



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA
PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DEL GEN
DE LA SUBUNIDAD NR1 DE LOS RECEPTORES
DE GLUTAMATO DEL TIPO NMDA DURANTE
LA DIFERENCIACIÓN NEURONAL

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA
MÉDICO CIRUJANO
GABRIEL JESÚS MORENO GONZÁLEZ

DIRECTOR DE TESIS:
DR. ÁNGEL ZARAIN HERZBERG

MÉXICO, D. F.

MARZO, 2009



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.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA

Facultad de Medicina
PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

**REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DEL GEN DE LA
SUBUNIDAD NR1 DE LOS RECEPTORES DE
GLUTAMATO DEL TIPO NMDA DURANTE LA
DIFERENCIACIÓN NEURONAL**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR EN CIENCIAS
PRESENTA**

**MÉDICO CIRUJANO
GABRIEL JESÚS MORENO GONZÁLEZ**

**DR. ÁNGEL ZARAIN HERZBERG
TUTOR**

AGRADECIMIENTOS

Gracias aroma
azul,
fogata
encelo.
Gracias pelo
caballo
mandarino.
Gracias pudor
turquesa
embrujo
vela,
llamarada
quietud
azar
delirio.
Gracias a los
racimos
a la tarde,
a la sed
al fervor

a las arrugas,
al silencio
a los senos
a la noche,
a la danza
a la lumbre
a la espesura.
Muchas gracias al
humo
a los microbios,
al despertar
al cuerno
a la belleza,
a la esponja
a la duda
a la semilla
a la sangre
a los toros
a la siesta.

Gracias por la
ebriedad,
por la vagancia,
por el aire
la piel
las alamedas,
por el absurdo de
hoy
y de mañana,
desazón
avidez
calma
alegría,
nostalgia
desamor
ceniza
llanto.
Gracias a lo que
nace,
a lo que muere,

a las uñas
las alas
las hormigas,
los reflejos
el viento
la rompiente,
el olvido
los granos
la locura.
Muchas gracias
gusano.
Gracias huevo.
Gracias fango,
sonido.
Gracias piedra.
Muchas gracias
por todo.
Muchas gracias.
Gabriel Moreno,
agradecido.

Adaptado de... O.G.?

ÍNDICE

| | Página |
|---|-----------|
| I. RESUMEN | 11 |
| II. ABSTRACT..... | 13 |
| III. MARCO TEÓRICO. | |
| i. Introducción..... | 15 |
| ii. Receptores de Glutamato Metabotrópicos..... | 16 |
| a. Grupo I..... | 19 |
| b. Grupo II..... | 20 |
| c. Grupo III..... | 21 |
| iii. Receptores de Glutamato Ionotrópicos..... | 23 |
| a. No-NMDA..... | 24 |
| b. NMDA..... | 27 |
| iv. Expresión de receptores Metabotrópicos durante el desarrollo y la diferenciación neuronal..... | 34 |
| v. Expresión de receptores NMDA durante el desarrollo y la diferenciación neuronal..... | 35 |
| vi. Expresión de receptores AMPA y KA durante el desarrollo y la diferenciación neuronal..... | 36 |
| vii. Receptores de glutamato en la diferenciación y sobrevida neuronal..... | 38 |

| | |
|---|----|
| viii. Receptores de glutamato en el establecimiento y mantenimiento de la sinapsis..... | 39 |
| ix. Receptores de glutamato en el crecimiento y desarrollo dendrítico..... | 41 |
| x. Receptores de glutamato y migración neuronal..... | 43 |
| xi. Biología molecular de los receptores de glutamato..... | 46 |
| IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA..... | 52 |
| V. HIPÓTESIS..... | 54 |
| VI. OBJETIVO GENERAL..... | 55 |
| VII. OBJETIVOS PARTICULARES..... | 56 |
| VIII. ESTRATEGIAS METODOLÓGICAS..... | 57 |
| IX. RESULTADOS | |
| i. Diferenciación neuronal de células P19 y PC12 con ácido retinoico y NGF..... | 67 |
| ii. Expresión del gen <i>Grin1</i> en células P19 y PC12 durante la diferenciación neuronal..... | 69 |
| iii. Expresión de factores de transcripción NRSF y SP durante la diferenciación neuronal de células P19 y PC12..... | 72 |
| iv. Activación transcripcional del promotor <i>Grin1</i> de pollo durante la diferenciación neuronal de células P19 y PC12..... | 75 |
| v. Análisis funcional de la región reguladora del gen <i>Grin1</i> de pollo..... | 77 |

| | |
|---|-----|
| vi. Análisis <i>in silico</i> y comparativo de la región reguladora del gen <i>Grin1</i> de pollo..... | 79 |
| vii. Análisis de los ensayos de interacción ADN-proteína de los elementos NRSE y SP presentes en la región 5' no traducida de la región reguladora del gen <i>Grin1</i> de pollo..... | 83 |
| viii. La represión transcripcional del gen <i>Grin1</i> de pollo está mediada por los factores de transcripción SP3 y NRSF..... | 87 |
| ix. El elemento SP del promotor proximal activa la transcripción del gen <i>Grin1</i> de pollo..... | 90 |
| x. Papel de REST4 en la actividad transcripcional de la región reguladora del gen <i>Grin1</i> de pollo..... | 93 |
| xi. Mecanismos de regulación epigenética del gen <i>Grin1</i> de pollo evaluados por medio de ensayos funcionales y farmacológicos..... | 97 |
| X. DISCUSIÓN..... | 104 |
| XI. CONCLUSIONES..... | 113 |
| XII. PERSPECTIVAS..... | 115 |
| XIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 116 |
| XIV. APÉNDICE I: Artículo publicado..... | 136 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | Página. |
|---|---------|
| III.1. Estructura de los receptores de glutamato metabotrópicos..... | 18 |
| III.2. Clasificación de los receptores metabotrópicos de glutamato y sus variantes de empalme alternativo..... | 19 |
| III.3. Localización y mecanismos de acción de los receptores de glutamato metabotrópicos..... | 22 |
| III.4. Estructura general de una subunidad de los receptores de glutamato ionotrópicos..... | 24 |
| III.5. Estructura de los receptores de glutamato del tipo NMDA..... | 28 |
| III.6. Estructura y variantes de empalme alternativo del gen <i>Grin1</i> de rata y de pollo..... | 31 |
| III.7. Propiedades electrofisiológicas de receptores heteroméricos de subunidades NR1 asociadas con diferentes subunidades NR2..... | 33 |
| III.8. Papel de los receptores de glutamato en los diferentes procesos del desarrollo neuronal..... | 45 |
| III.9. Esquema representativo de las regiones reguladoras de los genes clonados de los receptores de glutamato ionotrópicos y metabotrópicos..... | 51 |
| IX.10. Inmunocitoquímica en células P19 y PC12 indiferenciadas y durante la diferenciación neuronal inducida con ácido retinoico y NGF, respectivamente, con anticuerpo contra β -tubulina III..... | 68 |

| | |
|---|----|
| IX.11. Expresión del gen <i>Grin1</i> en células P19 indiferenciadas y durante 8 días de diferenciación neuronal inducida con ácido retinoico..... | 70 |
| IX.12. Expresión del gen <i>Grin1</i> en células PC12 durante la diferenciación neuronal inducida con NGF..... | 71 |
| IX.13. Expresión de los factores de transcripción NRSF y su variante de empalme REST4 durante la diferenciación neuronal de células P19 y PC12..... | 73 |
| IX.14. Expresión del factor de transcripción SP durante la diferenciación neuronal de células P19 y PC12 inducida con ácido retinoico y NGF, respectivamente..... | 74 |
| IX.15. Actividad transcripcional del gen <i>Grin1</i> de pollo durante la diferenciación neuronal..... | 76 |
| IX.16. Actividad transcripcional de construcciones quiméricas del promotor del gen <i>Grin1</i> de pollo en neuronas corticales de embriones de pollo..... | 79 |
| IX.17. Análisis <i>in silico</i> de la región reguladora del gen <i>Grin1</i> de pollo..... | 81 |
| IX.18. Geles de retardo de movilidad por electroforesis para el sitio de unión a NRSF (N1), presente en la región 5' no traducida del promotor del gen <i>Grin1</i> de pollo..... | 84 |
| IX.19. Geles de retardo de movilidad por electroforesis para el sitio de unión a factores SP (S2) presente en la región 5' no traducida del promotor del gen <i>Grin1</i> de pollo..... | 86 |

| | |
|---|------------|
| IX.20. Papel de los elementos N1 y S2 en la actividad transcripcional de la región reguladora 5' del gen <i>Grin1</i> de pollo..... | 89 |
| IX.21. Geles de retardo de movilidad por electroforesis del sitio GSG/SP presente en la región reguladora proximal del promotor del gen <i>Grin1</i> de pollo..... | 91 |
| IX.22. Ensayos funcionales con construcciones quiméricas con mutación en los elementos GSG y SP de la región reguladora proximal del gen <i>Grin1</i> de pollo..... | 92 |
| IX.23. Efecto de REST4 en la actividad transcripcional de la región reguladora del gen <i>Grin1</i> de pollo..... | 94 |
| IX.24. Efecto de REST4 en la unión de NRSF por medio de ensayos de retardo de movilidad por electroforesis..... | 96 |
| IX.25. Efecto de la tricostatina A, butirato de sodio, mitramicina A y 5-azacitidina en la actividad transcripcional del promotor del gen <i>Grin1</i> de pollo en células P19 y PC12 indiferenciadas..... | 100 |
| IX.26. Efecto de la tricostatina A, butirato de sodio, mitramicina A y 5-azacitidina en la actividad transcripcional del promotor del gen <i>Grin1</i> de pollo en células C₂C₁₂ y en neuronas corticales de embriones de pollo..... | 102 |

CUADROS

| | |
|--|-----------|
| III.I. Clasificación y propiedades de los receptores de glutamato metabotrópicos..... | 21 |
| III.II. Expresión en corteza cerebral de las subunidades de los receptores de glutamato durante el desarrollo del sistema nervioso central..... | 37 |

TABLAS

| | |
|--|-----------|
| VIII.I. Oligonucleótidos utilizados para la reacción en cadena de la polimerasa..... | 65 |
| VIII.II. Oligonucleótidos utilizados para los geles de retardo de movilidad por electroforesis..... | 66 |

ABREVIATURAS

3,5,-DHPG: 3,5, dihidrofenilglicina

AC: Adenilil ciclase

ADN: Acido desoxirribonucleótido

AMPA: ácido α -amino, 3-hidroxi, 5-metil, 4-isoxazol- propiónico

AP-1: Proteína activadora 1

AR: Ácido retinoico

ARN: Ácido ribonucleótido

BDNF: Factor neurotrófico derivado del cerebro

C/EBP: Proteína incrementadora de unión a la secuencia CAAAT

CaMKII: Calmodulina cinasa II

COUP-TF: Factor de transcripción de río arriba de promotor de ovoalbúmina de pollo

CRE: Elemento de Respuesta a CREB

CREB: Proteína de unión al elemento de respuesta a AMP cíclico

DAG: Diacilglicerol

DMSO: Dimetilsulfóxido

DTT: di-tio-treitol

EAR2: Receptor huérfano miembro de la familia COUP-TF

EMSA: Ensayo de retardo de movilidad por electroforesis

EphB: Receptor B de efrina

GABA: Ácido gama-amino butírico

Grin1: Gen que codifica para la subunidad NR1

HDAC: Complejo de desacetilasas de histonas

HEPES: Ácido 4,2, hidroxietil- 1- piperazina etano sulfónico

iGluR: Receptores de Glutamato Ionotrópicos

IP3: Inositol 1,4,5, trifosfato

KA: Kainato

MAZ-1: Proteína de dedos de zinc 1 asociada a Myc

MEF-2C: Factor incrementador de miocitos 2C

MEPC: Complejo de proteínas de unión a ADN metilado

MgCl₂: Cloruro de magnesio

mGluR: Receptores de Glutamato Metabotrópicos

NaCl: Cloruro de sodio

Nav1.2: Gen neuronal del canal de sodio

NF κ B: Factor nuclear kappa de células B.

NGF: Factor de crecimiento nervioso

NMDA: N-metil-D-aspartato

NMDAR: Receptores de Glutamato del tipo NMDA

NO: Óxido nítrico

NR1: Subunidad NR1 de los NMDAR

NR2: Subunidad NR2 de los NMDAR

NR3: Subunidad NR3 de los NMDAR

NRF-1: Factor respiratorio nuclear 1

NRSE: Elemento silenciador restrictivo neuronal

NRSF: Factor silenciador restrictivo neuronal

Nurr1: Proteína relacionada al receptor nuclear 1

PDK1: Fosfo-cinasa dependiente de inosítido

PI3K: Cinasa de 3-fosfo-inosítido

PIP2: Fosfatidilinositol 4,5, difosfato

PKC: Proteína cinasa C

PLC: Fosfolipasa C

PMSF: Fluoruro de fenil metil sulfonilo

Rac1-GEF-Tiam1: factor intercambiador de nucleótido guanina Tiam1 de Rac1

Ras-GRF: Factor intercambiador de nucleótido guanina de Ras

RT-PCR: Transcripción Reversa-Reacción en cadena de la polimerasa

SC: Suero de caballo

SFB: Suero fetal bovino

SNC: Sistema Nervioso Central

SP: Factor de transcripción SP (Stimulatory Protein)

SSCG: Gen del ganglio cervical superior

TTF-1: factor de transcripción tiroideo 1

I. RESUMEN

El glutamato es el principal neurotransmisor excitador en el sistema nervioso central (SNC). Para llevar a cabo sus funciones, actúa a través de dos grandes familias de receptores, los receptores de glutamato metabotrópicos (mGluR) y los ionotrópicos (iGluR). Los mGluR son receptores de 7 pasos transmembranales acoplados a señalización intracelular por medio de proteínas G triméricas, mientras que los iGluR son canales iónicos de apertura por ligando. La familia de los iGluR está formada por los receptores para el ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxasol-propiónico (AMPA), para el kainato (KA) y para el N-metil-D-aspartato (NMDA), los cuáles tienen propiedades farmacológicas y fisiológicas particulares. Los iGluR de tipo NMDA, están formados como heterotetrámeros de subunidades NR1, NR2 (NR2A-D) y NR3 (NR3A y B) las cuáles están codificadas por genes diferentes denominados, *Grin1*, *Grin2* (a-d) y *Grin3* (a y b), respectivamente. Para ser funcional, un receptor de tipo NMDA, debe contener dos subunidades NR1 y dos de las subunidades NR2 y/o NR3. La subunidad NR1 es imprescindible ya que contiene el sitio de unión al co-agonista (L-glicina o D-serina) y forma el canal iónico. Estudios previos han demostrado que la expresión de la subunidad NR1 incrementa durante la diferenciación neuronal y durante el desarrollo del SNC. Estudios con la región reguladora-5' del gen *Grin1* de humano y de roedores han demostrado que los factores de transcripción SP (Stimulatory Protein) 1, 2, 3 y 4 tanto por la unión a los elementos reguladores presentes en la región del promotor, como por su interacción con los factores de transcripción CREB (cAMP Responsive Element

Binding Protein), NF κ B (Nuclear Factor kappa of B cells), MEF-2C (Myocyte Enhancer Factor-2C), AP1 (Activating Protein-1) y MAZ-1 (Myc-associated Zinc Finger Protein 1), pueden activar la transcripción del gen. Por otro lado, se ha demostrado que el factor de transcripción NRSF (Neural Restrictive Silencer Factor) es un represor transcripcional, mediante su unión al elemento regulador NRSE presente en la región 5'-no traducida del gen. En nuestro laboratorio, se clonó el gen *Grin1* de pollo, junto con 1.9 kb de región reguladora-5'. En este trabajo de tesis se demuestra que al igual que en mamíferos, la actividad transcripcional del gen *Grin1* de pollo incrementa con la diferenciación neuronal. Por medio de análisis funcionales usando construcciones quiméricas del promotor del gen *Grin1* de pollo asociados al gen reportero de luciferasa y a través de ensayos de unión ADN-proteína, demostramos que el factor de transcripción SP3 tiene un papel dual, uno como activador transcripcional en neuronas y otro como represor transcripcional en conjunto con NRSF, principalmente en células no neuronales, por medio de su unión a los elementos presentes en la región 5'-no traducida del gen. Además, en este trabajo demostramos por medio de análisis farmacológicos, que la represión transcripcional del promotor *Grin1* de pollo está mediada por desacetilasas de histonas y no por metilación de ADN. Sin embargo, todavía son necesarios estudios para determinar con exactitud qué mecanismos epigenéticos están involucrados en la regulación transcripcional del gen *Grin1* durante el proceso de diferenciación neuronal.

II. ABSTRACT

Glutamate is the main excitatory neurotransmitter in the Central Nervous System (CNS). The broad diversity of glutamate actions is determined by the presence of diverse glutamate receptors (GluR). There are two main families of GluR, metabotropic (mGluR) and ionotropic (iGluR). The mGluR are G-protein coupled receptors whereas iGluRs are ligand gated ion channels. The iGluR family, include the α -amino-3-hidroxi-5-methyl-4-isoxazole-propionic acid (AMPA) receptors, kainate (KA) receptors and N-methyl-D-Aspartate (NMDA) receptors, that share some pharmacological and physiological properties. The NMDA receptors assemble as hetero-tetramers of NR1 and NR2 or NR3 subunits that are encoded by different genes, named *Grin1*, *Grin2* and *Grin3*, respectively. The NR1 subunit is essential because it forms the ion channel pore and contains the co-agonist binding site. It is known that *Grin1* gene expression is up regulated during neuronal differentiation and CNS development. Previous studies have demonstrated that SP transcription factors (SP1, SP2, SP3 and SP4) play important roles in activating *Grin1* gene transcription in mammals. To activate *Grin1* gene transcription, the SP factors can directly bind to the regulatory elements present in the promoter or can interact with other transcription factors such as CREB, AP-1, MEF-2C, MAZ-1 and NF κ B. In contrast, *Grin1* gene repression, as observed in undifferentiated cells, is mediated mainly by the neuron restrictive silencer factor (NRSF). We have cloned the chicken *Grin1* gene and 1.9 kb of its regulatory region. Here, we confirmed that *Grin1* gene expression is up regulated along neuronal differentiation and that this up-

regulation is mediated by transcriptional activation. By electro mobility shift assays and site directed mutagenesis we demonstrated that SP3, a member of the SP family, has a dual role in regulating the chicken *Grin1* gene transcription. First, it can repress transcription predominantly in undifferentiated cells together with NRSF, and it can activate transcription in neurons. Finally, by pharmacological and functional analyses we demonstrated that histones deacetylases are repressing the *Grin1* gene transcription mostly in undifferentiated cells and non-neuronal cells, and this repression is lesser in neurons. Our data rule out the role of methylation in transcriptional regulation of chicken *Grin1* gene. However, future experimental work is needed to know the precise epigenetic mechanisms that regulate chicken *Grin1* gene expression during neuronal differentiation.

III. MARCO TEÓRICO

i. Introducción

Las bases moleculares de la transmisión sináptica glutamatérgica en el Sistema Nervioso Central (SNC) se elucidaron lentamente durante aproximadamente 20 años, a partir de los años 50s. El experimento crucial realizado en 1977 por John Davies (Biscoe et al., 1977), después de más de 30 años de que Hayashi en 1954 (Watkins and Jane, 2006) sugirió que el glutamato podía tener una función en procesos electrofisiológicos en el SNC más allá de su función en el metabolismo celular, validó la conclusión de que los receptores N-metil-D-aspartato eran receptores sinápticos en condiciones fisiológicas (Watkins and Jane, 2006). Después de varios años de estudios farmacológicos y posteriormente con la ayuda de la biología molecular en los 80's y 90's, se clasificó a los receptores de glutamato en receptores ionotrópicos, los cuáles forman canales iónicos de apertura de compuerta por ligando, y en receptores metabotrópicos, que actúan por medio de vías de señalamiento intracelular (Hollmann and Heinemann, 1994).

Hoy se conoce al glutamato como el principal neurotransmisor excitador en el SNC, que está involucrado en procesos fundamentales como son el desarrollo del SNC, la diferenciación neuronal, el establecimiento de la sinapsis, desarrollo y crecimiento axonal y dendrítico, crecimiento, migración y muerte neuronal, aprendizaje y memoria, además de jugar un papel importante en

diferentes enfermedades neurológicas y psiquiátricas, incluyendo el cáncer (Javitt, 2004; Waxman and Lynch, 2005), lo que hace fundamental su estudio desde todas las perspectivas de conocimiento en el área biomédica.

ii. Receptores de Glutamato Metabotrópicos

Monaghan en 1989 (Monaghan et al., 1989) observó por primera vez respuestas celulares bioquímicas en respuesta a aminoácidos excitadores mediados por receptor que, posteriormente, se demostró su existencia y se clasificaron como receptores de glutamato metabotrópicos (mGluR) (Monaghan et al., 1989). Los mGluR tienen un papel importante en la modulación sináptica en todo el SNC regulando la excitabilidad neuronal, la plasticidad neuronal, la liberación de neurotransmisores y funciones gliales, procesos importantes para el desarrollo cerebral y mecanismos de aprendizaje, daño y neuroprotección (Benarroch, 2008). Además se ha implicado a los receptores metabotrópicos en la fisiopatología de varias enfermedades neurológicas y enfermedades psiquiátricas como el daño hipóxico, epilepsia, enfermedad de Parkinson, Alzheimer, dolor, ansiedad, esquizofrenia y adicciones (Benarroch, 2008).

Los mGluR son receptores acoplados a proteína G (de unión al nucleótido guanina) que tienen como estructura general un gran dominio amino terminal (N-terminal) extracelular, siete dominios transmembranales (TMD) separados por pequeñas asas intracelulares y extracelulares, y una región carboxilo terminal (C-terminal) intracelular de longitud variable (Conn and Pin, 1997; Conn, 2003) (ver Figura 1). La región N-terminal contiene el sitio de unión al glutamato,

mientras que los dominios intracelulares interactúan con las proteínas G. Hasta hoy se conocen 8 subtipos de mGluR los cuáles se clasifican con base en sus secuencias homólogas, acoplamiento a segundos mensajeros, selectividad a agonistas y a mecanismos de transducción de señales, en grupo I (mGluR1 y 5), grupo II (mGluR2 y 3) y grupo III (mGluR4, 6, 7 y 8) (ver cuadro I) (Hermans and Challiss, 2001; Ferraguti and Shigemoto, 2006). Además, la multiplicidad de los mGluR es mayor debido a la existencia de variantes por empalme alternativo. Dentro de la familia de los mGluR, con excepción de variantes cortas (mGluR1E55, mGluR3 Δ 4, mGluR6b, mGluR8c) que carecen de segmentos transmembranales, este empalme alternativo se genera en la región C-terminal. Estas variantes cortas son secretadas y pueden dimerizarse con receptores completos regulando su actividad (Hermans and Challiss, 2001; Ferraguti and Shigemoto, 2006) (ver figura 2).

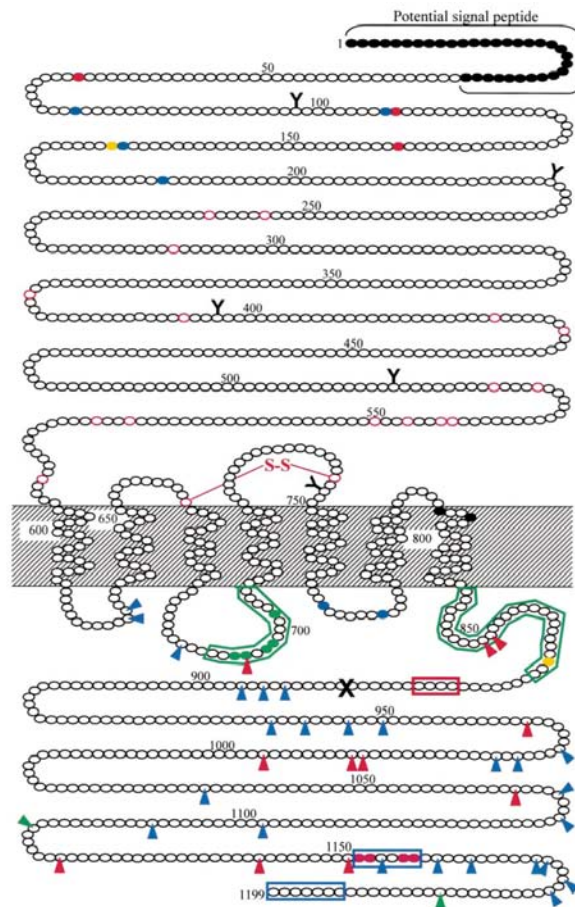


Figura 1. Estructura de los receptores de glutamato metabotrópicos. La estructura general de los receptores metabotrópicos es un dominio N-terminal extracelular de gran tamaño, 7 dominios transmembranales, 3 asas intra y extracelulares y un dominio C-terminal intracelular. Tomado de Hermans and Challiss, 2001.

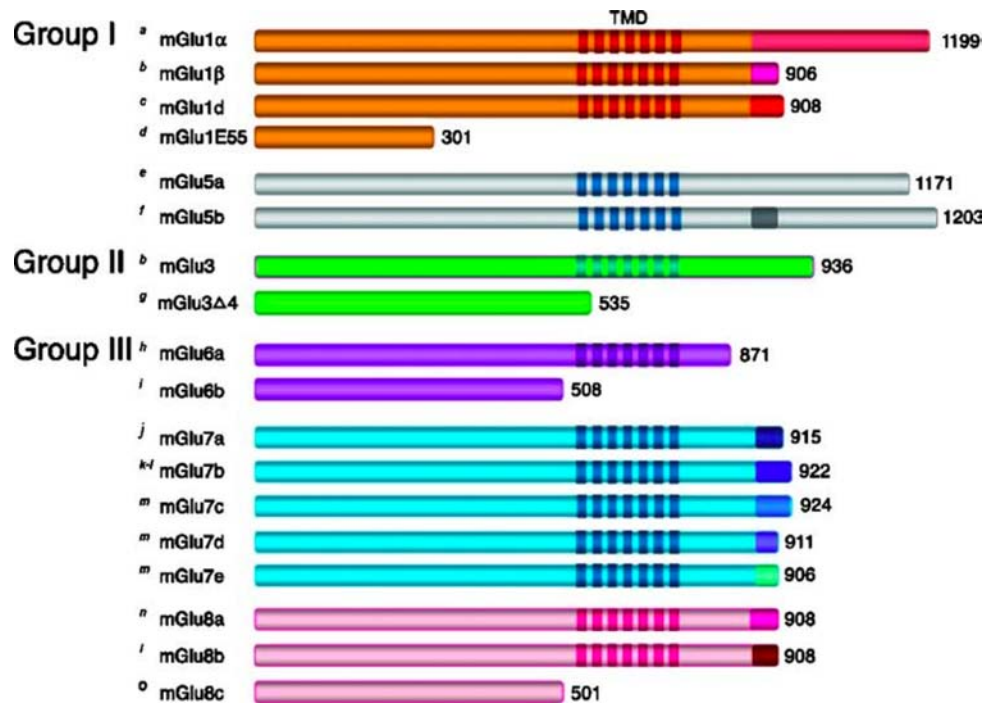


Figura 2. Clasificación de los receptores metabotrópicos de glutamato y sus variantes de empalme alternativo. Los receptores de glutamato metabotrópicos se clasifican en mGluR del grupo I, II y III. Cada uno de los grupos presenta variantes de empalme alternativo de la región C-terminal. Las excepciones son los receptores mGlu1E55, el mGlu3Δ4 del grupo II y el mGlu6b y mGlu8c del grupo III. Estas variantes de empalme alternativo no contienen los dominios transmembranales pero pueden dimerizarse con receptores completos regulando su actividad. Tomado de Ferraguti and Shigemoto, 2006.

a. Grupo I

Los mGluRs del grupo I, que incluyen a los mGluR1 y mGluR5, están acoplados a proteína G_q o G_{11} , actúan por medio de degradación de fosfoinosítidos por la fosfolipasa C (PLC) y son selectivamente activados por 3,5-dihidroxifenilglicina (3,5-DHPG). La PLC lleva a cabo la degradación del fosfatidilinositol-4-5-difosfato (PIP2) para generar inositol 1-4-5-trifosfato (IP3) y diacilglicerol (DAG), disparando la liberación de calcio (Ca^{2+}) del retículo endoplásmico y la activación de la proteína cinasa C (PKC).

Estos receptores también actúan potenciado canales de calcio tipo L, inhibiendo canales de K^+ y activando cascadas de señalamiento intracelular de manera independiente de proteínas G generando fosforilación de canales iónicos, de factores de transcripción y de otras proteínas blanco (Conn and Pin, 1997; Hermans and Challiss, 2001; Conn, 2003; Ferraguti and Shigemoto, 2006; Gerber et al., 2007). En general, los mGluR del grupo I se localizan en la post-sinapsis en el soma neuronal y en dendritas en la periferia de las densidades post-sinápticas. Proteínas de andamiaje como Homer permiten la interacción de los mGluR del grupo I con vías de señalamiento intracelular y con los receptores NMDA en las densidades postsinápticas (Conn and Pin, 1997; Hermans and Challiss, 2001; Conn, 2003; Ferraguti and Shigemoto, 2006; Gerber et al., 2007).

b. Grupo II

Los mGluR2 y mGluR3 que pertenecen al grupo II, están acoplados a la proteína G_i/G_o , actúan por medio de la inhibición de la adenilil ciclasa (AC), activan corrientes de K^+ e inhiben canales de Ca^{2+} presinápticos. Además, tienen como agonista selectivo al LY379268 (Conn and Pin, 1997; Hermans and Challiss, 2001; Conn, 2003; Ferraguti and Shigemoto, 2006; Gerber et al., 2007). Los mGluR del grupo II tienen una localización presináptica, distribuidos en las porciones preterminales de los axones, lejos de la zona de liberación presináptica y generalmente inhiben la liberación del glutamato, del ácido gamma-amino-butírico (GABA), así como de otros neurotransmisores. Hay algunos mGluR de este grupo que se encuentran en la región postsináptica (Conn and Pin, 1997; Hermans and Challiss, 2001; Conn, 2003; Ferraguti and Shigemoto, 2006; Gerber et al., 2007).

c. Grupo III

Los mGluR del grupo III consisten en mGluR4, mGluR6, mGluR7 y mGluR8. Están acoplados también a la proteína G_i/G_0 con la subsiguiente inhibición de la AC y son activados por el 2-amino-4-fosfonobutirato. De la misma manera que los mGluR del grupo II, pueden inhibir a canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje y activar canales de K^+ . Su localización es presináptica en la zona activa y funcionan inhibiendo la liberación de neurotransmisores; además, pueden actuar como autoreceptores inhibitorios (Conn and Pin, 1997; Hermans and Challiss, 2001; Conn, 2003; Ferraguti and Shigemoto, 2006; Gerber et al., 2007).

Cuadro I. Clasificación y propiedades de los receptores de glutamato metabotrópicos.

| Parámetro | Grupo I | Grupo II | Grupo III |
|---|---|---|---|
| Variantes de empalme alternativo | mGluR1a-d mGluR5a y b | mGluR2 mGluR3 | mGluR4a y b mGluR6 mGluR7 a y b mGluR8a-c |
| Vía de señalamiento preferente | Proteína Gq/11 PLC | Proteína $G_i/0$ iAC | Proteína $G_i/0$ iAC Fosfodiesterasa |
| Mecanismos de acción independientes de proteína G | Potenciación de canales de Ca^{2+} tipo L Inhibición de canales de K^+ Cascadas de fosforilación independientes de proteína G | Inhibición de canales de Ca^{2+} tipo L Activación de canales de K^+ | Inhibición de canales de Ca^{2+} tipo L Activación de canales de K^+ |
| Agonistas selectivos | L-quisqualato (s)-DHPG CHPG | DCG-IV (2R,AR)-APDC | L-AP4 L-SOP |
| Antagonistas Selectivos | AIDA LY367385 CPCCOEt MPEP | MCCG LY341495 EGLU | MeSOP MAP4 CPPG |
| Localización sináptica | Postsinápticos y algunos presinápticos | Presinápticos en la periferia de la zona activa | Presinápticos en la zona activa |

Tomado y modificado de Hermans and Challiss, 2001.

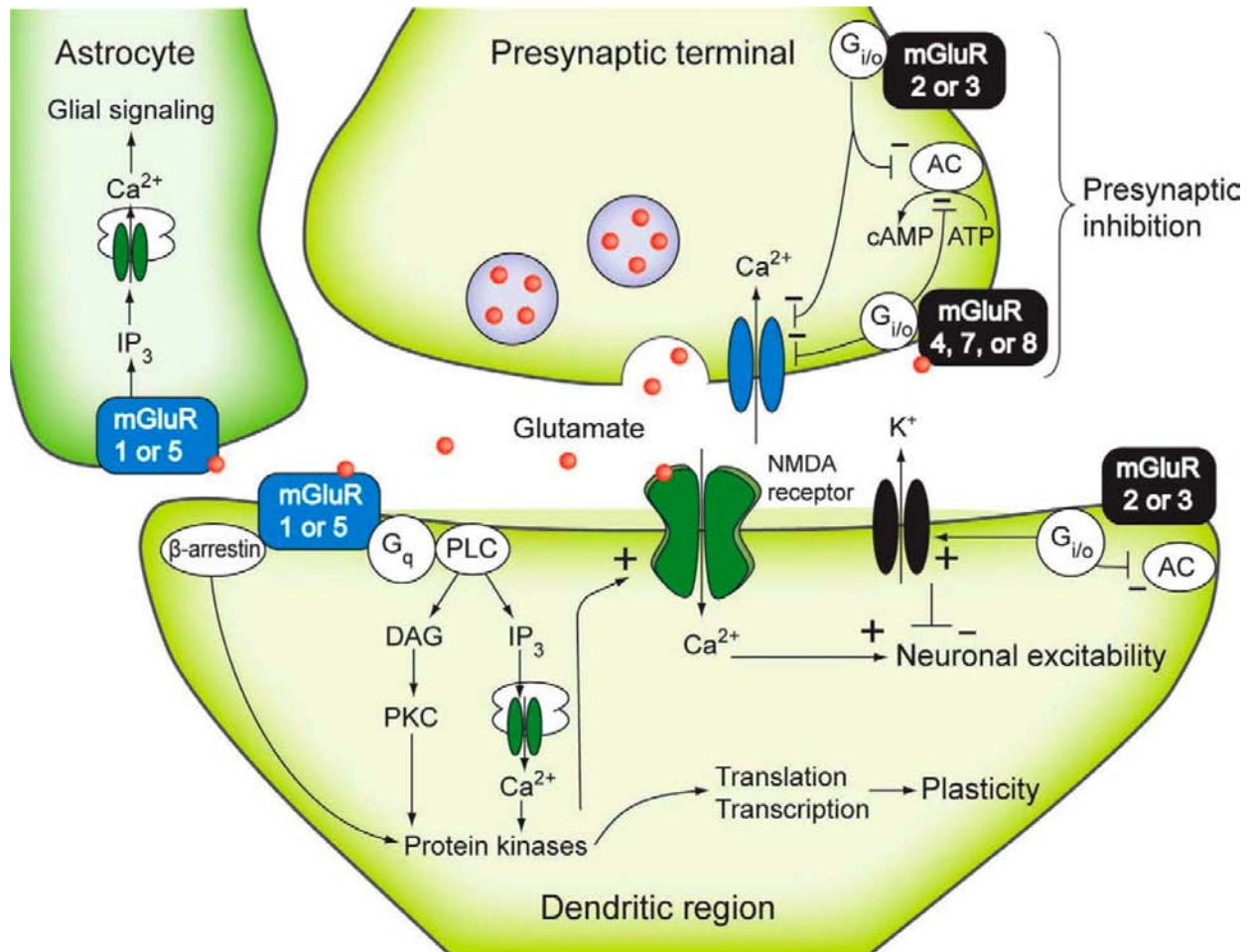


Figura 3. Localización y mecanismos de acción de los receptores de glutamato metabotrópicos.

Los mGluR del grupo I, mGluR1 y 5, se encuentran localizados en neuronas postsinápticas y en astrocitos, actúan por medio de señalización intracelular mediada por proteínas G_q, activación de la fosfolipasa C generando diacilglicerol e inositol 3 fosfato con activación de proteína cinasa C e incremento de Ca²⁺. También la activación de los receptores metabotrópicos de grupo I pueden actuar por medio de la β-arrestina. Los mGluR del grupo II, los mGluR2 y mGluR3 tienen una localización post y presináptica con acoplamiento a proteína G_{i/o} con inhibición de la adenilil ciclasa con disminución del AMP cíclico o por medio de activación de canales de K⁺. Los mGluR del grupo III, los mGluR4, mGluR7 y mGluR8, están localizados en neuronas presinápticas llevando a cabo sus funciones por medio de inhibición de la adenilil ciclasa con disminución del AMP cíclico y por medio de inhibición de los canales de Ca²⁺ presinápticos. Tomado de Benarroch, 2008.

iii. Receptores de Glutamato Ionotrópicos

Después de que Hayashi en 1954 sugirió por primera vez que el glutamato podía tener una función como neurotransmisor en el SNC, se desarrollaron diferentes fármacos análogos a la acción del L-glutamato y el L-aspartato (Watkins and Jane, 2006). Así, a principios de los años 60s se desarrolló un derivado aminoácido, el N-metil-D-aspartato (NMDA), el cuál presentó una actividad mucho más potente que el L-glutamato. Posteriormente se sintetizaron otros fármacos como el ácido β -N-oxalil-L- α - β -diaminopropiónico (proveniente de las semillas del guisante venenoso *Lathyrus sativus*), el ácido kaínico (del alga marina *Digenia simplex*), el ácido quisquálico (de plantas del género *Quisqualis*), el aminoácido excitador, el ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiónico (AMPA), que después de 20 años de investigaciones servirían para clasificar a los receptores de glutamato ionotrópicos en receptores de glutamato NMDA, AMPA y kainato. Finalmente, el primer receptor de glutamato funcional fue clonado en 1989 por Hollman el cuál correspondió a un receptor del tipo kainato (Hollmann et al., 1989).

Ahora se sabe que los receptores de glutamato ionotrópicos (iGluR) se forman como ensamblajes homo- o hetero-oligoméricos de cuatro subunidades proteicas integrales de membrana. Una subunidad típica de los iGluR consiste de un gran dominio N-terminal extracelular, un dominio de unión al ligando formado por dos estructuras conocidas como S1 y S2, tres dominios transmembranales (TM), una asa re-entrante de poro y un dominio C-terminal intracelular (Madden, 2002) (ver figura 4).

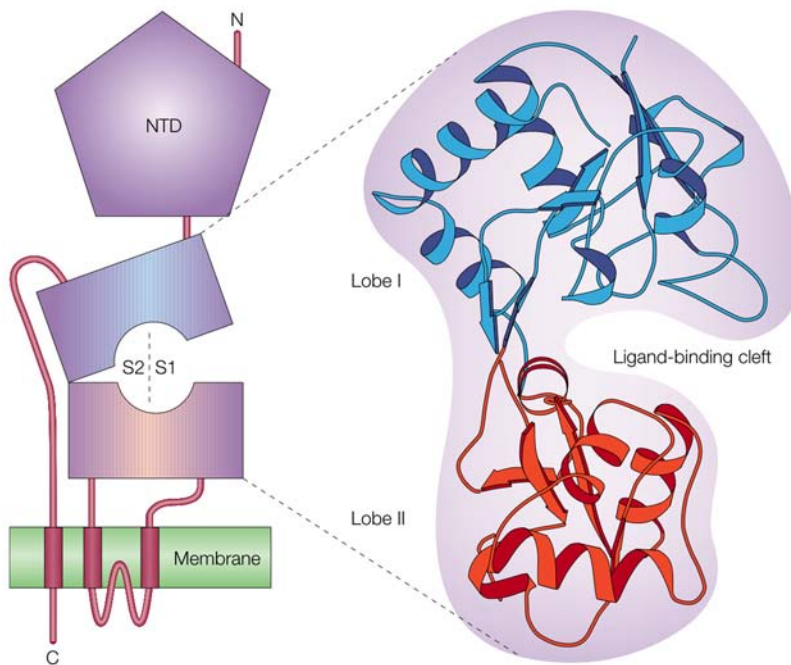


Figura 4. Estructura general de una subunidad de los receptores de glutamato ionotrópicos. Los iGluR tienen como estructura general un dominio amino terminal extracelular grande, tres pasos transmembranales y una asa reentrante de poro, un dominio de unión a ligando formando dos lóbulos creados por las asas entre los pasos transmembrana 1 y 3 y un dominio carboxilo terminal intracelular. Tomado de Madden, 2002.

a. Receptores no-NMDA

Receptores tipo AMPA

Los receptores de glutamato del tipo AMPA se ensamblan generalmente como hetero-tetrámeros formados como dímeros de dímeros de subunidades GluR2 y alguna de las subunidades GluR1, GluR3 o GluR4 (Madden, 2002). Las cuatro subunidades de los receptores de glutamato tipo AMPA son de tamaño similar (~900 aminoácidos), tienen una homología de secuencia de aminoácidos del 68 al 73% y tienen una

homología de ~20% con otras familias de subunidades de receptores de glutamato (Madden, 2002).

En general, los receptores de AMPA son permeables a Na^+ y K^+ , sin embargo, algunos receptores AMPA con variantes de empalme alternativo y edición son permeables a Ca^{2+} (Dingledine et al., 1999). Cada una de las subunidades presenta dos variantes de empalme alternativo codificadas por los exones 14 y 15, conocidas como flip y flop. Las primeras predominan antes del nacimiento y persisten en etapa postnatal (P) mientras que las segundas tienen muy poca abundancia antes del día P8. Las variantes flip desensibilizan más lentamente y menos profundamente que las formas flop (Dingledine et al., 1999).

La edición del ácido ribonucleico mensajero (ARNm) de las subunidades del iGluR tipo AMPA pueden editarse por medio de desaminasas de adenosina. El codón para glutamina (CAG) en el dominio TM2 de la GluR2 puede editarse a arginina (CIG) en el sitio Q/R. Las subunidades que tienen arginina tienen una baja permeabilidad al Ca^{2+} además de proporcionarle otras características fisiológicas. De la misma manera, todas las subunidades pueden editarse en el sitio R/G, cambiando una glicina por una arginina dándole propiedades específicas (Dingledine et al., 1999).

La localización de los receptores de glutamato tipo AMPA es predominantemente en neuronas en región postsináptica, sin embargo pueden localizarse en glía (Shepherd and Huganir, 2007). La función principal de los receptores tipo AMPA son la neurotransmisión excitadora rápida en el SNC y están involucrados en la modulación de la fuerza sináptica dependiente de actividad, un componente de la plasticidad sináptica importante para los procesos de memoria y aprendizaje (Shepherd and Huganir, 2007).

Los receptores tipo AMPA están relacionadas con diversas enfermedades como el Alzheimer y la enfermedad vascular cerebral (Shepherd and Huganir, 2007).

Receptores tipo Kainato

Los receptores del tipo KA se ensamblan como homo- o hetero-tetrámeros de subunidades GluR5, GluR6, GluR7, KA1 y KA2. Las subunidades GluR5 a GluR7 pueden formar homo-tetrámeros o hetero-tetrámeros, mientras que las subunidades KA1 y KA2 únicamente pueden formar canales funcionales al unirse a una de las GluR5 a GluR7 (Madden, 2002).

Al igual que los receptores de glutamato tipo AMPA, los receptores de KA son permeables a los cationes monovalentes Na^+ y K^+ , y tienen una permeabilidad al Ca^{2+} muy baja, la cuál depende de las variantes de empalme alternativo y de la edición del ARNm. En general, las variantes por empalme alternativo son producidas en la región C-terminal, y únicamente en la subunidad GluR5, la presencia de un exón que codifica para 15 aminoácidos, tiene variantes de empalme en la región N-terminal. Al igual que en los receptores de tipo AMPA, la edición en el sitio Q/R de la subunidad GluR6 puede dar lugar a una mayor permeabilidad al Ca^{2+} . Las subunidades GluR5 y 6 pueden ser editadas en los sitios I/V e Y/C (Dingledine et al., 1999).

La localización de los receptores de KA es presináptica controlando la liberación de neurotransmisores y postsináptica, mediando señales excitatorias sinápticas, favoreciendo la estabilidad de las conexiones sinápticas. Finalmente, se ha demostrado recientemente la presencia de respuestas metabotrópicas de los receptores de kainato (Rodríguez-Moreno and Sihra, 2007b, a).

Se ha involucrado a los receptores de tipo kainato en enfermedades psiquiátricas y neurológicas como autismo, esquizofrenia, enfermedad de Huntington y epilepsia (Bowie, 2008).

b. Receptores tipo NMDA

Los receptores del tipo N-metil-D-aspartato (NMDAR) tienen propiedades que los diferencian de otros receptores ionotrópicos de apertura por ligando. Estos canales iónicos tienen un bloqueo dependiente de voltaje a concentraciones fisiológicas de Mg^{2+} extracelular (Madden, 2002). Los NMDAR tienen una alta permeabilidad a iones de Ca^{2+} , y en menor medida al Na^+ y al K^+ , cuyas corrientes desencadenan una amplia variabilidad de respuestas celulares y que los involucran en múltiples procesos neuronales. Esta alta permeabilidad al Ca^{2+} y el bloqueo por Mg^{2+} está determinado por la presencia de una asparagina situada en el asa reentrante de poro, en un sitio homólogo al sitio Q/R de los receptores AMPA y KA (Dingledine et al., 1999). Además, el receptor de tipo NMDA está regulado por múltiples moléculas encontradas en el espacio extracelular como iones divalentes, protones y poliaminas, entre otros. Finalmente, la cinética del receptor muestra un incremento lento ($\sim 10ms$) y tiempo de decaimiento también lento ($>100ms$) que lo hace diferente al resto de los receptores de glutamato ionotrópicos, incluso de otros receptores ionotrópicos de apertura de compuerta por ligando (Cull-Candy and Leszkiewicz, 2004).

Al igual que otros receptores de glutamato ionotrópicos, los receptores del tipo NMDA se forman como ensamblajes hetero-tetraméricos de subunidades integrales de membrana (Madden, 2002). Hasta hoy se conocen tres familias de subunidades del NMDAR, conocidas como NR1, la familia de subunidades NR2 (NR2A-D) y un par de

subunidades NR3 (A y B). Para ser funcional, un receptor de glutamato del tipo NMDA requiere la presencia de dos subunidades NR1 y cualquiera de las subunidades NR2 o NR3 (Figura 5) (Madden, 2002).

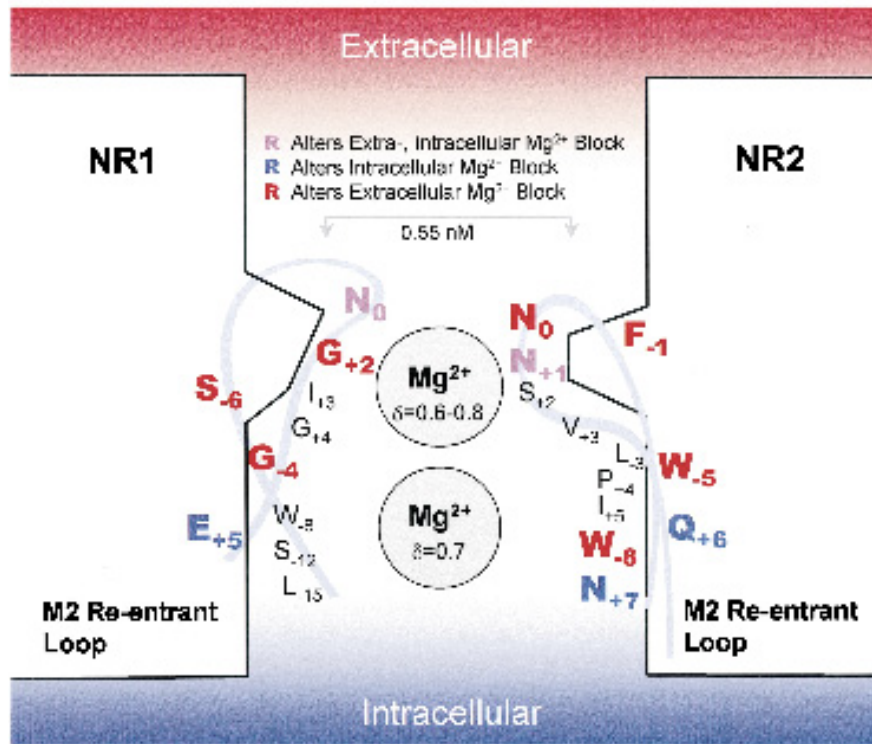


Figura 5. Estructura de los receptores de glutamato del tipo NMDA. La estructura de los receptores para NMDA son similares a la de otros iGluR. Los receptores de tipo NMDA se forman como ensamblajes hetero-tetraméricos de subunidades de proteínas integrales de membrana. Para que un canal sea funcional se requiere la presencia de dos subunidades NR1 y dos subunidades de NR2 (NR2A – D) o NR3 (NR3A y B). La subunidad NR1 es fundamental ya que contiene el sitio de unión a los co-agonistas (D-serina y L-glicina) y forma el canal iónico. La subunidad NR2 contiene el sitio de unión al L-glutamato mientras que las subunidades NR3 funcionan como moduladores del canal. Tomado de Dingledine et al., 1999.

Subunidad NR1

La subunidad NR1 tiene una estructura general similar a otros receptores de glutamato ionotrópicos. Para activar al receptor NMDA se requiere la presencia de un co-agonista (la L-glicina o D-serina) y la presencia del glutamato, que se unen al dominio S1-S2 de las subunidades NR1 y NR2, respectivamente (Dingledine et al., 1999).

La subunidad NR1 está codificada por el gen *Grin1* el cual, en roedores está formado por 22 exones. Se conocen hasta ahora nueve variantes de empalme alternativo; una de ellas se forma por la presencia de un codón de terminación en el exón 3 generando una variante trunca que carece de los dominios transmembranales, por lo que no es funcional. El empalme alternativo del exón 5 en la región N-terminal (denominado casete N1) y de los casetes C1 (formado por el exón 21) y C2 (formado por el exón 22) en la región C-terminal, dan lugar a las demás isoformas (ver Figura 6). El exón 5 del gen *Grin1* de murinos está formado por 63 pares de bases (pb) dando lugar a 21 aminoácidos. La presencia del casete N1 genera corrientes de mayor amplitud, le quita la potenciación observada con poliaminas y Zn^{2+} , reduce la afinidad por los agonistas y disminuye la sensibilidad por algunos antagonistas en comparación con las que carecen de este casete (Hollmann and Heinemann, 1994; Dingledine et al., 1999).

El casete C1 está formado por 111 pb y contiene los sitios de modulación por proteína cinasa C, proteína cinasa A y un sitio de unión a calmodulina (Tingley et al., 1993; Ehlers et al., 1996; Tingley et al., 1997). Además es necesaria para la inserción de los receptores del tipo NMDA en la membrana y de la interacción con el citoesqueleto neuronal (Ehlers et al., 1998; Okabe et al., 1999). El casete C2

compuesto por 422 pb tiene un sitio aceptor de intrón que genera un casete alternativo de 66 pb conocido como C2' que contiene un sitio de interacción con proteínas con dominio PDZ que favorece su integración en la membrana neuronal (Standley et al., 2000) (ver Figura 6A).

En el pollo, el gen *Grin1* está formado también por 22 exones, carece del exón homólogo al 3 de la rata que produce la variante trunca, por lo que el exón 4 es el homólogo al casete N1 de murinos. En la región C-terminal, la presencia de un casete adicional denominado C3 en el exón 20 que codifica la secuencia EETSEH no presente en murinos. El exón 22 contiene un sitio de N-miristoilación putativo y dos sitios putativos de fosforilación por PKC, posiblemente relacionados con la integración membranal. Hasta ahora se conocen al menos 6 variantes de empalme alternativo por la presencia o ausencia del casete N1 y la combinación de tres isoformas en la región C-terminal (Lee-Rivera et al., 2003; Zarain-Herzberg et al., 2005) (Ver Figura 6B).

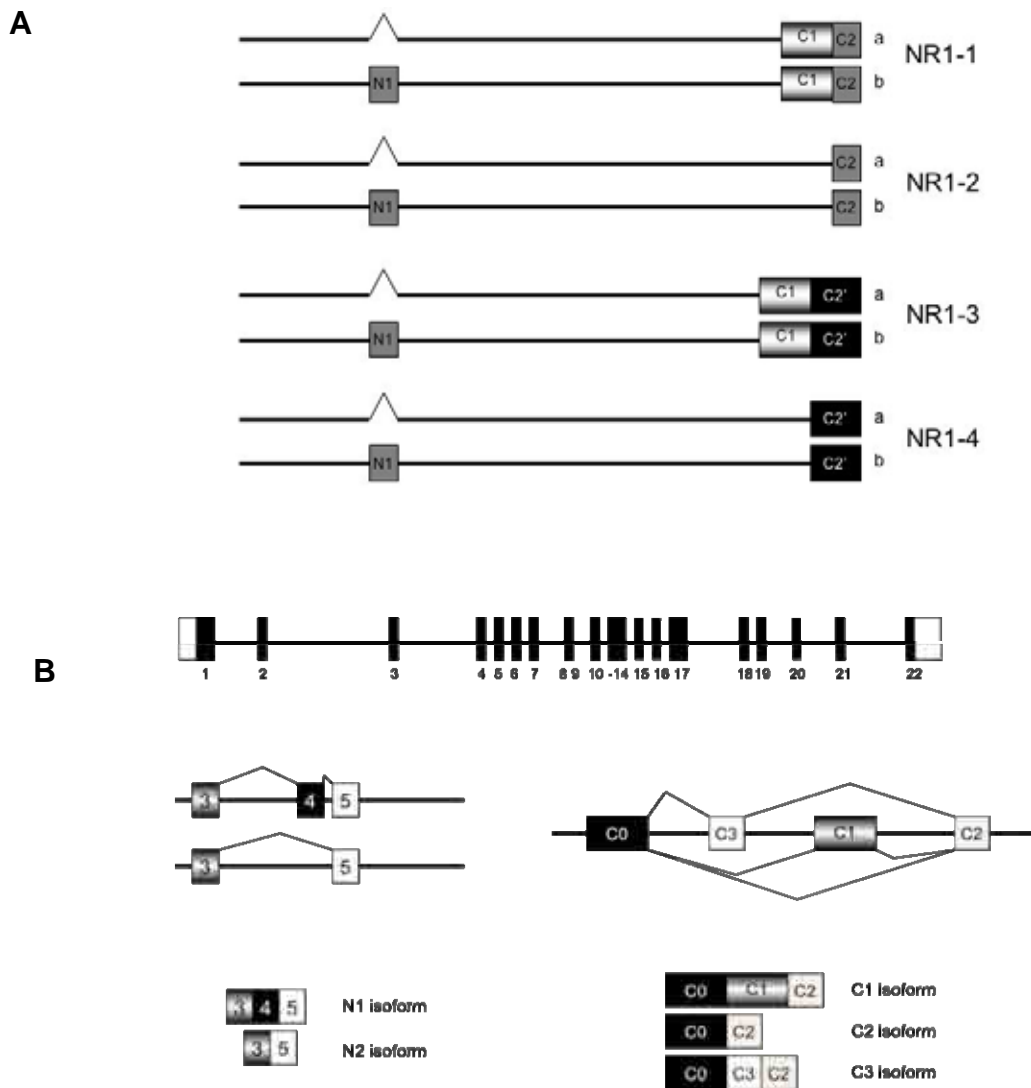


Figura 6. Estructura y variantes de empalme alternativo del gen *Grin1* de rata y de pollo. A. Variantes de empalme alternativo del gen *Grin1* de rata. Hasta la fecha se han demostrado 8 variantes de empalme alternativo generados por la presencia del casete N1 en la región amino terminal y por la presencia de los casetes C1, C2 o C2' en la región carboxilo terminal. B. Esquema que representa la estructura del gen *Grin1* de pollo el cuál cuenta con 22 exones. Hasta ahora se ha demostrado la existencia de al menos 6 variantes de empalme alternativo por la presencia del exón 4 (análogo al casete N1 de roedores) y por la presencia de los casetes C0, C1, C2 o C3 (exones 19, 21, 22 y 20, respectivamente) en la región carboxilo terminal. Tomado de (Hollmann and Heinemann, 1994; Dingledine et al., 1999; Lee-Rivera et al., 2003; Zarain-Herzberg et al., 2005).

Subunidad NR2

La familia de subunidades NR2, que incluye a las subunidades NR2A, NR2B, NR2C y NR2D, están codificadas por genes diferentes, denominados *Grin2a* –d, respectivamente. En general, tienen una estructura similar a otras subunidades de receptores ionotrópicos de glutamato. Se sabe que el dominio S1 y S2 de las subunidades NR2, contiene el sitio de unión al glutamato que es necesario para la funcionalidad del receptor (Dingledine et al., 1999). En el caso de los genes de ratón, se sabe que el gen *Grin2a* está formado por 12 exones, el *Grin2b* por 11 exones, el *Grin2c* por 11 exones, mientras que el *Grin2d* está conformado por 11 exones (PubMed).

La expresión de la subunidad NR1 está distribuída en todo el SNC, mientras que la expresión de las subunidades NR2 es diferencial, tanto espacial como temporalmente, en el cerebro (Takai et al., 2003). Además, la identidad de las subunidades NR2 determinan muchas de las propiedades biofísicas y farmacológicas del receptor, incluyendo la alta afinidad por glutamato, la modulación por glicina, la sensibilidad al Mg^{2+} , corrientes fraccionales de Ca^{2+} y la cinética del receptor (Cull-Candy and Leszkiewicz, 2004). Se sabe que el tiempo de decaimiento después de un pulso corto de glutamato, depende del tipo de subunidad NR2 presente, esto es, el tiempo de decaimiento es mayor en receptores heteroméricos de NR1 con NR2A y en orden decreciente $NR2A < 2C = 2B \ll 2D$ (Figura 7). Además, la conductancia del canal iónico y el bloqueo del receptor por iones de Mg^{2+} , también depende del tipo de subunidad NR2 presente en el receptor NMDA (Cull-Candy and Leszkiewicz, 2004).

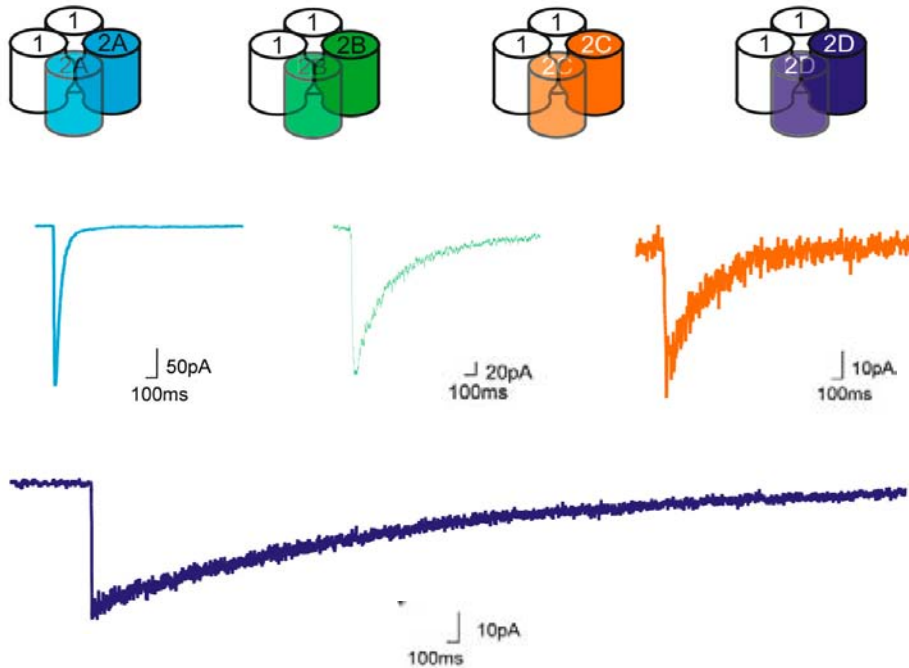


Figura 7. Propiedades electrofisiológicas de receptores heteroméricos de subunidades NR1 asociados con diferentes subunidades NR2. Se observa las propiedades electrofisiológicas de los receptores NMDA con heterotetrámeros NR1 y NR2. El tiempo de decaimiento de la corriente a través de los diferentes heterotetrámeros de receptores de glutamato es $NR2A < NR2B = NR2C < NR2D$. Tomado de Cull-Candy and Leszkiewicz, 2004.

Subunidad NR3

Esta familia de subunidades está formada por las subunidades NR3A y B, que son codificadas por genes diferentes conocidos como *Grin3a* y *b*, respectivamente. Hasta la fecha no se conocen receptores de glutamato del tipo NMDA que contengan únicamente subunidades NR3, ni heterómeros de NR2/NR3. Así, las subunidades NR3 son subunidades reguladoras que se co-expresan con subunidades NR1/NR2/NR3 (Madry et al., 2007; Schuler et al., 2008). La presencia de subunidades NR3 disminuyen

la sensibilidad al Mg^{2+} , la permeabilidad del canal al Ca^{2+} y disminuyen también las corrientes mediadas por agonistas. Sin embargo, recientemente se demostró la formación de un canal excitador de glicina impermeable al Ca^{2+} , al co-expresar subunidades NR1 con NR3 (Madry et al., 2007; Schuler et al., 2008).

iv. Expresión de receptores metabotrópicos durante el desarrollo y la diferenciación neuronal

En murinos, la expresión de mGluR1a aumenta en la neocorteza e hipocampo durante el desarrollo (Lopez-Bendito et al., 2002) y se expresa fuertemente en las células de Purkinje a partir del E18. El receptor se encuentra perisináptico, en el cuerpo neuronal y en la región troncal dendrítica. En la tercera semana se encuentra localizado totalmente en las dendritas (Lopez-Bendito et al., 2001). La expresión cortical de mGluR5 aumenta en el periodo perinatal (Lopez-Bendito et al., 2002) predominando en el bulbo olfatorio (Minakami et al., 1995), mientras que en la corteza somatosensorial incrementa en periodo fetal, alcanza su pico máximo en P0 y después disminuye (Minakami et al., 1995; Furuta and Martin, 1999). La expresión de mGluR1, mGluR2 y mGluR4 es baja al nacimiento y aumenta durante el desarrollo postnatal. En contraste mGluR3 y mGluR5 se expresa en la corteza cerebral al nacimiento y disminuye durante la maduración (Catania et al., 1994). El mGluR7a disminuye con el desarrollo a excepción del bulbo olfatorio donde aumenta (Bradley et al., 1998).

v. Expresión de receptores NMDA durante el desarrollo y la diferenciación neuronal

La expresión de la subunidad NR1 es fundamentalmente constante durante todo el desarrollo postnatal, los cambios mas notables son niveles relativamente mayores de las formas NR1-1 y -4 en el prosencéfalo maduro comparado con el perinatal (Laurie and Seeburg, 1994). Las variantes NR1-1a se expresan en un patrón difuso en la materia gris de la médula espinal mientras que la NR1-1b se encuentra en agregados celulares específicos. Las variantes con o sin el exón 22 y sin exón 21 se expresan en niveles altos en neuronas motoras neonatales (Stegenga and Kalb, 2001; Brown et al., 2002).

Las subunidades NR2A y NR2C se observan en la región temporal desde E18, en E20 en hipocampo y en el neonato en la corteza cerebral, hipocampo, células de Purkinje, mesencéfalo y diencéfalo. En el hipocampo las subunidades NR2A y NR2D incrementan mientras que las NR2B y NR2C disminuyen (Ritter et al., 2002; Takai et al., 2003). En la médula espinal las subunidades NR2A y NR2B son altas durante las dos semanas después del nacimiento y después disminuyen hasta alcanzar la etapa adulta (Stegenga and Kalb, 2001).

La expresión de la subunidades NR3A y B se detectan desde el E15 siendo la NR3A la que predomina hasta la etapa adulta (Sun et al., 1998). Hay un cambio postnatal de la subunidad NR2A por la NR3B en la médula espinal que puede dar lugar a un receptor glutamatérgico excitatorio en motoneuronas en desarrollo y un receptor glicinérgico excitatorio en neuronas maduras (Fukaya et al., 2005).

vi. Expresión de receptores AMPA y KA durante el desarrollo y la diferenciación neuronal

La expresión de la subunidad GluR1 es menor en recién nacidos en comparación con adultos; en el estriado dicho patrón se encuentra invertido. La expresión es temporal en células de Purkinje y granulares cerebelares durante el desarrollo y se localizan en región presináptica y extra-sináptica en etapas tempranas del desarrollo, no así en el tejido adulto (Martin et al., 1998). En hipocampo GluR1 aumenta desde el nacimiento mientras que las otras subunidades permanecen igual o disminuyen (Ritter et al., 2002). La expresión de las subunidades GluR1, GluR2 y GluR4 en la médula espinal son altas durante las dos semanas después del nacimiento, posteriormente disminuyen hasta la etapa adulta (Brown et al., 2002).

Las subunidades GluR3, GluR4, GluR6, GluR7, KA1 y KA2 se detectan a partir del día E10. La expresión de las subunidades GluR6 y KA2 aumenta durante la diferenciación neuronal, al igual que el porcentaje de edición del sitio Q/R de las subunidades GluR5 y GluR6 (Lai et al., 1997; Scherer and Gallo, 1998). En el hipocampo todas las subunidades de los receptores para KA disminuyen a partir del nacimiento (Ritter et al., 2002). Las subunidades GluR5, GluR6 y KA2 se expresan en neuronas motoras neonatales en la médula espinal (Stegenga and Kalb, 2001).

Cuadro 2. Expresión en corteza cerebral de las subunidades de los receptores de glutamato durante el desarrollo del sistema nervioso central.

| Estadío del Desarrollo | | E12 | E15 | P0 | P7 | P21 | A |
|----------------------------------|--|------------|------------|-----------|-----------|------------|----------|
| Receptores Ionotrópicos | | | | | | | |
| Receptores AMPA | Referencias | | | | | | |
| GluR1 | (Scherer and Gallo, 1998; Lujan et al., 2005) | * | * | ** | *** | *** | **** |
| GluR2 | | * | * | * | ** | ** | *** |
| GluR3 | | * | * | * | ** | ** | *** |
| GluR4 | | * | * | * | ** | ** | ** |
| Receptores KA | | | | | | | |
| GluR5 | (Scherer and Gallo, 1998; Stegenga and Kalb, 2001; Lujan et al., 2005) | * | ** | *** | **** | **** | ** |
| GluR6 | | * | ** | *** | **** | *** | ** |
| GuR7 | | * | ** | *** | **** | *** | ** |
| K1 | | * | ** | *** | ** | ** | * |
| K2 | | **** | **** | **** | **** | **** | **** |
| Receptores NMDA | | | | | | | |
| NR1 | (Laurie and Seeburg, 1994) | * | ** | ** | ** | ** | ** |
| NR2A | (Cull-Candy et al., 2001; Stegenga and Kalb, 2001; Takai et al., 2003) | | * | ** | *** | *** | **** |
| NR2B | | **** | **** | *** | ** | ** | * |
| NR2C | | | * | *** | ** | ** | ** |
| NR2D | | | * | ** | *** | *** | **** |
| NR3A | (Sun et al., 1998) | | ** | ** | ** | ** | * |
| NR3B | | | * | * | * | * | |
| Receptores Metabotrópicos | | | | | | | |
| Grupo I | | | | | | | |
| mGluR1 | (Catania et al., 1994; Lopez-Bendito et al., 2002) | * | * | ** | *** | *** | *** |
| mGluR5 | | | * | ** | *** | ** | ** |
| Grupo II | | | | | | | |
| mGluR2 | (Catania et al., 1994) | | | * | * | * | * |
| mGluR3 | | *** | ** | ** | * | * | * |
| Grupo III | | | | | | | |
| mGluR4 | (Bradley et al., 1998) | | | * | * | * | * |
| mGluR7 | | * | ** | ** | *** | ** | * |

*muy baja expresión, **baja expresión, ***expresión moderada, ****alta expresión.

E12, Día embrionario 12; **E15**, Día embrionario 15; **P0**, Nacimiento;

P7, Día postnatal 7; **P21**, Día postnatal 21; **A**, Adulto.

vii. Receptores de Glutamato en la diferenciación y sobrevivencia neuronal

Durante la neurogénesis en el SNC se encuentran niveles elevados de glutamato, además de que promueve el crecimiento y la diferenciación neuronal (Nguyen et al., 2001), favorece la expresión de genes importantes en la regulación del ciclo celular (mNAT1) con la entrada a la fase G0 a través de señalización por los receptores NMDA (Sugiura et al., 2001).

En el cerebelo el glutamato a través del receptor de NMDA de las células granulares aumenta su sobrevivencia vía BDNF-trkB. Además, puede generar un efecto trófico en las células de Purkinje aumentando su sobrevivencia (Hirai and Launey, 2000).

El glutamato influencia la proliferación de neuroblastos corticales a través de receptores AMPA-kainato pero no de NMDA, mientras que en los progenitores estriatales las funciones se encuentran invertidas (Luk et al., 2003; Luk and Sadikot, 2004). No obstante, la exposición sostenida de células progenitoras neuronales a NMDA inhibe la formación de neuroesferas y facilita su diferenciación, se observa la expresión de NR1, NR2A, B y D en las células progenitoras de hipocampo adulto (Kitayama et al., 2004) y una gran cantidad de expresión de mGluR5 en zonas de neurogénesis activa tanto en cerebro prenatal como postnatal, lo que le confiere la posibilidad de regular eventos en el desarrollo cerebral tanto en la vida embrionaria como postnatal. Además la presencia de mGluR5 podría generar oscilaciones de calcio importantes en dichos procesos (Di Giorgi Gerevini et al., 2004).

Los receptores de NMDA se expresan en neuronas post-mitóticas y los de AMPA se expresan en el estadio de progenitor neuronal durante la división neuronal terminal (Maric et al., 2000). Hay estudios que argumentan que la función del receptor de NMDA no es esencial para la diferenciación neuronal pero demuestran que si influye en la

sobrevida neuronal y que ésta función es dependiente de la subunidad NR1 (Okabe et al., 1998).

Se ha observado que el glutamato, a través de estimulación de receptores de NMDA, KA y mGluR del grupo II, puede actuar como un estímulo regenerativo para células progenitoras no comprometidas en la zona subventricular, que induce a las células troncales neuronales a dividirse tanto simétrica como asimétricamente (Brazel et al., 2005).

La activación endógena de los receptores mGluR1 y mGluR5 contribuye al desarrollo del cerebelo, particularmente mGluR1 en células de Purkinje y mGluR5 en células granulares (Catania et al., 2001). Una actividad mayor a través de mGluR4 lleva a las células neuro-precursoras granulares cerebelares a salir del ciclo celular y a diferenciarse a células granulares maduras (Canudas et al., 2004), mientras que éstas aumentan la sobrevivencia de las células de Purkinje (Morrison and Mason, 1998).

viii. Receptores de glutamato en el establecimiento y mantenimiento de la sinapsis

La mayoría de las sinapsis glutamatérgicas contienen agrupamientos de receptores funcionales tanto de AMPA como de NMDA. Estos agrupamientos aparecen a un tiempo similar en las sinapsis glutamatérgicas en desarrollo lo que favorece su consolidación (Cottrell et al., 2000). La transmisión sináptica excitadora se encuentra mediada casi exclusivamente por los receptores de AMPA en neuronas embrionarias y por los receptores AMPA y NMDA en neuronas más desarrolladas lo que sugiere su importancia en el establecimiento sináptico (Lin and Talman, 2002).

Los agrupamientos de receptores NR1/NR2B aparecen antes de recibir sus terminales presinápticas indicando que están regulados por mecanismos intrínsecos, independientemente de la presencia de axones en crecimiento, jugando un papel importante durante la consolidación sináptica (Li et al., 1998), i.e. para completar el patrón talamocortical y la formación de los barriles en la parcelación del mapa somatosensorial del cuerpo en la neocorteza en desarrollo y en el ajuste final de las áreas de representación de esta área (Iwayama et al., 2005; Lee et al., 2005a). Los NMDARs regulan el crecimiento del árbol presináptico terminal y la ramificación dendrítica postsináptica consolidando las sinapsis y el patrón de los elementos pre y postsinápticos (Iwayama et al., 2005; Lee et al., 2005a).

La eliminación sináptica es uno de los mecanismos importantes para el establecimiento de redes neuronales maduras. La función de los receptores de NMDA en el desarrollo temprano puede bloquear la formación sináptica o minimizar la vida de los contactos establecidos a través de la eliminación sináptica durante el refinamiento de la sinapsis (Colonnese et al., 2005). Las células de Purkinje en desarrollo difieren en la susceptibilidad a moléculas como el NO y el glutamato debido a una disminución de receptores de NMDA, sugiriendo ser un paso crítico de regresión de los procesos perisomáticos y la subsiguiente eliminación sináptica importante en el establecimiento de las redes neuronales cerebelares (Pisu et al., 2003). Las sinapsis glutamatérgicas en el hipocampo neonatal pueden perder su señalización por activación presináptica de receptores. Así, las sinapsis glutamatérgicas no son AMPA silentes cuando se forman pero se inducen a serlo por el silenciamiento dependiente de la actividad de receptores de AMPA, lo que tiene implicaciones para la eliminación sobrevivencia-dependiente de actividad de las sinapsis cuando se forma una red neuronal (Xiao et al., 2004).

En el núcleo subtalámico las subunidades GluR5/6/7 expresadas más tempranamente sugieren que los receptores de KA son funcionales antes que los de NMDA y AMPA. Como los receptores KA y NMDA maduran antes, su influencia en la organización sináptica y la plasticidad termina tempranamente durante el desarrollo, mientras que la de los receptores de AMPA se da durante todo el desarrollo neuronal (Lobo et al., 2003). Las propiedades dinámicas y la pérdida de los receptores de KA presinápticos durante el desarrollo puede ser un paso importante en la maduración de la red de procesamiento sensorial de las sinapsis talamocorticales importantes para la señalización efectiva de información sensorial para la corteza (Kidd et al., 2002).

Los mGluR3 y mGluR5 tienen un papel funcional durante la sinaptogénesis y el mantenimiento de las sinapsis adultas y los mGluR1, mGluR2 y mGluR4 en la transmisión sináptica madura (Catania et al., 1994; Elezgarai et al., 1999; Di Giorgi Gerevini et al., 2004). Se ha demostrado además la liberación de glutamato en sinapsis inhibitorias GABAérgicas/glicinérgicas en desarrollo, principalmente durante la primera semana postnatal, mediando el refinamiento sinapsis específico y tonotópico del mapa glicinérgico cerebral (Gillespie et al., 2005).

ix. Receptores de glutamato en el crecimiento y desarrollo dendrítico

La señalización a través de receptores NMDA puede servir como un regulador en la elaboración y crecimiento axonal terminal a través de señalización retrógrada, regulando el crecimiento y la focalización de las ramas terminales neuronales (Lee et al., 2005b; Lee et al., 2005a). La subunidad NR2B es el principal constituyente del receptor NMDA del cerebro perinatal en la rata, se acumula en los conos de crecimiento axonal en estadios tempranos de desarrollo regulando el crecimiento de neuritas

durante esta fase del desarrollo (Herkert et al., 1998). Además, la liberación de glutamato de terminales presinápticas activando la PLC- β 1 vía mGluR5 favorece la formación y desarrollo dendrítico en la corteza somatosensorial (Hannan et al., 2001).

La actividad neuronal mediada por los receptores de NMDA, juega un papel significativo en la formación de las terminales dendríticas presinápticas y postsinápticas en el primer relevo del núcleo de la vía trigeminal somatosensorial del ratón (Lee and Erzurumlu, 2005; Lee et al., 2005b) y se requiere para el desarrollo morfológico normal de neuronas jóvenes en células retinotectales. Los receptores de AMPA y NMDA son importantes para el mantenimiento de la estructura arborizada en neuronas maduras (Rajan and Cline, 1998).

La activación del receptor de NMDA lleva a la producción local de óxido nítrico (NO) el cual actúa como un mensajero intracelular promoviendo el crecimiento de las dendritas de neuronas motoras (Inglis et al., 1998). Los cambios bifásicos en las concentraciones de calcio intracelular en respuesta a glutamato se correlacionan con las fases facilitadoras e inhibitoras del crecimiento dendrítico: un incremento transitorio de las concentraciones intracelulares de calcio se correlaciona con aumentos en el crecimiento dendrítico asociado a calmodulina mientras el incremento sostenido de calcio se correlaciona con la retracción dendrítica asociado a calpaína reduciendo el nivel de polímeros de microtúbulos en las dendritas (Wilson et al., 2000).

La Rac1-GEF Tiam1 es un mediador crucial para el desarrollo dendrítico NMDA dependiente. El influjo de calcio a través del receptor NMDA induce la fosforilación de Tiam1 y la activación de Rac1 por medio de la CaMKII. Además la estimulación de NMDA activa a Ras por Ras-GRF regulada por calcio. La actividad de Tiam1 puede

modularse por receptores EphB que interactuando con el receptor NMDA, potencian el influjo de calcio. Además la estimulación del receptor de NMDA activa Rac1 y PI3K produciendo segundos mensajeros que reclutan y activan proteínas cinasas, la cinasa dependiente de inosítido 1 (PDK1) y la Akt; Tiam1 participa en la estimulación de esta vía induciendo la síntesis de proteínas que modulan el desarrollo dendrítico y la plasticidad neuronal (Tolias et al., 2005).

En células cerebelares el glutamato tiene una función importante para el desarrollo dendrítico. Las células granulares aumentan la sobrevivencia de células de Purkinje e inducen la formación dendrítica a través de la combinación de estimulación glutamatérgica no-NMDA y la producción de BDNF por las células granulares glutamatérgicas (Morrison and Mason, 1998). El cambio de la subunidad NR2B por NR2C durante el periodo postnatal temprano tiene un papel importante para el desarrollo dendrítico del circuito cerebelar (Metzger et al., 2005), mientras que la activación de los receptores mGluR4 promueve eventos tempranos en la neuritogénesis y media procesos importantes para el mantenimiento del fenotipo maduro en células granulares (Canudas et al., 2004).

x. Receptores de glutamato y migración neuronal

Se ha demostrado que la estimulación excesiva de los receptores de NMDA altera la migración neuronal (Marret et al., 1996). El glutamato liberado por las células superficiales corticales en gradientes difusibles, sirve como quimioatrayente estimulando la migración de estas neuronas hacia la placa cortical cuyo efecto es máximo a E17 a través de mecanismos dependientes de receptores de NMDA por incremento de calcio intracelular que modifica la dinámica del citoesqueleto (Behar et

al., 1999). La tasa de migración de las células granulares depende de la actividad de los receptores de NMDA y esta depende de un aumento en la concentración intracelular de calcio por la entrada a través de los receptores activados (Komuro and Rakic, 1993).

Se sugiere que el glutamato actuando a través de los receptores de AMPA puede o detener la migración de neuronas tangenciales por despolimerización del citoesqueleto en los procesos celulares o la existencia de gradientes de glutamato puede participar en los mecanismos de guía influyendo en la dirección de las extensiones de filopodias (Poluch et al., 2001).

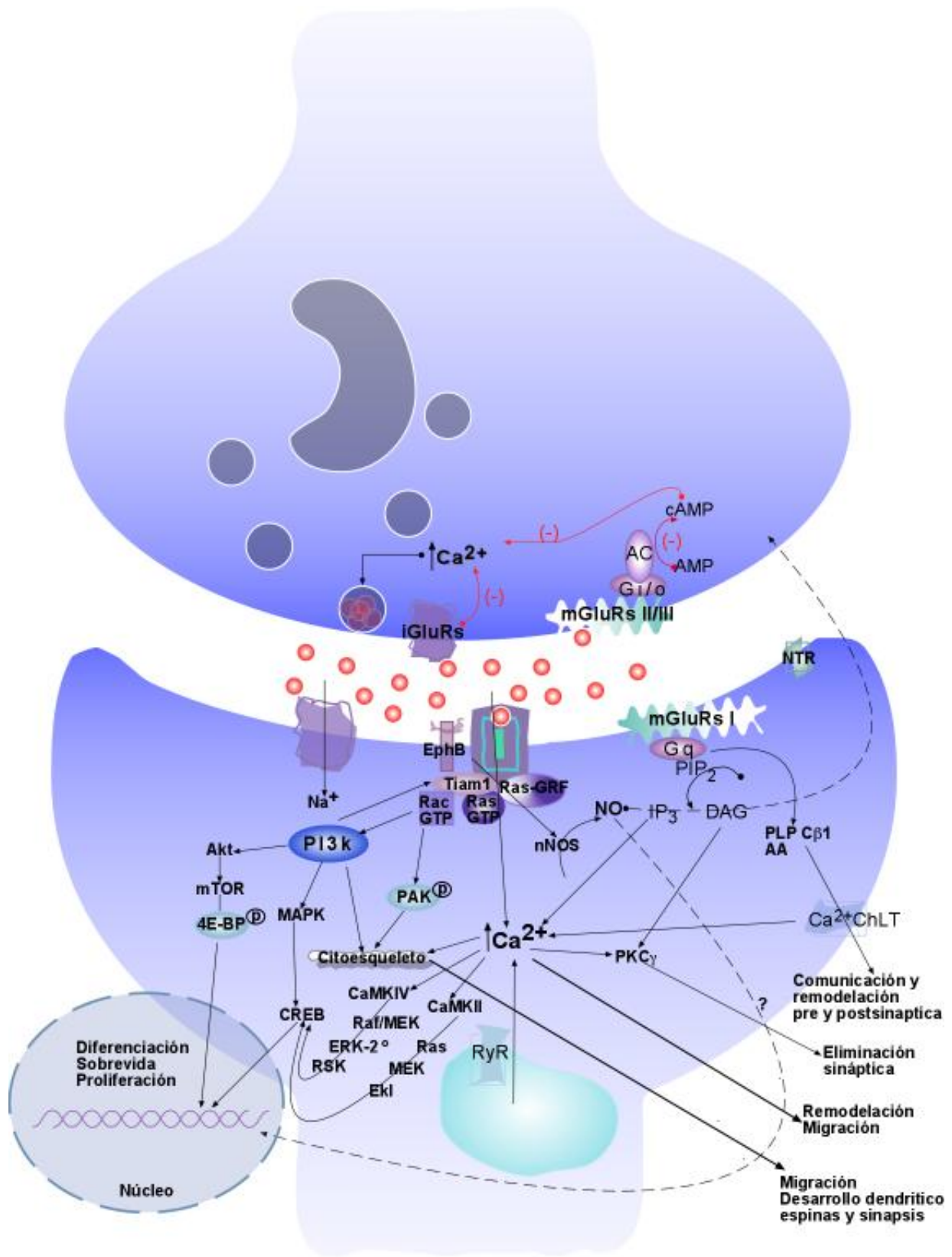


Figura 8. Papel de los receptores de glutamato en los diferentes procesos del desarrollo neuronal.

La despolarización inducida por medio de receptores no NMDA liberan el bloqueo de Mg^{2+} dependiente de voltaje de los NMDARs. La activación de los NMDARs promueve la entrada de calcio extracelular, así como la señalización por proteínas que forman parte del complejo de ensamble del receptor en la membrana sináptica, activándose las vías de señalización PI3k/Akt, MAP cinasas, Rac-Ras, la vía de la calmodulina cinasa (CaMK) II y IV, proteínas cinasas, Tiam1 y la producción de NO. Por otra parte, los receptores metabotrópicos postsinápticos promueven la degradación de fosfoinosítidos, aumentando la concentración de calcio intracelular ($[Ca^{2+}]_i$), donde convergen las vías de señalización mencionadas previamente, que son importantes en los procesos de sobrevivencia, diferenciación, establecimiento sináptico, crecimiento dendrítico, migración, proliferación, comunicación sináptica y eliminación sináptica. Además, la regulación de los GluRs en dichos procesos también está presente en la membrana presináptica modulando la liberación de glutamato.

xi. Biología Molecular de los Receptores de Glutamato

Gen *Grin1*

Hasta la fecha, se han clonado los genes *Grin1* de humano (Zimmer et al., 1995), ratón (Okamoto et al., 1999), rata (Bai and Kusiak, 1993) y pollo (Zarain-Herzberg et al., 2005), al igual que sus regiones reguladoras. Aunque la homología en secuencia entre las diferentes especies es baja (~30%), el patrón de unión a factores de transcripción es muy similar (Mejia-Guerra and Lareo, 2005). En primer lugar, el promotor *Grin1* carece de caja TATA, en su lugar tiene una secuencia rica en GC formando una caja GSG (GCG_5CG), que recluta al complejo de preiniciación de la transcripción favoreciendo la expresión génica. La sobre-expresión de los factores de transcripción del tipo SP, que incluye a SP1, 2, 3, y 4, activan la transcripción del gen *Grin1* de murinos (Bai and Kusiak, 1993, 1995; Okamoto et al., 2002; Liu et al., 2004) por unión a elementos SP

localizados en el promotor proximal. Además, se conoce que los factores de transcripción MEF-2C, NF κ B, AP-1, MZF regulan de manera positiva la transcripción por medio de su unión a los elementos presentes en la región reguladora o por medio de interacción con factores de transcripción SP (Bai and Kusiak, 1993, 1995; Krainc et al., 1998; Mao et al., 2002; Okamoto et al., 2002; Liu et al., 2004). Finalmente, se sabe que el factor de transcripción NRSF puede regular de manera negativa la transcripción del gen *Grin1* murino en células indiferenciadas y que dicha represión termina con el proceso de diferenciación neuronal en células P19 inducidas con ácido retinoico (Okamoto et al., 1999; Bai et al., 2003) o por medio de regulación por proteínas de unión a ADN de cadena sencilla (Bai et al., 1998). Además, se sabe que la represión mediada por NRSF del gen *Grin1* de murinos es necesaria, pero no suficiente para mantener reprimida la transcripción (Okamoto et al., 1999). En el caso del promotor del gen *Grin1* de humano se sabe que hay una disminución transcripcional mediada por el daño isquémico y que posiblemente el mecanismo de acción es por medio de la unión de NRSF al sitio NRSE presente en la región reguladora proximal del gen *Grin1* humano (Gascon et al., 2005).

Gen *Grin2a*

Se ha reportado la clonación y análisis de aproximadamente 9 kb de región reguladora del gen *Grin2a* de rata (Desai et al., 2002). Los sitios de inicio de la transcripción se encuentran agrupados en tres regiones, una entre -1047 y -1019 pb, otro entre -802 y -713 pb y el último entre -461 y -425 pb del sitio de inicio de la traducción. Este sitio se encuentra en el tercer exón, teniendo dos exones no

codificantes. Hay un sitio putativo RE1/NRSE en la posición -986 que no afecta la transcripción. El análisis *in silico* de esta región reguladora muestra un elemento CRE en región -1195, pero no se ha demostrado su funcionalidad (Desai et al., 2002). El análisis funcional demostró la presencia de elementos SP presentes en el exón 1 que regulan de manera positiva la actividad transcripcional de este gen (Desai et al., 2002).

Gen *Grin2b*

La región reguladora del gen *Grin2b* se clonó por dos grupos independientes (Sasner and Buonanno, 1996; Klein et al., 1998). Los sitios de inicio de transcripción se encuentran entre -717 y -762 o -876 pb del AUG cuando el exón 2 está excluido; si el exón 2 se incluye, la región 5' del ARNm se extiende unos 353 pb del sitio de inicio de la transcripción. El promotor del gen *Grin2a* carece de caja TATA y en su lugar contiene una región rica en GC a -43 pb con el motivo GSG/Sp1 que unen SP1 y CREB, controlando la actividad transcripcional. Además contiene un sitio de unión a NRSF al final del exón 1, el cual confiere actividad transcripcional específica neuronal (Sasner and Buonanno, 1996; Klein et al., 1998).

Gen *Grin2c*

La región reguladora del gen que codifica para la subunidad NR2C también se clonó previamente (Suchanek et al., 1995, 1997). Los dos sitios de inicio de transcripción en el ratón residen a -772 y -754 pb desde el sitio de inicio de la traducción. La región localizada 1 kb por arriba de la región 5' no traducida del intrón 1 restringe la expresión específica en cerebelo, los análisis funcionales muestran que

contiene un sitio para unión a NRSF que puede estar jugando un papel en dicha regulación, sin embargo su función no se ha elucidado (Suchanek et al., 1995, 1997).

Gen *Gria1*

La región reguladora del gen *Gria1* tiene dos sitios de inicio de transcripción en la región -295 y -202 pb del sitio de inicio de la transcripción, y al igual que los otros promotores, carece de caja TATA. A diferencia de los promotores de los otros receptores de glutamato, la región silenciadora esta entre -164 y -936 y aparentemente no depende de NRSF (Borges and Dingledine, 2001).

Gen *Gria2*

Los sitios de inicio de la transcripción del promotor del gen *Gria2* principales se encuentran a -429 y -431 pb del sitio de inicio de la traducción. Al igual que el resto, es un promotor que carece de caja TATA, con presencia de un sitio NRSE silenciador en la región entre -174 a -194 pb en células no neuronales y regulando la transcripción en neuronas. La unión de SP1 a una parte de la caja GSG y la unión de NRF-1 en el promotor proximal, activan fuertemente la transcripción en neuronas y glia, posiblemente formando un complejo activador (Myers et al., 1998).

Gen *Grik5*

El promotor del gen *Grik5* también carece de caja TATA y tiene múltiples sitios de inicio de transcripción en la región de -109 a -299 pb por arriba del sitio de inicio de la traducción. Contiene un sitio silenciador dentro del intrón 1 que posiblemente sea reconocido por varios receptores huérfanos como COUP-TF, EAR2 y Nurr1 (Chew et al., 1999; Chew et al., 2001).

Gen *Grm1*

El promotor del gen *Grm1*, al contrario que los otros promotores de los receptores de glutamato, sí tiene caja TATA y el elemento Inr, pero el análisis por mutación no revelaron su funcionalidad *in vivo*. La unión e interacción de los factores de transcripción TTF-1 y C/EBP al promotor en el exón 1, favorece el reclutamiento del promotor basal para iniciar y potenciar la transcripción. Finalmente, la presencia de un sitio NRSE en posición +687/+707 pb, silencia la transcripción del promotor del gen *Grm1* en fibroblastos, por medio de la remodelación de la cromatina (Crepaldi et al., 2007).

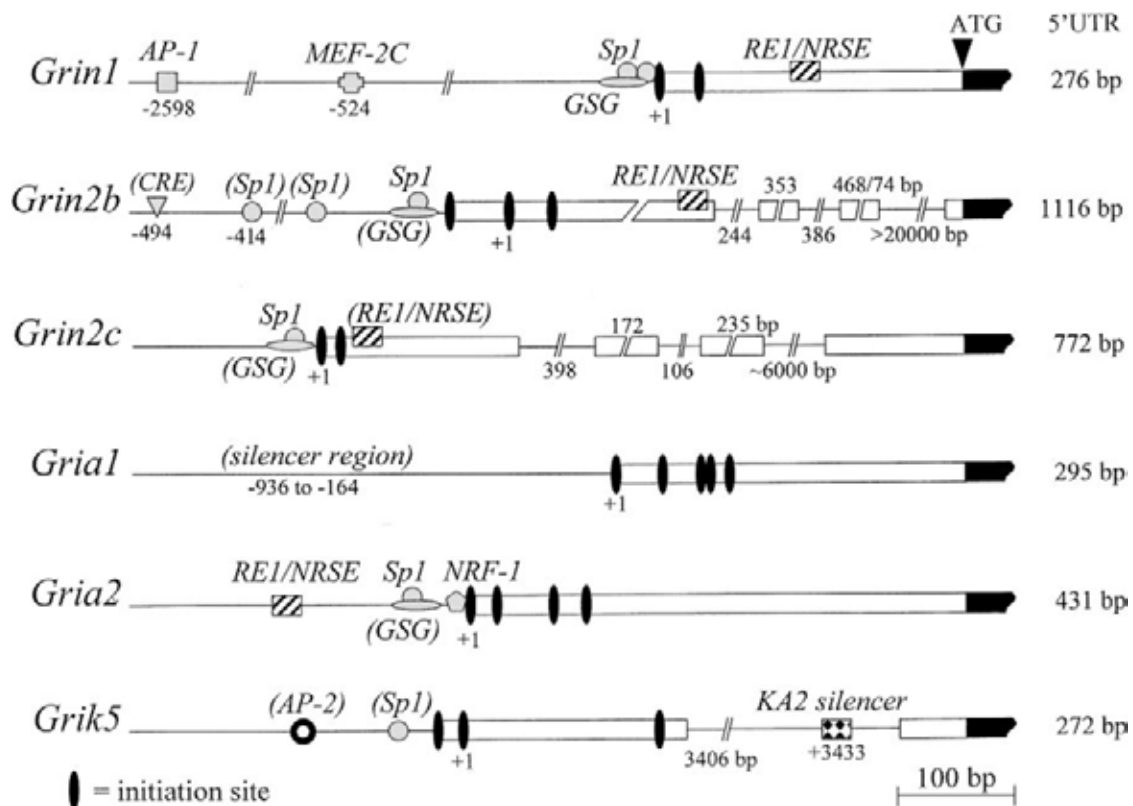


Figura 9. Esquema representativo de las regiones reguladoras de los genes clonados de los receptores de glutamato ionotrópicos y metabotrópicos. Se muestran las regiones reguladoras de los genes *Grin1*, *Grin2a*, *Grin2b*, *Grin2c*, *Gria1*, *Gria2*, *Grik5* de murinos; así como los elementos reguladores que se han demostrado por análisis *in silico* y/o su funcionalidad por análisis experimental. Tomado y modificado de Myers et al., 1999.

IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Hasta la fecha se han clonado y caracterizado las regiones reguladoras del gen *Grin1* de murinos (Bai and Kusiak, 1993; Okamoto et al., 1999) de humano (Zimmer et al., 1995) y sus regiones reguladoras. Recientemente, en nuestro laboratorio, se clonó el gen *Grin1* de pollo y ~1.9 kb de su región reguladora, incluyendo 86 pb de región 5'-no traducida (Zarain-Herzberg et al., 2005). Se sabe que la subunidad NR1 de los receptores de glutamato se encuentra diferencialmente expresada durante el desarrollo del cerebro y de la retina. Sin embargo, no se conocen los mecanismos moleculares que regulan la expresión de este gen. Con la secuenciación del genoma del pollo, publicada recientemente, es posible conocer los mecanismos transcripcionales que relacionan a los mamíferos con otros vertebrados (Consortium, 2004). Por lo anterior, conocer los mecanismos moleculares que regulan la expresión de genes de aves nos permite esclarecer los mecanismos de regulación de la expresión génica, que están conservados entre especies. Además, conocer los mecanismos de regulación transcripcional de los receptores de glutamato, permite entender mejor la expresión de genes neuronales, además de abrir un panorama más amplio para conocer los factores de transcripción involucrados en su expresión en condiciones fisiológicas, así como su alteración en condiciones patológicas. Se sabe que la subunidad NR1 de los receptores de glutamato del tipo NMDA es necesaria para la funcionalidad del receptor, ya que forma el canal iónico y contiene el sitio para unión al co-agonista, además su expresión está regulada positivamente durante la diferenciación y desarrollo del cerebro y está distribuída por todo el SNC, lo que hace fundamental conocer los factores de

transcripción que regulan la expresión del gen *Grin1* en células no neuronales así como en neuronas.

V. HIPÓTESIS

La represión transcripcional del gen *Grin1* de pollo está mediada por la unión de factores de transcripción a elementos de ADN del promotor proximal y región 5'-no traducida que están presentes en células indiferenciadas. Dicha represión transcripcional termina cuando se inicia el programa de diferenciación neuronal, favoreciendo la unión de activadores transcripcionales al promotor basal promoviendo la activación de la transcripción.

VI. OBJETIVO GENERAL

Esclarecer los mecanismos de regulación transcripcional del gen *Grin1* de pollo, que regulan su transcripción en células indiferenciadas (P19), células comprometidas a fenotipo neuronal (PC12) y células no neuronales (C₂C₁₂), así como conocer los factores de transcripción involucrados en su activación transcripcional en neuronas corticales de pollo.

VII. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Estudiar el patrón de expresión del ARNm de *Grin1* por medio de RT-PCR, durante la diferenciación neuronal de las células P19 y PC12.
2. Estudiar el patrón de expresión del ARNm de los factores de transcripción NRSF (REST) y su variante de empalme alternativo REST4, así como de los factores SP por medio de RT-PCR, durante la diferenciación neuronal de las células P19 y PC12.
3. Estudiar la actividad transcripcional del promotor *Grin1* de pollo por medio de ensayos funcionales usando construcciones quiméricas del promotor (*Grin1p*-Luc) en células P19, PC12 y durante la diferenciación neuronal inducida por diferentes mecanismos, así como en cultivos primarios de neuronas de pollo.
4. Caracterizar los elementos funcionales de unión para los factores de transcripción NRSF y SP en el promotor proximal del gen *Grin1* de pollo por medio de ensayos de unión DNA-proteína (EMSA).
5. Analizar la función de los elementos SP y NRSF del promotor proximal del gen *Grin1* de pollo por medio de ensayos funcionales de los sitios SP y NRSE mutados, generados por la técnica de mutagénesis dirigida.
6. Demostrar por medio de análisis farmacológicos el papel de las desacetilasas de histonas en la regulación transcripcional del promotor *Grin1* de pollo en células P19, PC12, C₂C₁₂ y en neuronas de pollo.

VIII. ESTRATEGIAS METODOLÓGICAS

Material químico y biológico

Todas las enzimas fueron adquirida de Invitrogen Co, USA y New England Biolabs Inc, USA. El $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ se adquirió de PerkinElmer Life Sciences, USA. El suero fetal bovino y el suero de caballo, las columnas de intercambio iónico, los oligonucleótidos y los reactivos para los geles de retardo de movilidad por electroforesis, la poli-D-ornitina, el ácido retinoico y el paraformaldehído se obtuvieron de Sigma-Aldrich, USA. El inhibidor de proteasas se adquirió de Roche. El NGF se adquirió de Alomone Labs, Israel. La tinción de Hoescht, el TRIzol, los plásmidos pGL3 básico, pGL3 promotor, pcDNA3, pRL, columnas de intercambio iónico, la tricostatina A y la mitramicina se obtuvieron de Invitrogen Co, USA. El sistema dual de ensayo de luciferasa de luciérnaga y de renila se adquirieron de Promega Co, USA. El anticuerpo TUJ1 se obtuvo de Millipore Co.; todos los demás anticuerpos se adquirieron de Santa Cruz Biotechnology Inc, USA. El butirato de sodio, la 5-azacitidina, la mitramicina A, los antibióticos y antimicóticos y el DMEM se obtuvieron de Gibco-Invitrogen Co., USA. Algunas columnas de intercambio iónico se obtuvieron de Qiagen Inc., USA. El kit de mutagénesis dirigida se adquirió de Stratagene, USA. Los oligonucleotidos de ADN para la reacción en cadena de la polimerasa fueron sintetizados en la Unidad de Biología Molecular, del Instituto de Fisiología Celular UNAM. Todas las líneas celulares se obtuvieron de ATCC, USA. Los embriones de 7 días de pollo se adquirieron de ALPES S.A. de C.V, México.

Cultivo Celular

Las células P19 y C₂C₁₂ se crecieron en Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Sigma) suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10%. Las células P19 se diferenciaron en neuronas en presencia de ácido retinoico (AR) (0.5 μ M) durante 4 días en suspensión; posteriormente se tripsinizaron y sembraron en cajas de cultivo con medio de crecimiento suplementado con arabinósido de citosina (ara-c) (25 ng/ml). Las células PC12 se crecieron en DMEM con suero de caballo (SC) 15% y 5% de SFB. Para la diferenciación a neuronas las células PC12 se sembraron en placas pretratadas con poli-D-ornitina y se mantuvieron en presencia del factor de crecimiento nervioso (NGF) murino (mNGF 2.5S) (Alomone Labs, Jerusalem, Israel) 50 ng/ml en DMEM suplementado con 2% de SC.

Los cultivos primarios de neuronas corticales de pollo se realizaron con la técnica descrita previamente (Zarain-Herzberg et al., 2005). Brevemente, los prosencéfalos de pollo de 7 días de desarrollo embrionario fueron digeridos con 0.5% de tripsina en Advance DMEM (Invitrogen) a 37°C durante 30 minutos en agitación constante, lavados dos veces en Advance DMEM suplementado con 20% de SFB, homogeneizados con pipeteo gentil, pasados por una membrana de nylon, sembrados en cajas de cultivos pretratados con poli-D-ornitina. Las neuronas se mantuvieron en Advance DMEM suplementado con 3% SFB y 25 ng/ml de ara-C.

Todos los medios de cultivo se suplementaron con kanamicina (60 mg/L) penicilina G (10 UI/ml), estreptomina (10 μ g/ml), anfotericina B (0.025 ng/ml) y nistatina (10 UI/ml).

Inmunocitoquímica

El anticuerpo TUJ1 se utilizó para la detección de la β -tubulina III durante la diferenciación neuronal de las células PC12 y P19. Las células en cultivo se diferenciaron a neuronas como se describió previamente. Las células se fijaron en cubreobjetos pretratados con poli-D-ornitina, con paraformaldehído al 4% durante 10 minutos. Las células se lavaron en PBS y se bloquearon con suero de cabra al 3% por 2 horas y se incubaron toda la noche a 4°C con el primer anticuerpo TUJ1 para β -tubulina III (1:2000) (Chemicon Internacional). Después de lavar con PBS, se incubaron con el segundo anticuerpo anti-ratón Fluor-Alexa 488 (1:500) (Molecular Probes, Invitrogen) durante 2 horas a temperatura ambiente y se utilizó la tinción de Hoescht 33258 (Molecular Probes, Invitrogen) como marcador nuclear. Las preparaciones se visualizaron en el sistema Nikon Eclipse TE 2000 – U y analizado con el software ACT-1 (Nikon).

Transcripción Reversa - Reacción en Cadena de la Polimerasa – Semicuantitativa (RT-PCR)

El aislamiento de RNA total se realizó con el reactivo TRIzol (Invitrogen) de acuerdo con el protocolo del fabricante. La concentración de ARN se cuantificó por absorbancia 260/280 nm. La calidad del ARN se determinó con geles de agarosa al 1% con formaldehído. La transcripción reversa se realizó con hexámeros al azar, utilizando 2 μ g de ARN total y 100U de transcriptasa reversa M-MLV (Invitrogen). Se utilizaron 2 μ l de cADN para la PCR. Las muestras se corrieron en gel de agarosa al 2% y con tinción con bromuro de etidio. Las fotos se analizaron con el programa ImageJ 1.36b NIH,

USA. Todos los datos se normalizaron con la expresión de β -actina. Los oligonucleótidos de ADN utilizados, las temperaturas de alineamiento y el número de ciclos utilizados se resumen en la Tabla I.

Construcción de plásmidos quiméricos

Previamente, en el laboratorio, se clonó un fragmento de ADN de 1817 pb de región reguladora del gen *Grin1* de pollo y 86 pb de región 5'-no traducida, en el plásmido pGL3-básico que contiene al gen de luciferasa de luciérnaga como gen reportero (Zarain-Herzberg et al., 2005). A partir de esta construcción subclonada en pGL3-básico se aisló el fragmento SmaI - SmaI de 140 pb se ligó en pGL3-básico cortado con SmaI y defosforilado; la clonación se verificó por secuenciación (Unidad de Biología Molecular. IFC. UNAM). Todas las otras construcciones se generaron con la enzima de restricción HindIII y las enzimas siguientes: BamHI (generando una construcción con 210 pb); PvuII (para generar una construcción con 334 pb); RsaI (generando una construcción de 549 pb); y NcoI (generando una construcción de 1237 pb). Todas las construcciones contienen los primeros 86 pb de región 5'-no traducida y se insertaron en el vector de expresión pGL3-básico (Promega). Se corroboró la inserción y la orientación con mapas de restricción. Todas las construcciones se ligaron río arriba del gen de luciferasa de luciérnaga. Se amplificaron en *E. coli* cepa DH5 α y se purificaron por medio de columnas de intercambio iónico (Qiagen) de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Los plásmidos se utilizaron para transfecciones transitorias y estables como se indica a continuación.

Los plásmidos REST-VP16 y REST4 fueron proporcionados por el Dr. S.

Majumder (Department of Molecular Genetics, M.D. Anderson Cancer Center, University of Texas, Houston, TX, U.S.A.) y por el Dr. M. Shimojo (Department of Molecular and Cellular Biochemistry, University of Kentucky College of Medicine, Chandler Medical Center, 800 Rose Street, Lexington, KY 40536–0298, USA).

Transfecciones transitorias y estables

Las células P19 y PC12 transfectadas establemente fueron generadas por medio de co-transfección de la construcción pGL3-*Grin1* 1817 pb y el plásmido pcDNA3 (que contiene el gen de resistencia a geneticina). Posteriormente, las células P19 y PC12 fueron crecidas por dos semanas en su medio de crecimiento respectivo suplementado con 250 µg/ml y 500 µg/ml de geneticina, respectivamente. Se seleccionaron tres colonias únicas resistentes a geneticina de cada línea celular y se realizó ensayo de luciferasa para determinar la actividad transcripcional. Las células P19 y PC12 transfectadas establemente se indujeron a diferenciar como se describió previamente y se midió actividad de luciferasa a intervalos de 24 h. Los resultados se normalizaron con el contenido total de proteína y se expresaron como la relación de actividad de luciferasa por mg de proteína.

Para las transfecciones transitorias, se utilizó el reactivo de Luciferasa 2000 (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se utilizó 1 µg de las construcciones pGL3-*Grin1* de pollo y 0.1 µg de pRL-CMV (Promega), el plásmido REST-VP16 o el plásmido REST4 (0.5 µg, 1 µg o 1.5 µg), en DMEM sin suero. Las transfecciones se realizaron en células P19 y PC12 indiferenciadas, en cultivo primario de neuronas de pollo y en células C₂C₁₂ y posteriormente se incubaron por 3 h a 37°C.

Después, el medio de cultivo se reemplazó por el medio de crecimiento respectivo y las células se incubaron a 37°C y 5% CO₂ durante 24 h. Las células se lisaron en amortiguador de lisis pasiva (Promega) por 30 minutos y se cuantificaron las actividades de luciferasa de luciérnaga y de Renilla utilizando el kit de ensayo dual de luciferasa en un luminómetro de placa multipozos (Wallac Victor2, PerkinElmer). La actividad de luciferasa se normalizó utilizando la actividad de luciferasa de Renilla o la proteína total, como se indica en cada experimento.

Los tratamientos farmacológicos se realizaron después de 24 h de las transfecciones transitorias. El medio de cultivo respectivo se suplementó con 100 nM de mitramicina A, trichostatina A 100 nM, butirato 1 mM y 5-azacitidina 1 μM y las células se incubaron durante, 16 h, 14 h, 24 h y 48 h, respectivamente, hasta que los ensayos de luciferasa se realizaron como se mencionó previamente.

Geles de Retardamiento de Movilidad Electroforética (EMSA)

La secuencia de los oligonucleótidos de ADN de doble cadena utilizados se muestran en la Tabla II. Los extractos nucleares se obtuvieron lisando las células P19, PC12, C₂C₁₂ y neuronas corticales de pollo con una solución hipo-osmolar que contiene HEPES 20 mM, NaCl 10 mM, glicerol 20%, MgCl₂ 1.5 mM, DTT 1 mM, PMSF 1 mM y un cocktail de inhibidores de proteasas (Roche) para aislar los núcleos celulares. Los núcleos se lisaron y se mantuvieron en solución que contiene HEPES 20mM, NaCl 0.5M, glicerol 20%, MgCl₂ 1.5mM, DTT 1mM, PMSF 1 mM y en presencia del cocktail de inhibidores de proteasas (Roche). Los oligonucleótidos de doble cadena se marcaron en presencia de γ-[³²P]-ATP (>6000 Ci/mmol) y 10 U de polinucleótido cinasa

de T4 (Invitrogen). Las mezclas de reacción se realizaron con 10 μ g de extracto nuclear, buffer de unión ADN-proteína que contiene 20 mM HEPES, 1.5 mM $MgCl_2$, 0.5mM DTT, glicerol 20%, 1 μ g de poli dl:dC (Amersham Bioscience), 250 mM NaCl, en un volumen final de 20 μ l y preincubados a temperatura ambiente por 10 minutos. Se agregaron 35 fmol de oligonucleótidos marcados a la reacción y se incubaron por 10 min. a temperatura ambiente. La mezcla se incubó con 2 μ g de anticuerpo para super-retardamiento para NRSF (H-290), SP1 (PEP2 y H-255), TFIID (N-12) y Egr-1 (C-20) (todos de Santa Cruz Biotechnology, USA). Después de incubar la reacción durante 20 minutos, las muestras se cargaron en geles de poliacrilamida al 5%, con glicerol al 2%, en condiciones no desnaturizantes y se separaron los complejos a corriente constante de 15 mA por 3 a 4hr. Los geles se secaron y se expusieron a placas X-Omat (Kodak) a $-80^{\circ}C$ por 12 – 72 h.

Mutagénesis dirigida

La mutagénesis dirigida de la caja GSG-like y GSG/SP (del sitio SP que se encuentra cerca de la caja GSG) y de los elementos S2 y N1 se realizaron por medio del kit de mutagénesis dirigida QuickChange (Stratagene) utilizando como templado la construcción control de -210 pb de región reguladora del gen *Grin1* de pollo en el plásmido pGL3-básico y usando los oligonucleótidos de ADN mutados (ver Tabla II). Las mutaciones sitio específicas se realizaron en presencia de 7.5% DMSO debido a la alta T_m del templado, se realizaron 12 ciclos de 30s a $95^{\circ}C$ para la desnaturización, 60 seg a la T_m indicada y 12 min a $68^{\circ}C$ para la extensión. Posteriormente, el templado de ADN se digirió con la enzima DpnI y los plásmidos mutados se transformaron en las

células competentes *E. Coli* cepa DH5 α . Los plásmidos se amplificaron y purificaron utilizando el kit Maxi endo-free (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las mutaciones se verificaron por medio de secuenciación automatizada (IFC, UNAM, México).

Análisis de secuencias y análisis estadístico

La secuencia de la construcción quimérica que contiene la región reguladora del gen *Grin1* de pollo de 1.9 kb está reportada previamente (Zarain-Herzberg et al., 2005) (GeneBank, NSD número de acceso AY663367). El análisis *In silico* comparativo de las secuencias de las regiones reguladoras del gen *Grin1* de pollo, rata, ratón y humano se realizó con los programas y algoritmos MathInspector (Genomatix), BLAST (National Center for Biotechnology Information), MacVector (Accelrys Software), Transfact (BioBase) y EMBOSS CpG Plot. Los resultados son expresados con +/- error estándar (al menos tres experimentos independientes por duplicado) y se analizaron por la prueba de Dunnett con Análisis de varianza (ANOVA) utilizando el programa Prism 4.0 (GraphPad). El valor de $P < 0.05$ fue considerado como estadísticamente significativo.

Tabla I. Oligonucleótidos utilizados para la reacción en cadena de la polimerasa.

| Nombre | Secuencia | tm | Ciclos |
|-------------------|---|-----------|---------------|
| <i>Grin1 f</i> | 5'-CAA TGG TGA CCC AGT GAA GAA GG-3' | 52°C | 35 |
| <i>Grin1 b</i> | 5'-TCC TGT GTG CCA AAC TTG CC-3' | 52°C | 35 |
| NRSF f | 5'-CTG TGA CCG GCT GTG GATACA ATA C-3' | 56°C | 35 |
| NRSF b | 5'-ATG GTT TCT CAG GTG TTT CCT CC-3' | 56°C | 35 |
| REST4 f | 5'-CAG AGT GTG ATC TAG ATG GGT GA-5' | 56°C | 35 |
| REST4 b | 5'-GCT CCT ATC GGC TGT TTT G-3' | 56°C | 35 |
| SP f | 5'-TTG GTG GCA ATA ATG GGG G-3' | 55°C | 30 |
| SP b | 5'-AAA GGA GAT GGC TGG GAT TCC-3' | 55°C | 30 |
| β -actina f | 5'-GCT CGT CGT CGA CAA CGG CTC-3' | 54°C | 30 |
| β -actina b | 5'-CAA ACA TGA TCT GGG TCA TCT TCT T-3' | 54°C | 30 |

*todos los oligonucleótidos y los productos se diseñaron con el programa MacVector 6.5 y se verificaron con el programa BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) para asegurar productos únicos.

Tabla II. Oligonucleótidos utilizados para los geles de retardamiento de movilidad por electroforesis.

| Nombre | Secuencia 5' – 3' |
|---------------|---|
| SP cs f | 5'-ATT CGA TCG <u>GGG CGG</u> GGC GAG C-3' |
| SP cs b | 5'-GCT CGC CCC GCC CCG ATC GAA T-3' |
| SPm cs f | 5'-ATT CGA TCG <u>GTT CGG</u> GGC GAG C-3' |
| SPm cs b | 5'-GCT CGC CCC GAA CCG ATC GAA T-3' |
| S2 f | 5'-AGC CGG CGG <u>CGG GCG</u> GAG CGG CGC GG-3' |
| S2 b | 5'-CCG CGC CGC TCC GCC CGC CGC CGG CT-3' |
| S2m f | 5'-AGC CGG CGG <u>CGT TCG</u> GAG CGG CGC GG-3' |
| S2m b | 5'-CCG CGC CGC TCC GAA CGC CGC CGG CT-3' |
| GSG/SP f | 5'- TCC CGC TGC <u>CGC GGG GGC CGG GGG CGG</u> GCC GGG GGT GGG-3' |
| GSG/SP b | 5'-CCC ACC CCC GGC CCG CCC CCG GCC CCC GCG GCA GCG GGA-3' |
| GSG/SPm1 f | 5'-TCC CGC TGC <u>CGC TTG GGC CGG</u> GGG CGG GCC GGG GGT GGG-3' |
| GSG/SPm1 b | 5'-CCC ACC CCC GGC CCG CCC CCG GCC CAA GCG GCA GCG GGA-3' |
| GSG/SPm2 f | 5'-TCC CGC TGC CGC GGG GGC CGG <u>GTT CGG</u> GCC GGG GGT GGG-3' |
| GSG/SPm2 b | 5'-CCC ACC CCC GGC CCG AAC CCG GCC CCC GCG GCA GCG GGA-3 |
| NRSE cs f | 5'-GCC AAA CAC GCT <u>TCA GCA CCT CGG ACA GCA</u> TCC GCC GCG C-3' |
| NRSE cs b | 5'-GCG CGG CGG ATG CTG TCC GAG GTG CTG AAG CGT GTT TGG C-3' |
| NRSEm cs f | 5'-GCC AAA CAC GCT <u>TCG TAA CCT CGG ACA GCA</u> TCC GCC GCG C-3' |
| NRSEm cs b | 5'-GCG CGG CGG ATG CTG TCC GAG GTT ACG AAG CGT GTT TGG C-3' |
| N1 f | 5'-GAG CGG GAG <u>GTT CAG CAC CAA GGA GAG CTC</u> CCC GCG CCG C-3' |
| N1 b | 5'-GCG GCG CGG GGA GCT CTC CTT GGT GCT GAA CCT CCC GCT C-3' |
| N1m f | 5'-GAG CGG GAG <u>GTT TCG TAC CAA GGA GAG CTC</u> TTA CGC GTG C-3' |
| N1m b | 5'-GCA CGC GTA AGA GCT CTC CTT GGT ACG AAA CCT CCC GCT C-3' |
| N2 f | 5'-CGG CGG CGG GCG <u>GAG CGG CGC GGA GCG GAG CGG</u> GAG GTT CA-3' |
| N2 b | 5'-TGA ACC TCC CGC TCC GCT CCG CGC CGC TCC GCC CGC CGC CG-3' |
| N3 f | 5'-CGC TGC <u>GGC AGC</u> GCG GGG <u>CCG CGG AGC</u> GGG AGG AGC CGG CGG-3' |
| N3 b | 5'-CCG CCG GCT CCT CCC GCT CCG CCG CCC CGC GCT GCC GCA GCG-3' |

Las secuencias subrayadas indican el sitio de unión para los factores de transcripción.

IX. RESULTADOS

i. Diferenciación neuronal de células P19 y PC12 con ácido retinoico y NGF

Para analizar el patrón de actividad transcripcional del gene *Grin1* de pollo durante la diferenciación neuronal, utilizamos dos modelos celulares de diferenciación; las células P19 son células pluripotenciales derivadas de teratocarcinoma embrionario que se diferencian con ácido retinoico (McBurney and Rogers, 1982) y las células PC12 son células comprometidas a linaje neuronal, derivadas de feocromocitoma, y que pueden adquirir un fenotipo neuronal con el Factor de Crecimiento Nervioso (NGF por sus siglas en inglés, Nerve Growth Factor) (Greene and Tischler, 1976). Estos dos modelos de diferenciación neuronal nos permiten tener condiciones estables para estudiar la regulación transcripcional del promotor durante el proceso de diferenciación neuronal. Para demostrar que nuestros modelos de diferenciación neuronal son acordes a lo reportado en la literatura, evaluamos la expresión de β -tubulina III por medio de inmunocitoquímica, en células P19 y PC12 indiferenciadas y durante su diferenciación a neuronas inducida con ácido retinoico y NGF, respectivamente. Como se muestra en la Figura 10A, las células P19 indiferenciadas no muestran expresión de β -tubulina III y a partir del cuarto día de diferenciación comienzan a expresarla, incrementando la expresión hasta el día 8 de diferenciación con ácido retinoico. Por otro lado, las células PC12 muestran expresión de β -tubulina III en estadio indiferenciado y ésta incrementa conforme las células se diferencian a neuronas los 6 días de tratamiento con NGF (ver Figura 10B).

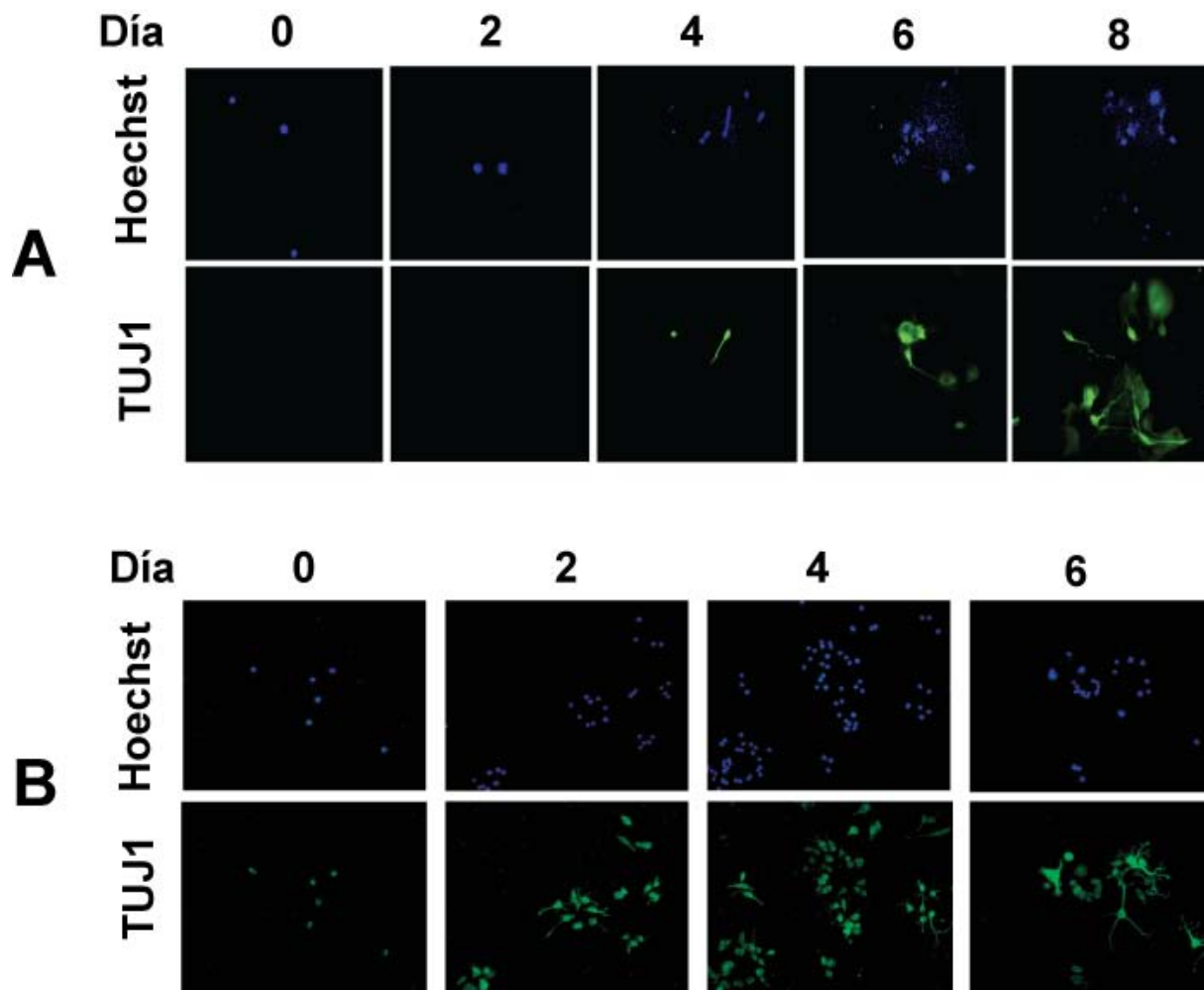


Figura 10. Inmunocitoquímica en células P19 y PC12 indiferenciadas y durante la diferenciación neuronal inducida con ácido retinoico y NGF, respectivamente, con anticuerpo contra β -tubulina III. Panel A. En la parte superior se muestra la tinción con Hoechst en células P19 indiferenciadas y durante los días 2, 4, 6 y 8 de diferenciación neuronal inducida con ácido retinoico. En la parte inferior se muestra la tinción para β -tubulina III en células P19 indiferenciadas y durante los días de diferenciación 2, 4, 6 y 8. No se observa la presencia de β -tubulina III en células indiferenciadas y empieza a observarse a partir de los 4 días de diferenciación neuronal. Panel B. En la parte superior se muestra la tinción con Hoechst en células PC12 indiferenciadas y durante los días 2, 4 y 6 de diferenciación neuronal inducida con NGF. En la parte inferior se muestra la tinción para β -tubulina III en células PC12 indiferenciadas y durante los días de diferenciación 2, 4 y 6. Se observa la presencia de β -tubulina III en células indiferenciadas y ésta incrementa durante toda la diferenciación neuronal.

ii. Expresión del Gen *Grin1* endógeno en células P19 y PC12 durante la diferenciación neuronal

Para conocer la expresión del gen *Grin1* en células P19 y en células PC12 indiferenciadas y durante la diferenciación neuronal, realizamos la técnica de PCR semicuantitativo. La Figura 11 muestra que la expresión de *Grin1* incrementa con la diferenciación neuronal a partir del día 2 de tratamiento con ácido retinoico lo que está de acuerdo a lo reportado previamente en la literatura (Bai et al., 2003). En las células PC12 indiferenciadas se observa que hay una expresión basal alta y no se observa un incremento significativo de la expresión del ARNm de *Grin1* durante 6 días de tratamiento con NGF (Ver Figura 12). Estos resultados están de acuerdo con lo reportado previamente en la literatura (Sucher et al., 1993; Leclerc et al., 1995).

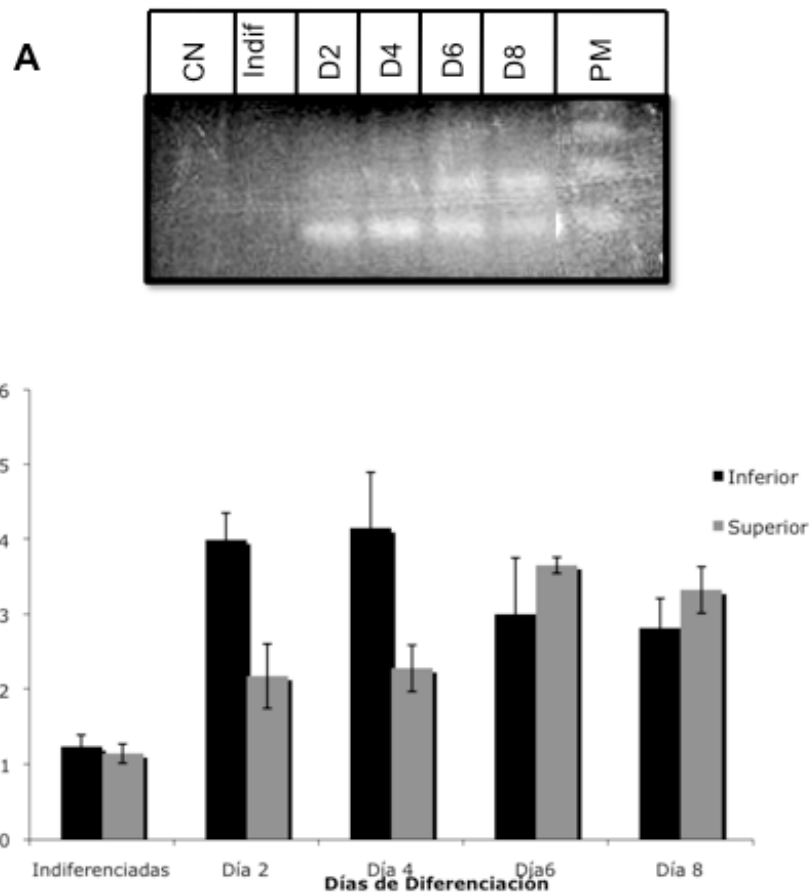


Figura 11. Expresión del gen *Grin1* en células P19 indiferenciadas y durante 8 días de diferenciación neuronal inducida con ácido retinoico. Se aisló el ARNm de células P19 indiferenciadas y durante los días de diferenciación 2, 4, 6 y 8. Posteriormente se realizó PCR semicuantitativa y se corrió en un gel de agarosa al 2% (Panel A). Se cuantificó por densitometría y se graficó normalizado con la expresión de β -actina (Panel B). CN, control negativo; Indif, células P19 indiferenciadas; D2, 4, 6 y 8, días de diferenciación 2, 4, 6 y 8 respectivamente; PM, marcador de peso molecular.

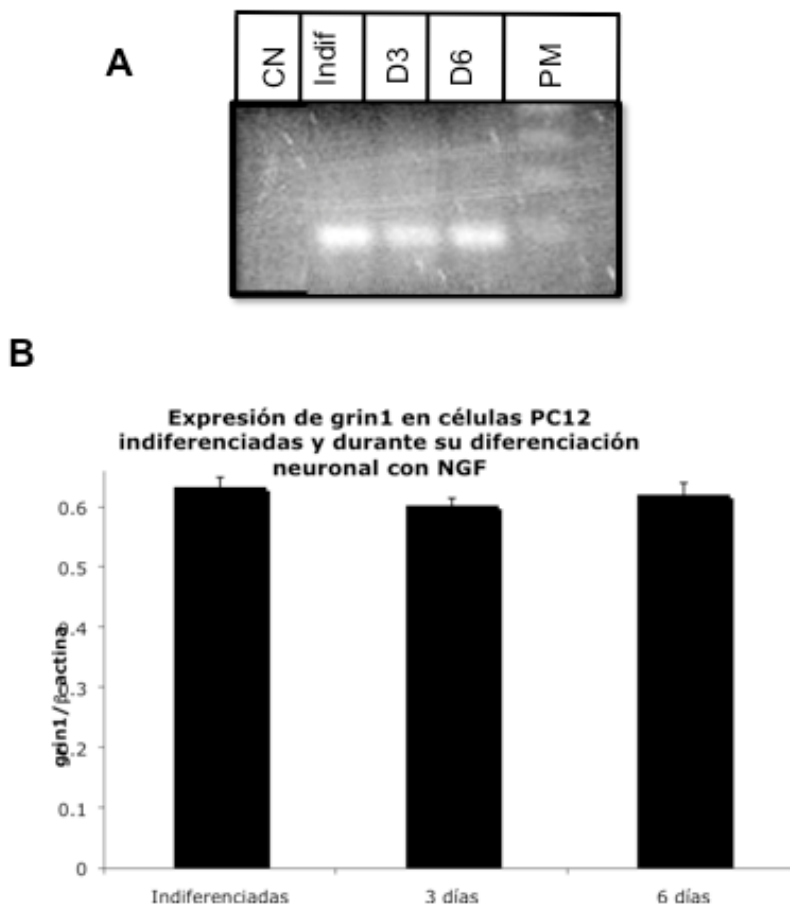


Figura 12. Expresión del gen *Grin1* en células PC12 durante la diferenciación neuronal inducida con NGF. Se extrajo el ARN mensajero de las células PC12 indiferenciadas y durante los días de diferenciación 3 y 6 inducida con NGF. Posteriormente se realizó PCR semicuantitativa y las muestras se corrieron en gel de agarosa al 2% (Panel A). Los pixeles de las bandas teñidas en el gel se cuantificaron por densitometría usando el programa Image J (NIH) y se graficaron normalizando con la expresión de β -actina (Panel B). CN, control negativo; Indif, células PC12 indiferenciadas; D3 y 6, 3 y 6 días de diferenciación con NGF; PM, marcador de peso molecular.

iii. Expresión de factores de transcripción NRSF y SP durante la diferenciación neuronal de células P19 y PC12

Para conocer el patrón de expresión de SP1 se diseñaron iniciadores específicos para una amplificar el ARN mensajero en células P19 y PC12 indiferenciadas y durante la diferenciación neuronal inducida con ácido retinoico y NGF, respectivamente. Además, para evaluar la expresión del factor de transcripción NRSF, se diseñaron dos pares de iniciadores, el primero que amplifica una región común para todas la isoformas y un par específico para la isoforma REST4, que carece de un dominio de unión al ADN funcional, contiene la región represora amino terminal y carece de la región represora carboxilo terminal y funciona como una dominante negativa endógena compitiendo con el NRSF (Shimojo et al., 1999), también en células P19 y PC12 indiferenciadas y durante la diferenciación neuronal. Como se observa en la Figura 14, la expresión de SP1 en células P19 y PC12 indiferenciadas no cambia con respecto a los 8 días y 6 días de diferenciación neuronal, inducida con ácido retinoico y NGF, respectivamente. Por otro lado, al amplificar la región común para las variantes de empalme alternativo de NRSF/REST no se observan cambios significativos en su expresión durante la diferenciación neuronal de ambas células (ver Figura 13). Sin embargo, como se muestra en la Figura 13, la isoforma REST4 está presente en muy bajas concentraciones en células P19 indiferenciadas, pero incrementa su expresión 2 veces a partir del día 4 de diferenciación neuronal inducida con ácido retinoico llegando al máximo al día 8 de diferenciación neuronal.

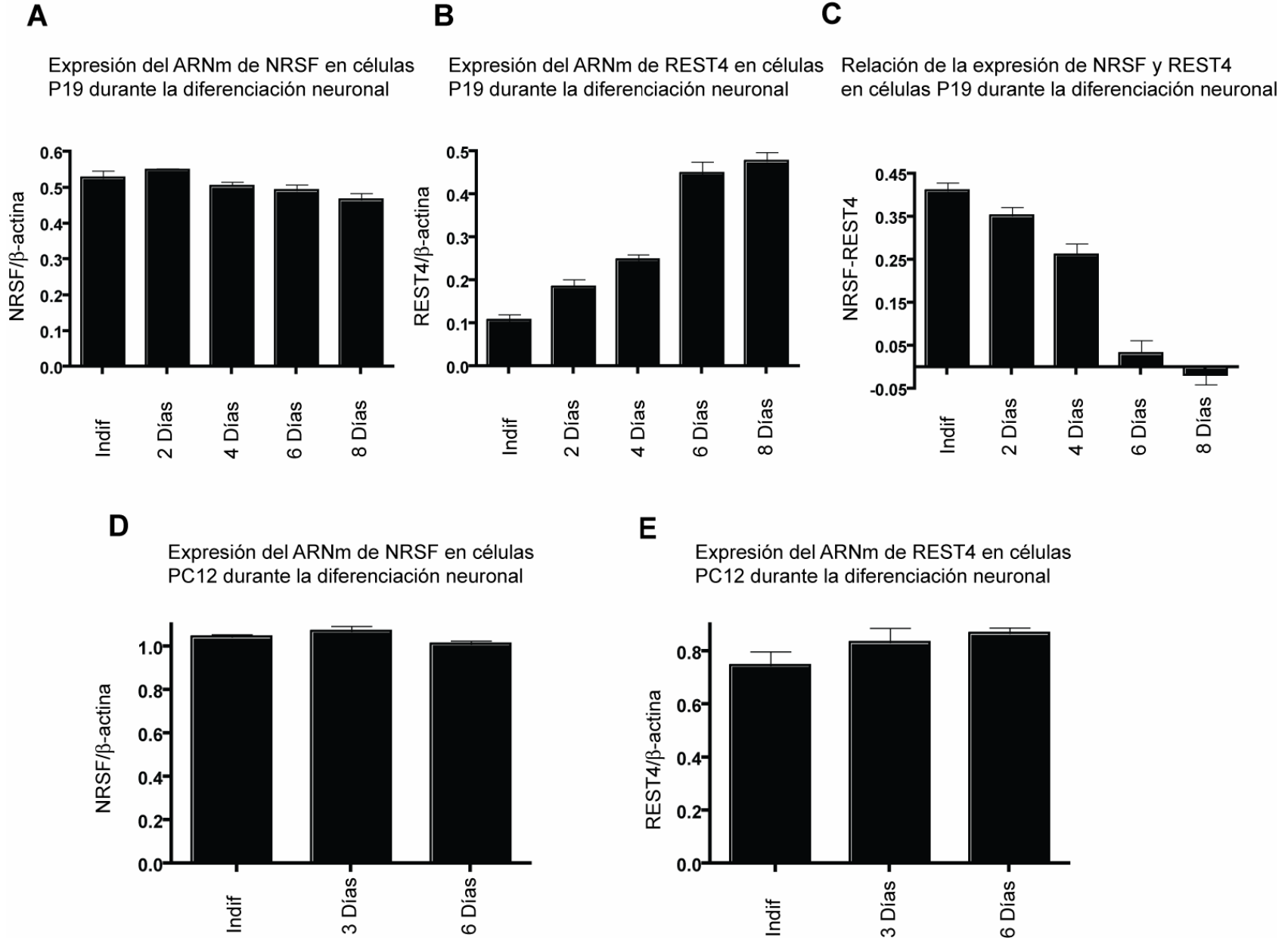


Figura 13. Expresión de los factores de transcripción NRSF y su variante de empalme REST4 durante la diferenciación neuronal de células P19 y PC12. Expresión del ARNm cuantificada por medio de la reacción en cadena de la polimerasa para NRSF (A) y de REST4 (B) en células P19 indiferenciadas y durante los días de diferenciación 2, 4, 6 y 8. C. Diferencia de expresión de NRSF y REST4 en células P19 indiferenciadas y durante los días de diferenciación 2, 4, 6 y 8. Expresión del ARNm de NRSF (D) y REST4 (E) en células PC12 indiferenciadas y durante los días 3 y 6 de diferenciación neuronal inducida con NGF.

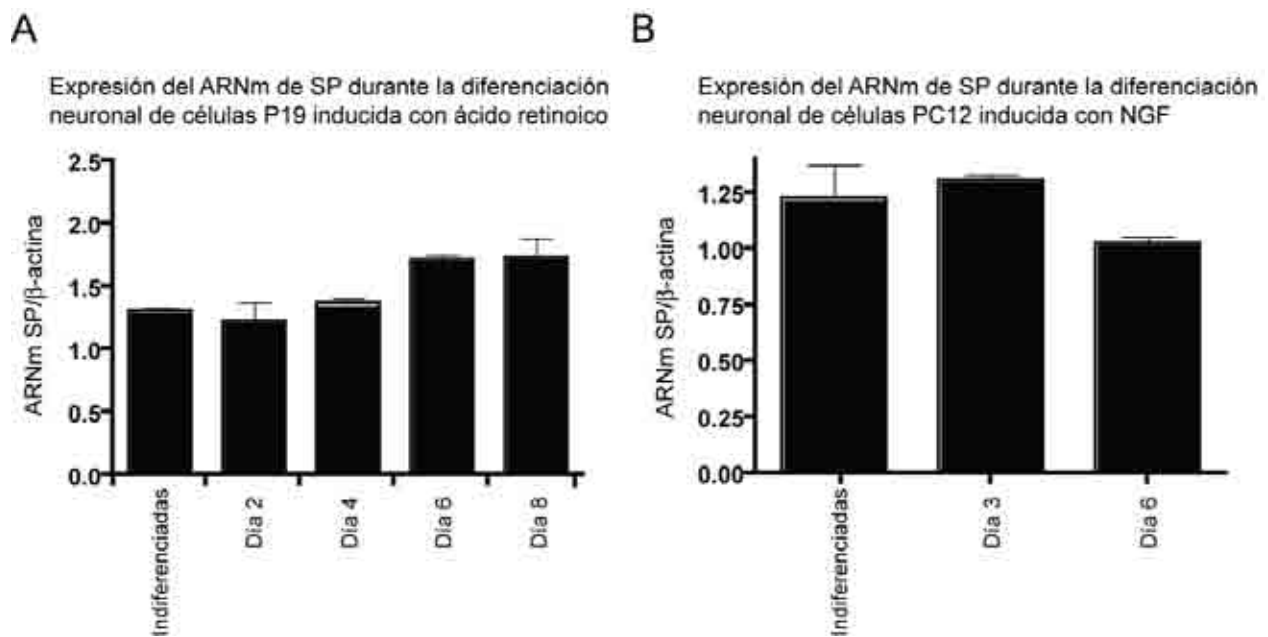


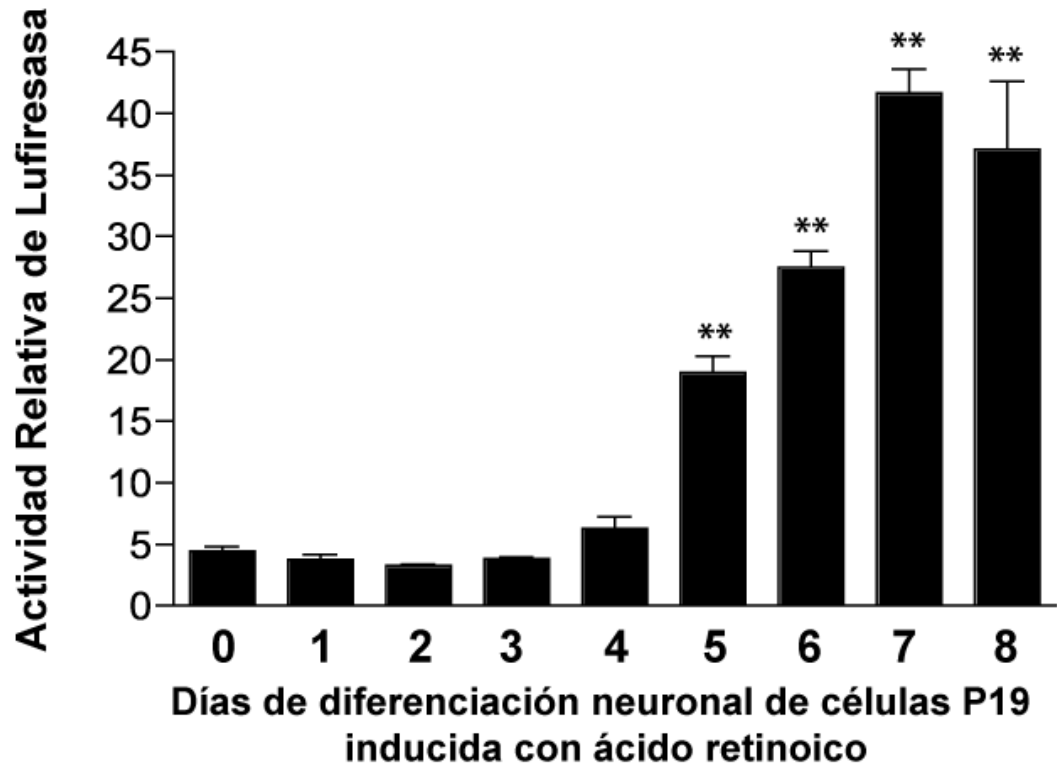
Figura 14. Expresión del factor de transcripción SP durante la diferenciación neuronal de células P19 y PC12 inducidas a diferenciar en neuronas con ácido retinoico y NGF, respectivamente. Expresión del ARNm por medio de la reacción en cadena de la polimerasa para SP1 en células P19 (Panel A) y células PC12 (Panel B) durante la diferenciación neuronal inducida con ácido retinoico y NGF, respectivamente.

iv. Activación transcripcional del promotor *Grin1* de pollo durante la diferenciación neuronal de células P19 y PC12.

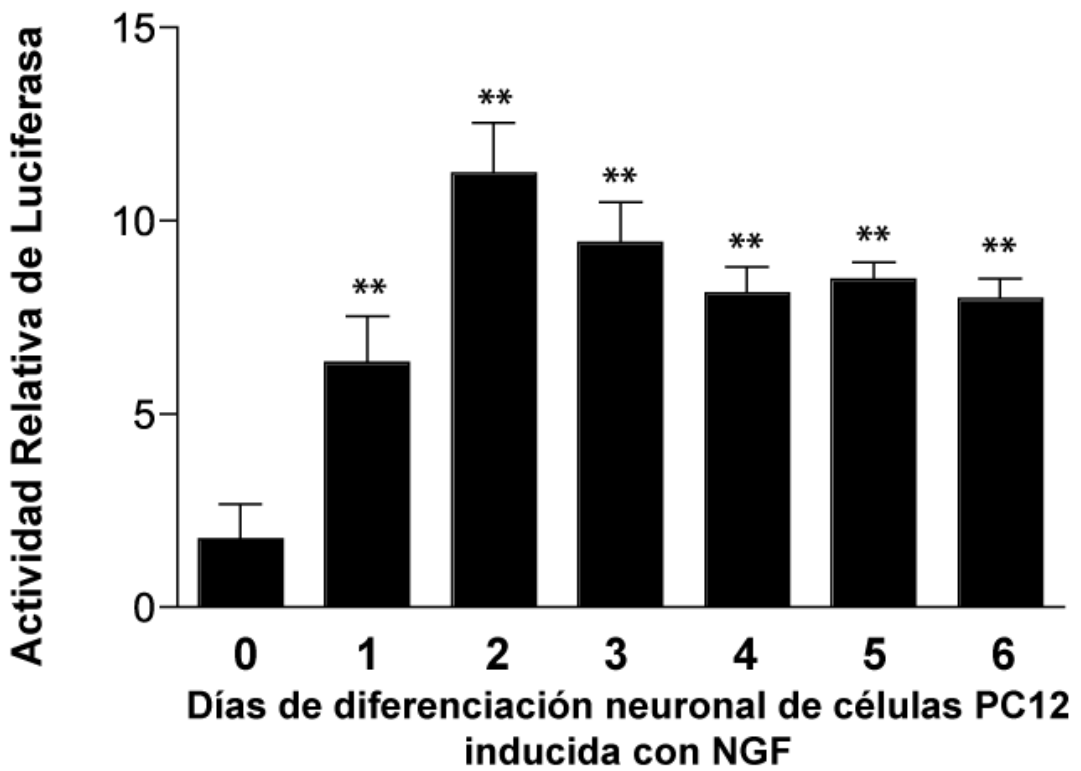
Para conocer si la actividad transcripcional del promotor del gen *Grin1* de pollo está regulada de manera positiva durante la diferenciación neuronal, generamos transfectantes estables de células P19 y células PC12 con el plásmido quimérico que contiene 1.8 kb de región reguladora dirigiendo la expresión del gen de luciferasa como reportero. En células P19 indiferenciadas, la actividad transcripcional de la región reguladora de gen *Grin1* de pollo mostró una actividad transcripcional basal disminuida, que incrementó a partir del quinto día de diferenciación neuronal inducida con ácido retinoico, llegando a su máximo valor al día 7 de diferenciación y manteniéndose hasta el día ocho de diferenciación alcanzando un incremento de 8 veces su valor inicial (ver Figura 15A). Las células PC12 indiferenciadas mostraron una actividad transcripcional basal que incrementó con la presencia de NGF llegando a su máximo nivel al segundo día de diferenciación y después llegando a un nivel estable del día 4 al día 6 de diferenciación neuronal (ver Figura 15B).

Para corroborar que el incremento de la actividad transcripcional es debida a la diferenciación hacia fenotipo neuronal, utilizamos las mismas transfectantes estables de células P19 e indujimos la diferenciación hacia fenotipo muscular con DMSO. Se observó un incremento máximo de sólo 2 veces después de 6 días de diferenciación muscular (Figura 15C).

A



B



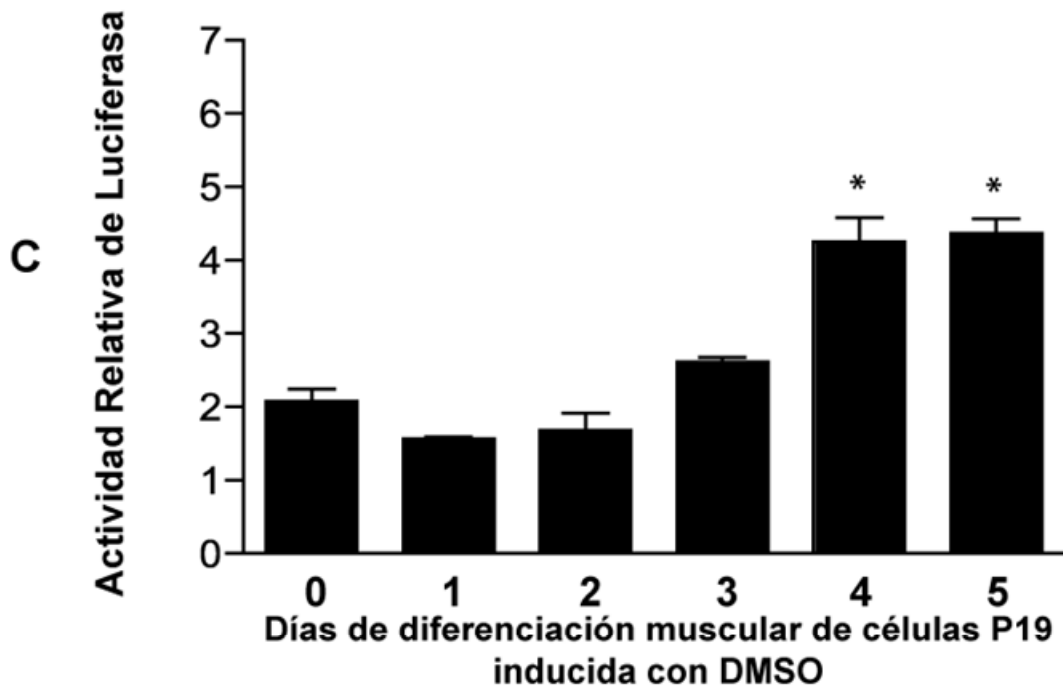


Figura 15. Actividad transcripcional del gen *Grin1* de pollo durante la diferenciación neuronal.

Transfectantes estables de células P19 (Panel A) y de células PC12 (Panel B) expresando el gen de luciferasa dirigido por 1.9 kb de región reguladora del gen *Grin1* de pollo. Se midió la actividad transcripcional en células indiferenciadas y durante 8 y 6 días de diferenciación neuronal inducida con ácido retinoico y con NGF, para las células P19 y PC12, respectivamente. Panel C. Las transfectantes estables de las células P19 se diferenciaron a células musculares estriadas con DMSO. Se midió la actividad transcripcional en células indiferenciadas y a lo largo de 5 días de diferenciación neuronal.

v. Análisis funcional de la región reguladora del gen *Grin1* de pollo

El análisis funcional de la región reguladora 5' del gen *Grin1* de pollo se realizó por medio de transfecciones transitorias de construcciones quiméricas pGL3-*Grin1* generadas con diferentes fragmentos del promotor *Grin1*. Las construcciones tienen 51 pb, 210 pb, 334 pb, 549 pb, 1237 pb y 1817 pb de región reguladora del gen *Grin1* de pollo, más 86 pb de región 5'-no-traducida fusionada con el gen de luciferasa como

reportero. Para definir el promotor basal y para corroborar los resultados obtenidos después de la diferenciación neuronal de células P19 y PC12, nosotros medimos la actividad transcripcional de las construcciones quiméricas transfectándolas transitoriamente en cultivo primario de neuronas corticales de embriones de pollo de 7 días. La Figura 16 muestra que la construcción que contiene 51 pb no presenta actividad transcripcional en neuronas corticales de pollo, mientras que la construcción de 210 pb muestra actividad transcripcional significativa en neuronas en cultivo. Se observó, además, que las construcciones con 334 y 549 pb de región reguladora tienen 2.5 y 2 veces de mayor actividad transcripcional, respectivamente, comparada con la construcción que contiene únicamente 210 pb. Por otro lado, la construcción de 1237 pb presenta una actividad transcripcional disminuida en comparación con la construcción de 549 pb, mientras que la construcción que contiene 1815 pb tiene una actividad transcripcional similar a la construcción de 549 pb.

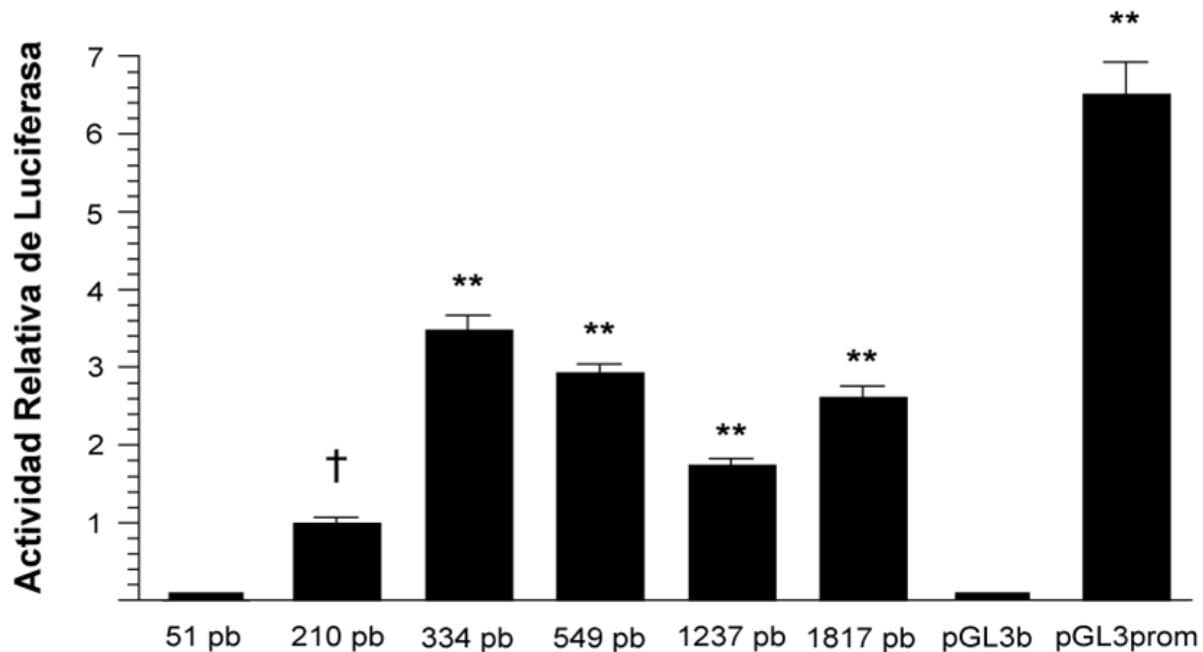
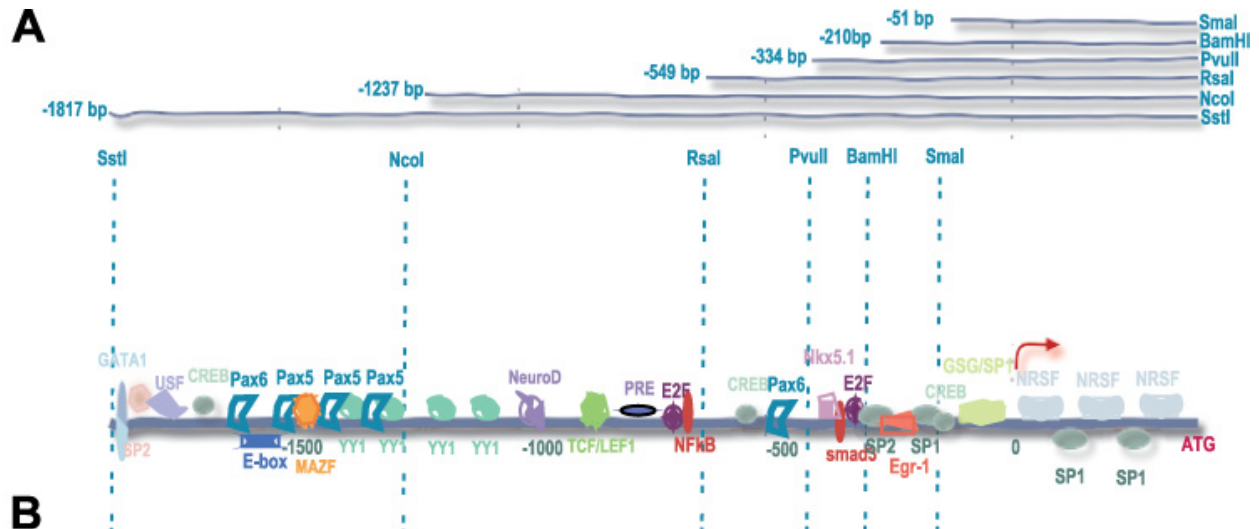


Figura 16. Actividad transcripcional de construcciones quiméricas del promotor del gen *Grin1* de pollo en neuronas corticales de embriones de pollo. Las construcciones del promotor que contienen 51 pb, 210 pb, 334 pb, 549 pb, 1237pb y 1817 pb de región reguladora-5' se transfectaron de manera transitoria en neuronas corticales de embriones de pollo. Después de 24 h se midió la actividad transcripcional. Los resultados se compararon con la actividad transcripcional del plásmido pGL3-básico y del pGL3-promotor. † Control. ** Significancia estadística con respecto al control.

vi. Análisis *in silico* y comparativo de la región reguladora del gen *Grin1* de pollo

Para conocer cual es el papel que juegan los factores de transcripción en la regulación de la actividad transcripcional del promotor *Grin1* de pollo, realizamos análisis *in silico* para comparar las secuencias de las regiones reguladoras 5' proximales de los genes *Grin1* de humano, ratón, rata y pollo. La Figura 17A muestra una esquema de 1.9 kb de región reguladora del gen *Grin1* de pollo con los sitios de corte de las enzimas de restricción utilizadas para generar las construcciones de delección de longitudes variables. En el panel B de la Figura 17 se observa el análisis

comparativo de secuencias del gen *Grin1* de humano, rata, ratón y pollo en donde se observa una baja homología en secuencia de 31% entre especies. El análisis de secuencia muestra que la región proximal es una región rica en G+C (90%) y contiene una isla de dinucleótidos CpG que abarca 397 pb de región reguladora-5' proximal incluyendo la región 5'-no traducida (ver panel C). Aunque el análisis de secuencia muestra una homología de secuencia baja, se conserva el patrón de localización similar para sitios de unión a factores de transcripción entre mamíferos y aves. Al igual que en los genes *Grin1* de mamíferos, el promotor *Grin1* de pollo carece de caja TATA; en su lugar tiene una caja GSG y un sitio de unión a factores SP en posición -30 pb y -14 pb del sitio de inicio de la transcripción principal, respectivamente (ver Figura 17C). El análisis de la región 5'-no traducida de los genes *Grin1* muestra la presencia de elementos de unión putativos para los factores de transcripción NRSF y SP. En el caso de las construcciones quiméricas del promotor de pollo contiene 2 sitios putativos de unión a SP (denominados S1 y S2) y tres elementos putativos de unión para NRSF (denominados N1, N2 y N3).



B

| | | | |
|---------|------|--|------|
| Chicken | -397 | TCCGGGAGGCGGGCATGGGAGGAGAGCACTCCGGGGGTCCTATTGACCCCATACGG | -337 |
| Mouse | -361 | GCATTTACGCCAACGCAGGCGCGCT-----CAGGAGGCGCGCT-CGACTCCGCGT | -309 |
| Rat | -363 | GCATTCACGCCAACGCAGGCGCGCT-----CAGGAGGCGCGCACT-CGACTCAGCGT | -311 |
| Human | -463 | ACGCTCACGCGAACGCAGGCGCAGCTCTGGCGCGGGAGGCGCCCCCTTCGCCTCCGTGT | -403 |
| | | * * * * * | |
| Chicken | -336 | AGGGAGCATGAGTCGAGGTGGGTGAGAGCAGCAGCCGGGGTCTCGCAC-CGACCCTA | -277 |
| Mouse | -308 | CAGGA-----AGCGGGGGCGGTGGGAGGGGTAGAACCCGTAGGTCCCGCTCAGACTCCG | -253 |
| Rat | -310 | CAGGA-----AGCGGGGGCGGTGGGAGGGGTAGAACCCGTAGGTCCCGCTCATGACTCCG | -255 |
| Human | -402 | TGGGA-----AGCGGGGGCGGTGGGAGGGGCAGGAGACGTTGGCCCGCTCGCGTTTCTG | -347 |
| | | *** ** * * * * * | |
| Chicken | -276 | CCCGAACAGAGCTGCCGCAGCGCCCGTGGACGACCCGGGGTCCCTCCCGTGCdGGGGG | -216 |
| Mouse | -252 | CAGCTGCTGCAGTCGCGCAGCATCGGGACCAG---TCGCACAGTCCAGGCAGCTGTCTT | -195 |
| Rat | -254 | CAGCTGCTGCAGTCGCGCAGCATCGGGACCAG---TCGCAGTCCGCGCTGTCTTCT | -197 |
| Human | -346 | CAGCTGCTGCAGTCGCCGCAGCTCCGACCCGGAACAGCGCCGTCGCGGAGCCCGCGC | -286 |
| | | * ** * * * * * * | |
| Chicken | -215 | GGCCGGGGGGGCGGGGGTGGGdGTTGdGBCAGCGCGGGGCGCGGGAGCGGGAGGAC | -155 |
| Mouse | -194 | TTCGCC-----TTTTCCGCGC-GGGTGTTCG-AGCAGCGCCAATAC-GCTT | -149 |
| Rat | -196 | TTCGCC-----TTTTCCGCGC-GGGTGTTCG-AGCAGCGCCAACAC-GCTT | -151 |
| Human | -285 | CGCCGCCCGGGCC---CTTTCCAAGCCGGGCGCTCGGAGCTGTGCCGGCCCCGCTT | -229 |
| | | ** * * * * * * * | |
| Chicken | -154 | CGCGGGGGGGCGGCGGCGCGGAGCGGAGGTCAGCACCAAGGAGAGCTCCC | -095 |
| Mouse | -148 | CAGCACCTCGGACAGCACC CGCCGCGCTCG-----CCCTGGGCTCCTGAAGAATCCGCG | -094 |
| Rat | -150 | CAGCACCTCGGACAGCATCCGCCGCGCTCG-----CCCGGGGCTCCTAGAGAACC CGG | -096 |
| Human | -228 | CAGCACCGGGACAGCGCCGGCCGCTGGGGCTGAGCCCGAGCCCCCGCGCAGCTTCA | -168 |
| | | * * * * * * * * | |
| Chicken | -094 | CGCGCCGCGCCGCGCGGGGCGG--CATGGGGCCGAGCTGAGCGGG-AGGGCGGCGGGCA- | -038 |
| Mouse | -093 | GGTGTGACCGCGCGGGGGC--CCGGGGTCCGTACATCGCGAG-GTGGTCGCGCTCGC | -036 |
| Rat | -095 | GGCGCTTGACCGCGCGdGGGCGGCGCGGGTCTGACATCGCGAG-GTCGTGCGACTCGC | -036 |
| Human | -167 | GCGCCCTTCCCTCGGCCGAGTCCCGGACC CGCCGCTCCGGGGGAGACGTTGGCTCCGC | -107 |
| | | * ** * * * * * * | |
| Chicken | -037 | AGGGGGGGGGCCCGGGGCTCCGGGCCGGCCGTGG | +1 |
| Mouse | -035 | GCAACCCAGAACCAGGCCCGCTGTGCCGAGGCTC | +1 |
| Rat | -035 | GCAACCCAGAGCCAGGCCCGCTGTGCCGAGGCTC | +1 |
| Human | -106 | AGCCCGGGGGCGGGGAGCGCAGGACGGCCCGGAAGCCCCGCGGGGATGCGCCGAGG | -046 |
| | | * * * * * * * | |
| Chicken | | | |
| Mouse | | | |
| Rat | | | |
| Human | -045 | GCCCCGCTTCGCGCCGCGCAGAGCCAGGCCCGCCCGGGCCGAGCCC | +1 |

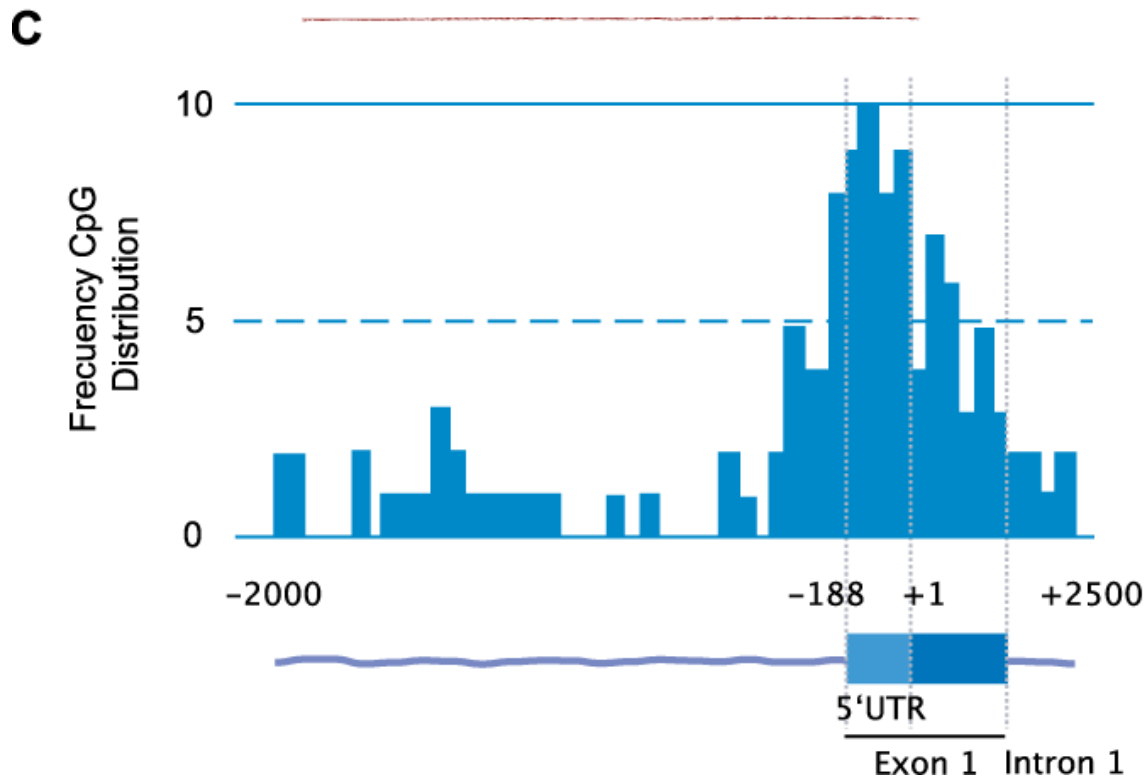


Figura 17. Análisis *in silico* de la región reguladora del gen *Grin1* de pollo.

Panel A. Esquema que representa 1.9 kb de región reguladora del gen *Grin1* de pollo con los elementos putativos de unión al ADN. Además se muestran los sitios de restricción enzimática con lo que se generaron las construcciones quiméricas del promotor.

Panel B. Análisis comparativo de las secuencias de las regiones reguladoras de los genes de humano, rata, ratón y pollo. Se muestran los elementos de unión a los factores de transcripción NRSF con sombreado en azul, SP y las cajas GSG en rectángulos verdes. En círculos negros se señalan los sitios de inicio de la transcripción.

Panel C. Esquema que representa la región del promotor *Grin1* de pollo que contiene una isla de dinucleótidos CpG que abarca desde -188 pb hasta los +2500 pb.

vii. Análisis de los ensayos de interacción ADN-proteína de los elementos NRSE y SP presentes en la región 5'-no traducida y de la región reguladora del gen *Grin1* de pollo

Para determinar si los elementos NRSE y SP tienen la capacidad de unir a factores de transcripción realizamos ensayos de retardo de movilidad por electroforesis de complejos ADN-proteína en el gel nativo (EMSA) utilizando los oligonucleótidos con secuencias consenso (control) y con mutaciones en las bases esenciales (core) del elemento de unión de ADN diseñados para estos sitios (ver Tabla II). Los ensayos de unión ADN- proteína muestran la presencia de dos complejos de alto peso molecular con extractos nucleares de células P19 indiferenciadas incubados con oligonucleótidos con la secuencia consenso NRSE. Estos complejos se compitieron tras la adición en exceso molar de los oligonucleótidos sin marcaje radioactivo, no se compitieron con los oligonucleótidos mutados y se compitieron cuando se incubaron con anticuerpos para NRSF. Además, se observó lo mismo cuando se incubaron los extractos nucleares de células P19 indiferenciadas con los oligonucleótidos que contienen la región de la secuencia del promotor de pollo denominada N1. Estos complejos no se observaron cuando se utilizaron los extractos nucleares de células P19 diferenciadas con ácido retinoico, con células PC12 no diferenciadas, ni con extractos nucleares de neuronas corticales de embriones de pollo (ver Figura 18).

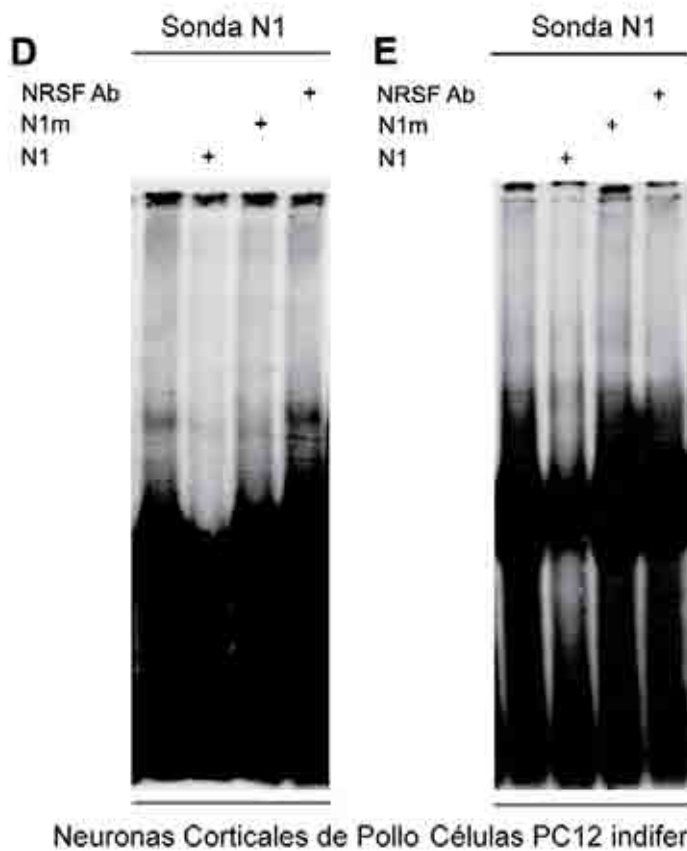
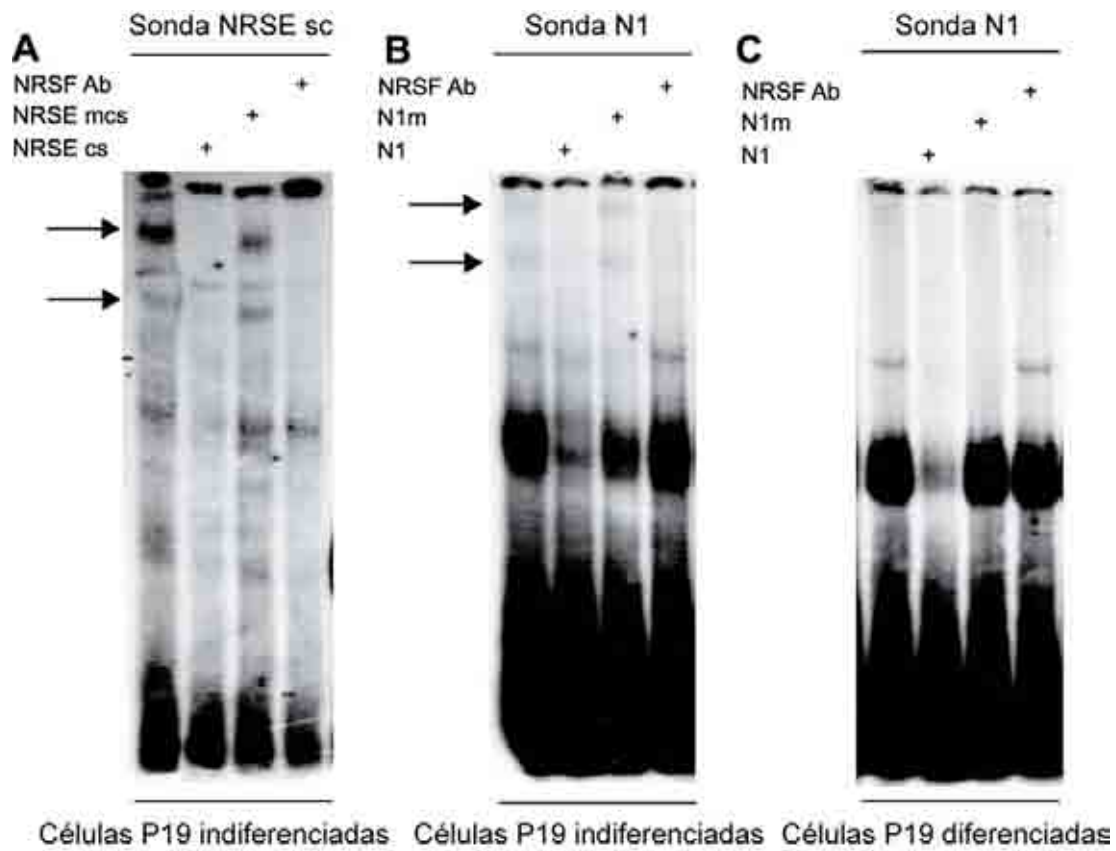


Figura 18. Geles de retardo de movilidad por electroforesis para el sitio de unión a NRSF (N1), presente en la región 5' no traducida del promotor del gen *Grin1* de pollo. Se incubaron los extractos nucleares de células P19 indiferenciadas con la sonda consenso para el factor NRSF (Panel A). Se observa la formación de dos complejos de alto peso molecular, los cuáles se compiten después de la adición de un exceso molar de la sonda sin marcaje radioactivo (NRSE cs), no se compiten con un exceso molar de sonda sin marcar con mutación en el elemento consenso (NRSE mcs). Estos complejos se compiten tras la adición del anticuerpo contra NRSF (NRSF Ab). Se evaluó la unión de NRSF en el elemento N1 presente en la región 5'-no traducida del promotor del gen *Grin1* de pollo. Se incubaron los extractos nucleares de células P19 indiferenciadas (panel B), células PC12 indiferenciadas (Panel C) y neuronas corticales de embriones de pollo (Panel D) con la sonda N1. Se observa la presencia de los dos complejos igual que con la sonda consenso en las células P19 indiferenciadas, pero no en las células PC12 ni en neuronas corticales de pollo. En las células P19 estos complejos se compitieron con el exceso molar de la sonda sin marcaje radioactivo y compitieron con la adición del anticuerpo contra NRSF.

Se evaluaron los elementos de unión a los factores de transcripción de la familia SP presentes en la región 5'-no traducida de la región reguladora del gen *Grin1* de pollo. Como se observa en la Figura 19, los oligonucleótidos consenso para SP y los oligonucleótidos que contienen la secuencia denominada S2 del promotor de pollo, forman tres complejos principales que desaparecieron tras la competencia molar con oligonucleótidos sin marcaje radiactivo, no se compitieron tras la incubación con un exceso molar con los oligonucleótidos con mutación en el core del elemento SP, los dos complejos inferiores se retardaron con la incubación con el anticuerpo para el factor de transcripción SP3. Estos complejos se formaron de la misma forma cuando se utilizaron los extractos nucleares de las células PC12 y neuronas corticales de embriones de pollo.

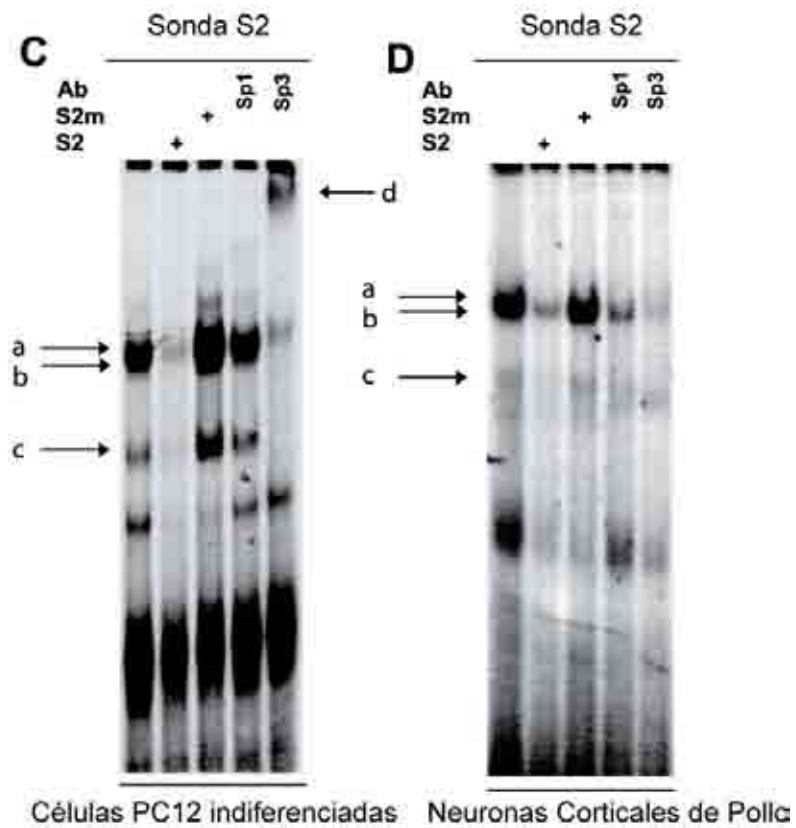
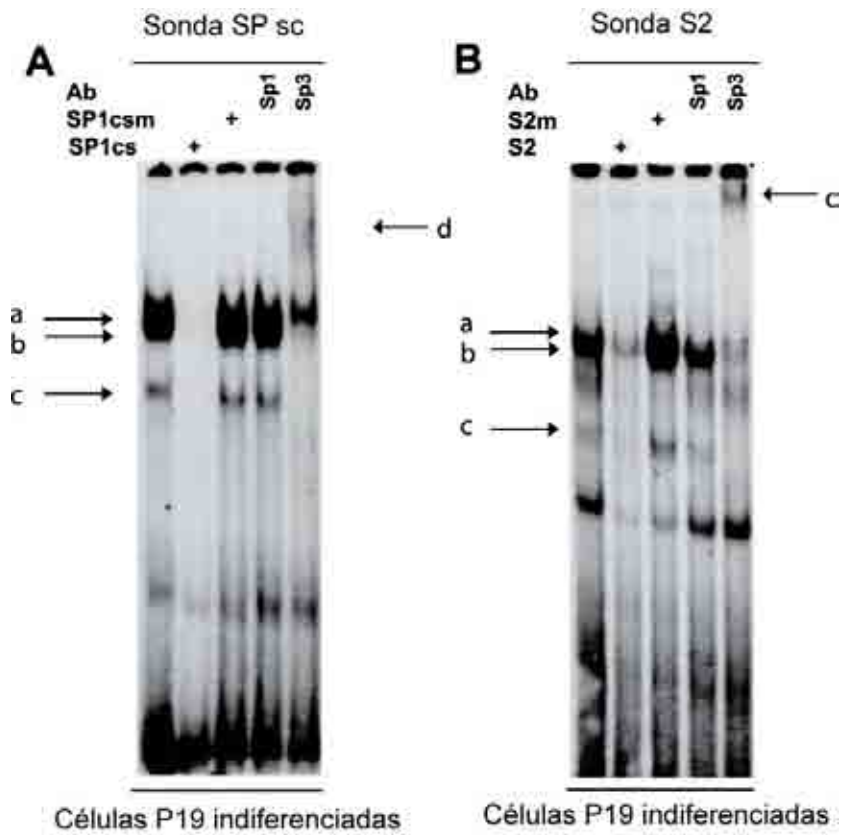


Figura 19. Geles de retardo de movilidad por electroforesis para el sitio de unión a factores SP (S2) presente en la región 5'-no traducida del promotor del gen *Grin1* de pollo. Panel A.

Se incubaron los extractos nucleares de células P19 indiferenciadas con la sonda consenso para el factor SP. Se observa la formación de tres complejos denominados a, b y c, los cuáles se compiten tras la adición de la sonda consenso sin marcar (SP1cs), no se compiten con la adición de la sonda con mutación del elemento consenso sin marcaje radioactivo (SP1 csm). Estos complejos se retardan tras la incubación con el anticuerpo contra SP3. Se evaluó la unión de SP3 en el elemento S2 presente en la región 5'-no traducida del promotor *Grin1* de pollo.

Panel B. Se incubaron con extractos nucleares de células P19 indiferenciadas con la sonda S2.

Panel C. Se incubaron con extractos nucleares de células PC12 indiferenciadas con la sonda S2.

Panel D. Se incubaron los extractos nucleares de neuronas de pollo con la sonda S2.

En todos los casos se observa la presencia de los tres complejos a, b y c al igual que con la sonda consenso. Este complejo se compitió con el exceso molar de la sonda sin marcaje radioactivo (S2), no se compitió con la misma sonda con mutación en el core (S2 csm) y se retardo (Panel B y C) o se compitió (Panel D) con la adición del anticuerpo contra SP3 (Ab).

viii. La represión transcripcional del gen *Grin1* de pollo está mediada por los factores de transcripción SP3 y NRSF

Los experimentos usando ensayos de retardamiento de movilidad por electroforesis, demuestran que los factores de transcripción NRSF y SP3 tienen la capacidad de unirse a los elementos N1 y S2 presentes en la región 5'-no traducida de la región reguladora del gen *Grin1* de pollo. Por lo tanto, para conocer el papel de estos factores en la regulación transcripcional del promotor del gen *Grin1* de pollo, generamos construcciones con mutaciones en los sitios N1 y S2, usando la construcción que contiene 210 pb de región reguladora con 86 pb de región 5'-no traducida por medio de mutagénesis dirigida. Se evaluó su funcionalidad por medio de

transfecciones transitorias en células P19, PC12 y neuronas corticales de pollo. En la Figura 20 se muestra que la actividad transcripcional de la construcción con mutación en el sitio N1 presenta 4 veces más actividad transcripcional comparado con el control en células P19. En las células PC12 y neuronas corticales de embriones de pollo el incremento fue de un 30% y de dos veces mayor comparado con el control, respectivamente.

Para examinar con mayor detalle el papel del NRSF en la transcripción del gen *Grin1* de pollo, realizamos co-transfecciones de la construcción control que contiene 210 pb junto con un plásmido que expresa REST-VP16. La proteína de fusión REST-VP16 es una proteína de fusión que contiene la región de unión al ADN del NRSF/REST, pero no contiene los elementos represores amino ni carboxilo terminales y está asociado al factor VP16 del virus de Herpes simplex que es un trans-activador transcripcional fuerte (Watanabe et al., 2004). Como se observa en la Figura 20, REST-VP16 incrementa alrededor de nueve veces la transcripción del promotor *Grin1* de pollo en células P19 indiferenciadas, mientras que en células PC12 y en neuronas de pollo muestra un incremento en la transcripción de veinte veces.

Por otro lado, las mutaciones del sitio S2 presente en la región 5' no traducida del promotor *Grin1* de pollo, presentó un incremento en la transcripción de seis veces con respecto al control (ver Figura 20). Los ensayos funcionales en células PC12 y neuronas de pollo demostraron que la mutación en el sitio S2 incrementó dos y tres veces la actividad transcripcional (Ver Figura 20). Finalmente, utilizamos la mitramicina A, un agente que se une a los sitios ricos en GC bloqueando la unión de factores de transcripción como los de la familia SP. Como se observa en la Figura 20 Panel D, la mitramicina A incrementa la actividad transcripcional en células P19 indiferenciadas,

sugiriendo que los elementos ricos en G+C presentes en el promotor *Grin1* de pollo reprimen la transcripción en estas células.

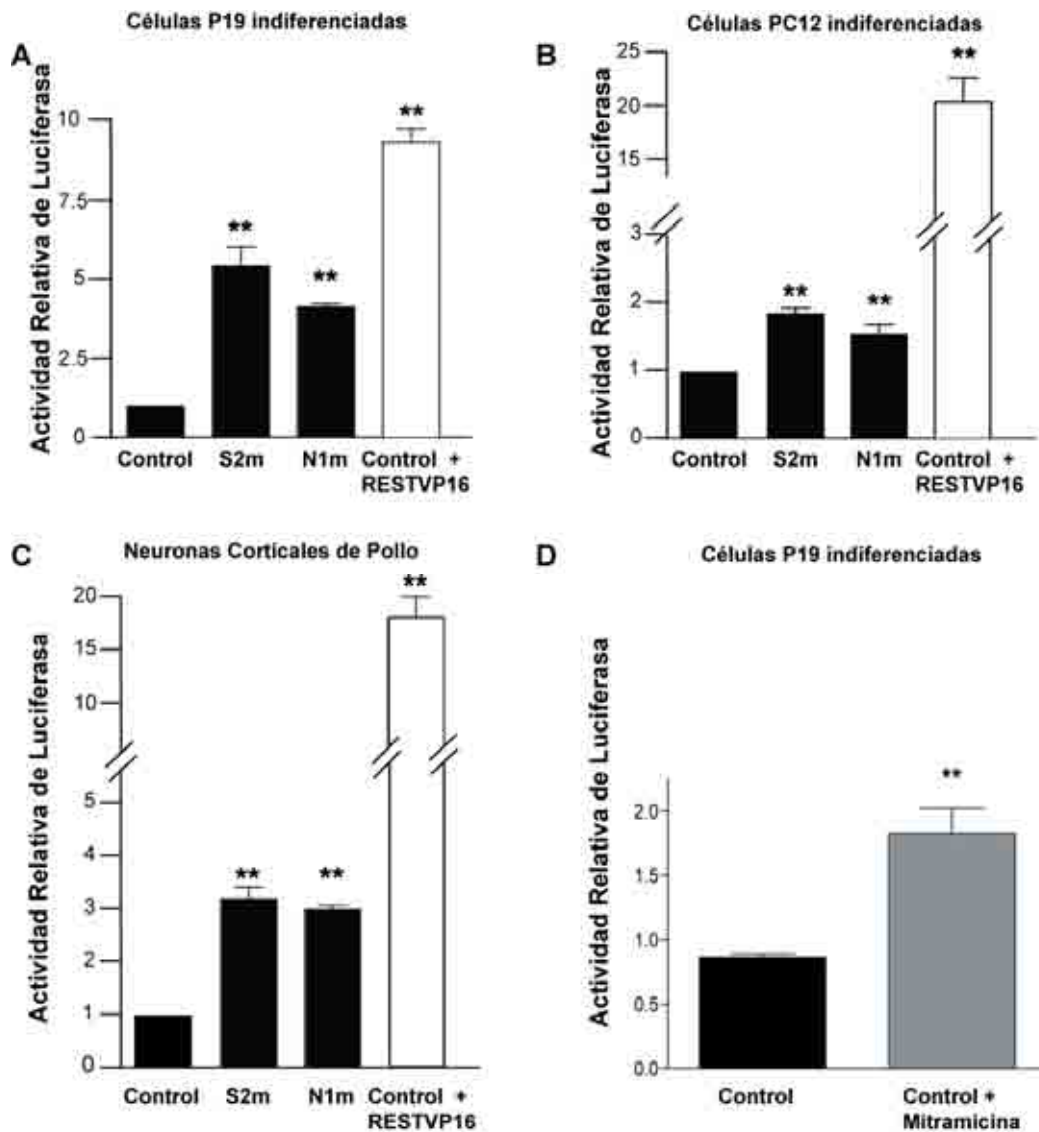


Figura 20. Papel de los elementos N1 y S2 en la actividad transcripcional de la región reguladora 5' del gen *Grin1* de pollo. Transfección transitoria de la construcción que contiene -210 pb (control) y de las construcciones de -210 pb que tienen la mutación en el elemento S2 (S2m) y N1 (N1m), así como la construcción de -210 pb co-transfectada con el plásmido REST-VP16 (Ver Estrategias Metodológicas) en células P19 (Panel A), células PC12 (Panel B) y en neuronas corticales de embriones de pollo (Panel C). Panel D. Transfecciones transitorias de la construcción que contiene -210 bp (control) y con tratamiento con Mitramicina A 100nM por 16 h.

ix. El elemento SP del promotor proximal activa la transcripción del gen *Grin1* de pollo

La región proximal de la región reguladora del gen *Grin1* de pollo carece de caja TATA, pero contiene una caja GSG y un elemento SP en posición -14 a -30 pb del sitio de inicio de la transcripción (Ver Figura 17 y Tabla II). Para evaluar la funcionalidad de estos elementos primero realizamos estudios de interacción ADN proteína. La Figura 21, muestra la presencia de dos complejos cuando se incubaron los extractos nucleares de neuronas corticales de embriones de pollo con los oligonucleótidos con la secuencia GSG/SP (ver Tabla II). Estos complejos se compitieron tras la adición de un exceso molar de los oligonucleótidos sin marcaje radiactivo, no se compitieron con la adición de los oligonucleótidos con mutación en el sitio SP y se súper retardó su movilidad por la incubación con el anticuerpo que reconoce específicamente a SP3. Estos complejos no se observaron con los extractos nucleares de células P19 ni de células PC12. Por lo anterior se concluye que el factor SP3 se une al elemento SP cercano al sitio GSG en neuronas de pollo, pero no en células P19 y PC12 indiferenciadas.

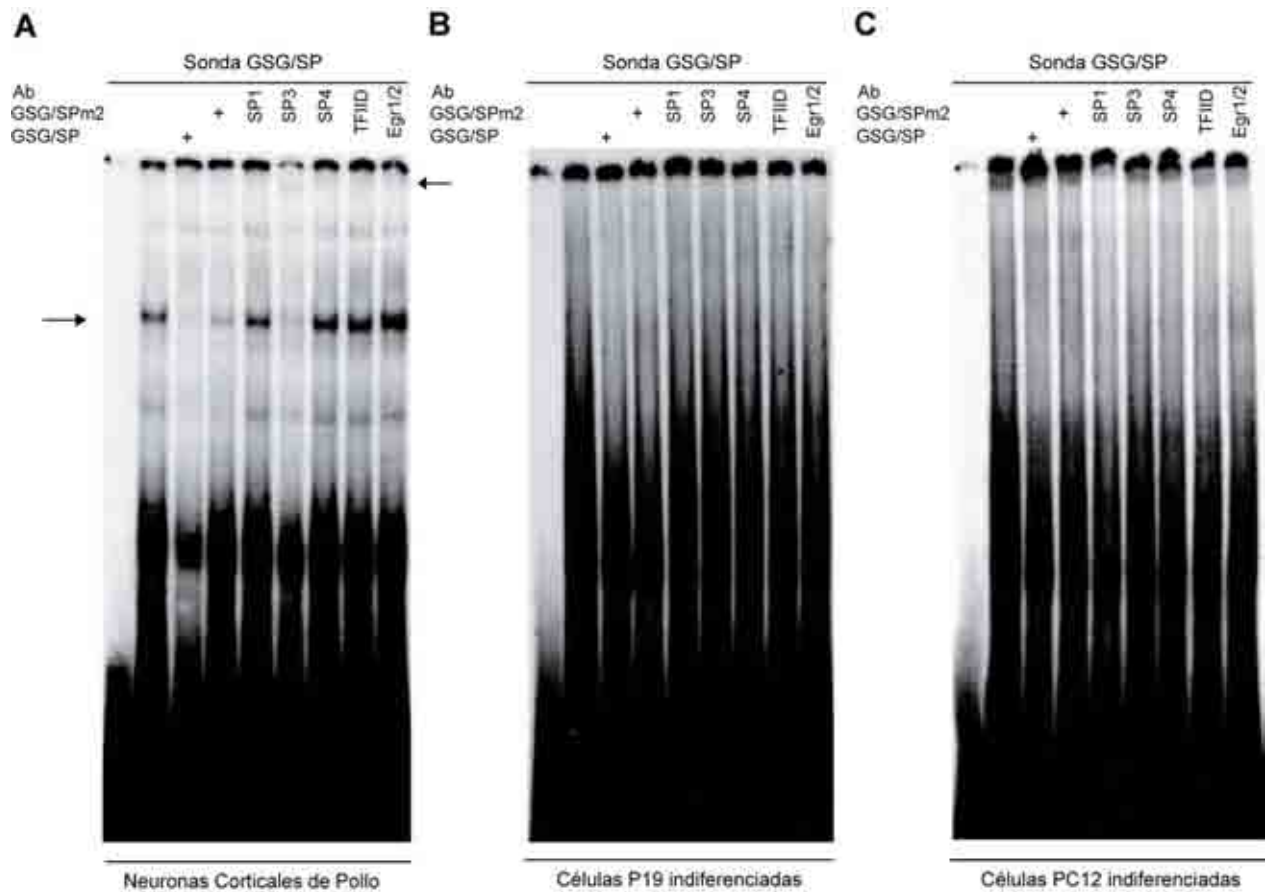


Figura 21. Geles de retardo de movilidad por electroforesis del sitio GSG/SP presente en la región reguladora proximal del promotor del gen *Grin1* de pollo. Los extractos nucleares de neuronas corticales de embriones de pollo (panel A), de células P19 indiferenciadas (panel B) y de células PC12 indiferenciadas (panel C), se incubaron con la sonda GSG/SP. Se observa la presencia de un complejo en neuronas de pollo que se compete con el exceso molar de la sonda sin marcaje radiactivo y que se retarda tras la adición del anticuerpo contra SP3, no así con la adición de anticuerpos contra SP1, SP4, TFIIID y Egr-1/2.

Finalmente, para demostrar la funcionalidad de estos sitios en la actividad transcripcional, generamos por medio de mutagénesis dirigida una construcción con mutación en el consenso de la caja GSG (GSG/SPm1) y otra construcción con

mutación en el sitio SP (GSG/SPm2). Como se observa en la Figura 21, la transfección transitoria de estas construcciones no mostraron diferencia significativa con respecto al control en células P19 ni en células PC12 indiferenciadas. Sin embargo, en las neuronas corticales de embriones de pollo se observa que la actividad transcripcional disminuye mas de la mitad cuando se muta el elemento SP en comparación con la construcción sin mutación (ver Figura 21).

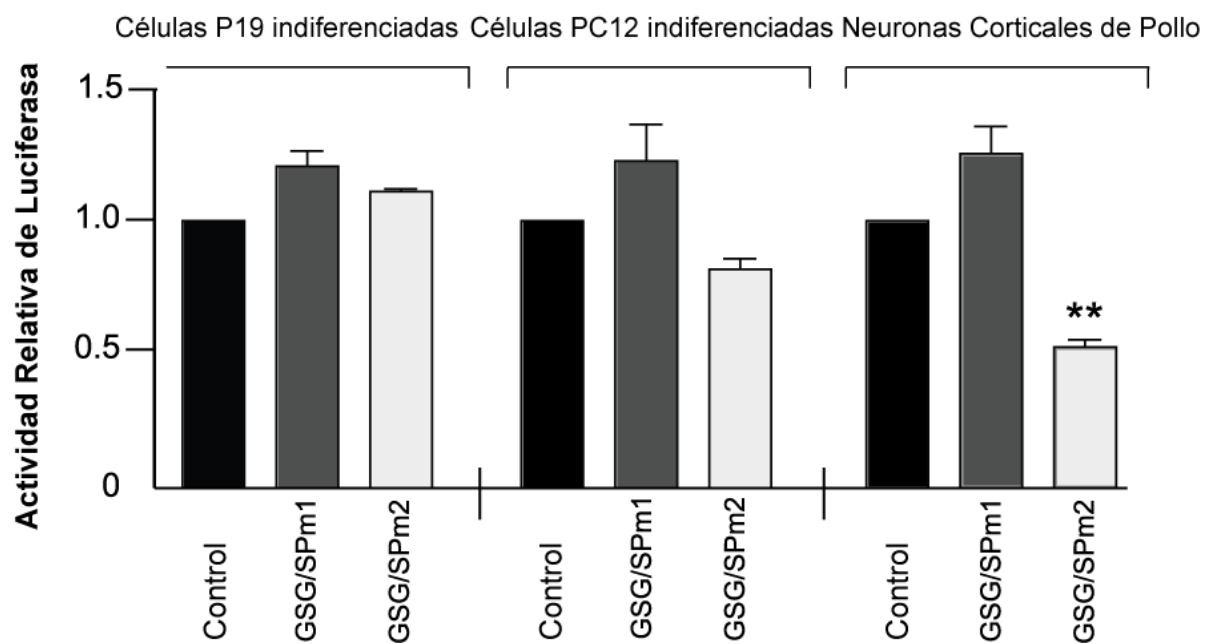


Figura 22. Ensayos funcionales con construcciones quiméricas con mutación en los elementos GSG y SP de la región reguladora proximal del gen *Grin1* de pollo. Las células P19 y PC12 indiferenciadas, así como las neuronas corticales de pollo en cultivo primario se transfectaron transitoriamente con la construcción que contiene -210 pb (control) y con la construcción que tiene la mutación en el sitio GSG (GSG/SPm1) y con la construcción mutada en el sitio SP cercano a la caja GSG (GSG/SPm2).

x. Papel de REST4 en la actividad transcripcional de la región reguladora del gen *Grin1* de pollo

Se realizaron ensayos funcionales por medio de co-transfecciones transitorias de la construcción que contiene -210pb de región reguladora del gen *Grin1* de pollo y de una construcción que contiene la isoforma de NRSF conocida como REST4, en células P19 indiferenciadas, células PC12 indiferenciadas, células C₂C₁₂ y en cultivo primario de neuronas corticales de embriones de pollo. El NRSF tiene al menos 5 variantes de empalme alternativo, conocidas como REST1 – 5. La isoforma REST4 contiene el dominio represor amino terminal, sin embargo el dominio de unión al ADN no es funcional por lo que funciona como una dominante negativa NRSF endógeno (Shimojo et al., 1999). Estudios previos demuestran que la sobre-expresión de REST-VP16 en células C₂C₁₂ puede reprogramarlas convirtiéndolas de mioblastos de músculo esquelético, que no expresan receptores de glutamato, a neuronas maduras que presentan respuestas electrofisiológicas con glutamato (Watanabe et al., 2004), por lo que nos ayudan a conocer los mecanismos de represión transcripcional de estos receptores, en particular el del gen *Grin1*.

En células P19 indiferenciadas se observa que con 0.5 µg de plásmido co-transfectado, la actividad transcripcional disminuye en mas de 5 veces y que ésta disminuye aún mas a mayores cantidades de plásmido co-transfectado (1 y 1.5 µg) (Figura 23, Panel A). En el caso de las células PC12 la disminución no es significativa, mientras que en las células C₂C₁₂ la actividad transcripcional incrementa en 60% con de 0.5 µg de plásmido co-transfectado, aumenta al doble con 1 µg y un poco mas del doble con 1.5 µg (Ver Figura 23, Panel B y C). En el caso de neuronas corticales de pollo,

únicamente se realizó con una cantidad fija de REST4 de 0.5 μg observándose un incremento de más del doble de actividad transcripcional (Ver Figura 23, Panel D).

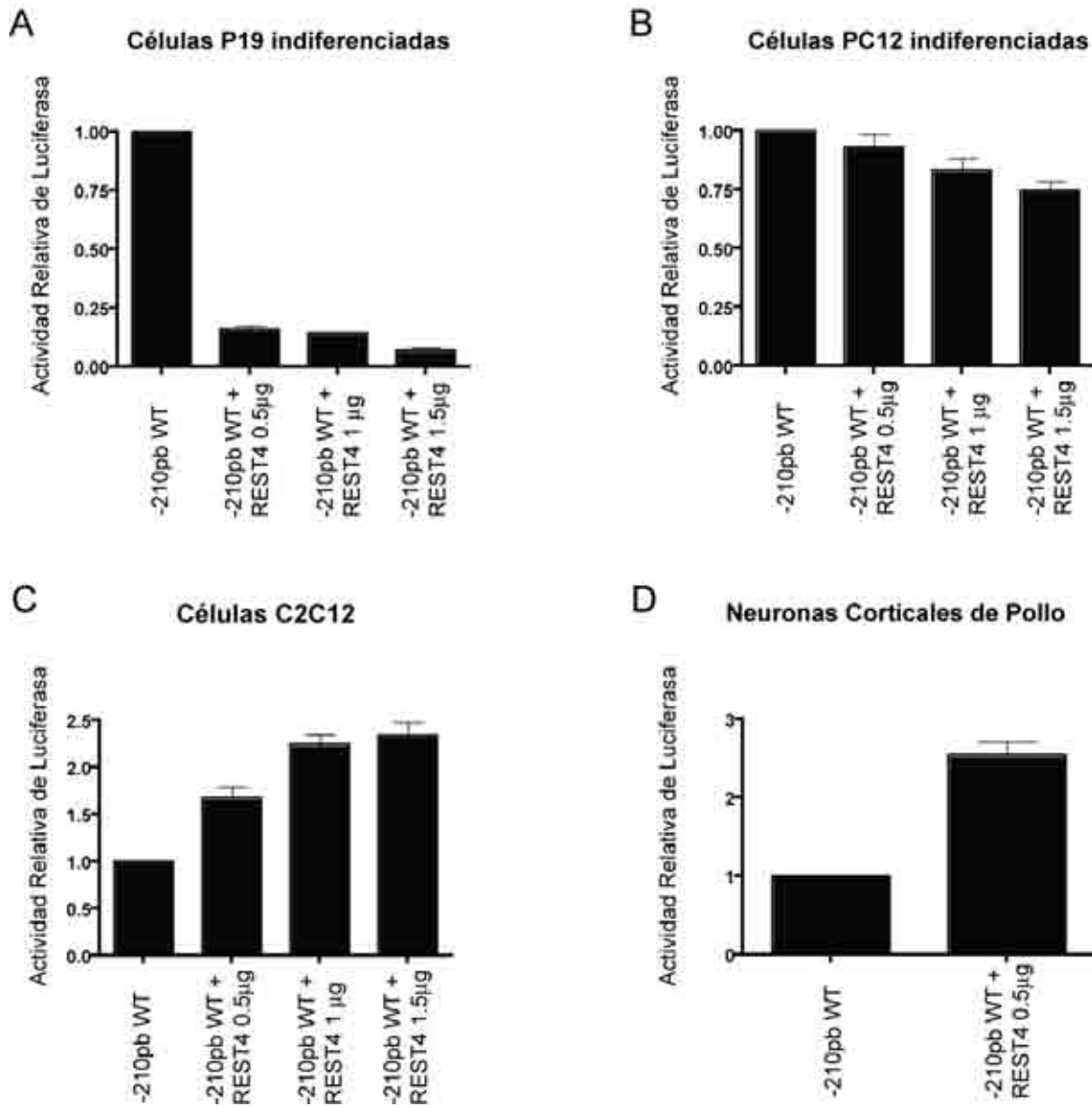


Figura 23. Efecto de REST4 en la actividad transcripcional de la región reguladora del gen *Grin1* de pollo. Se realizaron co-transfecciones de la construcción de -210 pb (control) y un plásmido que codifica para la variante de empalme alternativo REST4, en células P19 (Panel A), células PC12 (Panel B), células C₂C₁₂ (Panel C) y en neuronas corticales de embriones de pollo (Panel D).

Además, se realizaron ensayos de retardo de movilidad por electroforesis con extractos nucleares de células P19 indiferenciadas, células PC12 indiferenciadas, células C₂C₁₂ y de neuronas de pollo, y cada una de ellas con transfecciones transitorias del plásmido para expresar REST4. Estos extractos nucleares se incubaron con los oligonucleótidos con la secuencia N1 presente en la región 5'-no traducida de la región reguladora del gen *Grin1* de pollo. Se observa que en células P19 la unión de NRSF incrementa con la expresión de REST4. En células PC12, como se demostró previamente, no se observan complejos en células indiferenciadas ni en los núcleos que se transfectaron con REST4. En células C₂C₁₂, se observa un complejo en la región inferior, que no corresponde a NRSF, que disminuye con la expresión de REST4. En el caso de neuronas corticales de neuronas de pollo, como se demostró previamente, no se observan complejos en células sin REST4 y tampoco se observa con la expresión de REST4 (Figura 24).

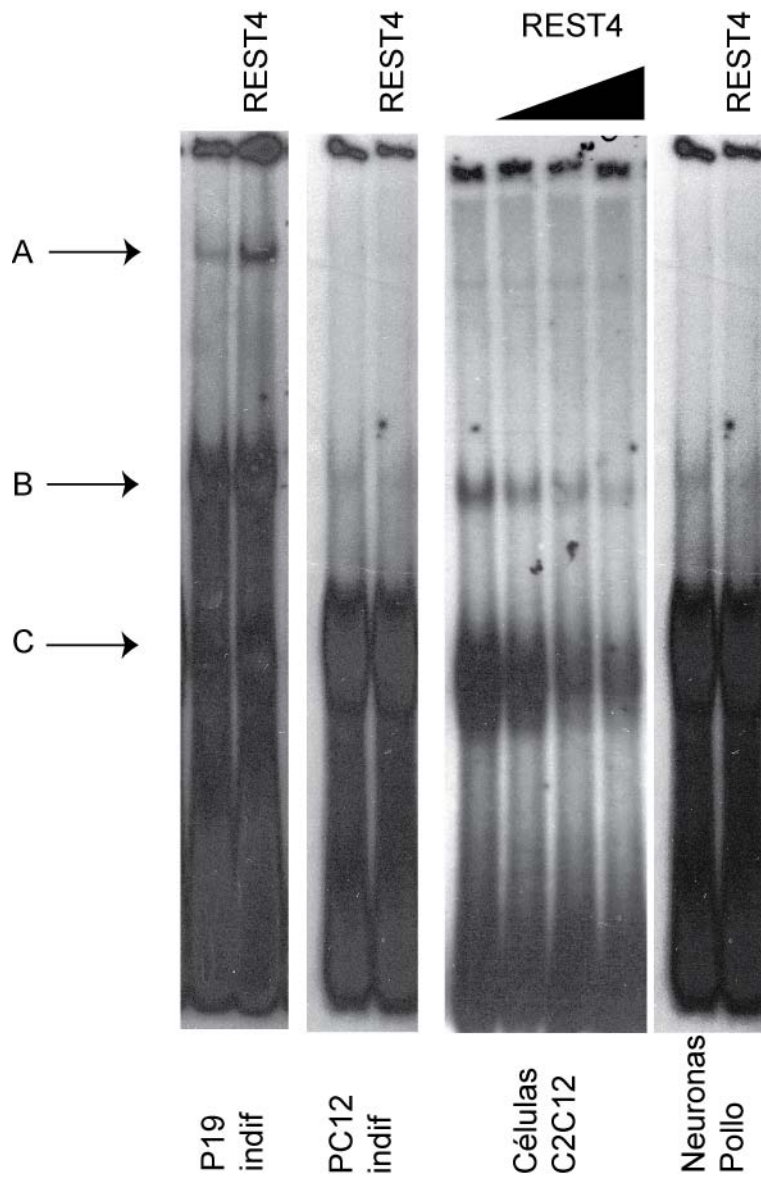


Figura 24. Efecto de REST4 en la unión de NRSF por medio de ensayos de retardo de movilidad por electroforesis. Se incubaron los extractos nucleares sin y con expresión de REST4 con los oligonucleótidos marcados con la secuencia N1 que une a NRSF. Se realizó gel de retardo de movilidad por electroforesis con extractos nucleares de células P19 indiferenciadas (P19 indif.), células PC12 indiferenciadas (PC12 indif.), células C₂C₁₂ y neuronas corticales de embriones de pollo de 7 días.

xi. Mecanismos de regulación epigenética del promotor *Grin1* de pollo evaluados por medio de ensayos funcionales y farmacológicos

Estudios previos han demostrado que tanto la tricostatina A como el butirato de sodio son inhibidores de las desacetilasas de histonas (Sealy and Chalkley, 1978; Yoshida et al., 1990). Hasta la fecha se sabe que el butirato, además de su efecto inhibitor de desacetilasas de histonas, puede tener efectos en fosfatasas (como la PP2A) y efectos en la acetilación de factores de transcripción, con lo cuál puede tener efectos transcripcionales afectando la unión de factores de transcripción a sus elementos consenso (Cuisset et al., 1997; Camarero et al., 2003) . Además, se sabe que la mitramicina A puede intercalarse en regiones ricas en GC inhibiendo la unión de los factores de transcripción que se unen a estas secuencias, como los factores de la familia SP (Aslam et al., 2001), entre otros. Finalmente, la 5-azacitidina es un agente que inhibe las metilasas de ADN (Jones and Taylor, 1980), favoreciendo la demetilación del mismo. Para demostrar el papel de las desacetilasas de histonas, de los elementos ricos en GC y el papel de la metilación del ADN en la regulación transcripcional del promotor *Grin1* de pollo, realizamos transfecciones transitorias en células P19, PC12, C₂C₁₂ y neuronas corticales de embriones de pollo y las células se mantuvieron en tratamiento con tricostatina A, butirato de sodio, mitramicina A y 5-azacitidina, durante, 14, 24, 16 y 24 horas, respectivamente. La Figura 25, panel A, muestra que la actividad transcripcional del promotor *Grin1* de pollo de la construcción de -210 pb, incrementa tres veces tras la adición de tricostatina A en células P19 indiferenciadas, muestra seis veces de activación transcripcional con butirato de sodio y dos veces con mitramicina A. El tratamiento con 5-azacitidina disminuye la actividad transcripcional en un 30% aproximadamente. Los paneles B y C muestran que la

actividad transcripcional de las construcciones mutadas en los sitios S2 y N1 presentes en la región 5' no traducida del promotor *Grin1* de pollo, no cambian tras el tratamiento farmacológico con tricostatina A y butirato, mientras que con la mitramicina A se observa una disminución del efecto comparado con la gráfica del panel A. Finalmente, la 5-azacitidina no muestra efectos importantes en la actividad transcripcional del promotor *Grin1* de pollo. En el panel D, se observa que la actividad transcripcional del promotor *Grin1* de pollo en células PC12 incrementa tres veces con la presencia de tricostatina A, dos veces con el butirato de sodio y disminuye con la incubación con mitramicina A y la 5-azacitidina. Cuando se transfectaron las construcciones mutantes para los elementos S2, se observa que la actividad transcripcional incrementa más de cinco veces con la tricostatina A y más de cuatro veces con el butirato de sodio, mientras que para el elemento N1, la tricostatina A y el butirato incrementan más de cuatro veces y más de cinco veces la actividad transcripcional, respectivamente. En general, la mitramicina disminuye la transcripción aproximadamente en la mitad y la 5-azacitidina no modifica significativamente la transcripción.

Para evaluar el efecto de dichos fármacos en la actividad transcripcional en células de otro linaje diferente al linaje neuronal, se realizaron los ensayos farmacológicos en células C₂C₁₂ que son mioblastos de músculo esquelético (Ver Figura 26). Lo que se observa es el incremento de más de doce veces la transcripción en presencia de tricostatina A en comparación con el control, mientras que el butirato de sodio incrementa la transcripción en aproximadamente siete veces. No se observa efectos significativos de la mitramicina A y la 5-azacitidina en la actividad transcripcional. La actividad transcripcional del promotor *Grin1* de pollo en células C₂C₁₂

utilizando la construcción con mutación en el elemento S2, se observó que incrementó doce y diez veces con la presencia de tricostatina A y de butirato de sodio.

La mitramicina A disminuyó la actividad transcripcional aproximadamente a la mitad, mientras que la 5-azacitidina no tuvo efectos. Cuando se evaluó la construcción con mutación en el elemento N1, se observó que la actividad transcripcional incrementó alrededor de cincuenta veces con la tricostatina A y más de cien veces con el butirato de sodio. La mitramicina A no presentó efectos, mientras que la incubación con 5-azacitidina incrementó la transcripción aproximadamente cinco veces. Finalmente, los experimentos realizados en neuronas corticales de embriones de pollo (Ver Figura 26), muestran un incremento de la actividad transcripcional de tres y cuatro veces en presencia de tricostatina A y de butirato de sodio, respectivamente. La mitramicina A y la 5-azacitidina disminuyeron la actividad transcripcional en un 60% y en un 50% aproximadamente. Los experimentos realizados con la construcción S2 mutada mostraron solamente un incremento de más de tres veces con el butirato de sodio mientras que con la tricostatina A, la mitramicina y la 5-azacitidina no se observaron cambios. Finalmente, cuando se evaluó la construcción con el elemento N1 mutado, se observó un incremento de dos veces aproximadamente tanto con la tricostatina A y el butirato de sodio. La incubación con mitramicina A no mostró cambios significativos y con 5-azacitidina se observó una disminución de un 30% aproximadamente.

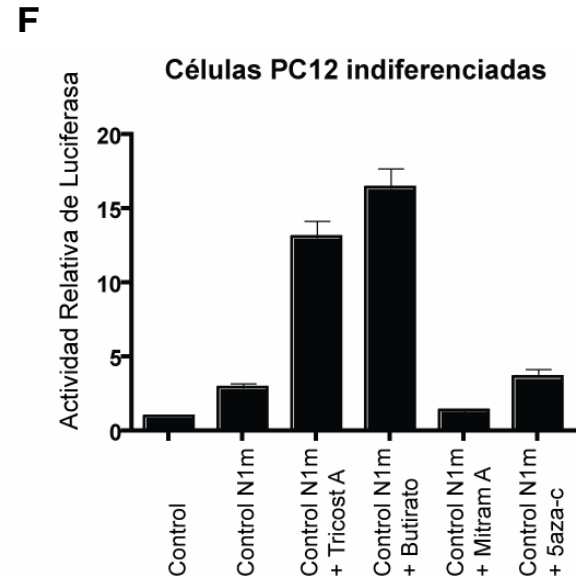
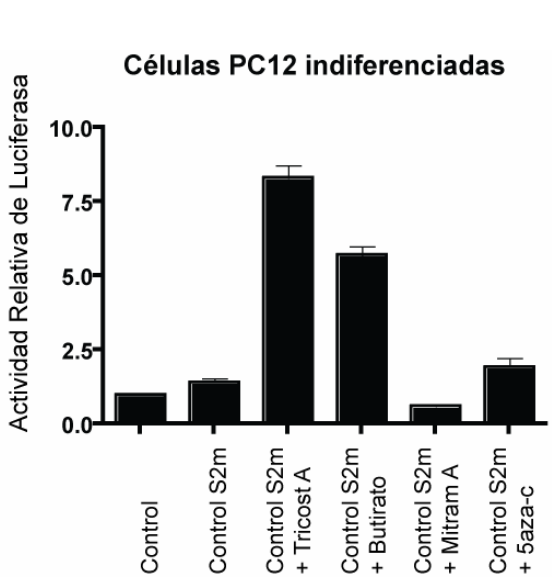
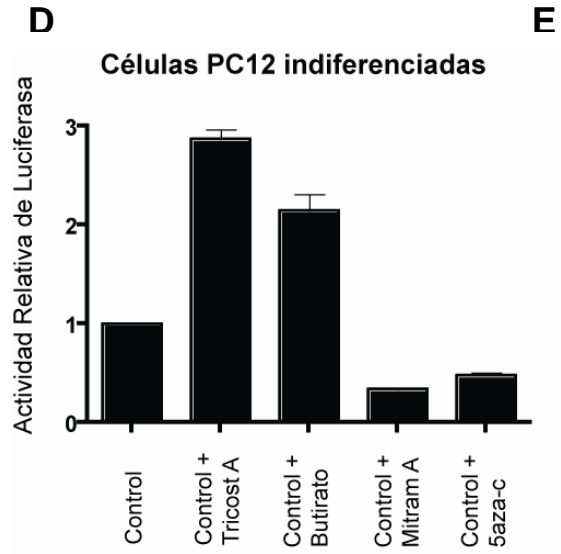
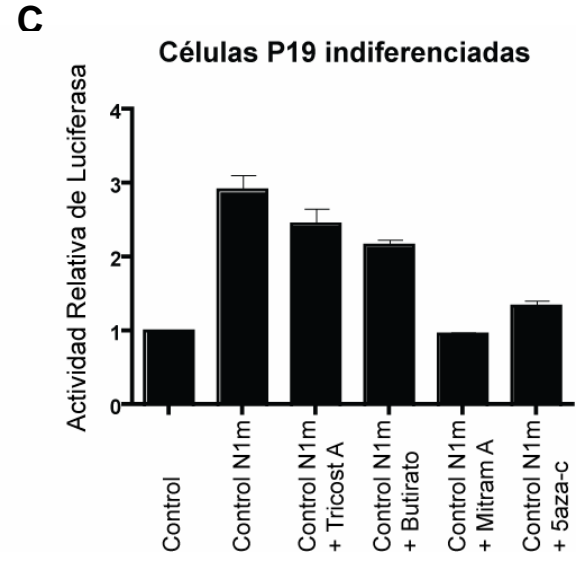
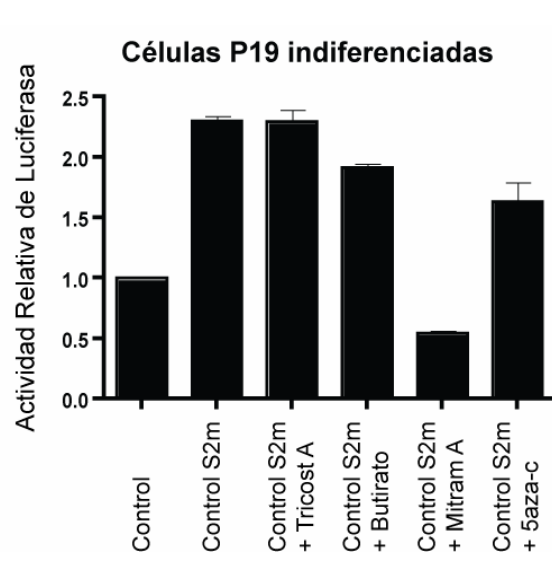
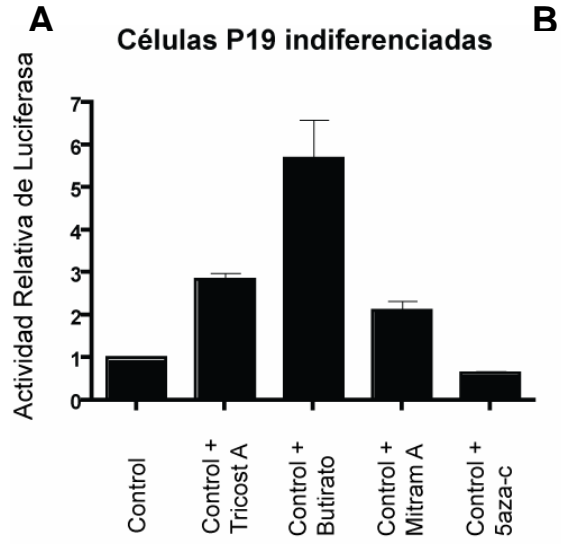


Figura 25. Efecto de la tricostatina A, butirato de sodio, mitramicina A y 5-azacitidina en la actividad transcripcional del promotor del gen *Grin1* de pollo en células P19 y PC12 indiferenciadas. Se realizaron transfecciones transitorias de la construcción de -210 pb (control) y de las construcciones con mutación en los elementos S2 y N1 en células P19 (panel A, B y C) y en células PC12 (Panel D, E y F) y se agregó tratamiento con tricostatina A, butirato de sodio, mitramicina A y 5-azacitidina (ver Estrategias Metodológicas).

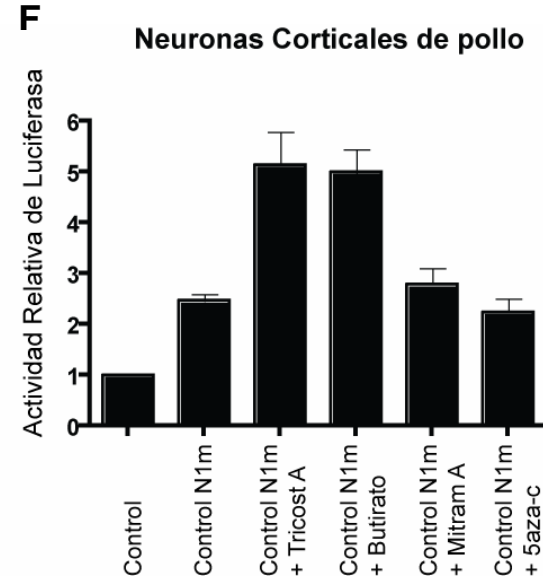
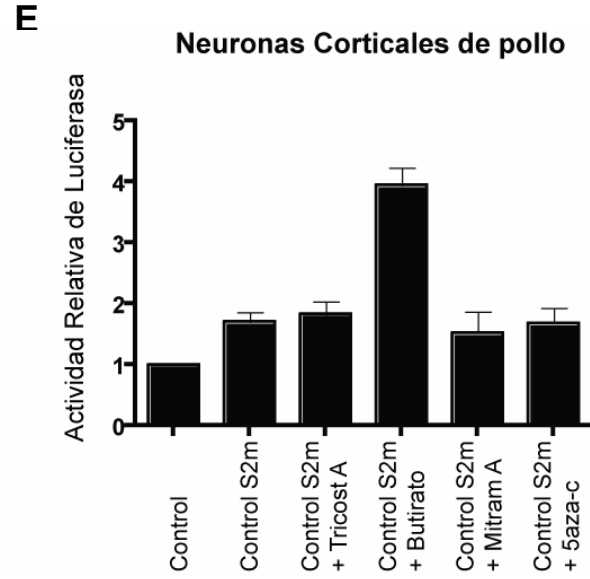
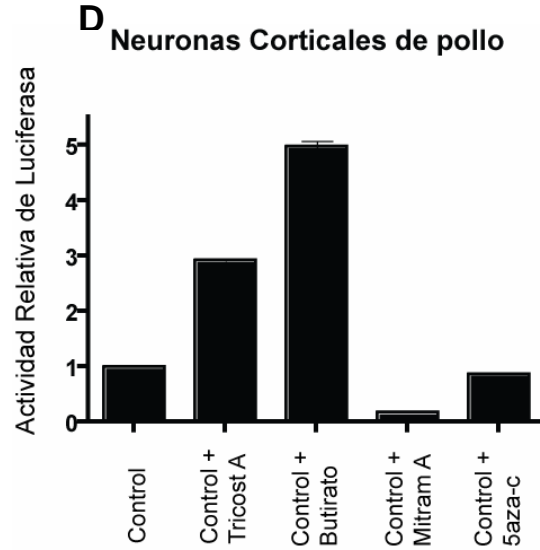
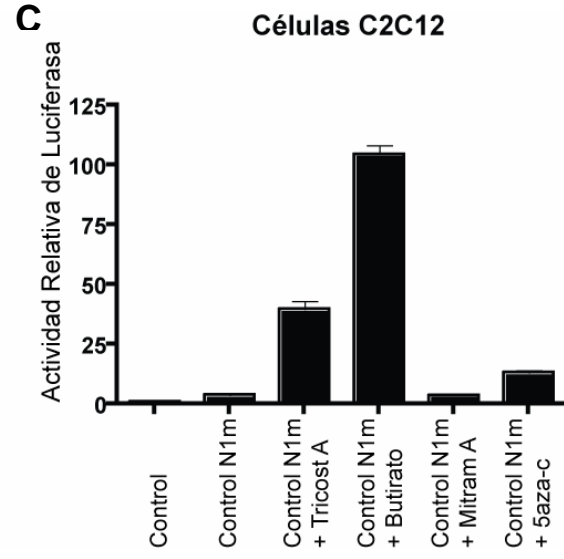
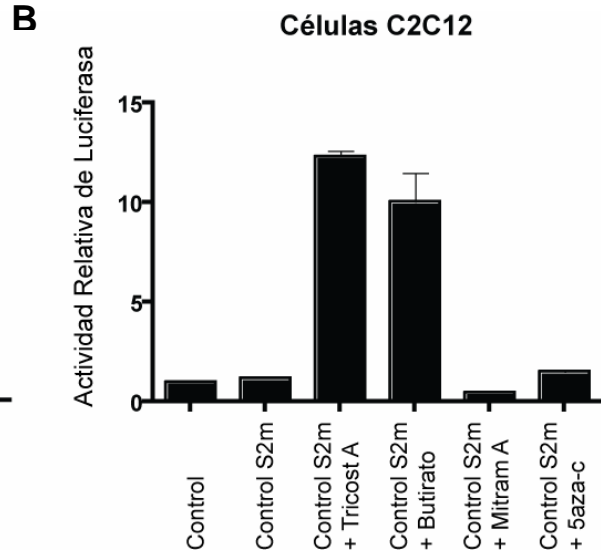
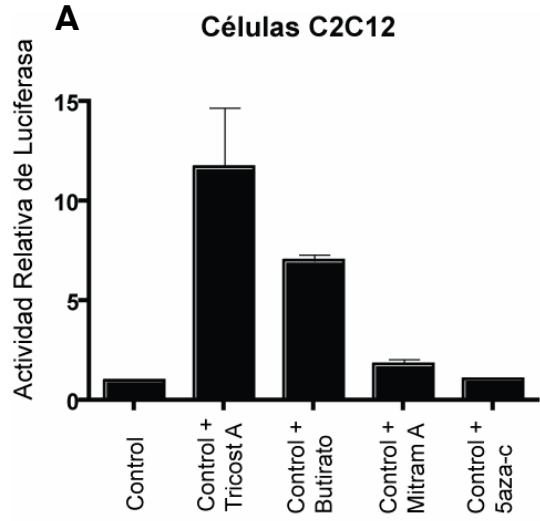


Figura 26. Efecto de la tricostatina A, butirato de sodio, mitramicina A y 5-azacitidina en la actividad transcripcional del promotor del gen *Grin1* de pollo en células C₂C₁₂ y en neuronas corticales de embriones de pollo. Se realizaron transfecciones transitorias de la construcción de -210 pb (control) y de las construcciones con mutación en los elementos S2 y N1 en células C₂C₁₂ (panel A, B y C) y en cultivo primario de neuronas corticales de embriones de pollo de siete días (Panel D, E y F) y se agregó tratamiento con tricostatina A, butirato de sodio, mitramicina A y 5-azacitidina (ver Estrategias Metodológicas).

X. DISCUSIÓN

Conocer los mecanismos moleculares que controlan la expresión de los receptores de glutamato del tipo NMDA, contribuye a entender el papel del glutamato tanto en condiciones fisiológicas como patológicas. Además, la identificación de los mecanismos transcripcionales conservados entre mamíferos y aves puede proveer un mayor entendimiento en la regulación de la expresión génica entre especies (Consortium, 2004). Sin embargo, hasta la fecha no se han realizado estudios de regulación transcripcional de los receptores de glutamato en aves. El objetivo de este trabajo fue investigar, por primera vez, los mecanismos involucrados en la regulación transcripcional del gen *Grin1* de pollo.

Para evaluar la actividad transcripcional del gen *Grin1* de pollo, nosotros generamos transfectantes estables de células P19 y PC12 y evaluamos su actividad transcripcional durante la diferenciación a neuronas con ácido retinoico y con NGF, respectivamente. De acuerdo a estudios previos con construcciones del promotor del gen *Grin1* de rata (Bai et al., 2003), los 1.9 kb de región reguladora de *Grin1* de pollo, mostraron una actividad transcripcional basal baja en células P19 indiferenciadas que incrementó durante 8 días de diferenciación neuronal inducida con ácido retinoico. De la misma forma, la actividad transcripcional de la construcción que contiene 1.9 kb de promotor del gen *Grin1* de pollo mostró un incremento durante la diferenciación neuronal de células PC12. Estos datos apoyan la hipótesis de que la expresión del gen *Grin1* está reprimida en células indiferenciadas y sugieren que la activación transcripcional que se produce tras la diferenciación neuronal ocurre por remoción de dicha represión transcripcional.

En este trabajo de tesis nosotros identificamos secuencias consenso de ADN en la región reguladora proximal, para factores de transcripción que pueden dirigir la expresión del gen *Grin1*. Los análisis *in silico* de esta región mostraron que el patrón de sitios de unión a factores de transcripción dentro de esta región, está conservado entre especies, a pesar de la baja homología en secuencia (31%). Las regiones reguladoras 5' de humano, rata y ratón contienen elementos putativos para los factores de transcripción NRSF y SP, así como contienen una caja GSG en una distribución similar. Además, dichos elementos están presentes en las regiones reguladoras de genes de otros receptores de glutamato como *Grin2a*, *Grin2b*, *Grin2c*, *Grik5* y *Grm1* (Suchanek et al., 1995; Sasner and Buonanno, 1996; Suchanek et al., 1997; Klein et al., 1998; Myers et al., 1998; Chew et al., 1999; Borges and Dingledine, 2001; Chew et al., 2001; Desai et al., 2002; Mejia-Guerra and Lareo, 2005; Crepaldi et al., 2007). En acuerdo con estos resultados, nosotros demostramos que la región proximal de la región reguladora del gen *Grin1* de pollo contiene elementos putativos para los factores de transcripción NRSF y SP, así como una caja GSG putativa que podría servir para la formación del complejo de pre-iniciación de la transcripción del gen *Grin1* en ausencia de caja TATA (Javahery et al., 1994).

Además, el análisis *in silico* de la región reguladora del gen *Grin1* de pollo muestra otros elementos de ADN putativos para la unión de factores de transcripción que pueden ser importantes para la regulación de la expresión de este gen. Estudios previos han demostrado que los factores NF κ B junto con los factores SP pueden mediar la activación transcripcional del gen *Grin1* de rata (Liu et al., 2004). Además, se ha sugerido que los factores de transcripción Pax6, Trb1/2 y Neuro D que pertenecen a la

familia de los bHLH (hélice-asa-hélice básicos) están involucrados en la especificación de las neuronas glutamatérgicas (Hevner et al., 2006) y pueden mediar la regulación transcripcional del gen *Grin1* de pollo durante la diferenciación neuronal. El factor de transcripción YY-1 tiene un papel dual en la regulación transcripcional de varios genes (Weill et al., 2003) y probablemente pudiera mediar la represión transcripcional del gen *Grin1* observada en la región entre -549 pb y -1237 pb en neuronas corticales de pollo. En la región entre -210 pb y -334 pb hay un sitio consenso de unión a Smad3 lo que sugiere que el gen *Grin1* de pollo puede estar regulado de manera positiva por la señalización mediada por TGF β (Lu et al., 2005). Se ha reportado que el factor de transcripción MAZ requiere de factores de la familia SP para activar el promotor *Grin1* de rata (Okamoto et al., 2002) y que el factor CREB puede jugar un papel en la señalización mediada por NGF (Vaudry et al., 2002; Grumolato et al., 2003) pudiendo estar involucrados en la regulación transcripcional del gen *Grin1* de pollo durante la diferenciación neuronal.

Dado que los factores de transcripción del tipo SP se expresan de manera ubicua en la mayoría de las células, el silenciamiento de la transcripción en células indiferenciadas y células no neuronales, requieren de la represión transcripcional para mantener el fenotipo celular específico. El NRSF es un factor de transcripción miembro de la familia Gli-Krüppel de proteínas reguladoras de la transcripción de dedos de zinc. El NRSF contiene una región de repetición de ocho dedos de zinc, seguido por una región rica en aminoácidos básicos, una región de seis repeticiones de prolina y un dedo de zinc cerca de la región carboxilo terminal (Schoenherr and Anderson, 1995b, a; Schoenherr et al., 1996). Se ha demostrado que el factor NRSF reprime la transcripción

del gen *Grin1* de rata en células P19 indiferenciadas (Bai et al., 2003). Además, el NRSF puede reprimir la transcripción mediada por SP1 por medio del reclutamiento de la región Carboxilo terminal de TFIID, lo que lleva a una inhibición de la transcripción por la inhibición de la formación del complejo de iniciación de la transcripción (Murai et al., 2004; Plaisance et al., 2005). Además, se ha demostrado que NRSF puede reprimir la transcripción de genes neuronales específicos, principalmente en células no neuronales y en células indiferenciadas por reclutamiento de desacetilasas de histonas (HDAC) y mSin3A/B por medio de su región amino terminal y por reclutamiento de CoREST por la región carboxilo terminal (Andres et al., 1999; Roopra et al., 2000; Roopra et al., 2001). Finalmente, la represión mediada por REST puede ser lograda por la inhibición directa de SP1 (Plaisance et al., 2005), inhibición directa de la TBP (la proteína de unión a la caja TATA, por sus siglas en inglés) (Murai et al., 2004), por reclutamiento del fosfatasa de dominio carboxilo terminal (CTD) que inhiben la transcripción mediada por la ARN polimerasa II (Yeo et al., 2005). En este trabajo, los resultados muestran que la represión transcripcional del gen *Grin1* de pollo mediada por NRSF/REST depende del tipo celular y del estadio de diferenciación neuronal. Esta represión transcripcional en células P19 requiere de NRSF pero requiere de otros mecanismos. Por otro lado, en células PC12 que son células que carecen de actividad de NRSF, requiere de otros mecanismos independientes de este factor.

La familia de factores de transcripción SP está formada por los factores de transcripción SP1, SP2, SP3 y SP4. Esta familia forma parte de los factores de transcripción de dedos de zinc (Suske, 1999). Se ha descrito que algunos factores de la familia SP pueden funcionar como activadores o como represores transcripcionales, jugando un papel importante en la regulación transcripcional de genes neuronales

(Suske, 1999; Kaczynski et al., 2003). El factor SP1 es un factor de transcripción que regula la expresión de genes relacionados con el ciclo celular y desarrollo (Saffer et al., 1991). El SP2 tiene como particularidad la afinidad a cajas ricas en GT (Kingsley and Winoto, 1992). El factor de transcripción SP3 puede funcionar como un represor transcripcional o como un activador transcripcional (Vasicek et al., 2003), mientras que el SP4 es un factor que es particularmente importante en la regulación transcripcional de genes neuronales (Hagen et al., 1995). La represión mediada por los factores SP puede estar dada por titulación de uno o más factores de transcripción específicos (Kennett et al., 1997), por reclutamiento de desacetilasas de histonas (Won et al., 2002) o por interacción con la proteína de unión a secuencias metiladas (MePC) (Wang et al., 2003). Además, la represión mediada por factores SP puede depender del número de elementos SP presentes en el promotor (Yu et al., 2003). En este trabajo, nosotros demostramos que la represión transcripcional del gen *Grin1* de pollo está mediada por la unión del factor de transcripción SP3 en el elemento S2 presente en la región 5' no traducida y esta represión transcripcional depende del tipo celular y del estadio de diferenciación neuronal. De acuerdo con estudios recientes que demuestran que la interacción de SP3 y NRSF resulta en represión transcripcional (Kim et al., 2006), nuestros resultados sugieren que los factores SP3 y NRSF pueden estar formando un complejo de represión transcripcional fuerte en la región 5' no traducida del promotor *Grin1* de pollo, bloqueando el inicio de la transcripción.

Por medio de ensayos funcionales con construcciones silvestres y mutadas y estudios de interacción ADN proteína, demostramos que SP3 está activando la transcripción del promotor proximal por medio de la unión al sitio SP cercano a la caja GSG. Estos resultados están en acuerdo con los estudio previos en el promotor del gen

Grin1 de rata en los cuales se demuestra la activación transcripcional mediada por los factores de transcripción de la familia SP (Bai and Kusiak, 1993, 1995; Okamoto et al., 2002; Liu et al., 2004). Estudios previos han demostrado que las modificaciones post-traduccionales como la sumoilación (Valin and Gill, 2007), la acetilación (Wooten-Blanks et al., 2007) y la fosforilación (Pages, 2007) pueden modificar la función de estos factores en la regulación transcripcional de genes, apoyando la idea de un papel dual del factor de transcripción SP3 en la regulación de la expresión génica. Sin embargo, no se sabe si estas modificaciones post-traduccionales regulan la función de SP1 y SP3 en el proceso de diferenciación neuronal, lo que requiere de estudios subsecuentes para demostrarlo.

Se sabe que el NRSF tiene 5 variantes de empalme alternativo (REST1-5) (Palm et al., 1999), de las cuáles REST4 es la que se ha demostrado que funciona como una dominante negativa del NRSF endógeno (Shimojo et al., 1999). Esta variante contiene el elemento represor amino terminal pero no tiene un dominio de unión al ADN funcional, con lo cuál puede secuestrar a los elementos represores de la región amino terminal, es decir, mSin3A y desacetilasas de histonas (Grimes et al., 2000). Nosotros demostramos que la expresión del ARNm de REST4 incrementa con la diferenciación neuronal de células P19. Los ensayos funcionales indican que la sobre-expresión de REST4 reprime la transcripción en células P19 indiferenciadas pero no en células PC12. Además, la sobre-expresión de REST4 parece incrementar la actividad transcripcional en neuronas de pollo y en células comprometidas a linaje muscular C₂C₁₂. Finalmente, los ensayos de unión ADN-proteína, muestran que en células P19 indiferenciadas, la unión de NRSF incrementa con la sobre-expresión de REST4. En células PC12 y neuronas de pollo no se observan cambios, mientras que en las células

C₂C₁₂, REST4 parece competir con otro factor de transcripción independiente de NRSF. Estos datos sugieren, primero que REST4 parece funcionar como represor transcripcional o como activador transcripcional dependiendo del tipo celular y estadio de diferenciación neuronal; segundo, REST4 parece mantener reprimida la transcripción en células indiferenciadas y posiblemente con el incremento de REST4 durante la diferenciación neuronal ésta represión disminuye por la disminución del NRSF; tercero, en células no neuronales pareciera competir con algún otro factor de transcripción independiente de NRSF, activando la transcripción; y cuarto, es posible que en neuronas la expresión de REST4 ayude a mantener la expresión de genes neuronales.

Para conocer los mecanismos de represión transcripcional en células indiferenciadas y no neuronales mediadas por los factores NRSF y SP3, realizamos estudios funcionales a través de transfecciones transitorias de la construcción que contiene -210 pb de región reguladora proximal del gen *Grin1* de pollo y realizamos ensayos farmacológicos, en las líneas celulares P19, PC12 y C₂C₁₂ y en cultivo primario de neuronas corticales de embriones de pollo. Los resultados nos muestran claramente que el gen *Grin1* de pollo se encuentra silenciado por desacetilasas de histonas en células P19 indiferenciadas. Estudios recientes indican que la cromatina de las regiones reguladoras de genes neuronales, en células pluripotenciales, está en una configuración bivalente (Bernstein et al., 2006), lo que permite silenciarlos en estado indiferenciado, pero esperando señales que les indiquen si se expresan o no se expresan (Bernstein et al., 2006). Nuestros resultados indican que en células P19 la represión transcripcional está mediada por la asociación de los factores de transcripción NRSF y SP3 en la región 5'-no traducida con desacetilasas de histonas sin embargo la

represión transcripcional no es muy fuerte y parece deberse completamente a la represión mediada por NRSF y SP3. Por otro lado, en células PC12 comprometidas a linaje neuronal, la represión transcripcional depende también de los factores de transcripción NRSF y SP3 y también esta mediada por reclutamiento de desacetilasas de histonas. En contraste, en neuronas corticales de pollo, esta represión transcripcional es mucho menor, pero también es susceptible de inhibición por desacetilasas de histonas. Por el contrario, la represión transcripcional del gen *Grin1* de pollo está totalmente silenciada en células no neuronales. En este caso, en las células C₂C₁₂ que son células comprometidas a linaje muscular, el gen *Grin1* está reprimido principalmente por NRSF, pero la gran activación transcripcional con la presencia de inhibidores de las desacetilasas de histonas, nos indica que la represión transcripcional en células que no expresan este gen depende de otros factores de transcripción, independientes de NRSF, que reprimen la transcripción por medio del reclutamiento de desacetilasas de histonas.

La estructura de la cromatina de las regiones reguladoras de genes neuronales en células indiferenciadas está en un estado de silenciamiento. Estudios con las regiones reguladoras del gen *Nav1.2* y *SSCG* indican que la represión mediada por NRSF puede estar clasificada en dos: la primera, en la cuál la represión transcripcional está dada solamente por el reclutamiento de desacetilasas de histonas por NRSF y; la segunda, cuando hay una asociación de un complejo represor de NRSF y proteínas de unión a ADN metilado (MePC) (Ballas et al., 2005; Ballas and Mandel, 2005). Este segundo tipo de genes requiere la despolarización neuronal para eliminar la represión transcripcional mediada por NRSF y MePC (Ballas et al., 2005).

Se ha demostrado que en células indiferenciadas, los inhibidores de desacetilasas de histonas promueven la expresión de genes neuronales (Balasubramaniyan et al., 2006). Esto nos indica que en el caso del gen *Grin1* de pollo, la represión transcripcional en células indiferenciadas está mediada posiblemente por la interacción de NRSF y SP3, los cuáles reclutan desacetilasas de histonas pero que mantienen la cromatina en una estructura susceptible a ser modificada. En células no neuronales, por ejemplo las células C₂C₁₂, la represión transcripcional del gen *Grin1* de pollo está mediada por NRSF, pero predominantemente por la unión de otros factores de transcripción que reclutan desacetilasas de histonas los cuáles forman un complejo represor muy fuerte. En neuronas, la actividad transcripcional del gen *Grin1* es muy fuerte y la asociación con los factores de transcripción con desacetilasas de histonas es mucho menor. Sin embargo, para conocer cuáles son los factores de transcripción que silencian la expresión de este gen en células no neuronales, cuáles son los complejos silenciadores y cuáles son las modificaciones específicas de la cromatina para mantener este gen silenciado en células no neuronales y la diferencia con neuronas, se requieren de más estudios.

Finalmente, el análisis *in silico* muestra la presencia de una isla de dinucleótidos CpG que puede estar regulando de manera negativa la actividad transcripcional del gen *Grin1* de pollo. Se sabe que la metilación del ADN puede mantener reprimida la transcripción por medio de la regulación de la unión de factores SP (Aoyama et al., 2004), por medio de unión de complejos de la proteína de unión a ADN metilado MBD2 (Wang et al., 2003) o regulando la unión factores que reclutan al complejo de inicio de la transcripción (Thorne et al., 2009). Sin embargo, los estudios farmacológicos con la 5-aza-citidina indican que la metilación del ADN no regula la expresión del gen *Grin1* en

nuestras condiciones. Sin embargo, para conocer si este mecanismo epigenético está regulando la expresión de este gen en otras condiciones se requieren de mas estudios.

XI. CONCLUSIONES

1. La expresión del gen *Grin1* endógeno incrementa con la diferenciación neuronal de células P19 inducida con ácido retinoico, pero no incrementa en la diferenciación neuronal de células PC12 inducida con NGF.
2. La actividad transcripcional de la región reguladora del gen *Grin1* de pollo incrementa con la diferenciación neuronal de células P19 y PC12 inducidas con ácido retinoico y NGF, respectivamente.
3. La construcción que contiene -210 pb de la región reguladora 5' y 86 pb de región 5'-no traducida del gen *Grin1* de pollo es suficiente para mantener la actividad transcripcional del gen quimérico en neuronas.
4. La región de -210 pb y la región 5'-no traducida del promotor del gen *Grin1* de pollo contiene elementos conservados entre especies a pesar de la baja homología en su secuencia global.
5. La región 5'-no traducida contiene los elementos NRSE y SP que son capaces de unir a los factores de transcripción NRSF y SP presentes en los núcleos de células P19, PC12 y neuronas corticales de embriones de pollo.
6. La mutación de los sitios NRSE y SP incrementan la actividad transcripcional del promotor *Grin1* de pollo, principalmente en células indiferenciadas y no neuronales.

7. El elemento SP cercano a la caja GSG (GSG/SP) es capaz de unir al factor de transcripción SP3 presente en el núcleo de neuronas corticales de embriones de pollo.
8. La mutación del sitio SP unido al GSG (GSG/SP) disminuye la actividad transcripcional del promotor del gen *Grin1* de pollo en neuronas corticales de embriones de pollo.
9. La variante de empalme alternativo de NRSF, REST4 incrementa durante la diferenciación neuronal y parece regular de manera dual la actividad del promotor *Grin1* de pollo dependiendo del tipo celular y del estadio de diferenciación neuronal.
10. La inhibición de desacetilasas de histonas por medio de ensayos funcionales y farmacológicos es capaz de incrementar la actividad transcripcional del promotor del gen *Grin1* de pollo, principalmente en células no neuronales y en células indiferenciadas.
11. La metilación de ADN parece no jugar un papel importante en la regulación transcripcional del promotor *Grin1* de pollo.

XII. PERSPECTIVAS

1. Demostrar por medio de inmunoprecipitación de cromatina los complejos de represión transcripcional del promotor del gen *Grin1* de pollo en células indiferenciadas y en células no neuronales.
2. Demostrar por medio de inmunoprecipitación de cromatina la ausencia de dichos complejos represores en neuronas.
3. Demostrar el papel de la cromatina en la regulación transcripcional del gen *Grin1* de pollo durante la diferenciación neuronal.

XIII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Andres ME, Burger C, Peral-Rubio MJ, Battaglioli E, Anderson ME, Grimes J, Dallman J, Ballas N, Mandel G (1999) CoREST: a functional corepressor required for regulation of neural-specific gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:9873-9878.

Aoyama T, Okamoto T, Nagayama S, Nishijo K, Ishibe T, Yasura K, Nakayama T, Nakamura T, Toguchida J (2004) Methylation in the core-promoter region of the chondromodulin-I gene determines the cell-specific expression by regulating the binding of transcriptional activator Sp3. *J Biol Chem* 279:28789-28797.

Aslam F, Palumbo L, Augenlicht LH, Velcich A (2001) The Sp family of transcription factors in the regulation of the human and mouse MUC2 gene promoters. *Cancer Res* 61:570-576.

Bai G, Kusiak JW (1993) Cloning and analysis of the 5' flanking sequence of the rat N-methyl-D-aspartate receptor 1 (NMDAR1) gene. *Biochim Biophys Acta* 1152:197-200.

Bai G, Kusiak JW (1995) Functional analysis of the proximal 5'-flanking region of the N-methyl-D-aspartate receptor subunit gene, NMDAR1. *J Biol Chem* 270:7737-7744.

- Bai G, Norton DD, Prenger MS, Kusiak JW (1998) Single-stranded DNA-binding proteins and neuron-restrictive silencer factor participate in cell-specific transcriptional control of the NMDAR1 gene. *J Biol Chem* 273:1086-1091.
- Bai G, Zhuang Z, Liu A, Chai Y, Hoffman PW (2003) The role of the RE1 element in activation of the NR1 promoter during neuronal differentiation. *J Neurochem* 86:992-1005.
- Balasubramaniyan V, Boddeke E, Bakels R, Kust B, Kooistra S, Veneman A, Copray S (2006) Effects of histone deacetylation inhibition on neuronal differentiation of embryonic mouse neural stem cells. *Neuroscience* 143:939-951.
- Ballas N, Mandel G (2005) The many faces of REST oversee epigenetic programming of neuronal genes. *Curr Opin Neurobiol* 15:500-506.
- Ballas N, Grunseich C, Lu DD, Speh JC, Mandel G (2005) REST and its corepressors mediate plasticity of neuronal gene chromatin throughout neurogenesis. *Cell* 121:645-657.
- Behar TN, Scott CA, Greene CL, Wen X, Smith SV, Maric D, Liu QY, Colton CA, Barker JL (1999) Glutamate acting at NMDA receptors stimulates embryonic cortical neuronal migration. *J Neurosci* 19:4449-4461.
- Benarroch EE (2008) Metabotropic glutamate receptors: synaptic modulators and therapeutic targets for neurologic disease. *Neurology* 70:964-968.
- Bernstein BE, Mikkelsen TS, Xie X, Kamal M, Huebert DJ, Cuff J, Fry B, Meissner A, Wernig M, Plath K, Jaenisch R, Wagschal A, Feil R, Schreiber SL, Lander ES (2006) A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells. *Cell* 125:315-326.

- Biscoe TJ, Evans RH, Francis AA, Martin MR, Watkins JC, Davies J, Dray A (1977) D-alpha-Aminoadipate as a selective antagonist of amino acid-induced and synaptic excitation of mammalian spinal neurones. *Nature* 270:743-745.
- Borges K, Dingledine R (2001) Functional organization of the GluR1 glutamate receptor promoter. *J Biol Chem* 276:25929-25938.
- Bowie D (2008) Ionotropic glutamate receptors & CNS disorders. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 7:129-143.
- Bradley SR, Rees HD, Yi H, Levey AI, Conn PJ (1998) Distribution and developmental regulation of metabotropic glutamate receptor 7a in rat brain. *J Neurochem* 71:636-645.
- Brazel CY, Nunez JL, Yang Z, Levison SW (2005) Glutamate enhances survival and proliferation of neural progenitors derived from the subventricular zone. *Neuroscience* 131:55-65.
- Brown KM, Wrathall JR, Yasuda RP, Wolfe BB (2002) Quantitative measurement of glutamate receptor subunit protein expression in the postnatal rat spinal cord. *Brain Res Dev Brain Res* 137:127-133.
- Camarero N, Nadal A, Barrero MJ, Haro D, Marrero PF (2003) Histone deacetylase inhibitors stimulate mitochondrial HMG-CoA synthase gene expression via a promoter proximal Sp1 site. *Nucleic Acids Res* 31:1693-1703.
- Canudas AM, Di Giorgi-Gerevini V, Iacovelli L, Nano G, D'Onofrio M, Arcella A, Giangaspero F, Busceti C, Ricci-Vitiani L, Battaglia G, Nicoletti F, Melchiorri D (2004) PHCCC, a specific enhancer of type 4 metabotropic glutamate receptors, reduces proliferation and promotes differentiation of cerebellar granule cell neuroprecursors. *J Neurosci* 24:10343-10352.

- Catania MV, Landwehrmeyer GB, Testa CM, Standaert DG, Penney JB, Jr., Young AB (1994) Metabotropic glutamate receptors are differentially regulated during development. *Neuroscience* 61:481-495.
- Catania MV, Bellomo M, Di Giorgi-Gerevini V, Seminara G, Giuffrida R, Romeo R, De Blasi A, Nicoletti F (2001) Endogenous activation of group-I metabotropic glutamate receptors is required for differentiation and survival of cerebellar Purkinje cells. *J Neurosci* 21:7664-7673.
- Chew LJ, Huang F, Boutin JM, Gallo V (1999) Identification of nuclear orphan receptors as regulators of expression of a neurotransmitter receptor gene. *J Biol Chem* 274:29366-29375.
- Chew LJ, Yuan X, Scherer SE, Qie L, Huang F, Hayes WP, Gallo V (2001) Characterization of the rat GRIK5 kainate receptor subunit gene promoter and its intragenic regions involved in neural cell specificity. *J Biol Chem* 276:42162-42171.
- Colonnese MT, Zhao JP, Constantine-Paton M (2005) NMDA receptor currents suppress synapse formation on sprouting axons in vivo. *J Neurosci* 25:1291-1303.
- Conn PJ (2003) Physiological roles and therapeutic potential of metabotropic glutamate receptors. *Ann N Y Acad Sci* 1003:12-21.
- Conn PJ, Pin JP (1997) Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 37:205-237.
- Consortium ICGS (2004) Sequence and comparative analysis of the chicken genome provide unique perspectives on vertebrate evolution. *Nature* 432:695-716.

Cottrell JR, Dube GR, Egles C, Liu G (2000) Distribution, density, and clustering of functional glutamate receptors before and after synaptogenesis in hippocampal neurons. *J Neurophysiol* 84:1573-1587.

Crepaldi L, Lackner C, Corti C, Ferraguti F (2007) Transcriptional activators and repressors for the neural-specific expression of a metabotropic glutamate receptor. *J Biol Chem*.

Cuisset L, Tichonicky L, Jaffray P, Delpech M (1997) The effects of sodium butyrate on transcription are mediated through activation of a protein phosphatase. *J Biol Chem* 272:24148-24153.

Cull-Candy S, Brickley S, Farrant M (2001) NMDA receptor subunits: diversity, development and disease. *Curr Opin Neurobiol* 11:327-335.

Cull-Candy SG, Leszkiewicz DN (2004) Role of distinct NMDA receptor subtypes at central synapses. *Sci STKE* 2004:re16.

Desai A, Turetsky D, Vasudevan K, Buonanno A (2002) Analysis of transcriptional regulatory sequences of the N-methyl-D-aspartate receptor 2A subunit gene in cultured cortical neurons and transgenic mice. *J Biol Chem* 277:46374-46384.

Di Giorgi Gerevini VD, Caruso A, Cappuccio I, Ricci Vitiani L, Romeo S, Della Rocca C, Gradini R, Melchiorri D, Nicoletti F (2004) The mGlu5 metabotropic glutamate receptor is expressed in zones of active neurogenesis of the embryonic and postnatal brain. *Brain Res Dev Brain Res* 150:17-22.

Dingledine R, Borges K, Bowie D, Traynelis SF (1999) The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol Rev* 51:7-61.

Ehlers MD, Zhang S, Bernhardt JP, Huganir RL (1996) Inactivation of NMDA receptors by direct interaction of calmodulin with the NR1 subunit. *Cell* 84:745-755.

- Ehlers MD, Fung ET, O'Brien RJ, Huganir RL (1998) Splice variant-specific interaction of the NMDA receptor subunit NR1 with neuronal intermediate filaments. *J Neurosci* 18:720-730.
- Elezgarai I, Benitez R, Mateos JM, Lazaro E, Osorio A, Azkue JJ, Bilbao A, Lingenhoehl K, Van Der Putten H, Hampson DR, Kuhn R, Knopfel T, Grandes P (1999) Developmental expression of the group III metabotropic glutamate receptor mGluR4a in the medial nucleus of the trapezoid body of the rat. *J Comp Neurol* 411:431-440.
- Ferraguti F, Shigemoto R (2006) Metabotropic glutamate receptors. *Cell Tissue Res* 326:483-504.
- Fukaya M, Hayashi Y, Watanabe M (2005) NR2 to NR3B subunit switchover of NMDA receptors in early postnatal motoneurons. *Eur J Neurosci* 21:1432-1436.
- Furuta A, Martin LJ (1999) Laminar segregation of the cortical plate during corticogenesis is accompanied by changes in glutamate receptor expression. *J Neurobiol* 39:67-80.
- Gascon S, Deogracias R, Sobrado M, Roda JM, Renart J, Rodriguez-Pena A, Diaz-Guerra M (2005) Transcription of the NR1 subunit of the N-methyl-D-aspartate receptor is down-regulated by excitotoxic stimulation and cerebral ischemia. *J Biol Chem* 280:35018-35027.
- Gerber U, Gee CE, Benquet P (2007) Metabotropic glutamate receptors: intracellular signaling pathways. *Curr Opin Pharmacol* 7:56-61.
- Gillespie DC, Kim G, Kandler K (2005) Inhibitory synapses in the developing auditory system are glutamatergic. *Nat Neurosci* 8:332-338.

- Greene LA, Tischler AS (1976) Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73:2424-2428.
- Grimes JA, Nielsen SJ, Battaglioli E, Miska EA, Speh JC, Berry DL, Atouf F, Holdener BC, Mandel G, Kouzarides T (2000) The co-repressor mSin3A is a functional component of the REST-CoREST repressor complex. *J Biol Chem* 275:9461-9467.
- Grumolato L, Louiset E, Alexandre D, Ait-Ali D, Turquier V, Fournier A, Fasolo A, Vaudry H, Anouar Y (2003) PACAP and NGF regulate common and distinct traits of the sympathoadrenal lineage: effects on electrical properties, gene markers and transcription factors in differentiating PC12 cells. *Eur J Neurosci* 17:71-82.
- Hagen G, Dennig J, Preiss A, Beato M, Suske G (1995) Functional analyses of the transcription factor Sp4 reveal properties distinct from Sp1 and Sp3. *J Biol Chem* 270:24989-24994.
- Hannan AJ, Blakemore C, Katsnelson A, Vitalis T, Huber KM, Bear M, Roder J, Kim D, Shin HS, Kind PC (2001) PLC-beta1, activated via mGluRs, mediates activity-dependent differentiation in cerebral cortex. *Nat Neurosci* 4:282-288.
- Herkert M, Rottger S, Becker CM (1998) The NMDA receptor subunit NR2B of neonatal rat brain: complex formation and enrichment in axonal growth cones. *Eur J Neurosci* 10:1553-1562.
- Hermans E, Challiss RA (2001) Structural, signalling and regulatory properties of the group I metabotropic glutamate receptors: prototypic family C G-protein-coupled receptors. *Biochem J* 359:465-484.

- Hevner RF, Hodge RD, Daza RA, Englund C (2006) Transcription factors in glutamatergic neurogenesis: conserved programs in neocortex, cerebellum, and adult hippocampus. *Neurosci Res* 55:223-233.
- Hirai H, Launey T (2000) The regulatory connection between the activity of granule cell NMDA receptors and dendritic differentiation of cerebellar Purkinje cells. *J Neurosci* 20:5217-5224.
- Hollmann M, Heinemann S (1994) Cloned glutamate receptors. *Annu Rev Neurosci* 17:31-108.
- Hollmann M, O'Shea-Greenfield A, Rogers SW, Heinemann S (1989) Cloning by functional expression of a member of the glutamate receptor family. *Nature* 342:643-648.
- Inglis FM, Furia F, Zuckerman KE, Strittmatter SM, Kalb RG (1998) The role of nitric oxide and NMDA receptors in the development of motor neuron dendrites. *J Neurosci* 18:10493-10501.
- Iwayama Y, Hashimoto K, Nakajima M, Toyota T, Yamada K, Shimizu E, Itokawa M, Hoshika A, Iyo M, Yoshikawa T (2005) Analysis of correlation between serum d-serine levels and functional promoter polymorphisms of GRIN2A and GRIN2B genes. *Neurosci Lett*.
- Javahery R, Khachi A, Lo K, Zenzie-Gregory B, Smale ST (1994) DNA sequence requirements for transcriptional initiator activity in mammalian cells. *Mol Cell Biol* 14:116-127.
- Javitt DC (2004) Glutamate as a therapeutic target in psychiatric disorders. *Mol Psychiatry* 9:984-997, 979.

- Jones PA, Taylor SM (1980) Cellular differentiation, cytidine analogs and DNA methylation. *Cell* 20:85-93.
- Kaczynski J, Cook T, Urrutia R (2003) Sp1- and Kruppel-like transcription factors. *Genome Biol* 4:206.
- Kennett SB, Udvadia AJ, Horowitz JM (1997) Sp3 encodes multiple proteins that differ in their capacity to stimulate or repress transcription. *Nucleic Acids Res* 25:3110-3117.
- Kidd FL, Coumis U, Collingridge GL, Crabtree JW, Isaac JT (2002) A presynaptic kainate receptor is involved in regulating the dynamic properties of thalamocortical synapses during development. *Neuron* 34:635-646.
- Kim CS, Choi HS, Hwang CK, Song KY, Lee BK, Law PY, Wei LN, Loh HH (2006) Evidence of the neuron-restrictive silencer factor (NRSF) interaction with Sp3 and its synergic repression to the mu opioid receptor (MOR) gene. *Nucleic Acids Res* 34:6392-6403.
- Kingsley C, Winoto A (1992) Cloning of GT box-binding proteins: a novel Sp1 multigene family regulating T-cell receptor gene expression. *Mol Cell Biol* 12:4251-4261.
- Kitayama T, Yoneyama M, Tamaki K, Yoneda Y (2004) Regulation of neuronal differentiation by N-methyl-D-aspartate receptors expressed in neural progenitor cells isolated from adult mouse hippocampus. *J Neurosci Res* 76:599-612.
- Klein M, Pieri I, Uhlmann F, Pfizenmaier K, Eisel U (1998) Cloning and characterization of promoter and 5'-UTR of the NMDA receptor subunit epsilon 2: evidence for alternative splicing of 5'-non-coding exon. *Gene* 208:259-269.
- Komuro H, Rakic P (1993) Modulation of neuronal migration by NMDA receptors. *Science* 260:95-97.

- Krainc D, Bai G, Okamoto S, Carles M, Kusiak JW, Brent RN, Lipton SA (1998) Synergistic activation of the N-methyl-D-aspartate receptor subunit 1 promoter by myocyte enhancer factor 2C and Sp1. *J Biol Chem* 273:26218-26224.
- Lai F, Chen CX, Lee VM, Nishikura K (1997) Dramatic increase of the RNA editing for glutamate receptor subunits during terminal differentiation of clonal human neurons. *J Neurochem* 69:43-52.
- Laurie DJ, Seeburg PH (1994) Regional and developmental heterogeneity in splicing of the rat brain NMDAR1 mRNA. *J Neurosci* 14:3180-3194.
- Leclerc CL, Chi CL, Awobuluyi M, Sucher NJ (1995) Expression of N-methyl-D-aspartate receptor subunit mRNAs in the rat pheochromocytoma cell line PC12. *Neurosci Lett* 201:103-106.
- Lee LJ, Erzurumlu RS (2005) Altered parcellation of neocortical somatosensory maps in N-methyl-D-aspartate receptor-deficient mice. *J Comp Neurol* 485:57-63.
- Lee LJ, Lo FS, Erzurumlu RS (2005a) NMDA receptor-dependent regulation of axonal and dendritic branching. *J Neurosci* 25:2304-2311.
- Lee LJ, Iwasato T, Itohara S, Erzurumlu RS (2005b) Exuberant thalamocortical axon arborization in cortex-specific NMDAR1 knockout mice. *J Comp Neurol* 485:280-292.
- Lee-Rivera I, Zarain-Herzberg A, Lopez-Colome AM (2003) Developmental expression of N-methyl-D-aspartate glutamate receptor 1 splice variants in the chick retina. *J Neurosci Res* 73:369-383.
- Li JH, Wang YH, Wolfe BB, Krueger KE, Corsi L, Stocca G, Vicini S (1998) Developmental changes in localization of NMDA receptor subunits in primary cultures of cortical neurons. *Eur J Neurosci* 10:1704-1715.

- Lin LH, Talman WT (2002) Coexistence of NMDA and AMPA receptor subunits with nNOS in the nucleus tractus solitarii of rat. *J Chem Neuroanat* 24:287-296.
- Liu A, Hoffman PW, Lu W, Bai G (2004) NF-kappaB site interacts with Sp factors and up-regulates the NR1 promoter during neuronal differentiation. *J Biol Chem* 279:17449-17458.
- Lobo MK, Itri JN, Cepeda C, Chavira CA, Levine MS (2003) Ionotropic glutamate receptor expression and dopaminergic modulation in the developing subthalamic nucleus of the rat: an immunohistochemical and electrophysiological analysis. *Dev Neurosci* 25:384-393.
- Lopez-Bendito G, Shigemoto R, Lujan R, Juiz JM (2001) Developmental changes in the localisation of the mGluR1alpha subtype of metabotropic glutamate receptors in Purkinje cells. *Neuroscience* 105:413-429.
- Lopez-Bendito G, Shigemoto R, Fairen A, Lujan R (2002) Differential distribution of group I metabotropic glutamate receptors during rat cortical development. *Cereb Cortex* 12:625-638.
- Lu J, Wu Y, Sousa N, Almeida OF (2005) SMAD pathway mediation of BDNF and TGF beta 2 regulation of proliferation and differentiation of hippocampal granule neurons. *Development* 132:3231-3242.
- Lujan R, Shigemoto R, Lopez-Bendito G (2005) Glutamate and GABA receptor signalling in the developing brain. *Neuroscience* 130:567-580.
- Luk KC, Sadikot AF (2004) Glutamate and regulation of proliferation in the developing mammalian telencephalon. *Dev Neurosci* 26:218-228.

- Luk KC, Kennedy TE, Sadikot AF (2003) Glutamate promotes proliferation of striatal neuronal progenitors by an NMDA receptor-mediated mechanism. *J Neurosci* 23:2239-2250.
- Madden DR (2002) The structure and function of glutamate receptor ion channels. *Nat Rev Neurosci* 3:91-101.
- Madry C, Mesic I, Bartholomaeus I, Nicke A, Betz H, Laube B (2007) Principal role of NR3 subunits in NR1/NR3 excitatory glycine receptor function. *Biochem Biophys Res Commun* 354:102-108.
- Mao X, Moerman AM, Barger SW (2002) Neuronal kappa B-binding factors consist of Sp1-related proteins. Functional implications for autoregulation of N-methyl-D-aspartate receptor-1 expression. *J Biol Chem* 277:44911-44919.
- Maric D, Liu QY, Grant GM, Andreadis JD, Hu Q, Chang YH, Barker JL, Joseph J, Stenger DA, Ma W (2000) Functional ionotropic glutamate receptors emerge during terminal cell division and early neuronal differentiation of rat neuroepithelial cells. *J Neurosci Res* 61:652-662.
- Marret S, Gressens P, Evrard P (1996) Arrest of neuronal migration by excitatory amino acids in hamster developing brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:15463-15468.
- Martin LJ, Furuta A, Blackstone CD (1998) AMPA receptor protein in developing rat brain: glutamate receptor-1 expression and localization change at regional, cellular, and subcellular levels with maturation. *Neuroscience* 83:917-928.
- McBurney MW, Rogers BJ (1982) Isolation of male embryonal carcinoma cells and their chromosome replication patterns. *Dev Biol* 89:503-508.
- Mejia-Guerra MK, Lareo LR (2005) In silico identification of regulatory elements of GRIN1 genes. *Omics* 9:106-115.

- Metzger F, Pieri I, Eisel UL (2005) Lack of NMDA receptor subunit exchange alters Purkinje cell dendritic morphology in cerebellar slice cultures. *Brain Res Dev Brain Res* 155:165-168.
- Minakami R, Iida K, Hirakawa N, Sugiyama H (1995) The expression of two splice variants of metabotropic glutamate receptor subtype 5 in the rat brain and neuronal cells during development. *J Neurochem* 65:1536-1542.
- Monaghan DT, Bridges RJ, Cotman CW (1989) The excitatory amino acid receptors: their classes, pharmacology, and distinct properties in the function of the central nervous system. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 29:365-402.
- Morrison ME, Mason CA (1998) Granule neuron regulation of Purkinje cell development: striking a balance between neurotrophin and glutamate signaling. *J Neurosci* 18:3563-3573.
- Murai K, Naruse Y, Shaul Y, Agata Y, Mori N (2004) Direct interaction of NRSF with TBP: chromatin reorganization and core promoter repression for neuron-specific gene transcription. *Nucleic Acids Res* 32:3180-3189.
- Myers SJ, Dingledine R, Borges K (1999) Genetic regulation of glutamate receptor ion channels. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 39:221-241.
- Myers SJ, Peters J, Huang Y, Comer MB, Barthel F, Dingledine R (1998) Transcriptional regulation of the GluR2 gene: neural-specific expression, multiple promoters, and regulatory elements. *J Neurosci* 18:6723-6739.
- Nguyen L, Rigo JM, Rocher V, Belachew S, Malgrange B, Rogister B, Leprince P, Moonen G (2001) Neurotransmitters as early signals for central nervous system development. *Cell Tissue Res* 305:187-202.

- Okabe S, Miwa A, Okado H (1999) Alternative splicing of the C-terminal domain regulates cell surface expression of the NMDA receptor NR1 subunit. *J Neurosci* 19:7781-7792.
- Okabe S, Vicario-Abejon C, Segal M, McKay RD (1998) Survival and synaptogenesis of hippocampal neurons without NMDA receptor function in culture. *Eur J Neurosci* 10:2192-2198.
- Okamoto S, Sherman K, Lipton SA (1999) Absence of binding activity of neuron-restrictive silencer factor is necessary, but not sufficient for transcription of NMDA receptor subunit type 1 in neuronal cells. *Brain Res Mol Brain Res* 74:44-54.
- Okamoto S, Sherman K, Bai G, Lipton SA (2002) Effect of the ubiquitous transcription factors, SP1 and MAZ, on NMDA receptor subunit type 1 (NR1) expression during neuronal differentiation. *Brain Res Mol Brain Res* 107:89-96.
- Pages G (2007) Sp3-mediated VEGF regulation is dependent on phosphorylation by extra-cellular signals regulated kinases (Erk). *J Cell Physiol* 213:454-463.
- Palm K, Metsis M, Timmusk T (1999) Neuron-specific splicing of zinc finger transcription factor REST/NRSF/XBR is frequent in neuroblastomas and conserved in human, mouse and rat. *Brain Res Mol Brain Res* 72:30-39.
- Pisu MB, Guioli S, Conforti E, Bernocchi G (2003) Signal molecules and receptors in the differential development of cerebellum lobules. Acute effects of cisplatin on nitric oxide and glutamate systems in Purkinje cell population. *Brain Res Dev Brain Res* 145:229-240.
- Plaisance V, Niederhauser G, Azzouz F, Lenain V, Haefliger JA, Waeber G, Abderrahmani A (2005) The repressor element silencing transcription factor

- (REST)-mediated transcriptional repression requires the inhibition of Sp1. *J Biol Chem* 280:401-407.
- Poluch S, Drian MJ, Durand M, Astier C, Benyamin Y, Konig N (2001) AMPA receptor activation leads to neurite retraction in tangentially migrating neurons in the intermediate zone of the embryonic rat neocortex. *J Neurosci Res* 63:35-44.
- Rajan I, Cline HT (1998) Glutamate receptor activity is required for normal development of tectal cell dendrites in vivo. *J Neurosci* 18:7836-7846.
- Ritter LM, Vazquez DM, Meador-Woodruff JH (2002) Ontogeny of ionotropic glutamate receptor subunit expression in the rat hippocampus. *Brain Res Dev Brain Res* 139:227-236.
- Rodriguez-Moreno A, Sihra TS (2007a) Kainate receptors with a metabotropic modus operandi. *Trends Neurosci* 30:630-637.
- Rodriguez-Moreno A, Sihra TS (2007b) Metabotropic actions of kainate receptors in the CNS. *J Neurochem* 103:2121-2135.
- Roopra A, Huang Y, Dingleline R (2001) Neurological disease: listening to gene silencers. *Mol Interv* 1:219-228.
- Roopra A, Sharling L, Wood IC, Briggs T, Bachfischer U, Paquette AJ, Buckley NJ (2000) Transcriptional repression by neuron-restrictive silencer factor is mediated via the Sin3-histone deacetylase complex. *Mol Cell Biol* 20:2147-2157.
- Saffer JD, Jackson SP, Annarella MB (1991) Developmental expression of Sp1 in the mouse. *Mol Cell Biol* 11:2189-2199.
- Sasner M, Buonanno A (1996) Distinct N-methyl-D-aspartate receptor 2B subunit gene sequences confer neural and developmental specific expression. *J Biol Chem* 271:21316-21322.

Scherer SE, Gallo V (1998) Expression and regulation of kainate and AMPA receptors in the rat neural tube. *J Neurosci Res* 52:356-368.

Schoenherr CJ, Anderson DJ (1995a) The neuron-restrictive silencer factor (NRSF): a coordinate repressor of multiple neuron-specific genes. *Science* 267:1360-1363.

Schoenherr CJ, Anderson DJ (1995b) Silencing is golden: negative regulation in the control of neuronal gene transcription. *Curr Opin Neurobiol* 5:566-571.

Schoenherr CJ, Paquette AJ, Anderson DJ (1996) Identification of potential target genes for the neuron-restrictive silencer factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:9881-9886.

Schuler T, Mesic I, Madry C, Bartholomaeus I, Laube B (2008) Formation of NR1/NR2 and NR1/NR3 heterodimers constitutes the initial step in N-methyl-D-aspartate receptor assembly. *J Biol Chem* 283:37-46.

Sealy L, Chalkley R (1978) The effect of sodium butyrate on histone modification. *Cell* 14:115-121.

Shepherd JD, Huganir RL (2007) The cell biology of synaptic plasticity: AMPA receptor trafficking. *Annu Rev Cell Dev Biol* 23:613-643.

Shimojo M, Paquette AJ, Anderson DJ, Hersh LB (1999) Protein kinase A regulates cholinergic gene expression in PC12 cells: REST4 silences the silencing activity of neuron-restrictive silencer factor/REST. *Mol Cell Biol* 19:6788-6795.

Standley S, Roche KW, McCallum J, Sans N, Wenthold RJ (2000) PDZ domain suppression of an ER retention signal in NMDA receptor NR1 splice variants. *Neuron* 28:887-898.

Stegenga SL, Kalb RG (2001) Developmental regulation of N-methyl-D-aspartate- and kainate-type glutamate receptor expression in the rat spinal cord. *Neuroscience* 105:499-507.

- Suchanek B, Seeburg PH, Sprengel R (1995) Gene structure of the murine N-methyl D-aspartate receptor subunit NR2C. *J Biol Chem* 270:41-44.
- Suchanek B, Seeburg PH, Sprengel R (1997) Tissue specific control regions of the N-methyl-D-aspartate receptor subunit NR2C promoter. *Biol Chem* 378:929-934.
- Sucher NJ, Brose N, Deitcher DL, Awobuluyi M, Gasic GP, Bading H, Cepko CL, Greenberg ME, Jahn R, Heinemann SF, et al. (1993) Expression of endogenous NMDAR1 transcripts without receptor protein suggests post-transcriptional control in PC12 cells. *J Biol Chem* 268:22299-22304.
- Sugiura N, Patel RG, Corriveau RA (2001) N-methyl-D-aspartate receptors regulate a group of transiently expressed genes in the developing brain. *J Biol Chem* 276:14257-14263.
- Sun L, Margolis FL, Shipley MT, Lidow MS (1998) Identification of a long variant of mRNA encoding the NR3 subunit of the NMDA receptor: its regional distribution and developmental expression in the rat brain. *FEBS Lett* 441:392-396.
- Suske G (1999) The Sp-family of transcription factors. *Gene* 238:291-300.
- Takai H, Katayama K, Uetsuka K, Nakayama H, Doi K (2003) Distribution of N-methyl-D-aspartate receptors (NMDARs) in the developing rat brain. *Exp Mol Pathol* 75:89-94.
- Thorne JL, Campbell MJ, Turner BM (2009) Transcription factors, chromatin and cancer. *Int J Biochem Cell Biol* 41:164-175.
- Tingley WG, Roche KW, Thompson AK, Huganir RL (1993) Regulation of NMDA receptor phosphorylation by alternative splicing of the C-terminal domain. *Nature* 364:70-73.

- Tingley WG, Ehlers MD, Kameyama K, Doherty C, Ptak JB, Riley CT, Huganir RL (1997) Characterization of protein kinase A and protein kinase C phosphorylation of the N-methyl-D-aspartate receptor NR1 subunit using phosphorylation site-specific antibodies. *J Biol Chem* 272:5157-5166.
- Tolias KF, Bikoff JB, Burette A, Paradis S, Harrar D, Tavazoie S, Weinberg RJ, Greenberg ME (2005) The Rac1-GEF Tiam1 couples the NMDA receptor to the activity-dependent development of dendritic arbors and spines. *Neuron* 45:525-538.
- Valin A, Gill G (2007) Regulation of the dual-function transcription factor Sp3 by SUMO. *Biochem Soc Trans* 35:1393-1396.
- Vasicek R, Meinhardt G, Haidweger E, Rotheneder H, Husslein P, Knofler M (2003) Expression of the human Hand1 gene in trophoblastic cells is transcriptionally regulated by activating and repressing specificity protein (Sp)-elements. *Gene* 302:115-127.
- Vaudry D, Stork PJ, Lazarovici P, Eiden LE (2002) Signaling pathways for PC12 cell differentiation: making the right connections. *Science* 296:1648-1649.
- Wang G, Wei LN, Loh HH (2003) Transcriptional regulation of mouse delta-opioid receptor gene by CpG methylation: involvement of Sp3 and a methyl-CpG-binding protein, MBD2, in transcriptional repression of mouse delta-opioid receptor gene in Neuro2A cells. *J Biol Chem* 278:40550-40556.
- Watanabe Y, Kameoka S, Gopalakrishnan V, Aldape KD, Pan ZZ, Lang FF, Majumder S (2004) Conversion of myoblasts to physiologically active neuronal phenotype. *Genes Dev* 18:889-900.

- Watkins JC, Jane DE (2006) The glutamate story. *Br J Pharmacol* 147 Suppl 1:S100-108.
- Waxman EA, Lynch DR (2005) N-methyl-D-aspartate receptor subtypes: multiple roles in excitotoxicity and neurological disease. *Neuroscientist* 11:37-49.
- Weill L, Shestakova E, Bonnefoy E (2003) Transcription factor YY1 binds to the murine beta interferon promoter and regulates its transcriptional capacity with a dual activator/repressor role. *J Virol* 77:2903-2914.
- Wilson MT, Kisaalita WS, Keith CH (2000) Glutamate-induced changes in the pattern of hippocampal dendrite outgrowth: a role for calcium-dependent pathways and the microtubule cytoskeleton. *J Neurobiol* 43:159-172.
- Won J, Yim J, Kim TK (2002) Sp1 and Sp3 recruit histone deacetylase to repress transcription of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) promoter in normal human somatic cells. *J Biol Chem* 277:38230-38238.
- Wooten-Blanks LG, Song P, Senkal CE, Ogretmen B (2007) Mechanisms of ceramide-mediated repression of the human telomerase reverse transcriptase promoter via deacetylation of Sp3 by histone deacetylase 1. *Faseb J* 21:3386-3397.
- Xiao MY, Wasling P, Hanse E, Gustafsson B (2004) Creation of AMPA-silent synapses in the neonatal hippocampus. *Nat Neurosci* 7:236-243.
- Yeo M, Lee SK, Lee B, Ruiz EC, Pfaff SL, Gill GN (2005) Small CTD phosphatases function in silencing neuronal gene expression. *Science* 307:596-600.
- Yoshida M, Kijima M, Akita M, Beppu T (1990) Potent and specific inhibition of mammalian histone deacetylase both in vivo and in vitro by trichostatin A. *J Biol Chem* 265:17174-17179.

Yu B, Datta PK, Bagchi S (2003) Stability of the Sp3-DNA complex is promoter-specific: Sp3 efficiently competes with Sp1 for binding to promoters containing multiple Sp-sites. *Nucleic Acids Res* 31:5368-5376.

Zarain-Herzberg A, Lee-Rivera I, Rodriguez G, Lopez-Colome AM (2005) Cloning and characterization of the chick NMDA receptor subunit-1 gene. *Brain Res Mol Brain Res* 137:235-251.

Zimmer M, Fink TM, Franke Y, Lichter P, Spiess J (1995) Cloning and structure of the gene encoding the human N-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR1). *Gene* 159:219-223.

APÉNDICE I: Artículo publicado

Biosci. Rep. (2008) / 28 / 177–188 (Printed in Great Britain) / doi:10.1042/BSR20080058

Original Paper

Bioscience
Reports

Transcription of the chicken *Grin1* gene is regulated by the activity of SP3 and NRSF in undifferentiated cells and neurons

Gabriel MORENO-GONZÁLEZ*, Ana María LÓPEZ-COLOMÉ†, Gabriela RODRÍGUEZ* and Angel ZARAIN-HERZBERG*¹

*Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Distrito Federal, 04510, México, and †Departamento de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Distrito Federal, 04510, México

Synopsis

The NMDA (*N*-methyl-*D*-aspartate) receptors are important in the regulation of neuronal development, synaptic plasticity, learning and memory, and are involved in several brain pathologies. The NR1 subunit is essential for the assembly of functional receptors, as it forms the calcium-permeable ion channel and contains the obligatory co-agonist binding site. Previous studies have shown that NR1 gene (*Grin1*) expression is up-regulated during neuronal differentiation and its expression is widespread in the central nervous system. We have previously cloned the chicken *Grin1* gene and 1.9 kb of the 5'-regulatory region. In the present study, we analysed the molecular mechanisms that regulate chicken *Grin1* gene transcription in undifferentiated cells and neurons. By functional analysis of chicken *Grin1*-luciferase gene 5'-regulatory region constructs, we demonstrate that the basal promoter is delimited within 210 bp upstream from the main transcription initiation site. DNA-protein binding and functional assays revealed that the 5'-UTR (untranslated region) has one consensus NRSE (neuron-restrictive silencing element) that binds NRSF (neuron-restrictive silencing factor), and one SP (stimulating protein transcription factor) element that binds SP3, both repressing *Grin1* gene transcription in undifferentiated P19 cells (embryonic teratocarcinoma cells) and PC12 cells (phaeochromocytoma cells). The promoter region lacks a consensus TATA box, but contains one GSG/SP (GSG-like box near a SP-consensus site) that binds SP3 and up-regulates gene transcription in embryonic chicken cortical neurons. Taken together, these results demonstrate a dual role of SP3 in regulating the expression of the *Grin1* gene, by repressing transcription in the 5'-UTR in undifferentiated cells as well as acting as a transcription factor, increasing *Grin1* gene transcription in neurons.

Key words: *Grin1*, *N*-methyl-*D*-aspartate receptor (NMDAR), NR1, neuron-restrictive silencing factor (NRSF), stimulatory protein transcription factor 3 (SP3), transcription

INTRODUCTION

The NMDARs [NMDA (*N*-methyl-*D*-aspartate) receptors] belong to the ionotropic glutamate receptor family, play important roles in neuronal development and synaptic plasticity and are involved in several neurological and psychiatric disorders [1,2]. The NMDARs are calcium-permeable ligand-gated cation channels containing NR1, NR2 and NR3 subunits, encoded by seven genes: *Grin1*, *Grin2a-d*, *Grin3a* and *Grin3b*. [3,4]. The NR1

subunit is essential for the formation of functional NMDARs because it forms the ion channel and contains the glycine co-agonist binding site [4,5].

Changes in NMDAR subunit expression induced by normal and pathological activity, as well as by neurotrophins, have been documented thoroughly [6]. Among the neurotrophins contained in serum, NGF (nerve growth factor) was shown to up-regulate NR1 subunit expression in PC12 cells (phaeochromocytoma cells) [7]. Also, the *Grin1* gene is expressed throughout the central nervous system and is

Abbreviations used: Ara-C, cytosine arabinoside; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; dsDNA, double-strand DNA; DTT, dithiothreitol; E7, embryonic day 7; EBRL, early growth response gene product 1; EMSA, electrophoretic mobility shift assay; FBS, fetal bovine serum; HDAC, histone deacetylase complex; HS, horse serum; MAZ, Myc-associated zinc-finger-binding protein; NLS, mutated NLS site; NGF, nerve growth factor; NMDA, *N*-methyl-*D*-aspartate; NMDAR, NMDA receptor; NRSE, neuron-restrictive silencing element; NRSF, neuron-restrictive silencing factor; PC12 cell, phaeochromocytoma cell; P19 cell, embryonic teratocarcinoma cell; S_{2m}, mutated S2 construct; SP, stimulating protein transcription factor; GSG/SP, GSG-like box near a SP-consensus site; GSG/SPm1, GSG/SP mutated in the putative core GSG site; GSG/SPm2, GSG/SP mutated in the SP site; TRID, transcription factor IID; T_m, melting temperature of DNA; UTR, untranslated region.

¹To whom correspondence should be addressed (e-mail zarain@servidor.unam.mx).

www.bioscirep.org

Bioscience Reports



up-regulated during neuronal differentiation and brain development [8,9].

The promoter regions of the rat, mouse and human *Grin1* genes have been cloned and characterized [10–13], and we have cloned the chicken *Grin1* gene previously [12]. Several transcription factors have been shown to play an important role in the transcriptional regulation of the rat *Grin1* gene. It has been demonstrated that overexpression of SP (stimulating protein transcription factor)1, SP2 and SP4 increases transcriptional activity of the rat *Grin1* gene [14–16] by directly interacting with GC-rich elements, or through interacting with MEF2C (myocyte enhancer factor 2C), NF- κ B (nuclear factor κ B) and MAZ (Myc-associated zinc-finger-binding protein) transcription factors [14,16,17]. In contrast, the NRSF (neuron-restrictive silencing factor) represses the transcription of neuronal genes in non-neuronal cells as well as in undifferentiated pluripotent cells [18]. NRSF is known to negatively regulate the transcription of several neuronal genes, including the rat *Grin1* [9,13,19], *Nav1.2* (voltage-gated sodium channel subunit 1.2) and *SCG10* (superior cervical ganglia protein 10) genes [20]. However, the molecular mechanisms controlling *Grin1* gene transcription in birds are unknown.

In the present study, we examined the transcriptional regulation of the chicken *Grin1* gene in undifferentiated and neuron-differentiated P19 cells (embryonic terato-carcinoma cells) and PC12 cells, and in chicken cortical neurons. The results showed transcriptional up-regulation of the chicken *Grin1* gene 5'-regulatory region upon neuronal differentiation of P19 and PC12 cells. By EMSA (electrophoretic mobility-shift assay) and functional analyses, we demonstrated that binding of NRSF and factors to their respective DNA elements in the 5'-UTR (untranslated region) was responsible for the repression of *Grin1* gene transcription in neuronal-committed PC12 cells and in undifferentiated P19 cells, and that such repression was attenuated in chicken cortical neurons. In contrast, binding of SP3 to a SP element near a GSG site located in the proximal promoter region activated transcription of the chicken *Grin1* gene in cortical neurons. These findings suggest a dual role of SP3 in the transcriptional regulation of the chicken *Grin1* gene as a transcriptional repressor together with NRSF by binding to the 5'-UTR and probably forming a repressor complex, whereas the interaction of SP3 with a SP-site located in the proximal promoter plays a role as a transcriptional activator of the *Grin1* gene in chicken cortical neurons.

EXPERIMENTAL

Cell culture

P19 cells were grown in DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium), supplemented with 10% (v/v) FBS (fetal bovine serum). P19 cells were induced to differentiate into neurons by the addition of 0.5 μ M retinoic acid for 4 days, and then cells were treated with trypsin and plated into tissue-culture dishes with their growth medium supplemented with 50 ng/ml Ara-C (cytosine

arabinoside). PC12 cells were maintained in DMEM supplemented with 10% (v/v) HS (horse serum) and 5% (v/v) FBS. For neuronal differentiation of PC12 cells, cells were plated on poly-D-ornithine-coated tissue-culture dishes. Subsequently, the medium was substituted with DMEM containing 2% (v/v) HS and 50 nM NGF2.5S (Alomone Labs, Jerusalem, Israel). Primary culture of cortical chicken neurons was performed as described previously [12]. Briefly, forebrains from E7 (embryonic day 7) chicken embryos were digested with 0.5% trypsin in Advanced DMEM (Invitrogen), washed twice with Advanced DMEM supplemented with 20% (v/v) FBS, passed through a nylon mesh, seeded and maintained in Advanced DMEM supplemented with 3% (v/v) FBS and 50 ng/ml Ara-C in poly-D-ornithine-coated culture dishes. All culture media were supplemented with kanamycin (60 mg/l), penicillin G (10 i.u./ml), streptomycin (10 mg/ml), amphotericin B (0.025 mg/ml) and nystatin (10 i.u./ml). The use of chicken embryos was approved by the Ethical Committee of the School of Medicine Universidad Nacional Autónoma de México.

Immunocytochemistry

The TUJ1 antibody (provided by Dr Iván Velasco, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Autónoma de México, México) was used for the detection of β -tubulin III during neuronal differentiation of P19 and PC12 cells. The cells were induced to differentiate into neurons as described above. Following fixation with 4% (w/v) paraformaldehyde for 10 min, cells were washed in PBS, blocked with 3% (v/v) goat serum for 2 h, and then incubated overnight with the mouse TUJ1 antibody (1:2000 dilution; Chemicon International) at 4°C. After washing with PBS, Alexa Fluor[®] 488-conjugated anti-mouse secondary antibody (1:500 dilution; Invitrogen) was added for 2 h at room temperature (22°C) and then washed with PBS. Nuclei were dyed with Hoechst staining. The cells were visualized using a confocal Nikon Eclipse TE 2000-U microscope and were analysed with ACT-1 software (Nikon).

Plasmid constructs

We previously cloned a 1.9 kb genomic DNA fragment digested with SstI containing 1817 bp of the 5'-regulatory region from the chicken *Grin1* gene and 86 bp of 5'-UTR into the pGL3-Basic plasmid expressing the firefly luciferase gene as a reporter (Promega). [12]. This construct was used to generate five additional DNA restriction enzyme deletion constructs. This plasmid was digested with SmaI to generate a construct containing only 51 bp of the 5'-flanking regulatory region. All of the other constructs were generated by digestion with HindIII and the following enzymes: BamHI (to generate a –210 bp construct); PvuII (to produce a –334 bp construct); RsaI (to generate a –549 bp construct); and NcoI (to generate the –1237 bp construct). All constructs contained the first 86 bp of the 5'-UTR. The obtained DNA fragments were cloned into pGL3-Basic, amplified in *Escherichia coli* DH5 α cells and purified using anion-exchange gravity-flow columns (Qiagen) following the manufacturer's instructions.

All constructs were verified by DNA restriction-endonuclease mapping and DNA sequencing. The REST-VP16 plasmid was provided by Dr S. Majumder (Department of Molecular Genetics, M.D. Anderson Cancer Center, University of Texas, Houston, TX, U.S.A.) [21]. The pGL3 promoter containing the basal SV40 (simian virus 40) promoter was used as a positive transfection control.

Mutagenesis

Site-directed mutagenesis of the GSG-like-box, GSG/SP (GSG-like box near a SP-consensus site), S2 and N1 elements was performed using the QuikChange[®] site-directed mutagenesis kit (Stratagene) with the wild-type -210 bp *Grin1*-luciferase plasmid construct used as the DNA template and the designed synthetic mutated DNA oligonucleotide primers (see Table 1). Mutations were performed in the presence of 7.5% (v/v) DMSO because of the high T_m (melting temperature of DNA) value of the template, and reactions were performed as follows: 12 cycles of 30 s at 95 °C for denaturing, 60 s at the indicated annealing T_m , and 12 min at 68 °C for extension. Subsequently, template DNA was eliminated by digestion with DpnI (a methylation-sensitive DNA-restriction enzyme) and the newly synthesized mutated plasmids were transformed into *E. coli* DH5 α competent cells. The mutant plasmids were then amplified and purified using the endo-free plasmid purification kit (Qiagen) following the manufacturer's instructions. The mutations in the obtained plasmids were confirmed by automated DNA sequencing.

Transfection and luciferase assays

The P19 and PC12 stable-transfected cell lines were generated by co-transfecting the pGL3-*Grin1* 1817 bp construct and pCDNA3, which contains the Geneticin-resistance gene. Briefly, P19 and PC12 cells were grown for 2 weeks in the appropriate growth medium supplemented with 250 μ g/ml and 500 μ g/ml Geneticin respectively. Three different unique clone Geneticin-resistant colonies were selected from each cell line and tested for firefly luciferase activity. The stably transfected cell lines were induced to differentiate as described above, and firefly luciferase activity was measured at 24 h intervals. The results were normalized against total protein content and expressed as the ratio of firefly luciferase activity per mg of protein.

For transient-expression studies, co-transfections were performed using Lipofectamine[™] 2000 reagent (Invitrogen) following the manufacturer's protocol in serum-free DMEM, with 1 μ g of the chicken pGL3-*Grin1* constructs and 0.1 μ g of pRL-CMV (Promega) or REST-VP16 plasmid. Transfections were performed in undifferentiated P19 and PC12 cells and in primary culture cortical chicken neurons and then incubated for 3 h at 37 °C. Subsequently, the transfection medium was replaced with the appropriate growth medium and cells were incubated at 37 °C and 5% CO₂ for 24 h. Cells were lysed in passive lysis buffer (Promega) for 30 min and firefly and *Renilla* luciferase activities assays were performed using the dual-luciferase assay reagent kit (Promega) in a multiwell plate luminometer (Wallac Victor²,

PerkinElmer). Firefly luciferase activity was normalized using *Renilla* luciferase activity or total protein in the samples as indicated. Pharmacological treatments were performed after 24 h of transient transfection. Briefly, growth medium was supplemented with 100 nM mithramycin A and cells were maintained in supplemented medium for 16 h until the luciferase assay was performed as stated above.

EMSA

The DNA oligonucleotide sequences employed for the EMSAs are listed in Table 1. Nuclear extracts were prepared from undifferentiated and neuron-differentiated P19 and PC12 cells, as well as from primary cultures of E7 cortical chicken neurons as described previously [22]. Briefly, cells were lysed in a hypo-osmotic buffer containing 20 mM Hepes, 20% (w/v) glycerol, 10 mM NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM EDTA, 1 mM DTT (dithiothreitol) and 1 mM PMSF (pH 7.9) and incubated at 4 °C for 10 min. Then nuclei were pelleted and lysed in a hyper-osmotic buffer containing 20 mM Hepes, 20% (w/v) glycerol, 0.5 M NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 mM PMSF and 3.5 fmol dsDNA (double-strand DNA) oligonucleotides 5'-end labelled by T4 polynucleotide kinase and 1 μ l of [γ -³²P]ATP (6000 Ci/mmol; PerkinElmer) (pH 8.0). The DNA-protein binding reaction was performed in a buffer containing 50 mM Tris/HCl (pH 7.6) 20% (w/v) glycerol, 5 mM MgCl₂, 2.5 mM EDTA, 1 mM DTT and 1 mM PMSF, with 150 mM NaCl for NRSE (neuron-restrictive silencing element) oligonucleotides or with 300 mM NaCl for the other oligonucleotides. Briefly, 10 μ g of nuclear extract, 1 μ g of poly-dI/dC and a 100-fold excess of unlabelled dsDNA oligonucleotides were added for the DNA-competition assay as indicated, and 1 μ l of [³²P]-labelled dsDNA oligonucleotides were incubated at room temperature to allow DNA-protein binding. The mixture was incubated with 2 μ g of super-shift antibodies for NRSF (H-290), SP1 (PEP2 and H-225), TFIID (transcription factor IID; N-12) and EGR-1 (early growth-response gene product 1; C-20) (all from Santa Cruz Biotechnology). Reaction products were resolved by non-denaturing PAGE (5% gels) containing 3% (w/v) glycerol for 4 h at 20 mA. Gels were dried and exposed to X-Omat film (Kodak) at -80 °C for 12–72 h.

Sequence and statistical analyses

The nucleotide sequence of the 1.9 kb 5'-regulatory region of the chicken *Grin1*-luciferase gene construct has been reported previously [12] (see GenBank[®] Nucleotide Sequence Database accession number AY663367). *In silico* DNA-sequence analyses were performed using BLAST (National Center for Biotechnology Information), MacVector (Accelrys Software), MathInspector (Genomatix), Transfac (BioBase) and EMBOSS CpG Plot programs and algorithms. The results are means \pm S.E.M. ($n \geq 3$) and were analysed by one-way ANOVA and Dunnett's test using the Prism 4.0 program (GraphPad). $P < 0.05$ was considered to be statistically significant.

**Table 1** Oligonucleotides used for EMSAs and site-directed mutagenesis

The consensus core sequences of the elements are underlined and the mutated nucleotides are indicated in bold type. cs, consensus sequence; f, forward; m, mutation; r, reverse.

| Name | Sequence 5' → 3' |
|------------|--|
| SP cs f | 5'-ATTCGATCGGGCGGGGCGAGC-3' |
| SP cs r | 5'-GCTCGCCCGCCCGGATCGAAT-3' |
| SPm cs f | 5'-ATTCGATCGG TT CGGGGCGAGC-3' |
| SPm cs r | 5'-GCTCGCCCGAACCAGATCGAAT-3' |
| S2 f | 5'-AGCCGCGCGCGGGCGGAGCGGC-3' |
| S2 r | 5'-CCGCGCGCTCCGCCCGCCCGGCT-3' |
| S2m f | 5'-AGCCGCGCGC TT CGGAGCGGC-3' |
| S2m r | 5'-CCGCGCGCTCCGAACGCCCGGCT-3' |
| GSg/SP f | 5'-TCCCGCTGCCGCGGGGCGGGGCGCGGGGTGG-3' |
| GSg/SP r | 5'-CCCACCCCGGCGCCCGCCGGCCCGCGGCGAGCGGA-3' |
| GSg/SPm1 f | 5'-TCCCGCTGCC TT GGGCGGGGCGGGGTGG-3' |
| GSg/SPm1 r | 5'-CCCACCCCGGCGCCCGCCGGCCCAAGCGGCGAGCGGA-3' |
| GSg/SPm2 f | 5'-TCCCGCTGCCGCGGGGCGGG TT CGGGCGGGGTGG-3' |
| GSg/SPm2 r | 5'-CCCACCCCGGCGCCGAACCGCCCGCGGCGAGCGGA-3' |
| NRSE cs f | 5'-GCCAAACACGCTCAGCACCTCGGACAGCATCCGCCGCG-3' |
| NRSE cs r | 5'-GCGCGCGGATGCTGTCGAGGTGCTGAAGCGTGTGGC-3' |
| NRSEm cs f | 5'-GCCAAACACGCT CTGTA CTCGGACAGCATCCGCCGCG-3' |
| NRSEm cs r | 5'-GCGCGCGGATGCTGTCGAGGTACGAAGCGTGTGGC-3' |
| N1 f | 5'-GAGCGGGAGGTT CAGC CAAGAGAGCTCCCGCGCGC-3' |
| N1 r | 5'-GCGCGCGGGGAGCTCTCTTGGTGTGAACCTCCGCTC-3' |
| N1m f | 5'-GAGCGGGAGG TTCTGTA CAAGAGAGCTCTTACGCTGC-3' |
| N1m r | 5'-GCACGCGTAAGACTCTCTTGGTACGAACTCCGCTC-3' |
| N2 f | 5'-CGCGCGCGGGGAGCGCGCGGAGCGGGAGGTTCA-3' |
| N2 r | 5'-TGAACCTCCGCTCCGCTCCGCGCGCTCCGCCCGCCGCG-3' |
| N3 f | 5'-CGTCGCG CAGC CGGGGCGCGAGCGGGAGGAGCGCGG-3' |
| N3 r | 5'-CCGCCGCTCTCCGCTCCCGCCCGCGCTGCCGAGCG-3' |

RESULTS

Grin1 gene transcription increases along neuronal differentiation

To analyse the pattern of transcriptional activity of the chicken *Grin1* gene during neuronal differentiation, we used the pluripotent P19 cells [23] and the neuron-committed PC12 cells [24] as two cellular models of neuronal differentiation. We generated stable transfectants of both cell lines by expressing a chimaeric *Grin1*-luciferase gene construct containing 1.9 kb of the chicken *Grin1* gene 5'-regulatory region subcloned into pGL3-Basic [12]. To confirm that the two neuronal-differentiation models were working properly, we assessed the expression of β -tubulin III in P19 and PC12 cells in the undifferentiated and neuronal-differentiated stages using immunocytochemistry. The results showed that although undifferentiated P19 cells did not express β -tubulin III, following the induction of differentiation by retinoic acid, a progressive increase in the expression of the protein was observed from day 5 to day 7 (Figure 1A). In contrast, β -tubulin III expression was observed in undifferentiated PC12 cells, and increased progressively up to the sixth day following NGF-induced neuronal differentiation (Figure 1C).

The P19 stable-transfectant cells showed low transcriptional activity in the undifferentiated stage, which increased starting on the fifth day after retinoic-acid-induced neuronal differentiation, reaching an 8-fold increase in stimulation by the eighth day of treatment (Figure 1B). In PC12 stable-transfectant cells, NGF-induced differentiation promoted a 4- to 5-fold increase in transcriptional activity after 2 days and then reaching a steady state from between 3 and 6 days (Figure 1D).

Functional analysis of the chicken *Grin1* gene 5'-regulatory region

The functional analysis of the chicken *Grin1* gene 5'-regulatory region was performed by transient transfection of pGL3-*Grin1* deletion constructs into primary cultures of chicken cortical neurons. The constructs contained 51 bp, 210 bp, 334 bp, 549 bp, 1237 bp and 1817 bp of the upstream 5'-regulatory region, as well as 86 bp of the 5'-UTR fused to a reporter firefly luciferase gene. To define the basal chicken *Grin1* gene promoter, we analysed the transcriptional activity of the constructs in chicken cortical neurons at E7. Figure 2(A) shows that the *Grin1*-luciferase construct containing only 51 bp upstream from the transcription initiation site did not exhibit transcriptional activity, whereas the

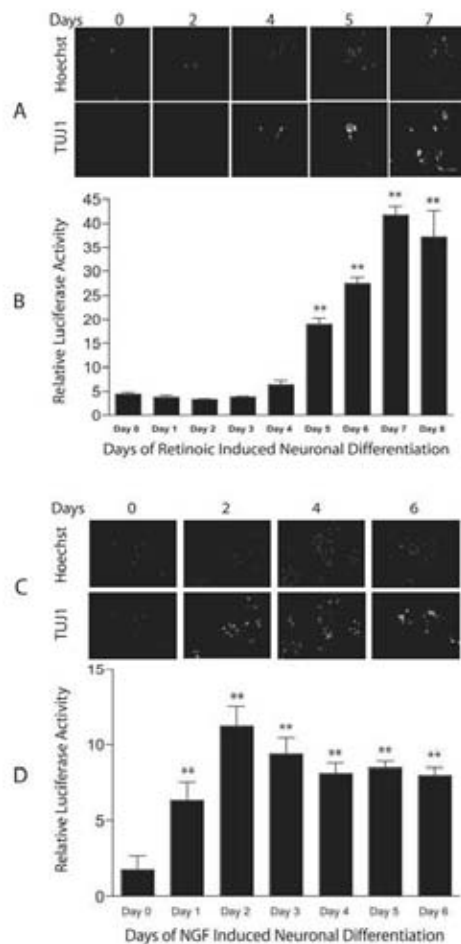


Figure 1 Transcription of the chicken *Grin1* gene is up-regulated during neuronal differentiation of P19 and PC12 cells

(A) Immunocytochemistry of β -tubulin III expression in P19 cells during 0, 2, 4, 5 and 7 days of retinoic-acid-induced neuronal differentiation. A β -tubulin III antibody (TUJ1) labelled with FITC and Hoechst stain to dye the nuclei was used. (B) Stable transfectants in P19 cells containing 1.9 kb of the chicken *Grin1* gene 5'-regulatory region driving the expression of the firefly luciferase gene were induced to differentiate into neurons by treatment with retinoic acid for 8 days. Luciferase activity and total protein amount was measured every 24 h. The results are expressed as the ratio of luciferase activity/total protein. ** $P < 0.01$. (C) Immunocytochemistry of β -tubulin III expression in PC12 cells during 0, 2, 4 and 6 days of NGF-induced neuronal differentiation. A β -tubulin III antibody (TUJ1) labelled with FITC and Hoechst stain to dye the nuclei was used. (D) Stable-transfected PC12 cells containing the 1.9 kb of the chicken *Grin1* gene 5'-regulatory region were induced to differentiate into neurons by treatment with NGF for 6 days. Luciferase activity and total protein amount were measured every 24 h. The results are expressed as the ratio of luciferase activity/total protein. ** $P < 0.01$.

construct containing 210 bp showed significant transcriptional activity in cortical neurons. The 334 bp and 549 bp constructs showed 2–2.5-fold higher transcriptional activity compared with the 210 bp *Grin1*-luciferase construct. In contrast, the 1237 bp *Grin1*-luciferase construct showed a decrease in transcriptional activity by 30% compared with the 549 bp construct, whereas the 1815 bp construct induced a 2-fold increase in activity similar to that induced by the 549 bp *Grin1*-luciferase construct (Figure 2A).

In silico analysis of the chicken *Grin1* gene 5'-regulatory region

To understand the role played by transcription factors in the transcriptional activity of the chicken *Grin1* gene promoter, we performed *in silico* comparative analyses of the proximal chicken *Grin1* gene 5'-regulatory region sequence with their counterparts in human, rat and mouse. Figure 2(B) shows the nucleotide alignment of the DNA sequence of the proximal 210 bp of the 5'-regulatory region and 86 bp of 5'-UTR of the chicken *Grin1* gene aligned with the 5'-regulatory region of the rat, mouse and human genes. It is revealed that there is a low overall nucleotide-sequence similarity (31%) among species (Figure 2B). The DNA-sequence analysis shows that the proximal 5'-flanking region of the chicken *Grin1* promoter is highly GC-rich (90%) and contains a CpG-dinucleotide island that spans 397 bp of the 5'-flanking genomic region, including the proximal promoter and the 5'-UTR (Figure 2C). Interestingly, although nucleotide similarity among species is low, conservation of the consensus DNA-binding sites for related transcription factors in the 5'-flanking region between mammals and birds is evident. As in the case of mammalian *Grin1* gene promoters, the chicken *Grin1* gene 5'-regulatory region does not possess a consensus TATA box, it instead has a putative GSG-like-box and one SP site at –14 bp to –30 bp upstream from the main transcription-initiation site (Figure 2B). It has been proposed that these sites play an equivalent role in recruiting basal transcription factors for RNA-polymerase-II-mediated transcription [25,26]. Analysis of the 5'-UTR of the *Grin1* genes revealed the presence of putative binding elements for NRSF and SP transcription factors (Figures 2B and 2C). The chicken *Grin1* gene constructs contain two consensus SP-binding sites (named S1 and S2) and three putative NRSEs (named N1, N2 and N3) in the 5'-UTR.

DNA-protein interaction of the NRSE and SP elements located in the 5'-UTR

To determine whether the putative NRSE and SP elements have DNA-protein-binding properties we performed EMSAs using wild-type and mutated synthetic dsDNA oligonucleotides designed for these sites (Table 1). We found that of the three putative NRSE sites (N1, N2 and N3), only the N1 element located in the 5'-UTR bound NRSF specifically (results not shown). Figure 3(A) shows the competition assays using the N1-oligonucleotide probe and nuclear extracts from undifferentiated P19 cells. As a positive control, we used an NRSE-consensus sequence from the rat *Grin1* gene [9] (see Table 1). Two

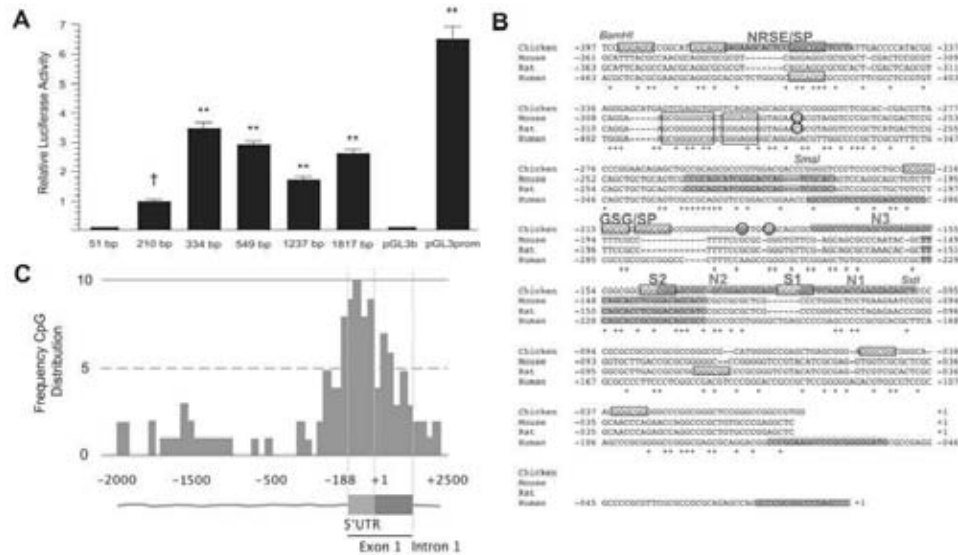


Figure 2 Functional and *in silico* analysis of the chicken *Grin1* gene 5'-regulatory region. (A) The chimaeric chicken 5'-flanking region *Grin1*-luciferase constructs that contain 51 bp, 210 bp, 334 bp, 549 bp, 1237 bp and 1817 bp of the 5'-regulatory region and 86 bp of the 5'-UTR were transiently transfected into E7 primary cortical neurons in culture. The results are expressed as the ratio of firefly/*Renilla* luciferase activities. Statistical significance was determined relative to the -210 bp *Grin1*-luciferase construct and ANOVA with Dunnett's analysis was performed (** $P < 0.01$). †, statistically significant relative to the 210 bp construct. (B) Nucleotide comparison of the *Grin1* gene regulatory region among human, rat, mouse and chicken shows a conserved pattern of transcription-factor-binding sites among species. The chicken *Grin1* gene nucleotide sequence shown has been previously reported (GenBank® nucleotide database sequence accession number AY663367) [12]. Nucleotide similarity among chicken, human, rat and mouse is indicated by asterisks (*). The putative SP sites and GSG-like-box are boxed, and the putative NRSEs are shaded grey. The transcription initiation sites described previously for the *Grin1* genes are circled [10–13]. Position +1 in the sequences corresponds to the translation initiation site. (C) The complete *Grin1* gene and regulatory-region sequence were analysed for the presence of a CpG dinucleotide island using EMBOSS CpG Plot and MacVector. The CpG dinucleotide distribution within the sequence is plotted and reveals the presence of a CpG island spanning the chicken *Grin1* gene 5'-flanking sequence. The structure of the genomic region is represented below the plot.

high-molecular-mass DNA-protein complexes were observed with both probes, and were specifically competed by a 100-fold molar excess of the unlabelled dsDNA consensus and N1 probes. These complexes were competed when a NRSF-specific antibody was added to the binding reaction. In contrast, when we used nuclear extracts from neuron-differentiated PC12 and P19 cells, and primary cultures of E7 chicken cortical neurons, no DNA-protein complexes were observed (Figure 3), probably as a result of a low abundance of NRSF in the nuclear extracts.

The two putative SP-factor-binding sites present in the 5'-UTR of the -210 bp construct were also examined. Figure 4(A) shows that the SP-consensus oligonucleotide and the S2 oligonucleotide formed three main DNA-protein complexes (a, b and c) with nuclear extracts from undifferentiated P19 and PC12 cells and from E7 chicken cortical neurons (Figures 4B–4D), and they were specifically competed by a 100-fold molar excess of the SP consensus and S2-unlabelled dsDNA probes. The two lower-molecular-mass DNA-protein complexes (b and c) were super-shifted when the SP3 antibody was added to the binding reaction

(d), and were not super-shifted upon the addition of the SP1 or SP4 antibodies (Figure 4). When nuclear extracts from E7 chicken cortical neurons were tested, addition of the SP3 antibody specifically competed against the complex (Figure 4B). Addition of the SP1 antibody to the binding reactions did not compete the DNA-protein complexes formed using nuclear extracts from undifferentiated P19 and PC12 cells, but partially competed the upper complexes (a and b) formed when using nuclear extracts from chicken cortical neurons.

Mutations of the N1 and S2 elements release transcriptional repression in undifferentiated P19 and PC12 cells

We demonstrated by EMSA that NRSF interacts with a NRSE element present in the 5'-UTR and in the proximal chicken *Grin1* gene promoter. Because the NRSF has been shown to play an important role in the transcriptional regulation of different neuronal gene promoters, including the rat *Grin1* gene, we generated

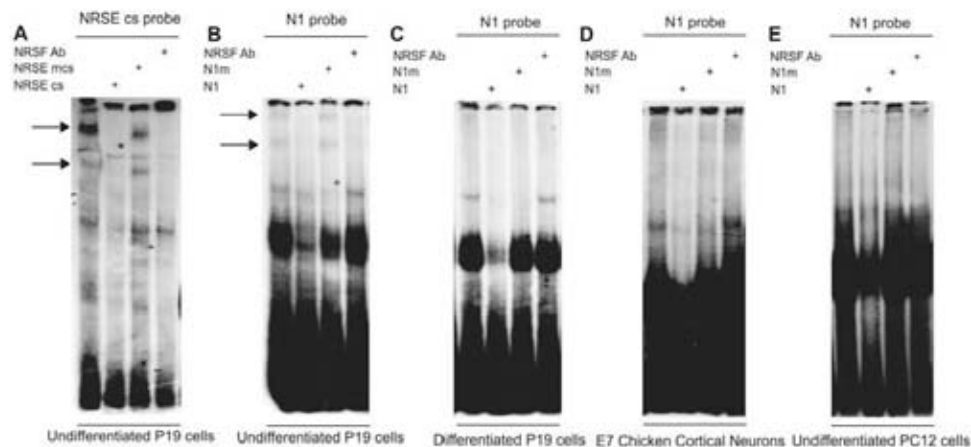


Figure 3 NRSF binds to the NRSE (N1) site present in the 5'-UTR of the chicken *Grin1* gene
 (A and B) Nuclear extracts obtained from undifferentiated P19 cells were incubated with a ³²P-labelled NRSE consensus dsDNA oligonucleotide probe from the rat *Grin1* gene [9], and the NRSE site (N1) of the chicken *Grin1* gene. Two slowmigrating DNA-protein complexes were observed with both probes and specifically competed with a 100-fold molar excess of the N1-unlabelled probe (NRSE cs), but not with the N1m probe (NRSE mcs). The DNA-protein complexes were competed with the NRSF antibody (NRSF Ab). The two high-molecular-mass complexes were not observed with nuclear extracts from differentiated P19 cells (C), E7 chicken cortical neurons (D) or undifferentiated PC12 cells (E).

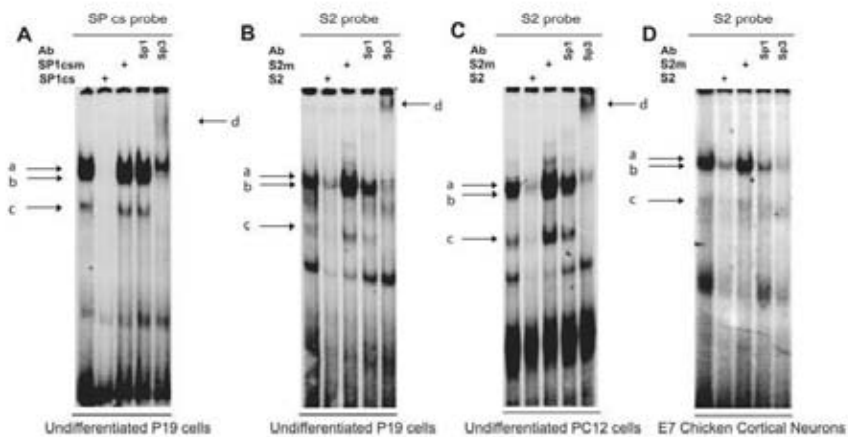


Figure 4 SP3 factor binds to the SP element (S2) present in the 5'-UTR of the chicken *Grin1* gene
 (A) EMSA analysis of the ³²P-labelled SP1 consensus dsDNA oligonucleotide probe (see Table 1) when incubated with nuclear extracts from undifferentiated P19 cells. Three major complexes were observed and competed with 100-fold molar excess of the unlabelled SP1-consensus probe (SP1cs), but were not competed with the SP1m probe (SP1esm). The two lower-molecular-mass complexes were super-shifted when 1 µg of the SP3 antibody was added to the binding reaction, but not with the SP1 and SP4 antibodies. The chicken *Grin1* gene SP1 dsDNA oligonucleotide (S2) was incubated with nuclear extracts from undifferentiated P19 cells (B), undifferentiated PC12 cells (C) or E7 chicken cortical neurons (D). With all cell extracts, the three upper complexes observed (a, b and c) were competed with 100-fold molar excess of the S2-unlabelled probe, but were not competed by the S2m probe. The complexes a and b were super-shifted by the SP3 antibody, but not with the SP1 antibody in undifferentiated P19 and PC12 cells. With E7 chicken cortical neuron extracts, SP1 and SP3 antibodies competed with the complex (D). Ab, antibody.



mutant constructs by site-directed mutagenesis to test their functional activity *in vivo*. To test the functionality of the N1 site, the -210 bp construct with a N1m (mutated N1 site) was transiently transfected into undifferentiated P19 cells. Figure 5 shows that the transcriptional activity of the N1m construct was 4-fold higher compared with the wild-type -210 bp construct. In addition, the transcriptional activity of the N1m construct in neuronal-lineage-committed PC12 cells that lack the NRSF was only slightly increased (30%) compared with the wild-type construct. Finally, in E7 chicken cortical neurons, the N1m construct activity was 2-fold higher compared with the -210 bp control construct.

To examine in more detail the role of NRSF in the transcription of the chicken *Grin1* gene, we performed co-transfection of the -210 bp construct and a plasmid expressing REST-VP16, which is a negative competitor of endogenous NRSF [21,27]. The results showed a strong transactivation of the chicken -210 bp *Grin1* construct in undifferentiated P19 cells (8-fold), PC12 cells (20-fold) and in E7 chicken cortical neurons (16-fold) (Figures 5A–5C).

The function of the chicken *Grin1* gene S2 element was also evaluated. Surprisingly, Figure 5 shows that transient transfection of the S2m (S2 mutated construct) into undifferentiated P19 cells increased the promoter activity 6-fold, whereas in PC12 cells, transcriptional activity was increased 2-fold over the control wild-type plasmid and, in E7 chicken neurons, S2m activity was 4-fold higher than observed for the control plasmid.

To complement the results observed by transient transfection using the -210 bp S2m, we used mithramycin A, a drug that interferes with binding of transcription factors to GC-rich elements. The results confirm that treatment of undifferentiated P19 cells with 100 nM mithramycin A for 16 h increased 2-fold the transcriptional activity of the -210 bp *Grin1*-luciferase gene construct (Figure 5D).

The proximal promoter SP site activates transcription of the chicken *Grin1* gene

The chicken *Grin1* gene proximal promoter region contains a GSG/SP at position -14 to -30 bp instead of a classical TATA box (see Figure 2 and Table 1). Therefore we investigated the role of the GSG-like-box and the adjacent SP site. First, we explored the protein-binding capabilities of the GSG/SP site. EMSAs performed using the GSG/SP probe showed the formation of a specific DNA-protein complex that was competed with a 100-fold molar excess of the unlabelled GSG/SP probe, but not with the GSG/SPm2 (GSG/SP mutated in the SP site) probe (Figure 6A). In addition, the complex was also competed by the GSG/SPm1 (GSG/SP mutated in the putative core GSG site) probe (results not shown). The GSG/SP complex observed was super-shifted with the SP3 antibody, but not by the SP1, SP4, TFIID and EGR-1 antibodies (Figure 6A). The complex was not formed with nuclear extracts of undifferentiated P19 or PC12 cells (Figures 6B and 6C).

To assess the functionality of the GSG/SP site, we generated two mutants of these sites using the -210 bp *Grin1*-luciferase

constructs GSG/SPm1 and GSG/SPm2. The constructs were transiently transfected into undifferentiated P19 cells and PC12 cells, and into E7 chicken cortical neurons. The GSG/SPm1 construct did not significantly change the transcriptional activity compared with the wild-type construct (Figure 7). The transcriptional activity of GSG/SPm2 did not change in undifferentiated P19 and PC12 cells, but was decreased by 50% compared with the wild-type construct in cortical neurons (Figure 7). These results are in agreement with the lack of binding activity of the GSG/SP DNA probe using nuclear extracts of undifferentiated P19 and PC12 cells.

DISCUSSION

The understanding of the molecular mechanisms that control the expression of NMDA receptors is essential for determining the role played by glutamate in normal neuronal processes and under pathological conditions. Furthermore, the identification of the conserved transcriptional mechanisms among mammals and birds could provide more insight into the regulation of gene expression among species [28]. However, to date, there are no studies on the transcriptional regulation of glutamate receptor genes in birds. Thus the aim of the present study was to investigate, for the first time, the mechanisms involved in the transcriptional regulation of the chicken *Grin1* gene.

In agreement with previous findings using the rat *Grin1* gene promoter constructs [9], the 1.9 kb construct displayed a low transcriptional activity in undifferentiated P19 cells, and this was significantly increased during neuronal differentiation after 8 days of retinoic acid treatment. Similarly, the transcriptional activity of the chimaeric *Grin1*-luciferase gene in PC12 cells was up-regulated during NGF-induced neuronal differentiation. These results support the hypothesis that *Grin1* gene expression is repressed in undifferentiated cells and suggest that transcriptional activation of the *Grin1* gene during neuronal differentiation occurs by removing such repression.

We identified consensus DNA sequences for regulatory elements that may drive *Grin1* gene expression within the first 210 bp of the 5'-regulatory region. *In silico* analysis of the proximal 5'-regulatory region of the cloned *Grin1* genes showed that the organization pattern of transcription-binding sites within this region is conserved, despite the overall low DNA sequence similarity among species (31%). The 5'-regulatory regions of human, mouse and rat *Grin1* have been shown to include putative *cis*-elements, such as NRSE, SP and a GSG-like-box in a similar distribution, although in distinct locations [29]. In addition, these elements are also present in other glutamate receptor genes [30], such as *Grin2a* [9], *Grik5* [31] and *Grm1* [32]. Consistent with these findings, we demonstrated that the *Grin1* gene proximal 5'-regulatory region that includes the 5'-UTR exhibits a pattern of *cis*-elements encompassing putative binding sites for NRSF- and SP-transcription factors, as well as a GSG-like-box that allows

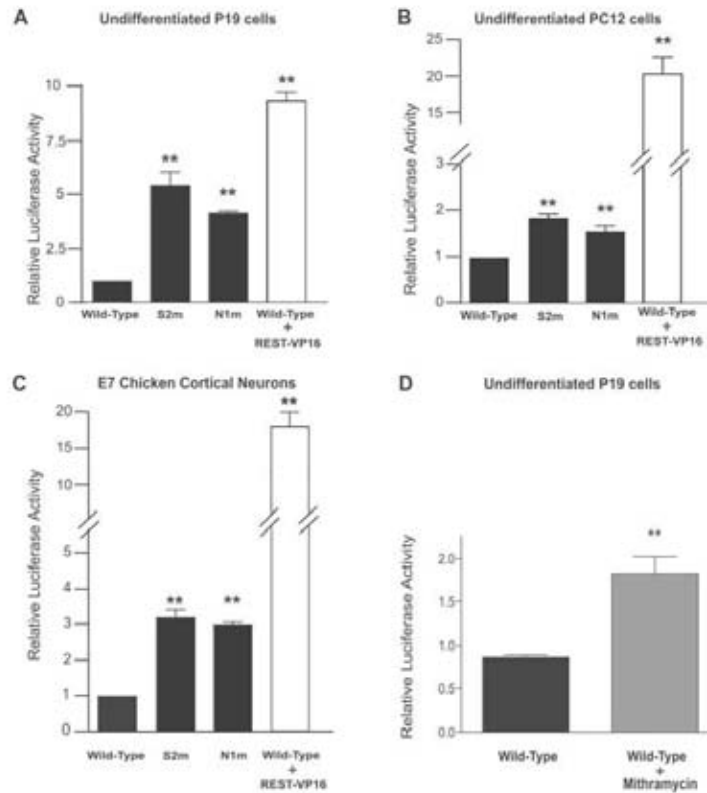


Figure 5 Mutagenic analysis of the functional SP and NRSE sites

Site-directed mutagenesis of the SP site S2 (S2m) and N1 (N1m) sites was performed as described in the Experimental section. The mutated *Grin1* gene chimaeric constructs were transiently transfected into undifferentiated P19 cells (A), undifferentiated PC12 cells (B) and E7 chicken cortical neurons (C). The white bars represent the transcriptional activity observed when the wild-type -210 bp *Grin1*-luciferase construct was co-transfected with the REST-VP16 plasmid and Dual-luciferase assays were performed as described in the Experimental section. The results are expressed as a ratio of the firefly/*Renilla* luciferase activities. Statistical significance is relative to the -210 bp *Grin1*-luciferase wild-type construct and was used as a control. ANOVA with Dunnett's test was performed (* $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$). (D) Undifferentiated P19 cells were transiently transfected with the -210 bp *Grin1*-luciferase construct as described in the Experimental section. The cells were maintained with medium supplemented with 100 nM mithramycin A for 16 h. Luciferase assays were then performed on cell extracts and the total protein amount was measured. The results are the ratio of luciferase activity/ total protein. Statistical significance is relative relative to the control (wild-type) and ANOVA with Dunnett's test was performed (** $P < 0.01$).

the formation of the pre-initiation complex required for *Grin1* gene transcription in the absence of a TATA box [25].

Because SP factors are expressed in a diversity of cell types, silencing of *Grin1* gene expression by transcriptional repression in undifferentiated and non-neuronal cells is required to maintain their cell-type specific phenotype. It has been shown previously that NRSF represses transcription of the rat *Grin1* gene in undifferentiated P19 cells [9]. Moreover, NRSF can repress SP1 transcriptional activation by recruitment of the TFIID C-terminal region, which leads to inhibition of transcription by preventing

the assembly of the pre-initiation transcriptional complex [33,34]. NRSF has been shown to repress neuron-specific gene expression [18] in both non-neuronal and undifferentiated cells by recruitment of HDAC (histone deacetylase complex) by mSin3A/B to the N-terminal and by CoREST (co-repressor element-silencing transcription factor) to C-terminal [35,36]. However, transcriptional repression may also be achieved through the inhibition of SP1, direct inhibition of the TATA-binding protein [33], or by the recruitment of small CTD (C-terminal domain) phosphatases that inhibit transcription driven by RNA polymerase

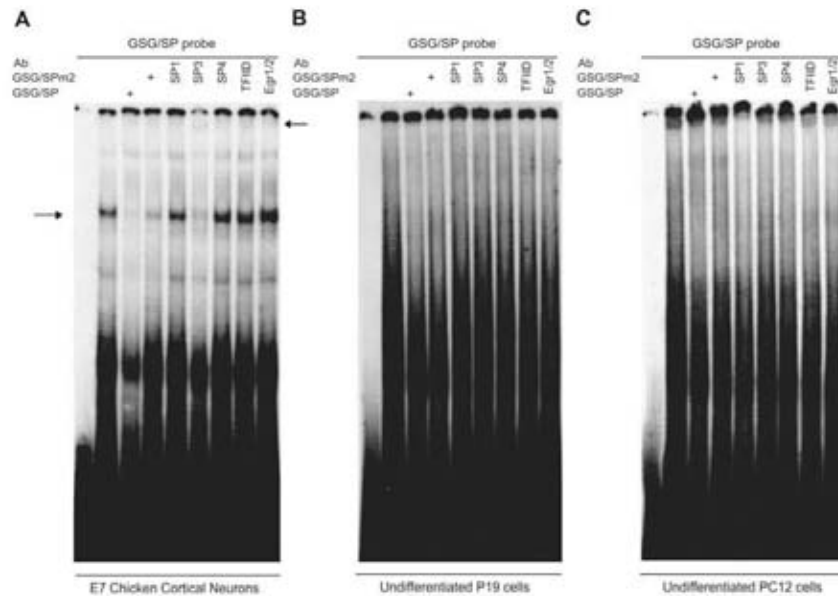


Figure 6 The SP3 factor binds to the GSG/SP site present in the promoter
Nuclear extracts from E7 chicken cortical neurons (A), undifferentiated P19 cells (B) and undifferentiated PC12 cells (C) were incubated with ³²P-labelled GSG/SP probe. In neuronal nuclear extracts, one complex was competed with 100-fold molar excess of the unlabelled wild-type GSG/SP probe, but was not competed by the GSG/SPm2 probe. The DNA-protein complex was super-shifted when the SP3 antibody was added to the binding reaction, but not when the SP1, SP4, TFIIID and EGR-1 (Egr1/2) antibodies were added to the reaction. With undifferentiated P19 and PC12 cells, no complexes were formed. Ab, antibody.

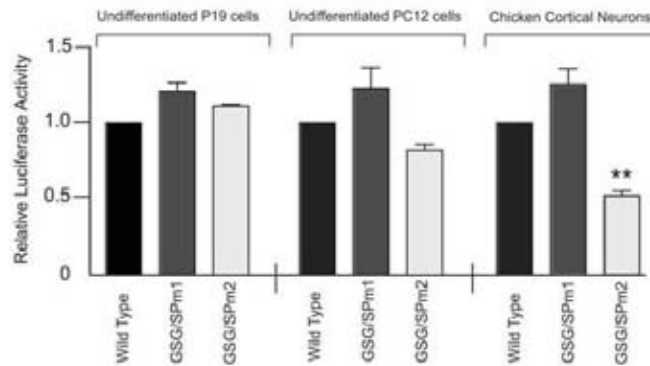


Figure 7 Mutagenic analysis of the GSG/SP site
Site-directed mutagenesis of the GSG site (GSG/SPm1) and the SP site near the GSG element (GSG/SPm2) sites was performed as described in the Experimental section. The mutated *Grin1* gene chimaeric constructs were transiently transfected into undifferentiated P19 cells, undifferentiated PC12 cells and E7 chicken cortical neurons. Dual-luciferase assays were performed. The results are expressed as the ratio of firefly/*Renilla* luciferase activity. Statistical significance was determined relative to the -210 bp *Grin1*-luciferase wild-type construct and was used as a control. ANOVA with Dunnett's test was performed (***P* < 0.01).

II [37]. In the present study, the results clearly show that NRSF-mediated transcriptional repression of the chicken *Grin1* gene depends on the cell type as well on the stage of neuronal differentiation. The *Grin1* gene transcriptional repression in pluripotent undifferentiated P19 cells requires NRSF repression, but also requires other repressor mechanisms. The neuronal-lineage-committed PC12 cell line lacks expression of NRSF and thus needs NRSF-independent mechanisms of gene repression.

It has been described that some SP factors can function either as activators or as repressors of gene transcription [38,39], playing a main role in transcriptional regulation [40]. SP-mediated transcriptional repression might proceed by titration of one or more promoter-specific transacting factors [41], by recruitment of HDACs [42] or by interaction with a methylation-specific binding protein [43]. Additionally, SP-mediated repression might also depend on the number of SP-binding sites present on the promoter [44]. In the present study, we show that repression of the chicken *Grin1* gene is also mediated by binding of SP3 to the S2 element, and that repression depends on the cell type and on the stage of neuronal differentiation. In agreement with recent studies showing that the interaction of SP3 with NRSF results in transcriptional repression [45], our results suggest that SP3 and NRSF could form a repressor complex in the chicken *Grin1* gene 5'-UTR, blocking the initiation of transcription.

We used EMSA and functional analyses of wild-type and mutated constructs to show that SP3 activates the transcriptional activity of a proximal promoter chicken *Grin1* gene construct by binding to GSG/SP located in the 5'-proximal promoter region. These results are in agreement with the finding that the SP family of transcription factors positively regulate rat *Grin1* gene promoter transcription by the direct interaction of SP factors with GC-rich elements [14,16,17]. In the present study, we found that the SP3 transcription factor plays a dual role in transcriptional regulation of the chicken *Grin1* gene. Previous reports have demonstrated that post-translational modification of SP factors, such as SUMOylation [46], acetylation [47] and phosphorylation [48], could modify the function of these factors in the transcriptional regulation of genes, supporting the dual role of SP3 in the regulation of gene expression. However, it is not known whether these post-translational modifications regulate the function of SP1 and SP3 in the process of neuronal differentiation, and this requires further study.

In conclusion, results from the present study demonstrate that the chicken *Grin1* gene transcription is up-regulated during neuronal differentiation, and is repressed in undifferentiated P19 and PC12 cells by binding of NRSF and SP transcription factors to the proximal promoter and 5'-UTR. We speculate that these factors are probably assembled as a strong repressor complex, which inhibits the transcription of the *Grin1* gene in the undifferentiated cells. During the neuronal differentiation process NRSF transcriptional repression ends, resulting in the proximal promoter GSG/SP site binding to SP3, up-regulating the transcription of this gene. However, further studies are required for a better understanding of the precise epigenetic and transcriptional mechanisms involved in the transcriptional repression of the *Grin1* gene in non-neuronal and pluripotent cells.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by a grant from the Programa de Apoyo para la Investigación y la Innovación Tecnológica, Universidad Nacional Autónoma de México (No. IN206706 to A. Z.-H.) and by grants from the Secretaría de Educación Pública, Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (No. 42801 to A. Z.-H. and No. 42640-Q to A. L.-C.). We thank Dr S. Majumder (Department of Molecular Genetics, M.D. Anderson Cancer Center, University of Texas, Houston, TX 77030, U.S.A.) for the REST-VP16 plasmid and Dr Iván Velasco (Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Distrito Federal, 04510, México) for the β -tubulin III antibody.

REFERENCES

- Dingledine, R., Borges, K., Bowie, D. and Traynelis, S. F. (1999) The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol. Rev.* 51, 7-61
- Kemp, J. A. and McKernan, R. M. (2002) NMDA receptor pathways as drug targets. *Nat. Neurosci.* 5 (Suppl.), 1039-1042
- Hollmann, M. and Heinemann, S. (1994) Cloned glutamate receptors. *Annu. Rev. Neurosci.* 17, 31-108
- Madden, D. R. (2002) The structure and function of glutamate receptor ion channels. *Nat. Rev. Neurosci.* 3, 91-101
- Cull-Candy, S. G. and Leszkiewicz, D. N. (2004) Role of distinct NMDA receptor subtypes at central synapses. *Science STKE* 2004, RE16
- Taylor, S., Srinivasan, B., Wordinger, R. J. and Roque, R. S. (2003) Glutamate stimulates neurotrophin expression in cultured Muller cells. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 111, 189-197
- Liu, A., Prenger, M. S., Norton, D. D., Mei, L., Kusiak, J. W. and Bai, G. (2001) Nerve growth factor uses Ras/ERK and phosphatidylinositol 3-kinase cascades to up-regulate the N-methyl-D-aspartate receptor 1 promoter. *J. Biol. Chem.* 276, 45372-45379
- Monyer, H., Burnashev, N., Laurie, D. J., Sakmann, B. and Seeburg, P. H. (1994) Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron* 12, 529-540
- Bai, G., Zhuang, Z., Liu, A., Chai, Y. and Hoffman, P. W. (2003) The role of the RE1 element in activation of the NR1 promoter during neuronal differentiation. *J. Neurochem.* 86, 992-1005
- Zimmer, M., Fink, T. M., Franke, Y., Lichter, P. and Spiess, J. (1995) Cloning and structure of the gene encoding the human N-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR1). *Gene* 159, 219-223
- Bai, G. and Kusiak, J. W. (1993) Cloning and analysis of the 5' flanking sequence of the rat N-methyl-D-aspartate receptor 1 (NMDAR1) gene. *Biochim. Biophys. Acta* 1152, 197-200
- Zarain-Herzberg, A., Lee-Rivera, I., Rodriguez, G. and Lopez-Colome, A. M. (2005) Cloning and characterization of the chick NMDA receptor subunit-1 gene. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 137, 235-251
- Okamoto, S., Sherman, K. and Lipton, S. A. (1999) Absence of binding activity of neuron-restrictive silencer factor is necessary, but not sufficient for transcription of NMDA receptor subunit type 1 in neuronal cells. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 74, 44-54
- Bai, G. and Kusiak, J. W. (1995) Functional analysis of the proximal 5'-flanking region of the N-methyl-D-aspartate receptor subunit gene, NMDAR1. *J. Biol. Chem.* 270, 7737-7744



- 15 Bai, G. and Kusiak, J. W. (1997) Nerve growth factor up-regulates the N-methyl-D-aspartate receptor subunit 1 promoter in PC12 cells. *J. Biol. Chem.* 272, 5936–5942
- 16 Liu, A., Hoffman, P. W., Lu, W. and Bai, G. (2004) NF- κ B site interacts with Sp factors and upregulates the NR1 promoter during neuronal differentiation. *J. Biol. Chem.* 279, 17449–17458
- 17 Okamoto, S., Sherman, K., Bai, G. and Lipton, S. A. (2002) Effect of the ubiquitously expressed transcription factors, Sp1 and MAZ, on NMDA receptor subunit type 1 (NR1) expression during neuronal differentiation. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 107, 89–96
- 18 Ballas, N., Grunseich, C., Lu, D. D., Speh, J. C. and Mandel, G. (2005) REST and its corepressors mediate plasticity of neuronal gene chromatin throughout neurogenesis. *Cell* 121, 645–657
- 19 Bai, G., Norton, D. D., Prenger, M. S. and Kusiak, J. W. (1998) Single-stranded DNA-binding proteins and neuron-restrictive silencer factor participate in cell-specific transcriptional control of the NMDAR1 gene. *J. Biol. Chem.* 273, 1096–1091
- 20 Bruce, A. W., Donaldson, I. J., Wood, I. C., Yerbury, S. A., Sadowski, M. I., Chapman, M., Gottgens, B. and Buckley, N. J. (2004) Genome-wide analysis of repressor element 1 silencing transcription factor/neuron-restrictive silencing factor (REST/NRSF) target genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 10458–10463
- 21 Watanabe, Y., Kameoka, S., Gopalakrishnan, V., Aldape, K. D., Pan, Z. Z., Lang, F. F. and Majumder, S. (2004) Conversion of myoblasts to physiologically active neuronal phenotype. *Genes Dev.* 18, 889–900
- 22 Paradar, P. N. and Roth, J. A. (2006) Nitric oxide transcriptionally down-regulates specific isoforms of divalent metal transporter (DMT1) via NF- κ B. *J. Neurochem.* 96, 1768–1777
- 23 McBurney, M. W. and Rogers, B. J. (1982) Isolation of male embryonal carcinoma cells and their chromosome replication patterns. *Dev. Biol.* 89, 503–508
- 24 Greene, L. A. and Tischler, A. S. (1976) Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 73, 2424–2428
- 25 Javahery, R., Khachi, A., Lo, K., Zenzie-Gregory, B. and Smale, S. T. (1994) DNA sequence requirements for transcriptional initiator activity in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* 14, 116–127
- 26 Kaufmann, J. and Smale, S. T. (1994) Direct recognition of initiator elements by a component of the transcription factor IID complex. *Genes Dev.* 8, 821–829
- 27 Immaneni, A., Lawinger, P., Zhao, Z., Lu, W., Rastelli, L., Morris, J. H. and Majumder, S. (2000) REST/VP16 activates multiple neuronal differentiation genes in human NT2 cells. *Nucleic Acids Res.* 28, 3403–3410
- 28 Consortium, C. G. (2004) Sequence and comparative analysis of the chicken genome provide unique perspectives on vertebrate evolution. *Nature* 432, 695–716
- 29 Mejia-Guerra, M. K. and Lareo, L. R. (2005) *In silico* identification of regulatory elements of GRIN1 genes. *OMICS* 9, 106–115
- 30 Myers, S. J., Dingledine, R. and Borges, K. (1999) Genetic regulation of glutamate receptor ion channels. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 39, 221–241
- 31 Chew, L. J., Yuan, X., Scherer, S. E., Qie, L., Huang, F., Hayes, W. P. and Gallo, V. (2001) Characterization of the rat GRIK5 kainate receptor subunit gene promoter and its intragenic regions involved in neural cell specificity. *J. Biol. Chem.* 276, 42162–42171
- 32 Crepaldi, L., Lackner, C., Corti, C. and Ferraguti, F. (2007) Transcriptional activators and repressors for the neural-specific expression of a metabotropic glutamate receptor. *J. Biol. Chem.* 282, 17877–17889
- 33 Murali, K., Naruse, Y., Shaul, Y., Agata, Y. and Mori, N. (2004) Direct interaction of NRSF with TBP: chromatin reorganization and core promoter repression for neuron-specific gene transcription. *Nucleic Acids Res.* 32, 3180–3189
- 34 Plaisance, V., Niederhauser, G., Azzouz, F., Lenain, V., Haefliger, J. A., Waeber, G. and Abderrahmani, A. (2005) The repressor element silencing transcription factor (REST)-mediated transcriptional repression requires the inhibition of Sp1. *J. Biol. Chem.* 280, 401–407
- 35 Roopra, A., Sharling, L., Wood, I. C., Briggs, T., Bachfischer, U., Paquette, A. J. and Buckley, N. J. (2000) Transcriptional repression by neuron-restrictive silencer factor is mediated via the Sin3-histone deacetylase complex. *Mol. Cell. Biol.* 20, 2147–2157
- 36 Ballas, N., Battaglioli, E., Atouf, F., Andres, M. E., Chenoweth, J., Anderson, M. E., Burger, C., Moniwa, M., Davie, J. R., Bowers, W. J. et al. (2001) Regulation of neuronal traits by a novel transcriptional complex. *Neuron* 31, 353–365
- 37 Yeo, M., Lee, S. K., Lee, B., Ruiz, E. C., Pfaff, S. L. and Gill, G. N. (2005) Small CTD phosphatases function in silencing neuronal gene expression. *Science* 307, 596–600
- 38 Kaczynski, J., Cook, T. and Urrutia, R. (2003) Sp1- and Kruppel-like transcription factors. *Genome Biol.* 4, 206
- 39 Suske, G. (1999) The Sp family of transcription factors. *Gene* 238, 291–300
- 40 Choi, H. S., Hwang, C. K., Kim, C. S., Song, K. Y., Law, P. Y., Wei, L. N. and Loh, H. H. (2005) Transcriptional regulation of mouse μ -opioid receptor gene: Sp3 isoforms (M1, M2) function as repressors in neuronal cells to regulate the μ -opioid receptor gene. *Mol. Pharmacol.* 67, 1674–1683
- 41 Kennett, S. B., Udvardi, A. J. and Horowitz, J. M. (1997) Sp3 encodes multiple proteins that differ in their capacity to stimulate or repress transcription. *Nucleic Acids Res.* 25, 3110–3117
- 42 Won, J., Yim, J. and Kim, T. K. (2002) Sp1 and Sp3 recruit histone deacetylase to repress transcription of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) promoter in normal human somatic cells. *J. Biol. Chem.* 277, 38230–38238
- 43 Wang, G., Wei, L. N. and Loh, H. H. (2003) Transcriptional regulation of mouse δ -opioid receptor gene by CpG methylation: involvement of Sp3 and a methyl-CpG-binding protein, MBD2, in transcriptional repression of mouse δ -opioid receptor gene in Neuro2A cells. *J. Biol. Chem.* 278, 40550–40556
- 44 Yu, B., Datta, P. K. and Bagchi, S. (2003) Stability of the Sp3-DNA complex is promoter specific: Sp3 efficiently competes with Sp1 for binding to promoters containing multiple Sp-sites. *Nucleic Acids Res.* 31, 5368–5376
- 45 Kim, C. S., Choi, H. S., Hwang, C. K., Song, K. Y., Lee, B. K., Law, P. Y., Wei, L. N. and Loh, H. H. (2006) Evidence of the neuron-restrictive silencer factor (NRSF) interaction with Sp3 and its synergistic repression to the μ -opioid receptor (MOR) gene. *Nucleic Acids Res.* 34, 6392–6403
- 46 Valin, A. and Gill, G. (2007) Regulation of the dual-function transcription factor Sp3 by SUMO. *Biochem. Soc. Trans.* 35, 1393–1396
- 47 Wooten-Blanks, L. G., Song, P., Senkal, C. E. and Oğretmen, B. (2007) Mechanisms of ceramide-mediated repression of the human telomerase reverse transcriptase promoter via deacetylation of Sp3 by histone deacetylase 1. *FASEB J.* 21, 3386–3397
- 48 Pages, G. (2007) Sp3-mediated VEGF regulation is dependent on phosphorylation by extra-cellular signals regulated kinases (Erk). *J. Cell. Physiol.* 213, 454–463

Received 6 June 2008; accepted 16 June 2008

Published as Immediate Publication 16 June 2008, doi 10.1042/BSR20080058