la familia NMDAR2 (Collingridge, 1994). La primer secuencia de un receptor metabotrópico se clono de la misma manera, posteriormente combinando hibridación diferencial y PCR se obtuvieron otras siete secuencias; en función del sistema efector y a su perfil farmacológico, los receptores metabotrópicos han sido agrupados en tres subfamilias, en el grupo I se encuentran mGluR1 y mGluR5, en el grupo II mGluR2 y mGluR3, y en el grupo III mGluR4, mGluR6, mGluR7 y mGluR8 (Pin, 1995).



**Fig 3. Representación esquemática de tres modelos representativos propuestos para la topología transmembranal de receptores a glutamato ionotrópicos.** A) Modelo reciente con tres dominios transmembranales (3TM), basado en análisis de hidrofobicidad, patrones de glicosilación, mutaciones por delección, mutagénesis dirigidas y proteólisis selectiva. B) Modelo con cuatro dominios transmembranales (4TM), basado en perfiles de hidropatía y supuesta homología a otros canales iónicos abiertos por ligando; estudios recientes indican que este modelo es incorrecto. C) Modelo con cinco dominios transmembranales (5TM) basado en la supuesta presencia de un sitio de fosforilación por proteína quinasa A y un sitio de N-glicosilación entre TMIII y TMIV, el cual puede implicar la presencia de una región adicional que atraviesa la membrana.

La homología de los iRGlu con otros canales iónicos abiertos por ligando es menor al 20%, por ello se considera que constituyen una familia genética independiente. Sin embargo en analogía a otros canales iónicos abiertos por ligando, se consideraba que los iRGlu eran complejos formados por 4-5 subunidades proteicas. Según este modelo cada subunidad presentaba cuatro segmentos transmembranales (TMs), el segmento transmembranal TMII se encontraba formando la boca del canal y los extremos amino (N) y carboxilo (C) terminal, eran extracelulares (Hollman,1994) (Fig.3B). Múltiples evidencias contradicen este modelo, alternativamente se han propuesto otros dos modelos topológicos de estos receptores. Uno de estos modelos propone solamente tres segmentos transmembranales (Fig.3A), y al ser impar el numero de segmentos transmembranales el N es extracelular y el C intracelular (Barinaga, 1995; Wo, 1995). El otro modelo predice cinco segmentos transmembranales (Fig.3C) (Wo, 1995).

## RECEPTORES A ACIDO GLUTAMICO IONOTROPICOS

### *Receptores de alta afinidad a AMPA (GluR1-GluR4)*

Este grupo (GluR1-GluR4) muestra alta afinidad a AMPA y baja afinidad a KA, por lo que se les ha llamado receptores AMPA/KA. Cada una de esas subunidades tienen dos formas de procesamiento alternativo, que han sido designados como "flip" y "flop" (los canales flip son más eficientes que los canales flop), son de tamaño similar (aproximadamente 100 kDa) tienen un 68-73% de identidad en sus secuencias de a.a. Aparentemente no son similares a otros canales iónicos abiertos por ligando (la homología de estas secuencias con otros genes de canales iónicos abiertos por ligando nAChR, GABAR, GlyR, es solo ~20%) (Hollman, 1994).

Los canales iónicos intrínsecos a estos receptores pueden ser activados con el siguiente perfil farmacológico: QA>Acido domoico (DOM) ~ AMPA >Glu> KA.AMPA. Glu y QA actúan como antagonistas parciales, KA y DOM parecen ser agonistas completos dando una respuesta máxima. Aunque AMPA es el agonista específico y más potente; KA es el más

eficiente. La co-expresión de subunidades confiere propiedades novedosas al canal, así como la aparición de efectos sinérgicos, sugiriendo que los receptores AMPA/KA naturales son ensamblados a partir de diferentes subunidades. Estos receptores se han clonado en rata, ratón y humano (Hollman, 1994). Los homólogos de estas secuencias se han clonado de pollo (Paperna, 1996), pichón (Ottiger, 1995) y pez dorado (Goldman, 1994; datos no publicados).

Las propiedades rectificantes de corrientes y la permeabilidad de iones divalentes del canal del receptor AMPA está controlado por diferentes determinantes moleculares; la subunidad GluR2 posee una arginina (Arg) en posición homóloga a la glutamina (Gln) en las subunidades GluR1, GluR3 y GluR4, ésta posición funcional (denominada como sitio de edición /no edición, sitio Q/R), determina la permeabilidad de  $Ca^{+2}$  y las propiedades rectificantes del canal. Los receptores AMPA heteroméricos que contienen la subunidad GluR2 tienen baja permeabilidad a iones divalentes y cuando carecen de la subunidad GluR2 son permeables a  $Ca^{+2}$ . Estos determinantes moleculares fueron evidenciados por substitución de residuos a.a. en el sitio Q/R (Wisden, 1993).

#### *Receptores de baja afinidad a KA (GluR5-GluR7)*

Estos receptores (GluR5-GluR7) tienen una constante de disociación ( $K_D$ ) para KA de alrededor de 50nM, por lo que se les considera de baja afinidad a KA. Este subgrupo tiene un porcentaje de identidad en sus secuencias a.a. del 75-80% entre miembros del subgrupo y solo ~40% con los de la familia AMPA/KA. El mismo mecanismo de edición que actúa en el codón del sitio Q/R en TMII de GluR2 opera en el sitio homólogo de GluR5 y GluR6, pero no en GluR7. En contraste con la edición de GluR2 la edición en GluR5 y GluR6 es incompleta, de tal manera que ambas formas: la R y la Q, coexisten. La subunidad GluR5 (Q) produce respuestas grandes y puede ser activado con el siguiente orden de potencia: DOM>KA>Glu>AMPA. GluR6 (R), responde a KA, QA, DOM y Glu pero no a AMPA y es bloqueado por CNQX, su orden de potencia es DOM>KA>QA>Glu. GluR7 no produce

alguna respuesta detectable en oocitos o líneas celulares transfectadas. Este tipo de receptores se han clonado de rata y ratón (Hollman, 1994).

#### *Receptores de alta afinidad a KA (K1 y K2)*

Las subunidades KA1 y KA2 se consideran de alta afinidad para KA, ya que su  $K_D$  es de aproximadamente 5nM. Estos receptores muestran un porcentaje de identidad en sus secuencias de a.a. del 70% pero solo el 37% con los miembros de la familia AMPA/KA y ~43% con los miembros de la familia KA de baja afinidad. No se han reportado variantes de procesamiento, no hay indicaciones de edición en el sitio Q/R en TMII el cual contiene Q en ambos receptores. No responden electrofisiológicamente al ser expresados en oocitos o en líneas celulares transfectadas, pero sí cuando se coexpresan con GluR5 y GluR6. Estos receptores se han clonado de rata, ratón y humano. El orden de potencia de sus agonistas es KA>QA>DOM>Glu>AMPA (Hollman, 1994).

#### *Receptores NMDAR1*

El receptor NMDA, juega un papel importante en la inducción y mantenimiento de la potenciación a largo plazo (LTP). Es altamente permeable a  $Ca^{+2}$  así como a  $Na^+$  y  $K^+$ . El resultado del incremento de  $Ca^{+2}$  intracelular mediado por este receptor es considerado como el responsable de llevar a cabo la plasticidad sináptica y la toxicidad neuronal. Este receptor se distingue de otros R<sub>Glu</sub> por la acción de un número de agonistas y antagonistas selectivos, y por sus propiedades únicas. Entre las propiedades de este receptor se incluyen; modulación por glicina (Gly), bloqueo por  $Mg^{+2}$  dependiente de voltaje, activación por poliaminas e inhibición por  $Zn^{+2}$ . Todas las subunidades del receptor NMDA poseen un residuo asparagina (Asn) en la posición equivalente al sitio de edición Gln-Arg de los receptores AMPA/KA (Nakanishi, 1992). Las subunidades NMDAR1 y NMDAR2 contienen algunos sitios consensos de fosforilación para proteín cinasa dependiente de  $Ca^{+2}$ -calmodulina y proteín cinasa C en el

dominio citoplasmático (Hollman, 1994).

La primera secuencia de un receptor del tipo NMDA se clonó en 1991 por Moriyoshi y col. utilizando ensayos funcionales (Moriyoshi, 1991). La importancia de los residuos Asn de NMDAR1, en la regulación de la permeabilidad de  $Ca^{+2}$  y el bloqueo del canal, se demostró por la caracterización electrofisiológica de receptores mutados en el cual la Asn fue reemplazada por Gln o Arg. Estas sustituciones reducen o eliminan la permeabilidad de  $Ca^{+2}$  e inhibición por  $Mg^{+2}$ ,  $Zn^{+2}$  (Wisden, 1992).

Las secuencias a.a. de NMDAR1 son 99% idénticas entre las especies rata y ratón, mientras que con miembros del tipo no NMDA muestra solo un 25-29% de identidad en sus secuencias a.a. El orden de potencia es Glu>NMDA. (Hollman, 1994). El receptor NMDAR1 expresado en oocitos de *Xenopus laevis* es activado por NMDA y Glu pero no por AMPA o KA (Moriyoshi, 1991). Presenta selectividad a antagonistas NMDA como son; D-(-)-2-amino-5-fosfonovalerato, 3-[(±)-2-carboxipeperazin-4-yl]-propil-1-fosfonato (CGS19755), antagonista competitivo, 7-Clorokinurenato (Antagonista no competitivo, actúa en el sitio de unión a glicina), MK-801 (bloqueador del canal) y  $Zn^{+2}$  (Nakanishi, 1992), 1-(1-fenilciclohexil) piperidina (PCP), N-(1-[2-thienyl] ciclohexil)-3,4-piperidina (TCP), Dextrometorfan, Dextrofan, L-2-amino-5-fosfonopentanoate [(+) L-AP5] (Cunningham, 1993).

Este gen se ha clonado de rata, ratón, humano, pato y mosca de fruta, con un tamaño aproximado de 100 kDa (Hollman, 1994).

#### *Receptores NMDAR2A-NMDAR2D*

Con la secuencia de NMDAR1 e iniciadores designados para regiones conservadas entre NMDAR1 y otros R<sub>Glu</sub> fueron clonados por ensayos de hibridación y PCR cuatro genes relacionados a NMDAR1. Estas cuatro secuencias forman una subfamilia independiente a los

receptores NMDAR1 y fueron designados NMDAR2A, NMDAR2B, NMDAR2C y NMDAR2D (Hollman, 1994). Las subunidades NMDAR2 tienen una característica estructural peculiar en comparación a NMDAR1 y a otros canales iónicos abiertos por ligando, ya que su carboxilo terminal es muy grande. La actividad del canal es inhibido por iones  $Mg^{+2}$  de una manera dependiente de voltaje. La homología en sus secuencias a.a. entre ellos mismos es del 42-56%,y con otros R<sub>Glu</sub> de 22-29%. (Hollmann, 1994).

La subunidad NMDAR2, en contraste con la subunidad NMDAR1, no presenta una respuesta electrofisiológica apreciable después de la aplicación del agonista. Sin embargo, la expresión combinada de NMDAR1 con subunidades de NMDAR2 da una respuesta electrofisiológica apreciable a NMDA o Glu. De esta manera, NMDAR1 sirve como una subunidad fundamental y necesaria para el complejo receptor NMDA formando una configuración heteromérica con diferentes miembros de las subunidades NMDAR2. (Nakanishi, 1992).

El orden de potencia es Glu>NMDA. Los receptores NMDAR2A, NMDA2B, NMDA2C y NMDA2D se han clonado en rata y ratón, tienen un tamaño de entre 130 kDa y 162 kDa (Hollman, 1994).

## **RECEPTORES A ACIDO GLUTAMICO METABOTROPICOS**

Se sabe que Glu, no solo activa canales catiónicos abiertos por ligandos, sino que también su activación se lleva a cabo a través de segundos mensajeros. Los mR<sub>Glu</sub> están acoplados a proteínas G y modulan la producción de mensajeros intracelulares (Nakanishi, 1992). En 1985 Sladeczek y col. reportaron que Glu estimula la fosfolipasa C (PLC) en cultivos de neuronas striatal mediante un receptor que no corresponde a la familia de receptores NMDA, AMPA, o KA. Poco después, un efecto similar del Glu fue descrito en cortes histológicos de hipocampo, cultivo de células granulares de cerebro y en cultivos de astrocitos. Estos resultados sugirieron que Glu, al igual que GABA, serotonina y ACh no solamente

activan receptores de canales abiertos por ligandos sino también receptores acoplados a proteínas G, comúnmente llamados receptores metabotrópicos a glutamato (mRGlu) (Pin, 1995).

En 1991 Houamed y col. así como Masu y col. lograron clonar el primer mGluR y expresarlo funcionalmente en oocitos de *Xenopus laevis* para posteriormente ser caracterizado electrofisiológicamente, este receptor fue denominado mGluR1, el cual más adelante sería utilizado como sonda en ensayos de hibridización y PCR para identificar otros miembros de la familia de mGluRs. A la fecha se conocen ocho secuencias de mRGlu, se han denominado mGluR1, mGluR2, mGluR3, mGluR4, mGluR5, mGluR6, mGluR7 y mGluR8, varios de ellos tienen variantes de procesamiento (Pin, 1995).

Los mRGlus tienen la característica de ser más grandes que otros receptores acoplados a proteínas G, sin embargo poseen una arquitectura transmembranal parecida, un dominio N-terminal grande extracelular, siete segmentos transmembranales y un dominio C-terminal citoplásmico pequeño (Fig. 2). La secuencia de a.a. de estos receptores es altamente conservada en sus siete segmentos transmembranales y en su dominio N-terminal extracelular (Nakanishi, 1992). Basado en la identidad de sus secuencias a.a., los ocho mRGlus se han clasificado en tres grupos, en el grupo I se encuentran mGluR1 y mGluR5, en el grupo II mGluR2 y mGluR3, y en el grupo III mGluR4, mGluR6, mGluR7 y mGluR8. Los mRGlu del mismo grupo muestran cerca de un 70% de identidad en sus secuencias mientras que entre los diferentes grupos solo hay un 45% de homología (Pin, 1995).

## **SECUENCIAS DE RECEPTORES A ACIDO GLUTAMICO CLONADAS EN OTRAS ESPECIES**

Las secuencias de los receptores AMPA/KA están muy conservadas en el grupo de organismos en que han podido ser clonadas. Por ejemplo la identidad entre las secuencias de esta familia entre rata, ratón y humano es de entre el 96-97% (Hollman, 1994). Además de

secuencias en mamíferos, esta familia ha sido clonada de aves y peces. Las cuatro secuencias se han obtenido de pollo, tres de ellas de pichón (GluPII, homólogo a GluR2, GluPIII homólogo a GluR3 y GluPIV homólogo a GluR4) y GluR4 del pez dorado (Goldman, 1994; datos no publicados). La identidad a nivel de a.a con los homólogos de mamífero es de entre 90% y 95% (Paperna, 1996; Ottiger, 1995).

Además de homólogos a las subunidades de mamífero existen otras secuencias de iRGlu clonadas de invertebrados. Estas secuencias incluyen dos receptores de mosca de fruta, *Drosophila* (DGluR-I y DGluR-II) y uno de molusco, *Lymnea* (LymGluR) (Hollman, 1994). Recientemente se ha clonado otra secuencia en nemátodo (*Caenorhabditis elegans*), con una identidad del 20 al 30% con las secuencias de mamífero (Maricq, 1995).

## ANTECEDENTES

En general toda célula presenta en su membrana citoplásmica distintos componentes membranales que le permiten regular el flujo de iones los cuales son denominados genéricamente como bombas, acarreadores y canales iónicos (Alberts, 1994).

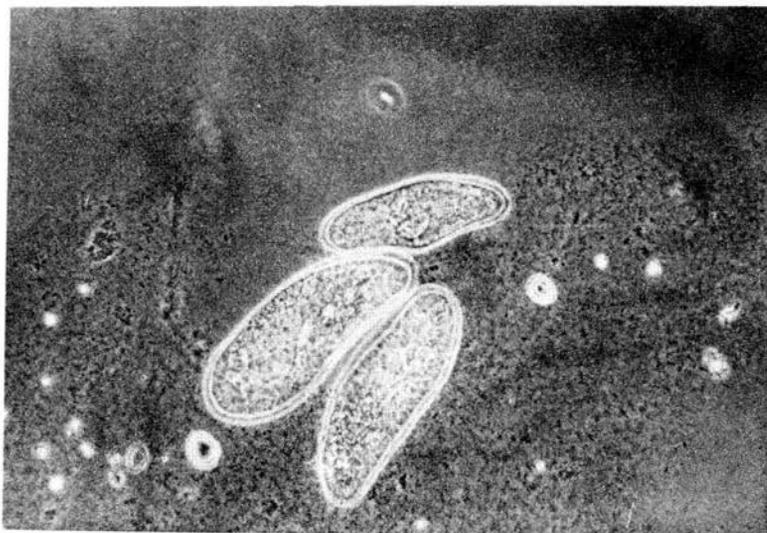
Los canales iónicos están involucrados en numerosas funciones celulares y se encuentran en una variedad de tipos celulares, desde organismos simples hasta células del cerebro de organismos superiores (Hille, 1984; Hille, 1989). Estos canales funcionan como poros macronucleares que permiten y regulan el paso de iones a través de la membrana en rangos de  $10^7$  a  $10^9$  iones por segundo. El movimiento de los iones de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{+2}$  y  $\text{Cl}^-$ , es responsable del fenómeno de excitación eléctrica en la membrana de nervio, músculo y otros tejidos, produciendo y traduciendo señales eléctricas. El cierre y apertura de los canales iónicos dependen de sustancias específicas (neurotransmisores, hormonas, a.a., etc.) o de cambios en el voltaje de la membrana (Kandel, 1991).

### *Paramecium* como célula excitable

El ciliado marino *Paramecium calkinsi* (Fig.4) y el ciliado de agua dulce *Paramecium tetraurelia*, fueron elegidos para este estudio por varias razones: 1) Son organismos eucarióticos unicelulares con membrana excitable (presentan muchas de las características mostradas por las membranas de las células nerviosas), 2) responden a una variedad de estímulos externos con respuestas fisiológicas y conductuales (sus patrones conductuales están gobernados por varias corrientes iónicas, el potencial de membrana controla la actividad ciliar y por consiguiente el movimiento locomotor), 3) tiene una longitud de 100-200  $\mu\text{m}$  (su conducta puede ser observada bajo un microscopio estereoscópico) 4) puede tomarse como un modelo neurofarmacológico conductual (por ejemplo desensibilización y adaptación), 5) son fáciles de manipular genéticamente, 6) Ofrecen la ventaja de tener un tiempo de reproducción relativamente corto (6-10 hrs) haciéndolos un modelo eucariótico ideal, además de hacer posible su manipulación bioquímica (Hinrichsen, 1988).

El ciliado *Paramecium* presenta en su membrana celular distintos tipos de canales iónicos que le permiten regular el influjo de distintos iones, los cuales determinan y controlan diferentes conductas de nado (Eckert y Brehem, 1979). En estudios electrofisiológicos y conductuales se ha visto la respuesta de fluctuaciones en el potencial de membrana de *P. tetraurelia* a la aplicación de L-Glu, éste es atraído por ácido L-Glu a concentraciones de  $10^{-9}$  a  $10^{-4}$  M induciendo una hiperpolarización pasajera mediada por flujos de  $\text{K}^+$  (Preston, 1988A). Por ensayos de unión se ha comprobado la existencia de sitios de unión a  $[^3\text{H}]\text{L-Glu}$  en fracciones ciliares de *P. tetraurelia*, se observó el efecto de desplazamiento de varios aminoácidos y análogos estructurales de L-Glu (como son por ejemplo D y L-Glu, D y L-Ibo, KA, QA, D y L-ASP, NMDA y ácido cisteico), ASP, Ibo, QA, ácido cisteico y NMDA son desplazadores potentes a la unión de  $[^3\text{H}]\text{L-Glu}$ , mientras que KA lo es pobremente (Preston, 1988B).

En estudios con el ciliado marino *P. calkinsi*, se logró establecer la expresión de una proteína inmunológicamente relacionada con la KBP de cerebelo de pollo con un peso molecular de aproximadamente 67 KDa. Por ensayos de inmunocitoquímica se estableció la presencia de esta proteína en la membrana de *P. calkinsi*, sugiriendo la presencia de un ancestro común de los miembros de la familia de receptores ionotrópicos tipo AMPA/KA (Acosta, 1993).



**Fig 4.** *Paramecium calkinsi*. Micrografía de contraste de fases de *P. calkinsi*.

Así mismo, en estudios electrofisiológicos en *P. calkinsi* se observó el efecto de agonistas de Glu (L-Glu, AMPA y KA) sobre la permeabilidad de membrana, estos agonistas producen una depolarización lenta de la membrana asociada con un incremento en la conductancia de entrada. Estos resultados sugieren que *P. calkinsi* expresa en su membrana un

receptor de tipo ionotrópico que puede ser activado por Glu, AMPA y KA; similar al iRGlu presente en vertebrados (Calvillo, 1993). Por otro lado, se ha sugerido que la activación del receptor AMPA/KA presente en la membrana celular de *P. calkinsi* presenta una permeabilidad iónica selectiva al  $Ca^{+2}$  (Bernal y Ortega, 1994).

Es claro por ensayos electrofisiológicos, conductuales y de unión que existe un RGlu en este tipo de organismos (Brehm, 1978; Preston, 1988A; Preston, 1988B; Calvillo, 1993; Ortega y Bernal, 1994). Por ello en este trabajo se pretendió determinar si los organismos *P. tetraurelia* y *P. calkinsi* expresan algún homólogo a los iRGlu.

## OBJETIVOS

### OBJETIVOS GENERALES :

1) Determinar si en *Paramecium calkinsi* y *Paramecium tetraurelia* se expresa un homólogo de receptor a glutamato.

### OBJETIVOS PARTICULARES:

1.a) Amplificación, titulación y purificación del ADN de la biblioteca de *P. tetraurelia* para ser utilizado como templado en reacciones de PCR.

1.b) Amplificación del ADNc de *P. calkinsi* y *P. tetraurelia* con oligonucleótidos de las secuencias GluR1–GluR4 (de secuencias conocidas en rata).

1.c) Diseño de oligonucleótidos de las regiones más conservadas de los RGlu para su utilización en reacciones de amplificación por PCR (basado en tabla de uso de codones de *P. tetraurelia*.)

1.d) Utilización de los productos de PCR para ensayos de Southern-blot.

## MATERIAL Y METODOS

### CULTIVOS DE *Paramecia*

Los protistas ciliados *P. tetraurelia* (Pt) de agua dulce y *P. calkinsi* (Pc), de agua salada son las especies utilizadas como preparación biológica en el desarrollo de la presente tesis. Estos ciliados fueron proporcionados por el Dr. Juan Bernal del Departamento de Fisiología y Farmacología de la Universidad Autónoma de Aguascalientes.

El *P. calkinsi* y el *P. tetraurelia* se cultivaron en medio marino y de agua dulce artificial respectivamente (**Tabla I**). Durante el crecimiento y expansión del cultivo las células se alimentaron con *Enterobacter aerogenes* (Acosta, 1993).

La bacteria se sembró en medio luria (LB) agar al 1.5% (**Tabla I**) a 37°C durante toda la noche, una vez crecida la bacteria, se tomaron dos inóculos y, se resembraron en 500 ml de cada uno de los medio de cultivo y, se dejó crecer durante toda la noche. Al día siguiente se filtró el *Paramecium* y se concentró por centrifugación en tubos de centrifuga de 250 ml a 5 000 rpm. durante 20 min a temperatura ambiente, las pastillas se añadieron en los dos matraces donde creció la bacteria.

**TABLA I. MEDIOS DE CULTIVO**

Medio dulce artificial al 25%	Stigmasterol 5mg/lit; Casaminoácidos 0.3 g/lit; NaCl 0.0102mM; KCl 10mM; CaCl <sub>2</sub> 15mM; MgCl <sub>2</sub> 5mM; HEPES-HCl 5mM pH7.3
Medio marino artificial al 25%	Stigmasterol 5mg/lit; Casaminoácidos 0.3 g/lit; NaCl 115mM; KCl 10mM; CaCl <sub>2</sub> 15mM; MgCl <sub>2</sub> 5mM; HEPES-HCl 5mM pH7.3
Medio LB agar	Bacto-tryptone 1%; Bacto-yeast extract 0.5%; NaCl 0.17M; Agar 1.5%
Medio LB líquido	Bacto-tryptone 1%; Extracto bacto-yeast 0.5%; NaCl 0.17M
Medio LB agar con IPTG	Luria 0.7%, IPTG (200mg/ml)

Medio LB/Ampicilina	Luria; Ampicilina
Medio luria suplementado	Luria; Maltosa 2%; 10mM de MgSO <sub>2</sub>
Medio agar NZCYM	Amida NZ ; NaCl 85mM; Extracto bacto-yeast 5g/lit; Casa aminoácidos 1g/lit; MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O 8mM

#### EXTRACCION DE ARN TOTAL

Para la extracción del ARN total de *P. tetraurelia* y *P. calkinsi*, las células se recuperaron por centrifugación a 4°C a 5000 rpm por un espacio de 15 min, en tubos de centrifuga estériles de 250 ml, y las pastillas obtenidas se lavaron dos veces con un volumen igual de amortiguador de fosfato salino (PBS) 1X pH 7.4, estéril, libre de iones de Ca<sup>+2</sup> y Mg<sup>+2</sup> (Tabla II). El ARN se extrajo de acuerdo al método de Tiocianato de guanidina (Chomcynski, 1987). Las células se lisaron brevemente en tubos nuevos y estériles de 50 ml con la ayuda de un politrón en solución D (200-300 µl /100 mg de células) (Tabla III), la mezcla se transfirió a tubos corex limpios, esterilizados y homeados, a cada tubo se le agregó 1 volumen de fenol saturado en Tris.HCl pH 8.0, 1/10 de volumen de acetato de sodio pH 5.6 3M y 1/5 de volumen de cloroformo- alcohol isoamflico (24:1). Despues de agregar las soluciones se mezcló vigorosamente con la ayuda de un vortex, y se dejó incubando 15 min en hielo. Pasado el tiempo de incubación, se centrifugó a 10 K por 20 min a 4°C (rotor SS34, centrifuga SORVALL), se recuperó la fase acuosa y se precipitó con un volumen de isopropanol (por lo menos 12 hrs). El ARN se recuperó por centrifugación a 10K 30 min a 4°C, se decantó el sobrenadante, las pastillas obtenidas se resuspendieron en solución D y se transfirieron a microtubos de 1.5 ml. Nuevamente se precipitó con un volumen de isopropanol y 1/10 de volumen de acetato de sodio al menos 2 hrs a -20°C, pasado el tiempo de incubación se centrifugarón a 12 000 x g por 15 min a 4°C en una microfuga. La pastillas obtenidas se lavarón dos veces con etanol al 70%, se dejarón secar y se resuspendieron en formamida. El ARN de cerebro de rata (Cr) e hígado de rata (Hr) se obtuvieron por el mismo método, y se

utilizarón como control positivo y control negativo respectivamente.

#### CUANTIFICACION DE ACIDOS NUCLEICOS

La cuantificación de los ácidos nucleicos se llevó a cabo por espectrofotometría considerando que, un valor de uno de absorbancia a 260 nm equivale a 40 µg/ml para ARN y 50 µg/ml para ADN. El cociente de el valor de absorvancia a 260 nm entre la absorvancia a 280 nm se utiliza para evaluar la pureza de la preparación, este cociente debe estar entre 1.8 y 2.

**TABLA II. AMORTIGUADORES**

Amortiguador I DIG-DEPC	Acido maleico 100mM; NaCl 150mM; pH 7.5
Amortiguador II DIG-DEPC	Reactivo de bloqueo al 1% (w/v) disuelto en amortiguador II DIG
Amortiguador III DIG-DEPC	Tris-HCl 100mM, pH 9.5; NaCl 100mM; MgCl <sub>2</sub> 50mM
Amortiguador MOPS 10X	MOPS 0.2M pH 7.0; Acetato de Na 80mM; EDTA 10mM pH 8.0
Amortiguador PBS 1X (libre de Ca <sup>+2</sup> y Mg <sup>+2</sup> )	KCl 2.6mM; NaCl 136mM; NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 10mM; KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1.3mM pH 7.4
Amortiguador SSC 30X	NaCl 4.5M; Citrato de Na 450mM
Amortiguador SSPE 20X	NaCl 3M; NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0.2M; EDTA 20mM pH 7.4
Amortiguador TAE 1X	Tris-acetato 0.04M; EDTA 0.001M PH 8.0
Amortiguador TE 1X	Tris-HCl 10 mM pH 7.4; EDTA 1mM pH 8.0
Amortiguador TEN 1X	NaCl 0.1M; Tris-HCl 10mM pH 8.0; EDTA 1mM pH 8.0
Amortiguador de PCR 10X	KCl 500mM, Tris-HCl pH 8.3 100mM
Amortiguador RP 1X	HEPES 90mM pH6.6, MgCl <sub>2</sub> 10mM

## ENSAYOS DOT-BLOT

La membrana se equilibró previamente con agua bidestilada tratada con dietil pirocarbonato (H<sub>2</sub>O-DEPC) por 5 min y 5 min con amortiguador de transferencia SSPE 20X (Tabla II). Las muestras fueron complementadas con formamida al 50%, formaldehído al 23.5% y SSPE 1.3X, posteriormente se desnaturalizaron por 15 min a 68°C y después se volvieron a complementar con dos volúmenes de SSPE 20X. Luego, fueron transferidas a membranas Duralon UV (Stratagene) con la ayuda de un Trans-blot, aproximadamente 6 µg por muestra, y se fijaron con la ayuda de un entrecruzador UV Stratalinker 2400 (Stratagene) a 120 000 µjoules por 30 seg (Sambrook,1989).

**TABLA III. SOLUCIONES**

Solución D	Tiocianato de guanidina 4M; Citrato de Na 25mM, pH 7.0; Sarkosil 0.5%; β-mercapto etanol (300 µl/50 ml desolución D)
Solución SM	NaCl 1M; MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O 8mM; Tris-HCl 0.05M
Solución STE	NaCl 0.1M; Tris-HCl 10mM, pH 8.0; EDTA 1mM, pH 8.0
Solución I lisis alcalina	Glucosa 50mM; Tris-HCl 25mM, pH 8.0; EDTA 10mM, pH 8.0
Solución II lisis alcalina	NaOH 0.2 N (diluido al momento de una solución stock 10 N), SDS 1%
Solución III lisis alcalina	De una solución con 60 ml de acetato de potasio 5M; 11.5 ml de ácido acético glacial y 28.5 ml de H <sub>2</sub> O bidestilada. La solución resultante es 3M con respecto a potasio y 5M con respecto al acetato
Solución de colorante para muestras de ARN	Glicerol al 50%; EDTA 1mM pH 8.0; Azul de bromofenol al 0.25%; Xilene cianol FF 0.25%
Solución de tinción para membranas con ARN	Acetato de Na 0.5M, pH 5.2; Azul de metileno al 0.05%
Solución de tinción para geles de agarosa con ADN o ARN	10 mg de bromuro de etidio por ml de H <sub>2</sub> O bidestilada (conservar en frasco obscuro)
Solución depuración Southern-blot	HCl 0.25 N

Solución desnaturalización Southern-blot	NaOH 0.5N; NaCl 1.5 M
Solución neutralización Southern-blot	Tris-HCl 100mM; NaCl 1.5M
Solución prehibridización con alta concentración de SDS para el sistema DIG	Formamida 50%, SSC 5X, fosfato de sodio 50 mM pH 7.0, reactivo de bloqueo 2%, N-lauroylsarcosine 0.1% , SDS 7%
Solución de lavado 1 para geles de agarosa Northern-blot	NaCl 150mM, NaOH 500mM
Solución de lavado 2 para geles de agarosa Northern-blot	Tris-HCl 100mM, pH7.4; NaCl 150mM

#### ENSAYOS NORTHERN BLOT

Entre 25 y 30  $\mu$ g de ARN total fue separado por electroforesis en geles de agarosa desnaturalizantes al 1% (formaldehído 2.2 M y amortiguador de MOPS 1X, **Tabla II**), a 85 volts por 60 min. Previamente a la corrida las muestras se desnaturalizarón en 50% de formamida, 0.5X MOPS y 6.5% de formaldehído a 65°C por 15 min, posteriormente a cada muestra se le adicionó 1  $\mu$ l de una solución de bromuro de etidio (**Tabla III**) y 2  $\mu$ l de solución de colorante para ARN (**Tabla III**). Se utilizó una minicámara para electroforesis y como amortiguador de corrida MOPS 1X, el gel se recorrió a 85 volts durante 5 min. Previo a la transferencia el gel se lavó 20 min con la solución de lavado 1 (**Tabla III**) y 30 min con la solución de lavado 2 (**Tabla III**), a temperatura ambiente. Posteriormente el ARN se transfirió a membranas Duralon UV utilizando como amortiguador de transferencia SSPE 10X, con la ayuda de un aparato de transferencia (Stratagene). Finalmente se fijó a 120 000  $\mu$ joules por 30 seg con la ayuda de un entrecruzador UV Stratalinker 2400 (Sambrook,1989) . Para visualizar los ácidos nucleicos la membrana se tiño, con solución de tinción para ARN (**TablaV**).

## ENSAYOS SOUTHERN BLOT

Los fragmentos de ADNc obtenidos en la amplificación de GluR3 en ambas muestras de ARN (Pc y Pt) se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 1.5% utilizando como amortiguador de corrida TAE 1X (**Tabla II**). Previamente a la transferencia el gel se sometió a depurinización, desnaturalización y neutralización, por 30 min y en agitación constante con cada una de las soluciones (**Tabla III**). El ADN se transfirió a membranas Duralon UV con SSPE 10X con la ayuda de un aparato de transferencia. El ADN se fijó a la membrana a 120 000  $\mu$ joules por 30 seg con la ayuda de un entrecruzador UV Stratalinker 2400(Sambrook,1989).

## ENSAYOS DE HIBRIDACION

### **Dot y Northern blot (método radioactivo)**

La membrana se prehibridó 30 min a 64°C con solución de prehibridación rápida (Stratagene), posteriormente se hibridó 60 min en la misma solución adicionando la sonda marcada con terminal transferasa (0.7 pmoles/ml de solución de hibridización) y 1000 $\mu$ g de ADN de esperma de salmón (ADNss). Pasado el tiempo de hibridación, la membrana se lavó dos veces con solución de lavado 1 (**Tabla III**) por 15 y 5 min en agitación constante a temperatura ambiente, y dos veces con la solución de lavado 2 (**Tabla III**) por 30 y 15 min en agitación constante a 42 °C. Posteriormente la membrana se expuso a autorradiografía (Sambrook,1989).

### **Southern blot (método no radiactivo)**

La membrana se prehibridó 60 min. a 55°C con solución de prehibridación con alta concentración de SDS (**Tabla III**) y se dejó hibridando toda la noche con solución de prehibridación con alta concentración de SDS (con aprox. 2.5 pmoles de sonda por ml de solución de hibridización) a la misma temperatura; los tiempos de lavado fueron los mismos que para los ensayos de Dot-Blot, posteriormente se realizó el ensayo de inmunodetección por

el sistema DIG según instrucciones del proveedor (Boehringer).

## ENSAYOS DE INMUNODETECCION POR DIGOXIGENINA

Después de la hibridación y lavados de posthibridación, la membrana se equilibró en amortiguador I (**Tabla II**) en agitación suave y constante de 1 a 5 min. Posteriormente se bloqueó en amortiguador II (**Tabla II**) por 30 a 60 min. Al final del periodo de bloqueo se preparó la solución de anticuerpo (Ab), diluyendo la fosfatasa alcalina Anti-DIG 1:10 000 (75mU/ml) en amortiguador II y mezclándolo suavemente por inversión, y se incubó por 30 min con la solución de Ab. Pasado el tiempo de incubación se descartó la solución de Ab y se lavó con amortiguador I, dos veces por 5 min. La membrana se equilibró en amortiguador III (**Tabla II**) de 2-3 min, y se incubó por 5 min con CDP-Star™ 25mM (substrato quimiolumincente) diluido en amortiguador III. Finalmente se retiró la solución para exponerla a autorradiografía.

## MARCAJE DE SONDAS

### Oligonucleótidos-Transferasa terminal

Los oligonucleótidos correspondientes a las subunidades GluR1 a GluR4 (**Tabla IV**) (Keinänen, 1990) se marcaron radioactivamente. Aproximadamente 2.5 pmoles de cada oligonucleótido se utilizaron por reacción. Se utilizaron 500  $\mu$ Ci de [<sup>32</sup>P]- $\alpha$ -dATP y 50 U de transferasa terminal en las condiciones indicadas por el proveedor (Boehringer). Los oligonucleótidos sin incorporar fueron removidos en columnas de Sephadex G-50 (Sambrook, 1989).

### Plásmidos

Para el marcaje por métodos no radioactivos se llevó a cabo una minipreparación del ADN plasmídico de la clona a GluR3 (pRB312, gen GluR3, flop) por el método de lisis alcalina (Sambrook, 1989). Aproximadamente 1  $\mu$ g de ADN se marcó por el sistema DIG-11-dUTP-hexámeros al azar según instrucciones del proveedor (Boehringer).

**TABLA IV. SECUENCIA OLIGONUCLEOTIDOS PARA ENSAYOS DE DOT-BLOT Y NORTHERN-BLOT**

GEN	OLIGONUCLEOTIDOS
GluR 1	5' GTC ACTGGTTGTCTGGTCTCGTCCCTCTTCAA ACTCTTCGCTGTG 3'
GluR 2	5' TTC ACTACTTTGTGTTTCTCTTCCATCTTCAAATTCCTCAGTGTG 3'
GluR 3	5' AGGGCTTTGTGGGTCACGAGGTTCTTCATTGTTGTCTTCCAAGTG 3'
GluR 4	5' CTGGTCACTGGGTCCTTCCCTCCCATCCTCAGGTTCTTCTGTGTG 3'

Oligonucleótidos de secuencias conocidas de AMPA/KA (GluR1-GluR4).

#### PREPARACION DE COLUMNAS SEPHADEX G-50

En un vaso de precipitado se hidrató la cantidad necesaria de sephadex G-50, se retiró el sobrenadante para equilibrarse en amortiguador TE 1X pH 7.6 y posteriormente se esterilizó a 20 Lb/pulg<sup>2</sup> por 15 min. Nuevamente se retiró el sobrenadante y se equilibró en amortiguador TEN 1X estéril (**Tabla II**); con la ayuda de una centrifuga, el sephadex G-50 se empacó en jeringas para insulina estériles y se almacenaron a 4°C antes de su uso (Sambrook, 1989).

#### AMPLIFICACION DE LA BIBLIOTECA DE ADNc DE *P. tetraurelia*.

La biblioteca de ADNc de *P. tetraurelia* fué proporcionada por el Dr. Joachim Schultz de la Universidad de Tuebingen en Alemania. Está contruida en el vector  $\lambda$  ZAP y se amplificó en *E. coli* XL1-BLUE MRF. Se mezclaron 10<sup>5</sup> bacteriófagos con 600  $\mu$ l de la bacteria para placa y se incubó 20 min a 37°C, posteriormente se plaqueó el cultivo infectado en cajas petri con agar NZCYM (**Tabla I**) y se incubó por 12 hrs a 42°C. Los bacteriófagos se cosecharón con 15 ml de amortiguador para almacenar y diluir bacteriófagos  $\lambda$  (SM) (**Tabla III**) por 2hrs a temperatura ambiente. Se retiró cuidadosamente el SM y los restos celulares se removieron por centrifugación a 7 000 x g por 30 min a 4°C. La biblioteca se almacenó a 4°C en pequeñas alfcuotas de tubos cerrados herméticamente, con 20-30  $\mu$ l de cloroformo. La biblioteca se tituló

en *E. coli* XL1 BLUE MRF en placas de LB agar usando 3 ml de top agarosa (0.7%) (Sambrook,1989).

#### PURIFICACION DE ADN DEL FAGO

En un matraz Erlenmeyer de 250 ml con: 50 ml de medio LB, 200  $\mu$ l de fagos y 400  $\mu$ l de bacterias recién crecidas. Se crecieron a 30°C hasta que alcanzaran una densidad óptica (DO) a 550 nm de 0.5. Posteriormente se incubaron a 45°C por 15 min y después se cambiaron a 37°C hasta que alcanzaran el máximo de lisis celular. Una vez que la lisis se completó se le adicionó 500 $\mu$ l de cloroformo y se continuó la agitación por 15 min más, se removieron los restos celulares por centrifugación a 5 000 x g por 10 min a 4°C y se recuperó el sobrenadante. Se incubó a 37°C durante 20-30 min y se le adicionó un volumen de 20% PEG-80 y NaCl 2.0 M en diluyente  $\lambda$ , se mezcló suavemente y se incubó por 1hr a 0°C (en hielo). Las partículas del fago precipitado se recuperaron por centrifugación a 10 000 x g por min a 4°C, el sobrenadante se removió por aspiración y la pastilla obtenida se resuspendió en 500 $\mu$ l de TE 1X pH 8.0. Se le adicionó un volumen de cloroformo se agitó vigorosamente y se centrifugó a 10 000 x g por 5 min a temperatura ambiente. La fase acuosa contiene el fago, al cual se le adicionó 2 $\mu$ l de EDTA 0.5 M pH8.0, por cada 500 $\mu$ l de solución del virus, se mezcló y se le adicionó proteinasa K a una concentración final de 50 $\mu$ g/ml y SDS a una concentración final de 0.5%. La mezcla se incubó a 56°C durante 1 hr, pasado el tiempo de incubación se enfrió y se extrajo una vez con fenol y dos con cloroformo. La fase acuosa se precipitó con 1/10 de volumen de acetato de sodio 3.0 M pH 5.0 y dos volúmenes de etanol absoluto. El ADN se recupera por centrifugación y la pastilla se resuspende en 200  $\mu$ l de agua bidestilada estéril (Sambrook,1989).

#### MINI PREPARACION DE ADN PLASMIDICO (LISIS ALCALINA)

Aproximadamente 10 ml de cultivo se concentró y transfirió a un microtubo estéril; la pastilla se resuspendió primero en 0.5 ml de STE (**Tabla III**), posteriormente se centrifugó a

12 000 x g por 5 min a 4°C en una microfuga para retirar el sobrenadante. La pastilla se resuspendió por agitación vigorosa en 100 µl de solución de lisis I (Tabla III); se le agregó 200 µl de solución de lisis II preparada al momento (Tabla III); se almacenó en hielo y se le agregó 150 µl de solución III fría y se agitó (Tabla III). Se almacenó el tubo en hielo por 3-5 min y se centrifugó a 12 000 x g por 5 min a 4°C. Se transfirió el sobrenadante a otro tubo estéril y se extrajo con fenol:cloroformo. La fase acuosa se precipitó con dos volúmenes de etanol a temperatura ambiente por 2 min. Se centrifugó a 12 000 x g por 5 min a 4°C, se removió el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en 50 µl de TE (pH 8.0) con 20 µg/ml de Ribonucleasa pancreática (Sambrook, 1989).

**TABLA V. SECUENCIA DE OLIGONUCLEOTIDOS PARA PCR**

GEN	INICIADOR EN SENTIDO (5' 3')	INICIADOR EN CONTRASENTIDO (3' 5')
GluR 1	TGGTGGTTCTTCACCCTGATCAT	TATGGC.TTCATTGATGGATTGC
GluR 2	TGGTGGTTCTTCACCCTGATCAT	TGCAAAATTCTGGGAATTCTGC
GluR 3	TGGTGGTTCTTCACCCTGATCAT	AAT TCTGAGTGTGGTGGCAGG
GluR 4	TGGTGGTTCTTCACCCTGATCAT	ACTCCCAGTGATGGATAACCTG

Oligonucleótidos de secuencias conocidas de AMPA/KA (GluR1-GluR4).

#### AMPLIFICACION-PCR

Las reacciones de reverso transcriptasa (RT) del ARN y amplificación (PCR) del ADN se llevarán a cabo en microtubulos de 500 µl, y con la ayuda de un termociclo de ADN (MJ Research, INC) y reactivos de Perkin Elmer (según instrucciones del proveedor).

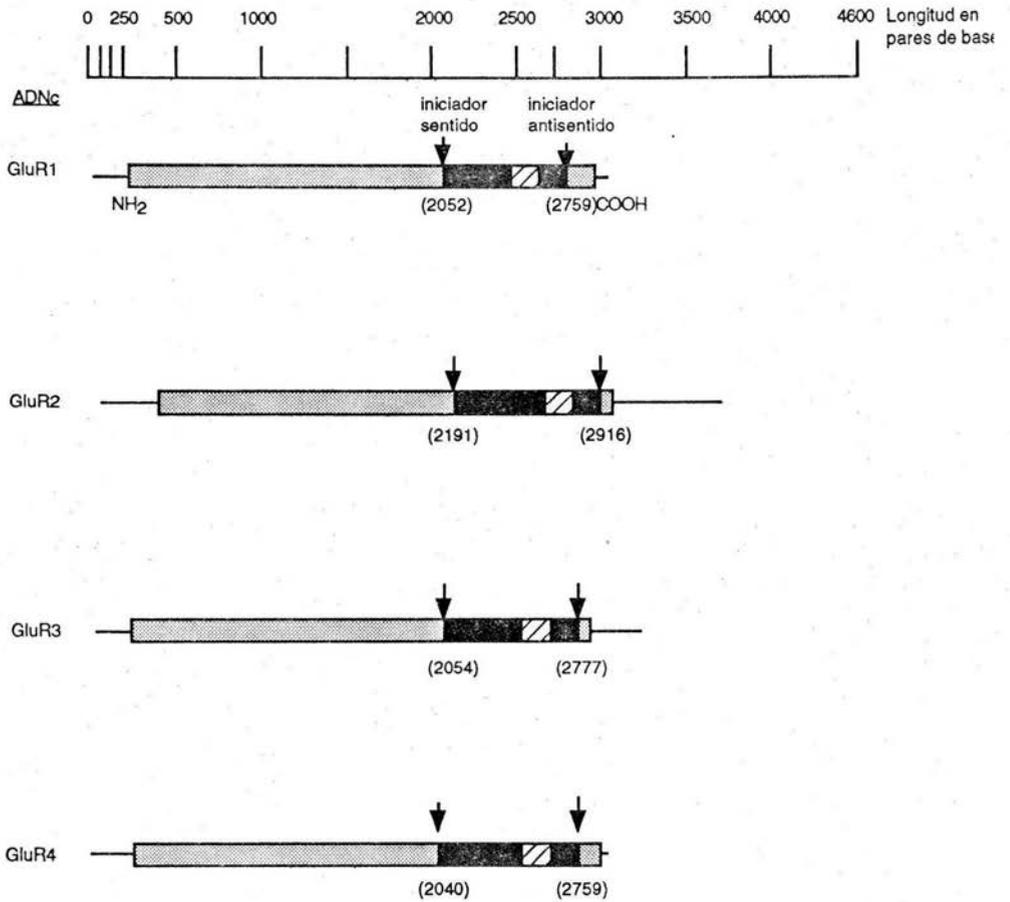
Las condiciones en las que se llevarán a cabo los ensayos de RT fueron: Amortiguador de PCR 1X (Tabla II); dATP, dCTP, dGTP y dTTP 0.5 mM de c/u; Oligo dT 0.2 µg; Inhibidor de ribonucleasas 50 unidades (U); MgCl<sub>2</sub> 1mM; MLV RT 200 U; cada muestra se llevó a un volumen final de 20 µl. Finalmente se incubó a 37°C por 60 min.

Las condiciones, en las que se llevó a cabo los ensayos de PCR, fueron las siguientes: Amortiguador de PCR 1X; dATP, dCTP, dGTP, y dTTP 0.12 mM de c/u; MgCl<sub>2</sub> 2.5 mM; iniciador sentido e iniciador antisentido 0.2-1.0 μM de c/u (Tabla V); 3μl de la reacción de RT y Taq polimerasa 2.5 U; cada muestra se llevó a un volumen final de 80 μl. Las muestras se sometieron a 35 ciclos de temperaturas de: 1 min. a 95° C, 1 min a 56°C y 1 min a 72°C; finalmente se sometieron a una incubación final de 7 min a 72°C. Los productos de PCR se resolvieron en geles de agarosa al 1.5 % con amortiguador TAE 1X , y se visualizaron por tinción con bromuro de etidio. Como marcador de peso molecular se utilizó el fago ØX174 RF restringido con HaeII.

#### DISEÑO DE OLIGONUCLEÓTIDOS

Para el diseño de los oligonucleótidos se llevó a cabo una búsqueda de las secuencias que codificaran R<sub>Glu</sub>, en la base de datos (Gene Bank). Estas secuencias se alinearon para tratar de buscar las zonas más conservadas. Posteriormente se localizaron secuencias codificantes de *P. tetraurelia* para elaborar una tabla de uso de codones, que nos permitiera seleccionar los oligonucleótidos más probables que codificaran para las secuencias más conservadas de R<sub>Glu</sub> en este organismo.

El diseño de los oligonucleótidos se llevó a cabo considerando los parámetros adecuados como son longitud en pares de bases, contenido en GC, formación de dímeros o estructuras de lazos. La síntesis de estos oligonucleótidos se llevó a cabo en la Unidad de Acidos Nucleicos del Departamento de Genética y Biología Molecular del CINVESTAV-IPN.



**Fig 5:** Ilustración esquemática de los oligonucleótidos usados en reacciones de PCR, de secuencias conocidas de AMPA/KA (GluR1-GluR4)

## RESULTADOS

### DOT-BLOT

Con la finalidad de establecer si *Paramecium* expresa algun ARNm homólogo a alguna de las subunidades de la familia AMPA/KA, se llevaron a cabo ensayos de Dot-blot. El ARN total de ambas especies de *Paramecium* se fijó a membranas de nylon y se hibridó contra oligonucleótidos de secuencias específicas para GluR1, GluR2, GluR3 o GluR4 marcada con [<sup>32</sup>P]. (Tabla IV). Como control positivo se utilizó el ARN total de cerebro de rata (Cr) y como control negativo el ARN total de Hígado de rata (Hr).

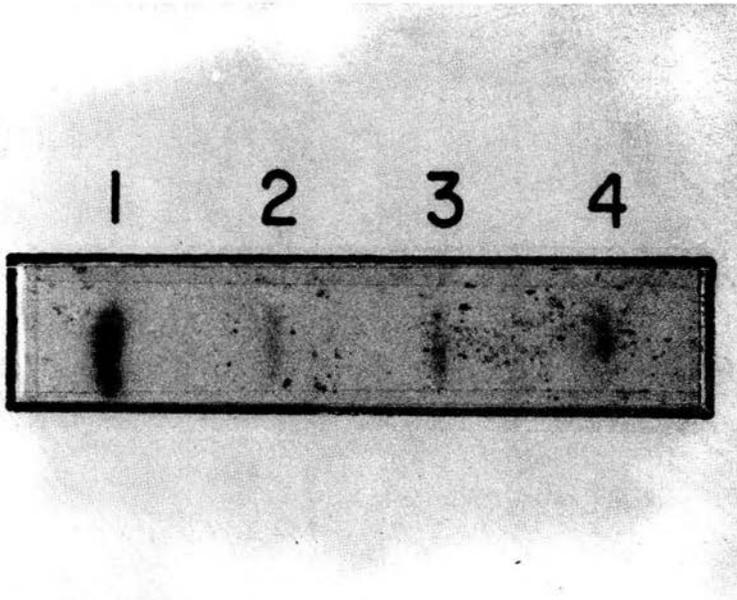


Fig 6. Análisis de Dot-blot del ARN total de *P. calkinsi* y *P.tetraurelia* con la sonda a GluR3 marcada con [<sup>32</sup>P]. 1) ARN total de Cr (control positivo), 2) ARN total de Hr (control negativo), 3) ARN total de *P. calkinsi* y 4) ARN total de *P. tetraurelia*.

Se detectó señal en ambas especies de *Paramecium* con la secuencia de GluR3. La señal detectada en ambas especies fue menos intensa en comparación con la obtenida en el control positivo. Así como la señal en *P. tetraurelia* fue más intensa en comparación con la obtenida en *P.*

*calkinsi* (Fig.6). En ambos casos puede existir la posibilidad de que se trate de falsos positivos. En vista de que no pudimos determinar la línea de corte para verificar si se trata de positivos reales se decidió llevar a cabo ensayos de Northern blot para estimar el tamaño de este posible ARNm.

#### NORTHERN-BLOT

Como por ensayos de Dot-blot, solo se detectó señal utilizando la sonda de GluR3, para los ensayos de Northern blot solamente se utilizó esta sonda. Este tipo de ensayos tiene la ventaja de permitirnos conocer el tamaño del ARNm, por lo que no requiere de determinar un valor a partir del cual se considere una señal como positiva. En las condiciones en que se realizaron los ensayos no fue posible detectar un homólogo a la subunidad GluR3 en ninguna de las dos especies de *Paramecium* (Fig.7).

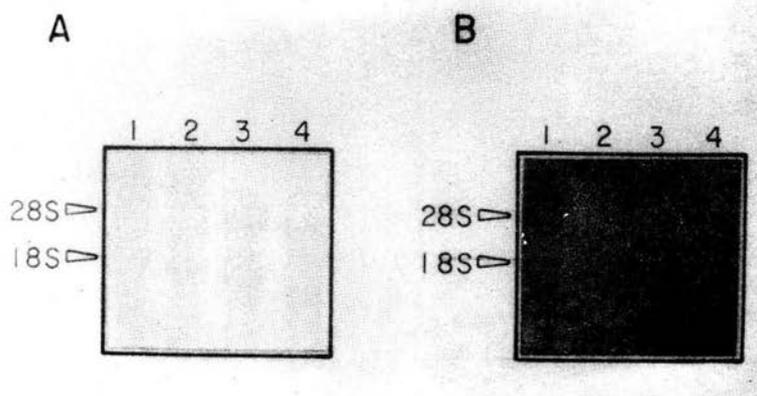
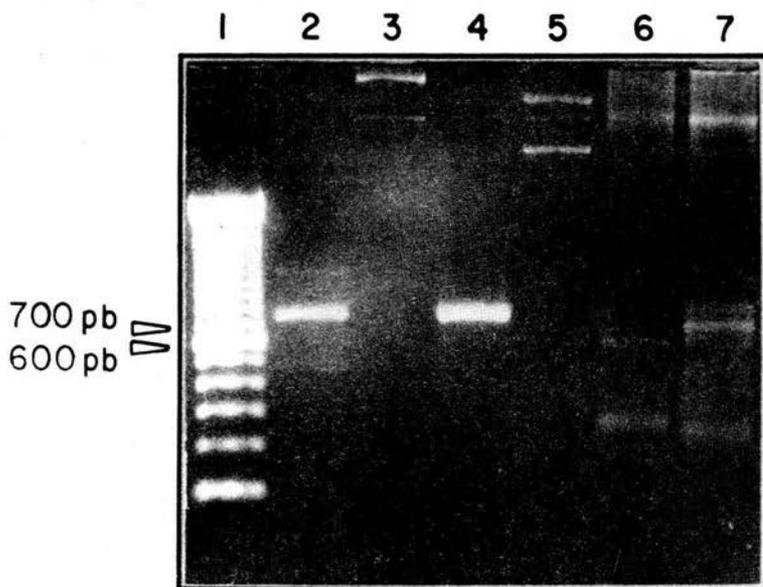


Fig 7. Análisis de Northern-blot del ARN total de *P. calkinsi* y *P.tetraurelia* con la sonda a GluR3 marcada con  $[^{32}\text{P}]$ . Aproximadamente 25  $\mu\text{g}$  de ARN se depositó en cada carril. El panel A muestra el ARN teñido en la membrana con azul de metileno. El panel B muestra la misma membrana hibridada con la sonda GluR3 marcada con  $[^{32}\text{P}]$ . 1) Cerebro de rata 2) Hígado de rata 3) *P. tetraurelia* y 4) *P. calkinsi*.

## AMPLIFICACION POR PCR

La imposibilidad de detectar mediante Northern blot los ARNm que codifican para RGlu, en estos organismos, pudo deberse a que la señal en el Dot blot es inespecífica; o a que la abundancia del mensajero es muy baja, por lo que el ARNm no sea detectable mediante las condiciones en las que se llevarón a cabo los ensayos de Northern blot.



**Fig 8. Análisis de PCR del gene GluR3 en *P. tetraurelia* y *P. calkinsi*.** 1. Marcador de peso molecular (fragmentos de ØX174 RF DNA/*Hae* I) 2. PCR GluR3 de Cr (control positivo), 3. ADN plasmídico de la clona GluR3 (control positivo), 4. PCR GluR3 de la clona GluR3 (control positivo), 5. ADN plasmídico de la clona KBP (control negativo), 6. PCR GluR3 de *P. tetraurelia*, 7. PCR GluR3 de *P. calkinsi*

Con la finalidad de detectar algún tipo de RGlu que pudiera expresarse en estos organismos, se llevaron a cabo ensayos de RTPCR en ambas especies de *Paramecium*. En vista de que, en el Dot blot se detectó una ligera señal con oligonucleótidos para GluR3; se decidió utilizar iniciadores que amplifican secuencias de los receptores de la familia AMPA/KA (Tabla V). Ya que

este método es extremadamente sensible y se pueden detectar cantidades mínimas de ADN; de existir un homólogo a alguna de estas subunidades sería muy probable detectarlo. Por otro lado, además de utilizar como templado en las reacciones de PCR el ADN complementario (ADNc) de ambas especies de *Paramecium*; se utilizó el ADN proveniente de una biblioteca de *P. tetraurelia*. El ADNc de Cr y el ADN plasmídico de la clona GluR3, se utilizaron como control positivo en las amplificaciones en las que se utilizaron los iniciadores que amplifican la secuencia de GluR3.

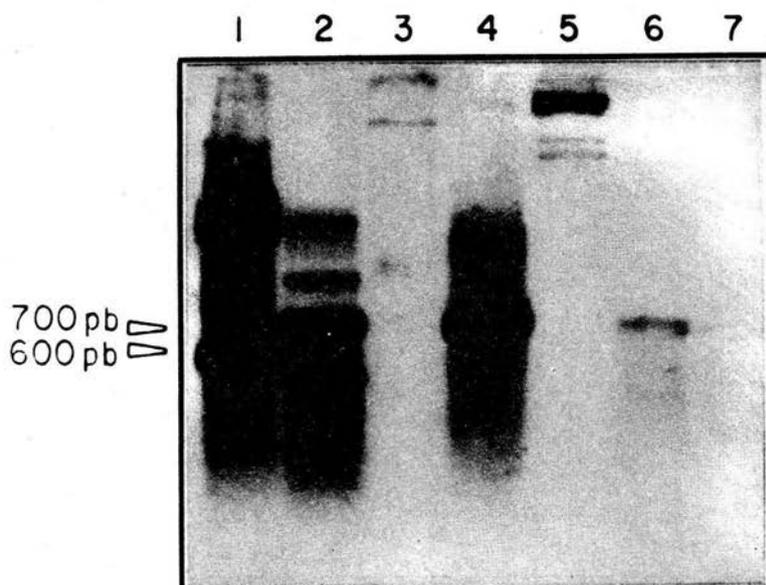
A partir del ADNc de ambas especies de *Paramecium* y utilizando los iniciadores que amplifican la secuencia GluR3, fue posible amplificar una serie de bandas que pudieran constituir amplificadas de esta secuencia. El tamaño esperado para este juego de oligonucleótidos es de alrededor de 700 pb; en ambas especies, una de las bandas resultantes de la reacción de amplificación, correspondió con este tamaño. A partir del ADN de la biblioteca no fue posible amplificar alguna banda (Fig.8)

#### SOUTHERN-BLOT

EL amplio espectro de bandeo que se observa con las amplificaciones es muy común cuando se amplifican fragmentos de forma inespecífica. Una posibilidad para demostrar cual o cuales de estas bandas puedan codificar para homólogos de RGlu es secuenciar y comparar con secuencias de receptores conocidos. Otra posibilidad para averiguar el grado de homología con las secuencias de RGlu es, utilizando estos productos como blanco en experimentos de Southern blot. Los productos de PCR obtenidos de ambas especies de *Paramecium* fueron resueltos en geles de agarosa y transferidos a membranas de nylon. Se hibridaron contra el ADNc de la secuencia GluR3 marcada con DIG para identificar el producto de PCR homólogo al receptor GluR3. La señal fue inmunodetectada con un conjugado de Ab anti-digoxigenina y fosfatasa alcalina; como sustrato se utilizó CDP-Start™.

Por medio de estos ensayos se detectó señal en las bandas de 700 pb amplificadas a partir del ADNc de Cr, clona GluR3, ADNc de *P. tetraurelia* y ADNc de *P. calkinsi*. La señal detectada en los controles positivos (Cr y clona GluR3) fue más intensa que las obtenidas en ambos tipos de

*Paramecium*. Así mismo; a pesar de que la banda de 700 pb amplificada en *P. tetraurelia* no se apreciaba a simple vista en el gel, la señal por inmunodetección, fue más intensa que en *P. calkinsi*, a pesar de que esta no se amplificó lo suficiente para ser visualizada con bromuro de etidio (Fig.9).



**Fig 9.** Análisis de Southern-blot de los productos de PCR de *P. tetraurelia* y *P. calkinsi*. La membrana se prehibridó 60 min y se hibridó toda la noche con 2.5 pmoles de sonda por ml de solución de hibridización a 55°C. Como sonda se utilizó la secuencia de ADNc de GluR3 marcada con digoxigenina. Pasado el tiempo de hibridización, la membrana se lavó dos veces con solución de lavado 1 (SSPE 2X, SDS 0.1%), en agitación por 15 y 5 min (a temperatura ambiente), y dos veces con la solución de lavado 2 (SSPE 0.1X y SDS 0.1%) por 30 y 15 min, en agitación constante y a 42 °C. La señal fue inmunodetectada con conjugado de fosfatasa alcalina y Ab anti-digoxigenina, y visualizada con luminol (CDP-Start™) al exponer la membrana a autorradiografía. 1. Marcador de peso molecular (fragmentos de ØX174 RF DNA/*Hae* I), 2.PCR GluR3 de Cerebro de rata, 3. ADN plasmídico de la clona GluR3, 4. PCR GluR3 de la clona GluR3, 5. ADN plasmídico de la clona KBP, 6. PCR GluR3 de *P. tetraurelia* y 7. PCR GluR3 de *P. calkinsi*.

## DISEÑO DE OLIGONUCLEOTIDOS PARA *P. tetraurelia*

Alternativamente al uso de secuencias previamente reportadas de RGlú; se diseñaron oligonucleótidos que pudieran codificar RGlú en *Paramecium*. Estos oligonucleótidos se utilizaron en reacciones de PCR para la amplificación de fragmentos de receptores tipo NMDA y no NMDA, en ambas especies de *Paramecium*.

El diseño de estas secuencias se llevó a cabo basándose en el alineamiento de secuencias ya conocidas de genes que codifican RGlú de tipo NMDA y no NMDA; de donde se seleccionaron las zonas más conservadas de estos. Posteriormente con secuencias codificantes de *P. tetraurelia* se elaboró una tabla de uso de codones (**Tabla VI**), la cual nos permitió seleccionar los oligonucleótidos más probables que pudieran codificar para secuencias más conservadas de receptores tipo NMDA y no NMDA en ambas especies de *Paramecium* (**Tabla VII y VIII**). Fue necesario diseñar por separado, secuencias para receptores NMDA y no NMDA ya que, al considerarlos juntos no es posible encontrar dos zonas lo suficientemente conservadas.

## AMPLIFICACION POR PCR CON OLIGONUCLEOTIDOS ESPECIFICOS A *P. tetraurelia*

Los ensayos de PCR se llevaron a cabo con los oligonucleótidos degenerados que se diseñaron, específicos a *P. tetraurelia*. Se establecieron las siguientes condiciones para los ensayos de PCR: Amortiguador de PCR 1X; dATP, dCTP, dGTP, y dTTP 1 mM de c/u; MgCl<sub>2</sub> 2.5 mM para los NMDA y 3.5mM para los No NMDA; iniciador sentido e iniciador antisentido 0.2-1.0 μM de c/u (**Tablas VII y VIII**); ADNc 1 μg aprox.; Amplificasa (ADN polimerasa) 2.5 U; cada muestra se complementó con H<sub>2</sub>O bidestilada dos veces estéril a un volumen de 80 μl. Las condiciones de PCR fueron 35 ciclos de: 1 min. a 95 °C; 1 min de alineamiento a 53° C para los NMDA y 46.5 °C para los No NMDA; y por último 1 min. a 72 °C. Alternativamente a las temperaturas de alineamiento para los oligonucleótidos tipo NMDA y no NMDA, las temperaturas de alineamiento se variaron a 43 °C y 36.5 °C, respectivamente. Además, también se llevaron a cabo ensayos en los que por cada ciclo, la temperatura de alineamiento se fue disminuyendo 0.5 °C

hasta llegar a 10 °C, completandose hasta los 35 ciclos. Los productos de PCR fueron resueltos en geles de agarosa al 1.5 % utilizando como amortiguador TAE 1X ( 0.04M Tris-acetato, 0.001M EDTA). No se logró amplificar algun fragmento tanto para los NMDA como para los no NMDA en ambas especies de *Paramecium*.

**TABLA VI. USO DE CODONES EN *P. tetraurelia***

Aminoácidos	Codon	Numero	/1000	Fracción
Ala	GCG	29.00	0.83	0.01
Ala	GCA	1060.00	30.21	0.36
Ala	GCT	1429.00	40.72	0.48
Ala	GCC	435.00	12.40	0.15
Arg	CGG	5.00	0.14	0.01
Arg	CGA	29.00	0.83	0.03
Arg	CGT	48.00	1.37	0.05
Arg	CGC	8.00	0.23	0.01
Arg	AGG	68.00	1.94	0.07
Arg	AGA	839.00	23.91	0.84
Asn	AAT	1523.00	43.40	0.76
Asn	AAC	478.00	13.60	0.24
Asp	GAT	1674.00	47.70	0.80
Asp	GAC	411.00	11.71	0.20
Cys	TGT	1439.00	41.01	0.65
Cys	TGC	761.00	21.69	0.35
End	TGA	42.00	1.20	1.00
Gln	CAG	73.00	2.08	0.04
Gln	CAA	482.00	13.74	0.29
Gln	TAG	253.00	7.21	0.15
Gln	TAA	908.00	25.88	0.52
Glu	GAG	430.00	12.25	0.26
Glu	GAA	1196.00	34.08	0.74
Gly	GGG	64.00	1.80	0.03
Gly	GGA	1286.00	36.65	0.59
Gly	GGT	712.00	20.29	0.33
Gly	GGC	125.00	3.56	0.06
His	CAT	284.00	8.09	0.73
His	CAC	106.00	3.02	0.27
Ile	ATA	403.00	11.48	0.22
Ile	ATT	909.00	26.47	0.51
Ile	ATC	475.00	13.54	0.36

Leu	TTG	990.00	28.21	0.40
Leu	TTA	817.00	23.28	0.33
Leu	CTG	68.00	1.94	0.03
Leu	CTA	137.00	3.90	0.06
Leu	CTT	296.00	8.44	0.12
Leu	CTC	175.00	4.99	0.07
Met	ATG	539.00	15.36	1.00
Phe	TTT	596.00	16.98	0.48
Phe	TTC	655.00	18.67	0.52
Pro	CCG	2.00	0.06	0.00
Pro	CCA	525.00	14.96	0.57
Pro	CCT	288.00	8.21	0.31
Pro	CCC	100.00	0.85	0.11
Ser	AGT	551.00	15.70	0.21
Ser	AGC	160.00	4.56	0.06
Ser	TCG	46.00	1.31	0.02
Ser	TCA	1065.00	30.35	0.41
Ser	TCT	572.00	16.30	0.22
Ser	TCC	194.00	5.53	0.07
Thr	ACG	29.00	0.83	0.01
Thr	ACA	1647.00	46.94	0.47
Thr	ACT	1473.00	41.98	0.42
Thr	ACC	369.00	10.52	0.10
Trp	TGG	451.00	10.85	1.00
Tyr	TAT	763.00	21.74	0.70
Tyr	TAC	331.00	9.43	0.30
Val	GTG	317.00	9.03	0.18
Val	GTA	318.00	9.06	0.18
Val	GTT	854.00	24.34	0.47
Val	GTC	319.00	9.09	0.18

TABLA VII. OLIGOS PCR NO NMDA EN *P. tetraurelia*

	601	753
rglu6	.....FSKPFMTLGISIL.....	ISSYTANLAAPL.....
rgluk2	.....FSKPFMTLGISIL.....	ISSYTANLAAPL.....
caglu4	.....FSKPFMSLGISIM.....	ISSYTANLAAPL.....
rglu3	.....FSKPFMSLGISIM.....	ISSYTANLAAPL.....
hglu1	.....FSKPFMSLGISIM.....	ISSYTANLAAPL.....
lgluk1	.....FTKPFMSLGISIM.....	ISSYTANLAAPL.....
dgluk1	.....FSKPFMTLGISIL.....	ISSYTANLAAPL.....
dgluk2	.....FTVPPMQLGISIL.....	LSTYTANL.AFL.....

	→	←			
Leu	Gly	Ile	Ser	Ile	Met
TTG 0.40	GGA 0.59	ATT 0.51	TCA 0.41	ATT 0.51	ATG 1.00
TTA 0.33	GGT 0.33	ATC 0.26	TCT 0.22	ATC 0.26	
CTT 0.12	GGC 0.06	ATA 0.22	AGT 0.21	ATA 0.22	
CTC 0.07	GGG 0.03		TCC 0.07		
CTA 0.06			AGC 0.06		
CTG 0.03			TCG 0.02		

5' TTRGGWATTTCAATTATG 3'

Ile	Ser	Ser	Tyr	Thr	Ala
ATT 0.51	TCA 0.41	TCA 0.41	TAT 0.70	ACA 0.47	GCT 0.48
ATC 0.26	TCT 0.22	TCT 0.22	TAC 0.30	ACT 0.42	GCA 0.36
ATA 0.22	AGT 0.21	AGT 0.21		ACC 0.10	GCC 0.15
	TCC 0.07	TCC 0.07		ACG 0.01	GCG 0.01
	AGC 0.06	AGC 0.06			
	TCT 0.02	TCG 0.02			

5' WGCWGTATATGATGAAAT 3'

5' ATTCATCATATACWGCW 3'

**TABLA VIII. OLIGOS PCR NMDA EN *P. tetraurelia***

	741		950
RNMDA1D	.....GFAMIIVASY	TANLAAF.....	NMAGVFM LVAGGIVAGI.....
RNMDA3A	.....GFAMIIVASY	TANLAAF.....	NMAGVFM LVAGGIVAGI.....
RNMDA1A	.....GFAMIIVASY	TANLAAF.....	NMAGVFM LVAGGIVAGI.....
RNMDA2A	.....GFAMIIVASY	TANLAAF.....	NMAGVFM LVAGGIVAGI.....
DNMDA	.....GFAMIIVASY	TANLAAF.....	NMAGVFI LVGVGIAGGV.....
2A	.....FFAVIFLASY	TANLAAF.....	NMAGVFY MLAAAMALSL.....
2B	.....FFAVIFLASY	TANLAAF.....	NMAGVFY MLGAAMALSL.....
2C	.....FFAVIFLASY	TANLAAF.....	NMAGVFY MLLVAMGLAL.....
2D	.....FFAVIFLASY	TANLAAF.....	NMAGVFY MLLVAMGLSL.....
HNMDA1	.....FFTLIIISSY	TANLAAF.....	NVAGVFY ILIGGLGLAM.....



Ala	Asn	Leu	Ala	Ala	Phe
GCT 0.48	AAT 0.76	TTG 0.40	GCT 0.48	GCT 0.48	TTC 0.52
GCA 0.36	AAC 0.24	TTA 0.33	GCA 0.36	GCA 0.36	TTT 0.48
GCC 0.15		CTT 0.12	GCC 0.15	GCC 0.15	
GCG 0.01		CTC 0.07	GCG 0.01	GCG 0.01	
		CTA 0.06			
		CTG 0.03			



5' GCWAATTTTRGCWGCWTT 3'

Asn	Met	Ala	Gly	Val	Phe
AAT 0.76	ATG 1.00	GCT 0.48	GGA 0.59	GTT 0.47	TTC 0.52
AAC 0.24		GCA 0.36	GGT 0.33	GTG 0.18	TTT 0.48
		GCC 0.15	GGC 0.06	GTA 0.18	
		GCG 0.01	GGG 0.03	GTC 0.18	



5' AAAACWCCWGCCATRTT 3'

5' AAYATGGCWGGWGTTTT 3'

## DISCUSION

Con la finalidad de establecer la identidad del RGlu que ha sido descrito en *Paramecium* se realizaron ensayos de Dot-blot con el ARN total de *P. tetraurelia* y *P. calkinsi*. Como sondas para estos ensayos se utilizaron oligonucleótidos específicos que codifican para las subunidades GluR1, GluR2, GluR3 y GluR4. De estos genes aparentemente se expresa un homólogo al ARNm correspondiente a GluR3 en ambas especies de *Paramecium*. En comparación con el nivel de expresión del ARNm en cerebro de rata, la expresión en *Paramecium* es muy baja. La baja intensidad de la señal puede ser resultado de uno de dos eventos; primeramente puede ser efecto la pobre expresión del receptor en estos organismos. O bien, puede ser causa de unión inespecífica de la sonda al ARNm de *Paramecium*.

Con la finalidad de establecer si en *Paramecium* se expresa un ARNm homólogo a GluR3 se llevaron a cabo ensayos de Northern-blot. Este tipo de ensayo, además de ser menos ambiguo que el ensayo de Dot-blot, permite determinar el tamaño y la abundancia del ARNm. No fue posible detectar el ARNm de GluR3 en ninguna de las dos especies. Si bien este resultado no apoya la existencia de un ARNm homólogo a GluR3 en estos organismos, tampoco la descarta. Es posible que mensajeros poco abundantes sean difíciles de detectar por Northern-blot cuando se utiliza ARN total en lugar de ARN poliadenilado.

Un ensayo muy sensible para detectar ARNm específicos es la combinación de reversotranscripción y PCR (RT-PCR). Combinando estas técnicas es posible detectar ARNm de muy baja abundancia, aún partiendo de ARN total. Se llevaron a cabo ensayos de RT-PCR utilizando como iniciadores oligonucleótidos designados para amplificar las secuencias de los receptores de la familia AMPA/KA de rata. Solamente fue posible amplificar, a partir del ADNc de *Paramecium*, cuando se utilizaron los oligonucleótidos designados para amplificar la secuencia de GluR3, no así con los de las otras secuencias. Con estos oligonucleótidos fue posible amplificar una serie de bandas, entre las que se incluye una de 700 pb; éste es el tamaño esperado cuando se utiliza este juego de iniciadores. Con el ADNc de la biblioteca de *P.*

*tetraurelia* no se logró amplificación con ninguno de los juegos de iniciadores. Es probable que el mensaje de este receptor se encuentre muy pobremente representado en la población de clonas de la biblioteca; y por ello no fue posible amplificar a partir de ella.

El patrón de bandeo que se observa en las amplificaciones puede ser resultado de amplificación inespecífica; si bien, es probable que alguno de los fragmentos codifique para un RGlu. Con la finalidad de determinar si la banda de 700 pb, o alguna otra, era en verdad un homólogo a GluR3; se realizaron ensayos de Southern-blot con los productos de PCR. Como sonda se utilizó ADNc de la clona GluR3 marcada con digoxigenina, y como controles positivos el producto de PCR GluR3 de Cr, ADN plasmídico de la clona GluR3, y el producto de PCR GluR3 de la clona GluR3 y como control negativo el ADN plasmídico de la clona KBP. En este caso el fragmento de 700pb amplificado en Cr, el ADNc de la clona GluR3 y los productos de PCR de ambas especies fueron reconocidos por la sonda. En *P. tetraurelia*, a pesar de que la banda de 700pb no se visualizaba a simple vista en el gel de agarosa teñido con bromuro de etidio se detectó una señal más intensa que la banda de 700pb amplificada en *P. calkinsi*, que sí se visualizaba en el gel teñido. Una posible explicación es que la secuencia de *P. tetraurelia* conserva un mayor grado de homología con GluR3 que la secuencias de *P calkinsi*.

En ensayos de unión, llevados a cabo por Preston y Usherwood en 1988, se demostró la unión específica de L-[<sup>3</sup>H]-GLU en fracciones ciliares de *P. tetraurelia*. En esta preparación, KA tiene una muy baja potencia para desplazar L-[<sup>3</sup>H]-Glu; aspártico y NMDA son mucho más potentes (Preston, 1988B). Por otro lado, en ensayos conductuales llevados a cabo en *P. calkinsi* por Ortega y Bernal en 1994, se determinó la potencia relativa de algunos AAE en la conducta de nado y permeabilidad membranal en este organismo. El orden de potencia en este ensayo es: AMPA>L-Glu>KA. También en *P calkinsi*, KA evoca un incremento constante en la depolarización membranal; con AMPA esta depolarización fue pasajera (ambas depolarizaciones estuvieron acompañados de un incremento en la conductancia de entrada de Ca<sup>2+</sup>) (Ortega y Bernal, 1994). Estos resultados sugieren que en las dos especies de

*Paramecium* no se expresa el mismo tipo de receptor. Es posible que en *P. tetraurelia* exista una secuencia con un mayor grado de homología a GluR3 que en *P. calkinski*. Por ello no es de extrañar la diferencia en la intensidad de la señal detectada en el Southern blot.

Alternativamente al uso de iniciadores que amplifican secuencias conocidas del tipo AMPA/KA, se diseñaron secuencias que pudieran amplificar fragmentos de secuencias de RGlu considerando el uso de codones en *Paramecium*. Como no es posible tener dos regiones lo suficientemente conservadas cuando se alinean todos los RGlu; se diseñaron oligonucleótidos para amplificar separadamente secuencias que codifican para receptores NMDA y receptores no NMDA. Contrariamente a lo que se esperaba, no se logró amplificar fragmento alguno en ninguna de las dos especies de *Paramecium*, ni con el ADN de la biblioteca de *P. tetraurelia*. Es posible que las secuencias que seleccionamos como blanco para el diseño de los oligonucleótidos, no esten conservadas en *Paramecium*. De hecho, recientemente fue reportada la secuencia de un RGlu en el nemátodo *Caenorhabditis elegans* (Maricq, 1995). Esta secuencia difiere en dos aminoácidos con respecto a la secuencia que utilizamos en el diseño de los oligonucleótidos, se encuentran en las posiciones 608 y 742 de los iniciadores sentido y antisentido respectivamente (Tabla VII). La primera de estas posiciones en *C. elegans* codifica para Treonina y en la secuencia consenso para Lisina. En el segundo caso, Valina en *C. elegans* e Isoleucina en la secuencia consenso. Es posible que las condiciones en las que se llevaron a cabo los ensayos de amplificación no fueran los óptimos por ejemplo, temperaturas de alineamiento, concentraciones de MgCl<sub>2</sub>, número de ciclos etc.

Las secuencias caracterizadas en vertebrados como son rata, ratón, pollo, pichón y pez dorado se encuentran muy conservadas, presentan una homología del 90-95% (Hollman, 1994; Paperna, 1996; Ottiger, 1995; Goldman, 1994, datos no publicados). En invertebrados, como son *Drosophila*, *Lymnea* y *C. elegans*, no se ha reportado la existencia de subunidades equivalentes a las de vertebrados; solo presentan un 20-30% de homología con los receptores de vertebrados (Hollman, 1994; Maricq, 1995). Considerando la baja homología con los receptores de invertebrados, es posible que la secuencia de un posible receptor en un

protozoario no esté conservada en relación con las secuencias de animales. Es posible que la secuencia de *Paramecium* represente una forma ancestral de los RGlu, en este sentido debería tener las características básicas de la familia de RGlu. Se ha propuesto que la evolución de estos receptores se dio a partir de la entremezcla de exones, combinando de esta manera tres módulos básicos: 1) una porción extracelular que presenta similitud significativa a proteínas de unión periplásmica bacteriana, y que aumentan la posibilidad de que estos dominios medien la forma del sitio de unión al ligando (la porción N-terminal y el lazo que se encuentra entre TMIII y TMIV), 2) la región del canal que evolucionó de un precursor relacionado a los canales de K<sup>+</sup>, y 3) un dominio regulatorio C-terminal de origen desconocido (Fig 3A) (Wo, 1995).

Una posibilidad que no podemos descartar es que el receptor en estos organismos no sea de la familia de RGlu. Existen al menos dos casos reportados de proteínas que son canales iónicos abiertos por ligando; son abiertos por Glu y no tienen ninguna relación con las secuencias de los RGlu. Uno de estos receptores es el canal sensible a avremectina de *C. elegans*; éste es una canal de Cl<sup>-</sup> abierto por Glu y presenta un alto grado de homología con los receptores de GABA y glicina (Cully, 1994). El otro receptor es una proteína de 33 kDa denominada GR33, su secuencia es idéntica a la sintaxina, cuando es expresada en oocitos de *Xenopus* forma canales de Ca<sup>+2</sup> activados por Glu, que farmacológicamente, son similares a los receptores NMDA pero con diferentes propiedades electrofisiológicas (Smirnova, 1993).

*Paramecium*. utiliza un código genético diferente al universal; los codones UAA y UAG no representan codones de paro, si no que codifican para glutamina (Caron,1985; Preer Jr.,1985), El sesgo en el uso de codones es diferente al de organismos superiores (Jukes and Osawa, 1993), y por ello aunque se utilicen secuencias conservadas en el diseño de oligonucleótidos la secuencia final podría no ser 100% idéntica. En el diseño de los oligonucleótidos de PCR solamente fueron sintetizados utilizando los codones que son utilizados en más del 20% de las ocasiones; por azar es posible que en la secuencia real se utilicen algunos de los que tienen frecuencias menores al 20% y por ello la detección por PCR sea más difícil.

## CONCLUSIONES

1. Las evidencias presentadas sugieren que en ambas especies de *Paramecium* (*P. tetraurelia* y *P. calkinsi*) sea expresado un ARNm homólogo al del receptor GluR3.
2. La naturaleza del receptor a Glu en ambas especies de *Paramecium* parece ser diferente a nivel de secuencia nucleotídica con R<sub>Glu</sub> clonados en rata.
3. La naturaleza del receptor a Glu en ambas especies de *Paramecium* (*P. tetraurelia* y *P. calkinsi*), según evidencias de otros autores y las obtenidas en el presente trabajo, sugieren sea diferente entre ambas especies.

## BIBLIOGRAFIA

- ( 1) Acosta , Rincon O. E. (1993). Caracterización inmunológica de un receptor a glutamato en el ciliado marino *P. calkinsi*. Tesis Licenciatura. UAA.
- ( 2) Advokat, C. y Pellegrin, A. Y. (1992). Excitatory Amino Acids and Memory: Evidence from Research on Alzheimer's Disease and Behavioral Pharmacology. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. **16**: 13-24.
- ( 3) Alberts, B.; Bray, D.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Watson, J.D.(1994). Molecular biology of the cell. 3a. edic. Garland Publishing, Inc. New York & London.
- ( 4) Barinaga, M. (1995). A New Face for the Glutamate Receptors. *Science*.**267**:13, 177-178.
- ( 5) Bernal, J.; Calvillo, M.; Ortega, A. (1994). La activación del receptor AMPA/KA en *Paramecium* produce una permeabilidad iónica dependiente del calcio extracelular. Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas A.C. XXXVII Congreso Nacional Mérida, Yucatán.
- ( 6) Bliss, T. V. P. y Collingridge. (1993). A Synaptic Model of Memory: Long-term Potentiation in the Hippocampus. *Nature*.. **361**: 31-39.
- ( 7) Boulter, H; Hollmann, M, O'Shea-Greenfield, A.; Hartley, M.; Deneris, E.; Maron, C.; Heinemann, S. (1990). Molecular cloning and Functional Expression of Glutamate Receptor Subunit Genes. *Science*.**249**:1033-1037.
- ( 8) Brehm, P. and Eckert R. (1978). An Electrophysiological study of the regulation of ciliary beating frequency in *Paramecium*. *J. Physiol*. **283**: 557-568.
- ( 9) Calvillo, García Mario. (1993). Efecto de los amino ácidos excitatorios sobre la permeabilidad de membrana en el ciliado marino *Paramecium calkinsi*. Tesis Licenciatura. UAA.
- (10) Caron, Francois & Meyer. (1985). Does *Paramecium primaurelia* use a different

- genetic code in its macronucleus?. *Nature* **314**:14, 185-188.
- (11) Chomczynski, P. y Sacchi, N. (1987). Single-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction. *Anal. Biochem.* **162**: 156-159.
- (12) Collingridge, G.L. and Watkins J.C. (1994). The NMDA receptor. 2a. edic. Oxford University Press. New York.
- (13) Cully, Doris F.; Vassilatis, Demetrios K.; Lui, Ken K.; Pares, Philip S.; Van der Ploeg, Lex H.T.; Schaeffer, James M. & Arena, Joseph P. (1994). Cloning of an avermectin-sensitive glutamate-gated chloride channel from *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. **371**: 707-711.
- (14) Cunningham, M. D.; Ferkany, J.W. and Enna, S.J. (1993). *Life Sciences*. **54**: 135-148.
- (15) Eckert, Roger and Brehm, Paul. (1979). Ionic mechanisms of excitation in *Paramecium*. *Ann. Rev. Bioeng.* **8**: 353-83.
- (16) Gasic P. y Hollman M. (1992). Molecular Neurobiology of Glutamate Receptors. *Annu. Rev. Physiol.* **54**: 507-553.
- (17) Henley, Jeremy H. (1994). Kainate-binding proteins: Phylogeny, structures and possible functions. *Tips*. **15**: 182-190.
- (18) Hille, Bertil. (1984). Ionic Channels of Excitable Membranes. Sinauer Associates INC. Massachusetts. 426 pgs.
- (19) Hille, Bertil. (1989). Ionic channels: Evolutionary origins and modern roles. *Quarterly Journal of Experimental Physiology*. **74**: 785-804.
- (20) Hinrichsen, R. D. y Schultz, J. E. (1988). *Paramecium*: a model system for the study of excitable cells. *Trends Neurosci.* **11**: 1, 27-32.
- (21) Hollmann, M.; Oshea-Greenfield, A.; Rogers, S. W. Heinemann, S. (1989). Cloning by

- functional expression of a member of the glutamate receptor family. *Nature*. **342**: 643-48.
- (22) Hollmann M. y Heinemann S. (1994). Cloned Glutamate Receptors. *Annu. Rev. Neurosci.* **17**: 31-108.
- (23) Ibarra, C. and Ortega, A. (1995). Interaction of guanine nucleotides with the kainate binding protein from chick cerebellum. *Neuroreport*. **6**: 1149-1152.
- (24) Jahr, Craig. E. and Lester, Robin A.J. (1992). Synaptic excitation mediated by glutamate-gated ion channels. *Current Opinion in Neurobiology*. **2**: 270-274.
- (25) Jensen, Abbie M. and Chiu S.Y.(1993). Expression of Glutamate Receptor Genes in White Matter: Developing and Adult Rat Optic Nerve. *The Journal of Neuroscience*. **13**,4: 1664-1675.
- (26) Jukes, T.H. and Osawa S.(1993). Evolutionary changes in the genetic code. *Comp. Biochemical. Physiol.* **106**, 3: 489-494.
- (27) Kandel, Eric R.; Schwartz, James H; Jessell, Thomas M (1991). Principles of neural science, 3a. edic. Appleton & Lange USA.
- (28) Keinanen, K.; Wisden, W.; Sommer B. et.al (1990). A Family of AMPA-Selective Glutamate Receptors. *Science*. **249**: 556-560.
- (29) Kurosawa, Norio; Kondo, Kazunori; Kimura, Naohiro; Ikeda, Tomio and Tsukada, Yasuzo. (1994). Molecular cloning and characterization of avian N-methyl-D-aspartate receptor type1 (NMDAR1) gene. *Neurochemical Research*. **19**,5: 575-580.
- (30) Lomeli, H.; Wisden, W.; Köhler, M.; et al. (1992). High-affinity kainate and domoate receptors in rat brain. *FEBS Lett.* **307**: 139-143.
- (31) Maricq, Andres V.; Peckol, Erin; Driscoll, Monica and Bargmann I. (1995). Mechanosensory signalling in *C. elegans* mediated by the GluR-1 glutamate receptor.

*Nature*. **378**: 78-81.

- (32) Moriyoshi, K.; Masu, M.; Ishii, T.; et al. (1991). Molecular cloning and characterization of the rat NMDA receptor. *Nature*. **354**: 31-37.
- (33) Nakanishi, S. (1992). Molecular Diversity of Glutamate Receptors and Implications for Brain Function. *Science*. **258**: 597-603.
- (34) Ottiger, Hans-Peter; Gerfin-Moser Andrea; Del principe, Franco; Dutly, Fabrizio and Streit Peter. (1995). Molecular cloning and differential expression patterns of avian glutamate receptor mRNAs. *Journal of Neurochemistry*. **64**,6: 2413-2426.
- (35) Paperna, Tamar; Lamed, Yocheved; Teichberg, Vivian I.(1996). cDNA cloning of chick brain  $\alpha$ -amino-3-hidroxy-5-methyl-4-Isoxazole propionic acid receptors reveals conservation of structure, function and post-transcriptional processes with mamalian receptors. *Molecular Brain Research*. **36**: 101-113.
- (36) Pasantes, H.; Sánchez, J. y Tapia, R. (1991). Neurobiología celular. SEP. Fondo de Cultura Económica. México.
- (37) Pin, J.P. and Duvoisin R. (1995). Review: Neurotransmitter receptors I. The metabotropic glutamate receptors: Structure and Functions. *Neuropharmacology*, **34**,1: 1-26.
- (38) Preer Jr, J.R.; Preer, L.B.; Rudman B.M. & Barnett A.J.(1985). Deviation from the universal code shown by the gene for surface protein 51A in *Paramecium*. *Nature* **314**: 14, 188-190.
- (39) Preston R.R. y Unsherwood P. N. R. (1988). L-Glutamate-induced membrane hyperpolarization and behavioural responses in *Paramecium tetraurelia*. *J. Comp. Physiol A*. **164**: 75-82.
- (40) Preston R.R. y Unsherwood P. N. R. (1988). Characterization of a specific L-[<sup>3</sup>H]

glutamic acid binding site on cilia isolated from *Paramecium tetraurelia*. *J. Comp. Physiol B.* **158**: 345-351.

- (41) Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning. A Laboratory Manual*. 2a edic. Cold Spring Harbor Laboratory Press. USA.
- (42) Siegel, George J.; Albers, R. Wayne; Agranoff, Bernard W; Katzman, Robert. (1981). *Basic Neurochemistry*. 3a edic. American Society for Neurochemistry U.S.A.
- (43) Wisden, W. y Seeburg, P. H. (1993). Mammalian Ionotropic Glutamate Receptors. *Current Opinion in Neurobiology.* **3**: 291-298.
- (44) Smirnova, T.; Stinnakre, J.; Mallet, J. (1993). Characterization of a presynaptic glutamate receptor. *Science.* **262**: 430-433.
- (45) Wo, Z. G. y Oswald, R. E. (1995). Unraveling the modular design of glutamate-gated ion channels. *Trends Neurosci.* **18**,4: 161-168.