



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Doctorado en Ciencias Biomédicas

**Participación de p38 MAPK en la regulación
transcripcional dependiente de glutamato de la proteína
de unión a kainato en células gliales de Bergmann**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

Doctora en Ciencias

PRESENTA:

M. en C. Rossana Citlali Zepeda Hernández

Director de tesis:

Dr. Arturo Ortega Soto

Comité tutorial:

Dr. Gabriel Gutiérrez Ospina

Dr. Gabriel Roldán Roldán

México, D.F.

2009



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Este trabajo fue realizado en el laboratorio 23 del Departamento de Genética y Biología Molecular, del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, bajo la dirección del Dr. Arturo Ortega Soto, y fue financiado por el apoyo concedido por Conacyt a los proyectos 43164, 54004-AO.

Durante la realización de este trabajo la autora fue becaria de Conacyt (beca número 170661).

*“La formulación de un problema,
es más importante
que su solución”*

*-Albert Einstein-
(1879 - 1955)*

Dedicatorias

A la memoria de Citlali

*A mis padres Carmen y Roberto:
Por su amor, su apoyo
y su ejemplo
Los adoro*

*A Carlos:
Llegamos juntos
al final
gracias por tu apoyo
te quiero mucho*

AGRADECIMIENTOS

A mi tutor, director de tesis y amigo, Dr. Arturo Ortega Soto, por haber puesto su confianza en mí, por sus valiosas enseñanzas, entre ellas su compromiso con la investigación y la dedicación que siempre demostró hacia mi formación profesional y personal

A los miembros de mi Comité Tutorial: Dr. Gabriel Gutiérrez Ospina y Dr. Gabriel Roldán Roldán, por todo el apoyo que me brindaron durante el doctorado

A mi comité de Grado: Dra. María Sitges Berrondo, Dra. Marina Macías, Dr. Miguel Pérez de la Mora, Dr. Ángel Zaráin Herzberg, por sus comentarios y el tiempo dedicado en la revisión de esta tesis

A la Dra. Esther López Bayghen, Dr. Francisco Castelán, Dr. José Aguilera y Dr. Carles Gil, por que sus comentarios enriquecieron mi formación profesional

Agradezco la asesoría técnica de: Luisa Clara Regina Hernández Kelly, Luis Ángel Cid Cid y Blanca Rocío Ibarra López, del Departamento de Genética y Biología Molecular, y Juan José Sierra Camacho del Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias, Cinvestav-IPN

A quienes durante estos años fueron mi familia en el D.F., Clarita, Dotorá Elba, Ilianiux, Tatis, Gis y Doña Dulce

A mi tía Tere, por hacerme sentir como en casa, por su cariño y su apoyo

A mis amigos de UNAM: Katia, Jorge, Roberto, Santiago, Arturo, por las sonrisas y los buenos momentos

A mis compañeros del Cinvestav: Ira-Ira, Edna, Cristiano, Yazz, Beto 1, Beto 2, Nancy, Luisillo, Blanquita, por hacer mi estancia en el lab mucho más agradable (algunas veces)

A Doña Gela y Doña Mary por cuidar a mi más grande tesoro

A los que se me olvidaron...

ABREVIATURAS

5'UTR	Región 5' no traducible
aa	Amino ácido
Ac	Astrocitos cerebelares
AC	Adenilato ciclasa
AMPA	α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoaxazolepropionato
AMPc	Monofosfato de adenosina cíclico
Asp	Aspartato
BGC	Células de gliales de Bergmann
CAT	Cloranfenicol acetiltransferasa
CaM	Calmodulina
CamKII	Cinasa dependiente de Ca^{2+} / CaM tipo II
ccp	Capa de células de Purkinje
cDNA	DNA complementario
Cf	Fibras trepadoras
cg	Capa granular
Chx	Ciclohexamida
cm	Capa molecular
CNQX	6-ciano-2,3-dihidroxi-7-nitroquinoxalino-2,3-diona
SNC	Sistema nervioso central
CREB	Proteína de unión al elemento de respuesta a AMP cíclico
DAG	Diacilglicerol
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol diclorhidrato
DHPG	(RS)-3,5-Dihidroxifenilglicina
DMEM	Medio Eagle modificado por Dulbecco
DNA	Ácido desoxiribonucléico
Dom	Domoato
DTT	Ditiotreitol
EAAT	Transportadores de aminoácidos excitadores
ECL	Equipo de quimioluminiscencia
EDTA	Ácido etilenediaminotetra acético
eEF2	Factor eucariótico de elongación 2
EGTA	Ácido etilenglicol tetraacético
EMSA	Ensayos de retardamiento de entrada al gel
ERK	Cinasa de respuesta a estímulos extracelulares
FITC	Fluoresceína
GABA	Ácido γ -aminobutírico
GLAST	Transportador de glutamato/aspartato dependiente de sodio
GLT-1	Transportador de glutamato 1

Gln	Glutamina
Glu	L-Glutamato
GluRE	Elemento de respuesta a glutamato
GluRs	Receptores de glutamato
Gly	Glicina
GPCR	Receptores acoplados a proteínas G triméricas
GS	Glutamina sintetasa
IGF-1R	Receptor del factor de crecimiento parecido a insulina tipo 1
iGluR	Receptor de glutamato de tipo ionotrópico
IL-1	Interleucina-1
IP3	1,4,5 trifosfato de inositol
KA	Kainato
kb	Kilobases
KBP	Proteína de unión a kainato
kDa	Kilodaltones
L-AP4	Ácido L-(+)-2-Amino-4-fosfobutírico
MAPK	Proteínas cinasas activadas por mitógenos
mGluR	Receptor de glutamato de tipo metabotrópico
mRNA	RNA mensajero
mTOR	Proteína blanco de rapamicina en mamíferos
NFκB	factor de transcripción que estimula la síntesis de la cadena ligera (kappa) de las inmunoglobulinas de los linfocitos B
nNOS	Sintasa de oxido nítrico neuronal
NMDA	N-metil-D-aspartato
NP40	Nonidet 40
nts	Nucleótidos
OSM	Proteína de andamiaje sensible a osmolaridad
p38 MAPK	Proteína cinasa activada por mitógenos p38
p70S6K	Cinasa de la proteína ribosomal S6
PBS	Solución salina de fosfatos
PC	Células de Purkinje
PD98059	2-(2-Amino-3-metoxifenil)-4H-1-benzopiran-4-ona
PDE1	Fosfodiesterasa 1
PF	Fibras paralelas
PI3K	Fosfatidil inositol 3 cinasa
PKB	Proteína cinasa B
PKC	Proteína cinasa dependiente de Ca ²⁺ /calmodulina
PLC	Fosfolipasa C
PMSF	Fenilmetilsulfonil fluoruro
pp125 ^{FAK}	Cinasa de adhesión focal pp125 FAK
PP2B	Calcineurina

Proteína G	Proteína que une nucleótidos de guanina
PSD	Densidad postsináptica
RasGRF1	Factor de liberación de nucleótidos de guanina Ras
RNA	Ácido ribonucleico
s	Espina dendrítica
SB202190	4-[4-(4-Fluorofenil)-5-(4-piridinil)-1H-imidazol-2-il] fenol
Src	Elemento transformante del retrovirus del sarcoma de Rous
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio
Ser	Serina
t-ACPD	Ácido 1-amino-1,3-ciclopentan- <i>trans</i> -dicarboxílico
TBS	Solución amortiguadora de tris
Thr	Treonina
Tyr	Tirosina
TBE	Tris de ácido bórico y EDTA
TMs	Segmentos transmembranales
TNF	Factor de necrosis tumoral

ÍNDICE

i) Resumen

ii) Abstract

1. Introducción

2. Justificación

3. Hipótesis

4. Objetivos

5. Estrategia experimental

6. Materiales y métodos

7. Resultados

8. Discusión

9. Conclusiones

10. Perspectivas

11. Referencias

12. Anexo

i) Resumen

El ácido glutámico es el principal aminoácido excitador en el Sistema Nervioso Central y está involucrado en los cambios en la expresión de genes que participan en la plasticidad sináptica. Este neurotransmisor ejerce sus funciones al unirse a diferentes tipos de receptores membranales. Los receptores de glutamato se clasifican en dos categorías funcionalmente distintas: receptores de glutamato de tipo metabotrópico, que median sus efectos al acoplarse a proteínas G y a sistemas de segundos mensajeros y receptores de glutamato de tipo ionotrópico, que son canales iónicos activados por ligando. Ambos tipos de receptores están presentes en neuronas y en células gliales. La vía de las proteínas cinasas activadas por mitógenos desempeña una función importante en la señalización de la membrana al núcleo. En células gliales de Bergmann cerebelares, la regulación transcripcional dependiente de glutamato del gen de la proteína de unión a kainato es dependiente de manera parcial de la actividad de p42/44 MAPK. La proteína p38 MAPK es otro miembro de esta familia de cinasas y es activada por estímulos no mitogénicos a través de la fosforilación de los residuos Thr180/Tyr182, y fosforila proteínas blanco citoplásmicas y nucleares involucradas en eventos traduccionales y transcripcionales, respectivamente. Tomando en consideración que el papel de p38 MAPK en células gliales no es conocido del todo, investigamos la activación de p38 MAPK por glutamato en cultivos primarios de células gliales de Bergmann. En este trabajo demostramos que la estimulación con glutamato aumenta la fosforilación de p38 MAPK, de manera dependiente del tiempo y la concentración de glutamato. Asimismo, encontramos que los receptores de glutamato de tipo ionotrópico y metabotrópico, así como la señalización por Ca^{2+} participan en la activación de p38 MAPK. Además, se demostró que p38 MAPK está involucrada en regulación transcripcional dependiente de glutamato de *chkbp* en este tipo celular. Estos resultados demuestran la participación de p38 MAPK en la regulación de la expresión de genes dependiente de glutamato en células gliales.

ii) Abstract

Glutamic acid is the main excitatory amino acid transmitter in central nervous system, and is involved in changes of gene expression underlying synaptic plasticity. This neurotransmitter exerts its functions by binding to different types of membrane receptors. Glutamate receptors can be classified into two functionally distinct categories: metabotropic glutamate receptors, that mediate their effects via coupling to G-protein second messenger systems, and ionotropic glutamate receptors, that are ligand-gated ion channels. Both types of glutamate receptors are present in neurons and glial cells. Mitogen-activated proteins kinases are critical for all membrane to nucleus signaling pathways described so far. In cerebellar Bergmann glial cells, glutamate-dependent transcriptional regulation of kainate binding protein gene is partially dependent on p42/44 MAPK activity. Another member of this kinase family, p38 MAPK is activated by non-mitogenic stimuli through its Thr180/Tyr182 phosphorylation. Once activated p38 MAPK phosphorylates cytoplasmic and nuclear protein targets involved in translational and transcriptional control. Taking into consideration that the role of p38 MAPK in glial cells is not well understood, we investigate here the p38 MAPK activation by glutamate using Bergmann glia cells primary cultures. We demonstrate that glutamate increases p38 MAPK phosphorylation in a time and dose dependent manner. Ionotropic and metabotropic glutamate receptors as well as Ca^{2+} signaling participate in p38 MAPK activation. Moreover, p38 MAPK is involved in the documented glutamate-induced transcriptional activation of *chkbp* in these cells. The present findings demonstrate the involvement of p38 MAPK in glutamate-dependent gene expression regulation.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 El Glu: sus receptores y transportadores

El ácido glutámico (Glu) es el principal neurotransmisor excitador del Sistema Nervioso Central (SNC) de los vertebrados. El Glu participa en diversas funciones en el SNC como diferenciación, migración, supervivencia neuronal y formación de redes neurales durante el desarrollo (Meldrum, 2000). En el cerebro adulto Glu media la mayor parte de la neurotransmisión excitadora, además de participar en la eficacia de los cambios plásticos que ocurren durante los procesos de aprendizaje y memoria (Madden, 2002). Además, debido al preponderante papel del Glu en las funciones del SNC, la disfunción de la señalización glutamatérgica está implicada en un amplio rango de patologías entre las cuales se encuentran la epilepsia, la esquizofrenia y la percepción de dolor (Gouaux, 2003).

El Glu es un aminoácido (aa) no esencial incapaz de atravesar la barrera hematoencefálica, por lo tanto es sintetizado a partir de precursores como el α -cetoglutarato, cuyo esqueleto carbonado proviene de la glucosa. El Glu está presente en altas concentraciones en el SNC y es liberado de manera dependiente de Ca^{2+} después de una estimulación eléctrica. Después de su liberación, el Glu estimula receptores expresados en neuronas y células gliales. El Glu es removido de la hendidura sináptica principalmente por los astrocitos y es convertido a glutamina (Gln) en una reacción enzimática catalizada por la

glutamina sintetasa (GS). La Gln es regresada a las neuronas que emplean Glu como neurotransmisor, donde nuevamente es convertida a Glu, en un ciclo que se denomina “lanzadera glutamina-glutamato”, el cual es esencial para la disposición y el reciclaje del Glu liberado por las neuronas (Figura 1) (Nedergaard et al, 2002). El Glu liberado en las terminales sinápticas se une a sitios selectivos de unión los cuales han sido caracterizados.

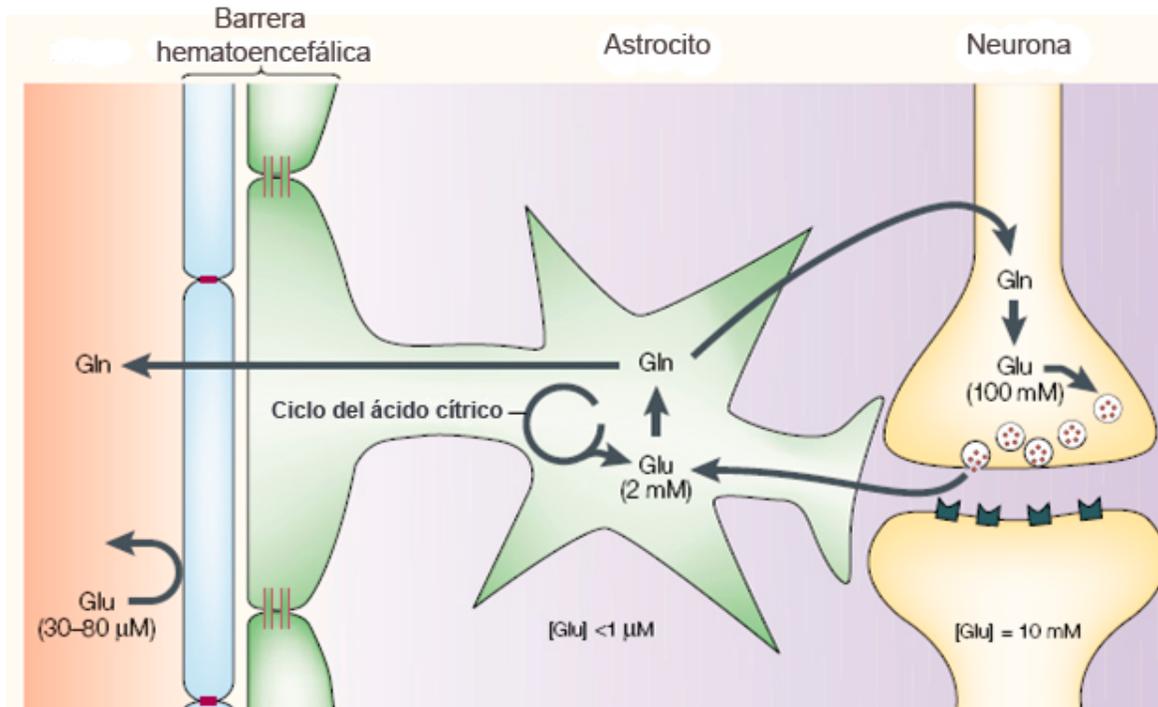


Figura 1. Metabolismo del glutamato en el SNC (Modificado de Nedergaard et al, 2002).

El Glu ejerce sus funciones al unirse a receptores membranales (GluRs) que han sido clasificados de acuerdo a su estructura y a los sistemas de transducción de señales a los cuales se acoplan en dos grupos principales: receptores glutamatérgicos metabotrópicos (mGluRs) y receptores glutamatérgicos ionotrópicos (iGluRs) (Hollmann y Heinemann, 1994).

1.1.1 Receptores de Glu de tipo metabotrópico

Los mGluRs pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteínas que unen nucleótidos de guanina (proteínas G) triméricas. Los mGluRs se acoplan a sistemas de señalización de segundos mensajeros. El análisis de la secuencia de aminoácidos de los mGluRs muestra que estas proteínas son evolutivamente distintas a los receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) previamente caracterizados (Kostenis et al, 1999). Estos receptores junto con el receptor del ácido γ -aminobutírico (GABA) tipo B, el receptor sensible a Ca^{2+} , así como algunos tipos de receptores a odorantes y feromonas constituyen la clase C de los GPCRs. Estructuralmente están constituidos por un solo polipéptido que contiene siete dominios transmembranales conectados por asas intra y extracelulares. El dominio amino terminal de estos receptores es extracelular y característicamente largo (aproximadamente 500-600 aa), mientras que el extremo carboxilo terminal es intracelular y es de tamaño variable. En él se encuentran varios sitios consenso de fosforilación. La región amino terminal contiene el sitio de unión al ligando, así como una región altamente conservada rica en cisteínas, la cual parece ser importante para la dimerización de estos receptores (Figura 2) (Coutinho y Knöpfel, 2002).

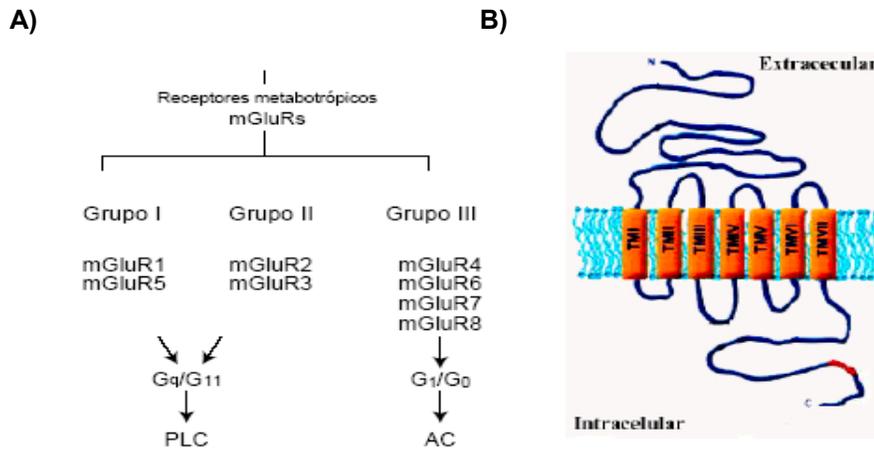


Figura 2. A) Clasificación de los receptores metabotrópicos glutamatérgicos. B) Modelo estructural de los mGluRs: extremo amino terminal extracelular, siete segmentos transmembranales (TMI-VII) y extremo carboxilo terminal intracelular (Modificado de Kew y Kemp, 2005).

Hasta la fecha se han identificado ocho genes que codifican para los mGluRs (mGluR1-mGluR8). Estos receptores han sido clasificados en tres grupos de acuerdo a la identidad de secuencia, vías de señalización que promueven y farmacología. El grupo I está constituido por mGluR1 y mGluR5. Este grupo de receptores es activado preferencialmente por el agonista (*RS*)-3,5-dihidroxifenilglicina (DHPG) y se acoplan a proteínas G_q , promoviendo el metabolismo de fosfoinosítidos a través de la activación de fosfolipasa C (PLC) y la producción de diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP3). Lo anterior permite la liberación del Ca^{2+} secuestrado en posas intracelulares y la generación de la señalización por Ca^{2+} (Pin y Acher, 2002). En contraste, el grupo II (formado por mGluR2 y mGluR3) y el grupo III (cuyos miembros incluyen mGluR4, mGluR6-8) son activados por el ácido 1-amino-1,3-ciclopentan-*trans*-dicarboxílico (*t*-ACPD) y el ácido L-(+)-2-amino-4-fosfobutírico (L-AP4), respectivamente, y se acoplan a

proteínas G_i y G_o , inhibiendo a la enzima adenilato ciclasa (AC) (Coutinho y Knöpfel, 2002).

El análisis de la estructura tridimensional de estos receptores, en especial de la subunidad mGluR1, ha revelado que los mGluRs existen en forma de dímeros. Los dímeros de mGluRs se estabilizan por puentes disulfuro en el extremo amino terminal extracelular y los residuos de cisteína parecen ser de importancia para la dimerización. El papel del proceso de la dimerización de los mGluRs no es del todo claro, sin embargo se ha propuesto que la dimerización promueve un cambio conformacional que facilita su activación (Pin et al, 2004).

1.1.2 Receptores de Glu de tipo ionotrópico

Los iGluRs son complejos multiprotéicos con un canal iónico intrínseco que al activarse promueve cambios en la permeabilidad de la membrana. Están constituidos por 4-5 subunidades de aproximadamente 100 kDa cada una (Figura 3), las cuales constan de un solo péptido con tres segmentos transmembranales (TM) y un asa reentrante (TM2) (Dingledine et al, 1999). De acuerdo a sus características estructurales y farmacológicas se han identificado tres tipos principales de iGluRs: AMPA, KA y NMDA, por responder a la unión con α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propionato, kainato y N-metil-D-aspartato, respectivamente (Hollmann y Heinemann, 1994).

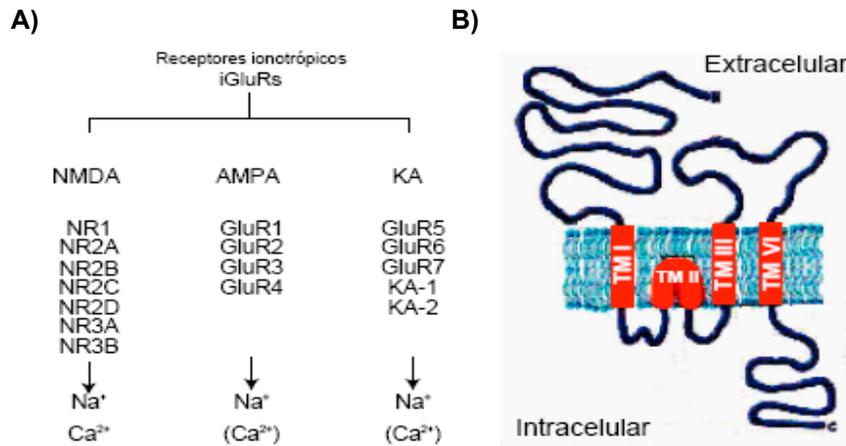


Figura 3. A) Clasificación farmacológica y molecular de los receptores glutamatérgicos ionotrópicos. B) Modelo estructural propuesto para las subunidades de los receptores ionotrópicos: extremo amino terminal extracelular, segmentos transmembranales (TM) I, III y IV, y asa reentrante (TMII), extremo carboxilo terminal intracelular (Modificado de Kew y Kemp, 2005).

La clasificación molecular de los iGluRs proviene de la aplicación de las técnicas de clonación de cDNA, las cuales revelan que la diversidad de estos receptores es mucho más compleja que lo que se sabía con los estudios electrofisiológicos y farmacológicos, ya que cada uno de los principales subtipos de iGluRs, comprenden una familia de genes (Madden, 2002).

La diversidad de funciones de los iGluRs está determinada en gran parte por los genes que se expresan en una célula determinada, además de ello las subunidades de los iGluRs están sujetas a alteraciones post-transcripcionales, como corte y empalme alternativo y edición de RNA, las cuales dan origen a una gran diversidad estructural y funcional.

Los receptores NMDA, están formados por tres familias de genes y 5 cDNAs: NR1, NR2A, NR2B, NR2C y NR3. La subunidad NR1 debe estar presente

para que se forme un receptor funcional y puede ensamblarse con cualquiera de las subunidades de las otras familias. En condiciones de reposo el canal está bloqueado por Mg^{2+} de una manera dependiente de voltaje. Por lo que su activación requiere de la despolarización de la membrana. Además para que el receptor adquiera mayor eficiencia es necesaria la presencia del co-agonista glicina (Gly). La subunidad NR1 contiene el sitio de unión a Gly (Mayer y Armstrong, 2004; Madden, 2002).

Los receptores de tipo AMPA están constituidos por las subunidades: GluR1, GluR2, GluR3 y GluR4 (también llamadas GluRA-GluRD). La permeabilidad de los receptores AMPA está determinada por la subunidad GluR2: los complejos homoméricos de GluR1, GluR3 o GluR4 forman canales permeables a Ca^{2+} , mientras que los homómeros de GluR2 o heterómeros de GluR2 son impermeables a Ca^{2+} (Seeburg y Hartner, 2003). Esta característica de permeabilidad ha sido atribuida a un solo residuo aminoácido en la región TM2 que forma el poro, denominado sitio Q/R. De esta manera la presencia de la subunidad GluR2 previene la permeabilidad de Ca^{2+} , así como otros cationes divalentes a través del canal. Las cuatro subunidades de los AMPAR se encuentran en dos versiones de corte y empalme alternativo denominadas *flip* y *flop*. En rata, las variantes *flip* predominan antes del nacimiento y se expresan con menor abundancia en el animal adulto, mientras que las variantes *flop* son poco abundantes durante los primeros días de nacimiento y son regulados positivamente cerca del mismo nivel que para las formas *flip* en el animal adulto (Dingledine et al, 1999). Existen además diferencias funcionales entre las

versiones *flip* y *flop*: las versiones *flop* se desensibilizan más rápidamente que las formas *flip* (Bredt et al, 2003).

Los genes que codifican para los receptores a kainato, pertenecen a dos familias: i) GluR5, GluR6 y GluR7, y ii) KA1 y KA2. En estos receptores el canal funcional se forma solo cuando se ensamblan miembros de la familia GluR5-GluR7. La identificación de una serie de isoformas derivadas de corte y empalme alternativo han revelado que el repertorio de los receptores a kainato no está limitada a las 5 subunidades antes mencionadas (Lerma et al, 2001).

Además de los GluRs antes mencionados, se han identificado y clonado proteínas con afinidad de unión a kainato, así como a los agonistas Glu y domoato (Dom), que en conjunto han sido denominadas proteínas de unión a kainato (KBP) (Henley, 1994).

1.1.3 Transportadores de Glu

La remoción del Glu extracelular es el mecanismo de inactivación del neurotransmisor, por lo que es importante para mantener el equilibrio de la neurotransmisión glutamatérgica, prevenir la sobreestimulación de los GluRs y proteger a las neuronas de la excitotoxicidad. Dicha remoción es llevada a cabo por una familia de transportadores denominados en conjunto transportadores de aminoácidos excitadores (EAATs). Esta familia de transportadores con alta afinidad por Glu, está compuesta por cinco diferentes transportadores: EAAT1,

EAAT2, EAAT3, EAAT4 y EAAT5 (Danbolt, 2001). Los EAATs son expresados tanto en neuronas como en células gliales. EAAT3, EAAT4 y EAAT5 son transportadores principalmente neuronales y su expresión se encuentra enriquecida en células piramidales de corteza e hipocampo, en las células de Purkinje del cerebelo y en la retina, respectivamente. EAAT1 y EAAT2, así como sus homólogos en rata: el transportador de glutamato-aspartato (GLAST) y el transportador de glutamato 1 (GLT-1) respectivamente, son transportadores primordialmente gliales. EAAT1/GLAST se expresa especialmente en cerebelo, en las células gliales de Bergmann y EAAT2/GLT-1 se expresa principalmente en los astrocitos localizados en el hipocampo, la corteza cerebral y el estriado (Perego et al, 2000). La mayor parte del Glu liberado durante la neurotransmisión es removido por transportadores gliales (Schousboe, 1981). Los cinco tipos de transportadores catalizan el transporte de Glu y aspartato (Asp), y están acoplados al co-transporte de Na^+ y K^+ . La alteración en la expresión y la actividad de los EAATs han sido implicadas en la etiología y progresión de varias patologías como epilepsia, Parkinson, Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica y enfermedad de Huntington (Danbolt, 2001).

1.2 El cerebelo y sus células

El cerebelo es una estructura que representa solo el 10% del volumen total del cerebro, pero que contiene más de la mitad de las neuronas del cerebro adulto. El cerebelo se encuentra en la base posterior del cerebro y recibe información somatosensorial de la médula espinal, información motora de la

corteza cerebral e información acerca del equilibrio de los órganos vestibulares del oído interno. Dentro de las funciones principales del cerebelo están el mantenimiento de la postura, coordinación de los movimientos de la cabeza y los ojos y control de movimiento fino. Anteriormente se consideraba al cerebelo como una estructura puramente motora, sin embargo en la actualidad se reconoce la participación del cerebelo en funciones cognitivas, de lenguaje, aprendizaje y memoria (Kandel, 2000).

Estructuralmente, el cerebelo se compone de: i) Fibras aferentes de la corteza cerebelosa, ii) Núcleo profundo cerebelar, y iii) Corteza cerebelar. El cerebelo se conecta con otras partes del SNC por medio de tres vías llamadas en conjunto pedúnculos cerebelosos (Purves, 2001).

La corteza cerebelar es una estructura laminar que está dividida en tres capas: i) la capa de células granulares, ii) la capa de células de Purkinje, y iii) la capa molecular. Contiene solo 5 tipos de neuronas: células estrelladas, células en canasta, células granulares, células de Golgi y células de Purkinje (PC). La capa granular contiene los somas de las células granulares, las células de Golgi y los axones de las fibras musgosas. Los axones de las células granulares proyectan hacia la capa molecular en donde se bifurcan formando las fibras paralelas (PF). La capa de células de Purkinje está formada por los somas de las células de Purkinje, mientras que sus dendritas se encuentran localizadas en la capa molecular, además de las fibras paralelas y las interneuronas estrelladas y en canasta (Voogd y Glickstein, 1998). Además existen tres tipos de células gliales

en la corteza cerebelar: i) astrocitos, ii) oligodendrocitos y iii) células gliales de Bergmann (BGC) (Müller y Kettenmann, 1995).

El circuito cerebelar tiene dos aferencias excitadoras: i) las fibras trepadoras que provienen de la oliva inferior, y ii) las fibras musgosas provenientes de la médula espinal y los núcleos reticulares y pontino. Las fibras trepadoras activan directamente a las células de Purkinje. Mientras que las fibras musgosas, lo hacen de manera indirecta formando sinapsis con las células granulares, cuyos axones en la capa molecular (fibras paralelas) establecen sinapsis excitadoras con el árbol dendrítico de las células de Purkinje, constituyendo el tipo de sinapsis más abundante en el SNC (Figura 4). Los axones de las células de Purkinje proyectan hacia los núcleos intracerebelares y vestibulares, constituyendo la única eferencia del circuito. Por otro lado las células granulares activan las interneuronas inhibitoras (las células estrelladas y de canasta), mientras que las células de Golgi, causan retroalimentación negativa hacia las células granulares. Asimismo, el cerebelo recibe fibras noradrenérgicas y serotoninérgicas provenientes de *locus coeruleus* y los núcleos de rafé (Kandel, 2000).

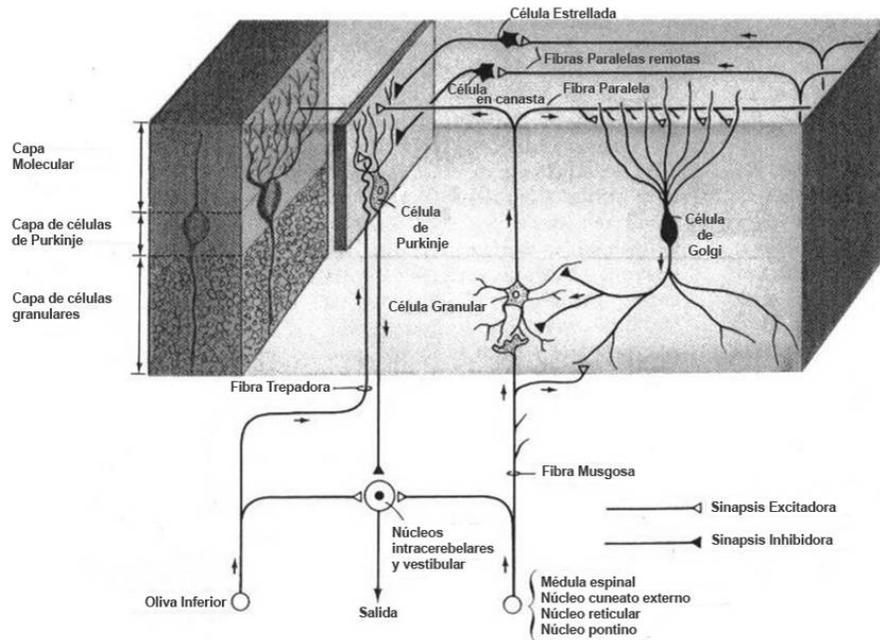


Figura 4. Organización celular de la corteza cerebelar y circuito cerebelar (Modificado de Kandel, 1981).

1.2.1 Células gliales de Bergmann

Las células gliales de Bergmann (BGC) son un tipo de glía radial que no sufre conversión astrocítica en el adulto y sirve como astrocito especializado en el cerebelo. Las BGC tienen sus cuerpos celulares localizados en la capa de células de Purkinje y sus procesos se extienden a través de la capa molecular (Figura 5) (Müller y Kettenmann, 1995).

Durante el desarrollo, las BGC sirven como soporte estructural y guía para la migración de las células granulares y del crecimiento de sus axones (Hatten y Mason, 1990). Durante la migración de las células granulares los procesos de las BGC son delgados y lisos, a excepción de protuberancias ocasionales debidas a

las mitocondrias. Esta apariencia cambia dramáticamente tan pronto como las células granulares alcanzan su destino. Es entonces cuando los procesos de las BGC se hacen más gruesos y desarrollan crecimientos laterales masivos. Estos apéndices laterales determinan las características morfológicas de las BGC adultas (Grosche et al, 1999) (Figura 5). Además, las BGC favorecen el crecimiento del árbol dendrítico de las células de Purkinje, en cultivos organotípicos (Lordkipanidze y Dunaevsky, 2005).

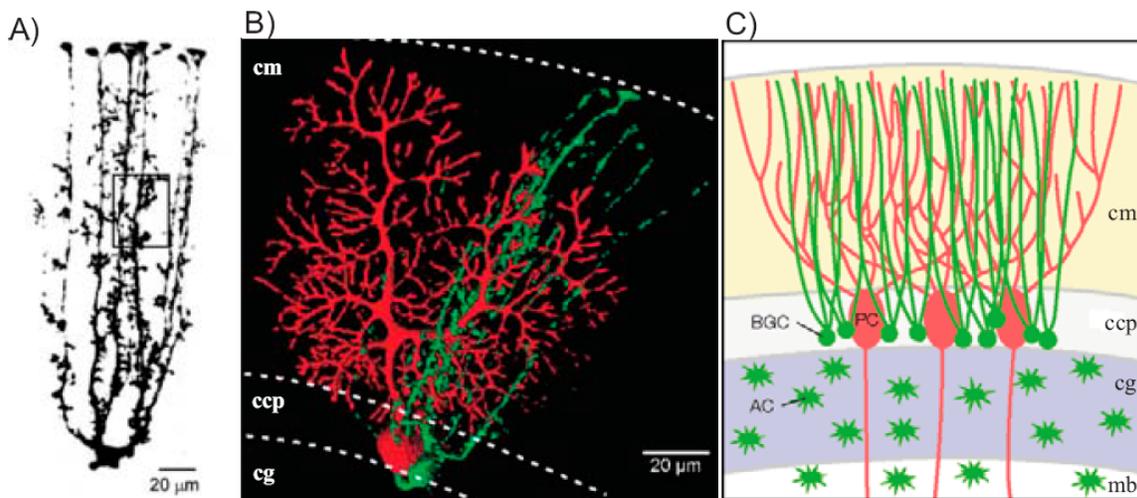


Figura 5. Morfología típica de células gliales de Bergmann (BGC). A) Célula de glía de Bergmann marcada con Alexa-594 y observada con microscopía de barrido láser de doble fotón: se observan el cuerpo celular y los procesos gliales. B) Reconstrucción tridimensional de un doble marcaje de BGC y células de Purkinje (PC): las BGC se marcaron con Alexa 488 (verde) y las PC con Alexa 568 (rojo). En la imagen se observa que los procesos de las BGC se sobrelapan con parte del árbol dendrítico de las PC en la capa molecular del cerebelo. C) Diagrama esquemático de la corteza cerebelar: los cuerpos celulares de las BGC están localizados en la capa de células de Purkinje (ccp), en donde se encuentran también los somas de las células de Purkinje (PC). En la capa molecular (cm), los procesos de las BGC se asocian íntimamente con las dendritas de las PC. En la capa granular (cg) y la materia blanca se encuentran los astrocitos cerebelares (Ac). (Adaptado de: A) Beierlein y Regehr 2006; B) Brockhaus y Deitmer, 2002; C) Tanaka et al, 2008)

En el cerebelo adulto los procesos de las BGC se alinean con las dendritas de las PC y rodean completamente las sinapsis que se establecen entre las PCy las fibras paralelas (PC-PF) (Figura 6) (Grosche et al, 2002; Matsui et al, 2005). Las sinapsis PC-PF son de tipo glutamatérgico (Bordey y Sontheimer, 2003). Debido a la ubicación de las BGC en relación con las sinapsis PC-PF se ha propuesto que las BGC regulan la eficiencia sináptica (Teichberg, 1991).

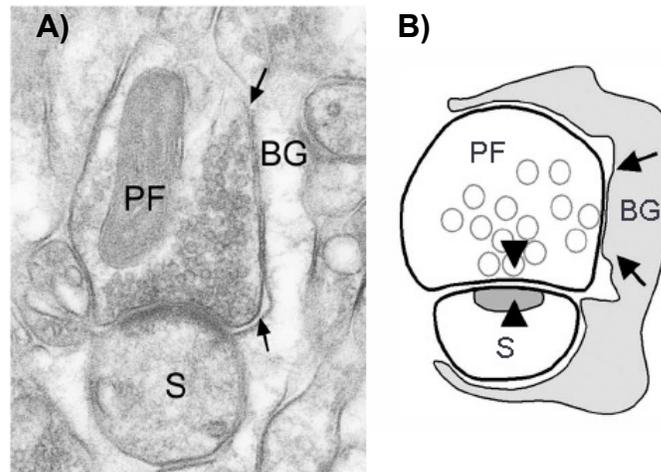


Figura 6. Las células gliales de Bergmann rodean la sinapsis PC-PF. A) Micrografía de la sinapsis glutamatérgica formada por las fibras paralelas (PF) y la espina dendrítica de una célula de Purkinje (S), la cual está totalmente rodeada por células gliales de Bergman (BG). B) Diagrama esquemático de la sinapsis PC-PF. (Tomado de Matsui et al, 2005).

Las BGC responden a la estimulación de las PF. El Glu liberado en la hendidura sináptica durante la neurotransmisión no solo estimula GluRs post-sinápticos sino también actúa en los GluRs localizados en las membranas de las BGC (revisado en Muller y Kettenmann, 1995). Las BGC expresan GluRs funcionales: tanto metabotrópicos de los grupos I y III, como ionotrópicos de tipo NMDA, AMPA y KA (López et al, 1998; López et al, 1994, López et al, 1997, Luque y Richards, 1995). Los iGluRs de tipo AMPA en las BGC no expresan la subunidad

GluR2, lo que les confiere permeabilidad a Ca^{2+} . Esta característica es de gran importancia, ya que la presencia de esta subunidad promueve cambios morfológicos en las BGC, lo que sugiere que los receptores de tipo AMPA participan activamente en la fisiología de estas células y en sus interacciones con las sinapsis PC-PF (Iino et al, 2001).

1.3 Señalización glutamatérgica

1.3.1 Señalización glutamatérgica en neuronas

La señalización glutamatérgica se lleva a cabo a través de la activación de los diferentes tipos de GluRs. Los GluRs están acoplados al influjo de Na^+ y Ca^{2+} , y a la liberación de Ca^{2+} del retículo endoplásmico, lo cual causa un incremento en la actividad de cinasas, fosfatasa y proteasas dependientes de Ca^{2+} , que promueve la regulación de la expresión de genes que permiten cambios en la estructura y la función de neuronas y células gliales.

La activación de los receptores de tipo NMDA en neuronas, permite la entrada de Ca^{2+} el cual se une a calmodulina (CaM), promoviendo la activación de las proteínas blanco del complejo Ca^{2+} / CaM: como AC, la cinasa dependiente de Ca^{2+} / CaM (CaMKII), el factor de liberación de nucleótidos de guanina Ras (RasGRF1), la fosfodiesterasa 1 (PDE1) y calcineurina (PP2B). Lo anterior permite la regulación de vías de señalización que tienen influencia en la actividad de las GTPasas Ras, Rap, Rac y Cdc42, lo cual lleva a la activación de cinasas como la

cinasa de respuesta a estímulos extracelulares 1/2 (ERK1/2), p38 MAPK y JNK, además de la proteína cinasa C (PKC) (revisado en Kennedy et al 2005). La estimulación de los GluRs en cultivos de neuronas de estriado, hipocampo y corteza promueve la fosforilación de ERK1/2 (Xia et al, 1996, Perkinson et al, 2002).

Los receptores AMPA funcionan no solo como canales iónicos sino también como transductores de señales en la superficie celular, por su interacción con la proteína tirosina cinasa no receptora de la familia de la cinasa del elemento transformante del retrovirus del sarcoma de rous (Src): Lyn. En el cerebelo, Lyn está físicamente asociada con los receptores AMPA y es rápidamente activada después de la estimulación del receptor de manera independiente del influjo de Ca^{2+} y Na^+ a través de los receptores AMPA, dando como resultado la activación de la vía de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK) (Hayashi et al, 1999).

En el cerebelo, la unión de Glu a los mGluR1 localizados en las PC activa a la proteína G_s y a vía PLC/DAG y de PKC, la cual fosforila a la subunidad GluR2 en Ser 880 promoviendo la endocitosis del receptor (revisado en Evans, 2007). Sin embargo, las cascadas de señalización de los mGluRs parecen ser más complejas que la de otros GPCRs, ya que pueden activar a la fosfodiesterasa de GMP cíclico, la fosfolipasa A2 (PLA₂) y las MAPKs (Fagni, 2004). Además, los mGluRs del grupo I se unen a proteínas de andamiaje formando complejos multiprotéicos en la densidad postsináptica (PSD) (Thomas, 2002). Dentro de las proteínas que

forman estos complejos se encuentran las proteínas de la familia Homer (1a, 1b/c, 2a/b y 3), las cuales participan en el tráfico de las subunidades de mGluRs (mGluR1alfa/5), la unión de las subunidades mGluR1 y mGluR5 con los receptores de IP3, la regulación de los canales de Ca^{2+} tipo N y de K^+ tipo M, el desarrollo de espinas dendríticas, axones y sinapsis (Mao et al, 2005). Asimismo, la proteína Homer 1b/c participa en la activación de ERK1/2 mediada por mGluRs del grupo I, en cultivos de neuronas estriatales. El mecanismo es parcialmente dependiente de la vía convencional $\text{PLC}\beta 1/\text{IP3}/\text{Ca}^{2+}$. Sin embargo la activación de ERK por mGluRs es independiente de la liberación de Ca^{2+} intracelular, en su lugar, la cual se une directamente a la región carboxilo terminal de mGluR5 (Mao et al, 2005).

1.3.2 Señalización glutamatérgica en BGC

Las BGC debido a su situación espacial en relación a la sinapsis PC-PF y a la presencia de receptores y transportadores de Glu, censan la actividad sináptica de las células vecinas: el Glu liberado por las PF despolariza a las BGC aumentando la concentración de Ca^{2+} intracelular (Bellamy et al, 2007) y promoviendo la activación de vías de señalización (Kirischuk et al, 1999). La estimulación de los iGluRs expresados en BGC, provoca la acumulación de inositol trifosfato (López-Colomé et al, 1997), la activación y translocación a la membrana celular de PKC (Cid y Ortega, 1993) y activa la vía de ERK1/2 MAPK (López-Colomé y Ortega, 1997; Aguirre et al, 2000; 2002). Además, la activación de iGluRs gliales activa las vías de PI3K/PKB/Akt/GS3K (Morales et al 2006) y

PI3K/ CaMKII/PKC/NFkB (Méndez et al, 2005). En estas mismas células, se ha descrito un mecanismo de señalización mediado por los receptores de tipo AMPA similar al descrito por Hayashi (1999), en neuronas: la cinasa de adhesión focal (pp125^{FAK}) y PI3K se asocian al receptor AMPA formando un transducisoma, aún en ausencia de Ca²⁺ (Millán et al, 2004). Las BGC expresan también mGluRs del grupo I (López et al, 1998), cuya activación participa en la señalización intracelular mediada por la proteína STAT3 (Aguilera et al, 1999). En la figura 7 se puede observar un resumen de las cascadas de señalización mencionadas.

Recientemente se ha especulado acerca de la participación de los flujos iónicos producidos por el co-transporte de Na⁺/K⁺ durante el transporte membranal de Glu, en la señalización glutamatérgica. Se ha reportado la activación de la vía de las MAPK MEK/ERK1/2, por el transportador GLAST/EAAT1 (Abe y Saito, 2001). Además, este transportador regula la expresión en la superficie celular de la subunidad γ (FXD2/ γ) de la ATPasa de Na⁺ y K⁺ en astrocitos fetales humanos (Gegelashvili et al, 2007). En BGC el transportador GLAST participa en la señalización que promueve la fosforilación de la proteína blanco de rapamicina en mamíferos (mTOR) mediada por Glu (Zepeda et al, 2009). Los mecanismos que intervienen en la transducción de señales a través del transportador GLAST aún no son claros (Abe y Saito, 2001).

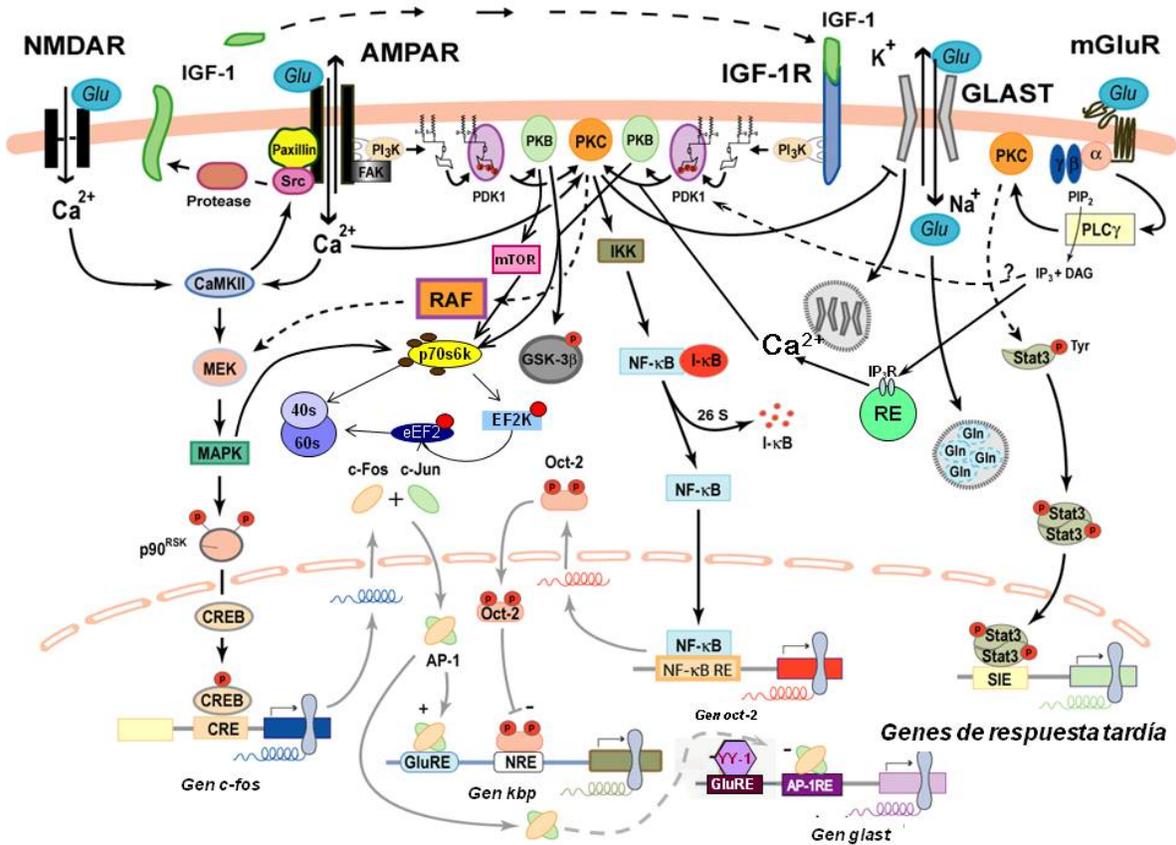


Figura 7. Vías de señalización inducidas por Glu en BGC. La estimulación glutamatergica en BGC promueve la activación de vías de señalización previamente caracterizadas, dentro de estas podemos mencionar: la proteína cinasa dependiente de Ca^{2+} /calmodulina II (CaMKII), la proteína cinasa B (PKB/Akt), la cinasa glicógeno sintasa 3 (GS3K), la proteína cinasa C (PKC), las proteínas STAT y las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK) (Aguirre et al, 2000; Aguirre et al, 2002; Morales et al, 2006; López-Bayghen y Ortega, 2004; Aguilera et al, 1999; López-Colomé y Ortega, 1997). Las vías de señalización antes mencionadas participan en la regulación de los procesos de traducción (González-Mejía et al, 2006; Barrera et al, 2008; Zepeda et al, 2009) y transcripción que tienen como finalidad la regulación de genes glía- específicos como: el transportador de glutamato-aspartato GLAST y la proteína de unión a kainato (KBP) (Aguirre et al, 2000; Aguirre et al, 2002, Méndez et al, 2005, Rosas et al, 2007).

1.4 Regulación de la expresión génica por Glu

El Glu regula la expresión de genes a nivel traduccional y transcripcional. La traducción es el paso final de la expresión de genes y el estudio de su regulación es de gran importancia dentro de la fisiología celular. En neuronas, el Glu incrementa la incorporación de L-[³⁵S]-metionina y la asociación de RNAm a polirribosomas (Bagni et al, 2000), lo anterior nos indica que existe una regulación positiva de la traducción. Igualmente, el Glu regula la síntesis local de proteínas en las dendritas durante periodos de intensa actividad sináptica (Schumann et al, 2006). En BGC, el Glu disminuye la incorporación de L-[³⁵S]-metionina durante los primeros minutos de tratamiento y aumenta luego de 30 minutos (González-Mejía et al, 2006). Este efecto bifásico en la traducción sugiere que el Glu regula las fases de inicio y de elongación de la traducción, a través de la fosforilación del factor eucariótico de elongación 2 (eEF2) en una vía dependiente de Ca²⁺/Cam/ERK1/2/eEF2K (Barrera et al, 2008). Además, el Glu regula la síntesis de proteínas en BGC, a través de la activación de p70S6K, en una manera dependiente de la vía de señalización Src/PI-3K/PKB/mTOR (González-Mejía et al, 2006; Zepeda et al, 2009).

El Glu además activa vías de señalización intracelular que inducen la expresión de genes tempranos. La inyección intraperitoneal de los agonistas NMDA o KA aumenta la expresión del mRNA *c-fos* y de la proteína c-Fos en extractos de cerebro de ratón. Además, el Glu induce la expresión de *c-fos*, *c-jun*, *erg-1*, a través de la activación de los receptores NMDA, en células granulares de

cerebelo de rata (revisado en Yoneda et al, 2001). Asimismo, en cultivos primarios de neuronas de estriado NMDA activa a ERK1/2 que fosforila a CREB, de una manera dependiente de Ca^{2+} extracelular (Mao et al, 2004). El tratamiento de cultivos de neuronas de estriado con los agonistas NMDA y DHPG a concentraciones submáximas, incrementan la fosforilación de ERK1/2 y de su sustrato Elk-1, lo que permite la inducción de *c-fos* (Wang et al, 2004).

El factor nuclear que estimula la síntesis de la cadena ligera (κ) de las inmunoglobulinas de los linfocitos B (NF κ B), es un factor de transcripción que tiene un papel fundamental en la regulación de la expresión de genes y en los procesos de plasticidad sináptica y de formación de memoria a largo plazo. La estimulación de los mGluRs del grupo I localizados en el hipocampo, incrementa la capacidad de unión con el DNA de varios miembros de esta familia de factores de transcripción incluyendo p50, p65/RelA y c-Rel, a través de la activación de la vía de p38 MAPK (revisado en Wang et al, 2007). En BGC el NF κ B participa en la regulación de *chkbp* (Méndez et al, 2005).

Las vías de señalización activadas por Glu en BGC participan en la regulación de genes específicos de la glía, como: el transportador de glutamato-aspartato GLAST (López-Bayghen y Ortega, 2004; Ramírez-Sotelo et al, 2007; Rosas et al, 2007) y la proteína KBP (Aguirre et al, 2000; 2002, López-Bayghen et al, 2003) (Ver figura 7).

1.5 Proteína de unión a kainato

La familia de las proteínas de unión a kainato (KBP) comprende un número de polipéptidos relacionados, con pesos moleculares que van de 40 a 50 kDa. El perfil hidrofóbico de las secuencias de las KBPs predice un patrón similar a los iGluRs y otros canales abiertos por ligando, ya que poseen un dominio amino terminal con 1 y 2 sitios consenso de N-glicosilación en las KBPs de pollo y rana respectivamente, mientras que en pez dorado se han encontrado 1 y 4 sitios de este tipo, localizados entre los segmentos TM3 y TM4 (Wo y Oswald, 1994). Se ha demostrado que las KBPs muestran homología significativa con los iGluRs, por lo que se clasifican dentro de esta familia de receptores (Hollmann y Heinemann, 1994). En promedio la homología de aminoácidos entre las subunidades que comprenden los iGluRs es de alrededor de 20-30%, compartiendo también características estructurales importantes (Tabla 1), la principal diferencia se encuentra en el extremo amino terminal, que representa en KBP, la mitad del tamaño que para los iGluRs (Gregor et al, 1989).

	GluR1- GluR4	GluR5-GluR7	KA-1/KA-2	NMDAR1-2
GluR1- GluR4	67.7-72.8	38.6-41.4	36.2-37.3	35.1-37.8
GluR5-GluR7		74.4-80.9	42.5-44.7	37.7-40.8
KA-1/KA-2			70.3	35.8-36.8
NMDAR1-2				22.2-28.5

Tabla 1. Porcentaje de identidad de aminoácidos de las distintas familias de GluRs ionotrópicos (Modificado de Arias, 1995).

A pesar de tener una homología significativa con los iGluRs, las KBPs no forman canales iónicos por sí solas, ni aún cuando se co-expresan con otras subunidades de los iGluRs (Strutz et al, 2002; Schmidt et al, 2005). La única evidencia de que estas proteínas pueden dar lugar a canales iónicos ha sido con la construcción de quimeras realizadas a partir de los dominios de unión de las KBPs y las subunidades GluR1 y GluR6, obteniéndose canales quiméricos funcionales. En este mismo trabajo se realizó una construcción en donde se transplantó el extremo amino terminal de GluR6 a la secuencia de KBP, con la intención de probar si esta diferencia estructural influye en las características funcionales de las proteínas, determinándose que la falta de aproximadamente 400 aa, no es la causa de la ausencia de las propiedades iónicas de las KBPs (Villmann et al, 1997).

Las KBPs son expresadas de manera abundante en vertebrados no mamíferos, entre los que podemos destacar pollo, rana y pez dorado (Gregor et al, 1988; Hampson y Wenthold, 1988). La KBP de pollo (chKBP) representa un sitio importante de unión a Glu y sus agonistas en el cerebelo, específicamente en la glía de Bergmann, en donde se expresa una forma glicosilada de 49 kDa. La caracterización del gen *chkbp* demuestra que está constituido por 10 intrones y 11 exones confiriéndole un tamaño de 11.2 kb, de los que 7.9 kb corresponden a regiones intrónicas, mientras que 3.3 kb son exones. El análisis del cDNA de estos últimos propone que el primer exón contiene la región 5' no traducida (5' UTR), mostrando un alto contenido de GC, secuencias consenso para la proteína de unión a TATA (TBP), así como secuencias consenso AP-1. El codón II contiene la

secuencia consenso de inicio de la traducción, el péptido señal y el codón de inicio de traducción. Los exones III al V codifican para el extremo amino terminal extracelular, mientras que los exones VI al VIII, contienen secuencias que son codificantes para los dominios transmembranales, los cuales además se encuentran codificados en exones diferentes (Gregor et al, 1992).

Utilizando hibridación *in situ* y de RNA, se determinaron los transcritos del *chkbp* (Gregor et al, 1992; Eshhar et al, 1992) encontrándose que los mRNA están localizados específicamente en las BGC. Se identificaron tres transcritos de 2.1, 5.2 y 3.5 kb, siendo este último el de mayor abundancia en estas células (Gregor et al, 1992).

Hasta el momento no se conoce la función de estas proteínas, sin embargo se tiene conocimiento de procesos en los cuales podría estar participando. En embriones de pollo la aparición del transcrito de KBP coincide con la migración de las células granulares, lo cual podría indicar que KBP participa en la coordinación o regulación de la migración de estas células (Ortega et al, 1991). Aunado a lo anterior, se ha reportado el aumento del mRNA de KBP en el fenómeno de impronta en patos (Kimura et al, 1992), así como un aumento en ensayos de unión y de expresión de KBP en modelos de aprendizaje asociativo en pichones (Figura 8) (Arias, 1995).

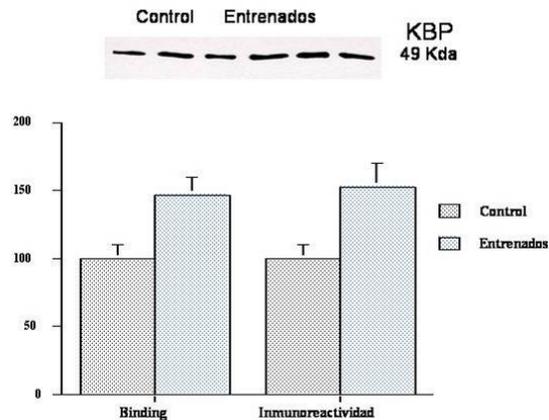


Figura 8. Aumento de la expresión de KBP (panel superior) y de la unión de KBP en un modelo de aprendizaje asociativo en pichones (panel inferior) (Arias, 1995).

El estudio de la estructura de chKBP muestra que contiene además de los sitios de N-glicosilación antes mencionados, sitios consenso para fosforilación, así como posibles dominios de interacción con nucleótidos de guanina (Gregor et al, 1989). Lo anterior llevó al estudio de la fosforilación de la chKBP, observándose que es fosforilada *in vitro* en presencia de la subunidad catalítica de PKA, reacción que es dependiente del tiempo y es además inhibida por KA (Ortega y Teichberg, 1990). Así mismo, Ibarra y Ortega (1995), mostraron que chKBP interacciona con GTP y al igual que lo observado para KA, esta interacción inhibe la fosforilación de KBP por PKA.

La abundancia y expresión selectiva de KBP en las células de Bergmann, ha generado interés en establecer su función. De manera más que interesante, se ha observado que Glu es capaz de regular los niveles celulares de KBP y de su mRNA. El tratamiento de BGC con Glu 1 mM aumentó los niveles de mRNA y la cantidad de la proteína KBP. Lo anterior es mediado por receptores

glutamatérgicos de tipo ionotrópico y metabotrópico. Dicha expresión se puede observar a partir de las 2h de tratamiento con Glu y continúa aumentando hasta las 12 h de estimulación (Figura 9) (Aguirre et al, 2000).

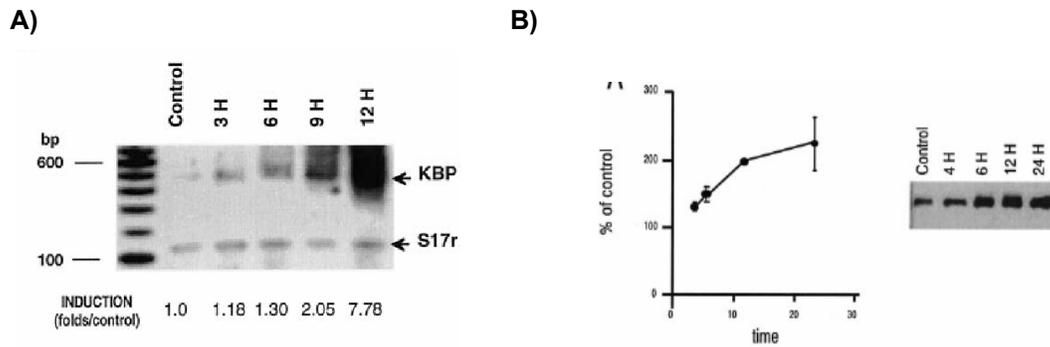


Figura 9. Regulación de los niveles de KBP por Glu. A) Niveles de mRNA de chKBP después del tratamiento de BGC con Glu 1 mM por los tiempos indicados. B) BGC fueron tratadas con Glu 1 mM, los niveles de expresión de KBP (Tomado de Aguirre et al., 2000).

El análisis de la región 5' UTR del *chkbp*, permitió determinar la región promotora del gen, misma que fue clonada en el vector pCAT-BASIC, obteniéndose la construcción p435kbpCAT. Utilizando ensayos funcionales de transfección transitoria en BGC, se establecieron tres elementos principales dentro del promotor: un elemento de respuesta a Glu (GluRE) entre los nucleótidos (nts) -450 a -250, un silenciador (nts -250 a -170) y el promotor mínimo (nts -170 a +88) (Figura 10) (Aguirre et al, 2000, Méndez et al, 2005).

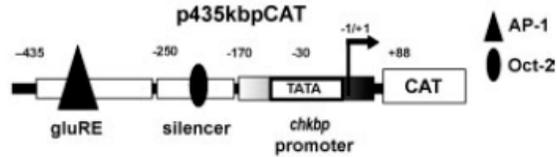


Figura 10. Representación esquemática de la región 5' no codificante del promotor de *chKBP* clonado en el gen reportero CAT, donde se muestran los sitios para la unión de los factores de transcripción AP-1 y Oct-2 (Méndez et al, 2005).

Aunado a esto, utilizando la construcción p435kbpCAT, se caracterizó la regulación transcripcional de *chKBP* mediada por Glu. Se identificó al sitio AP-1, localizado entre los nts -337 a -329 del promotor de *chKBP*, como el responsable de la respuesta a Glu (Aguirre et al, 2000). Además se determinó la vía de señalización que conlleva a la regulación transcripcional de *chKBP*. La activación de los receptores AMPA promueven la entrada de un influjo de iones Ca^{2+} a la célula, que activa a CamKII y a Src. La cinasa Src transactiva al receptor del factor de crecimiento parecido a insulina tipo 1 (IGF-1R). Una vez activado, IGF-1R inicia la vía de las MAPK. La cinasa ERK1/2 fosforila a la proteína p90^{RSK}, la cual una vez en el núcleo de la célula, fosforila a la proteína de unión al elemento de respuesta a AMP cíclico (CREB). Este factor de transcripción se une al promotor de *c-fos* y promueve su transcripción. La formación del dímero AP-1 y su posterior unión a su secuencia consenso en la región promotora de *chKBP*, finalmente producen el aumento en la transcripción del gen *chKBP* (Figura 11) (López-Bayghen et al, 2003).

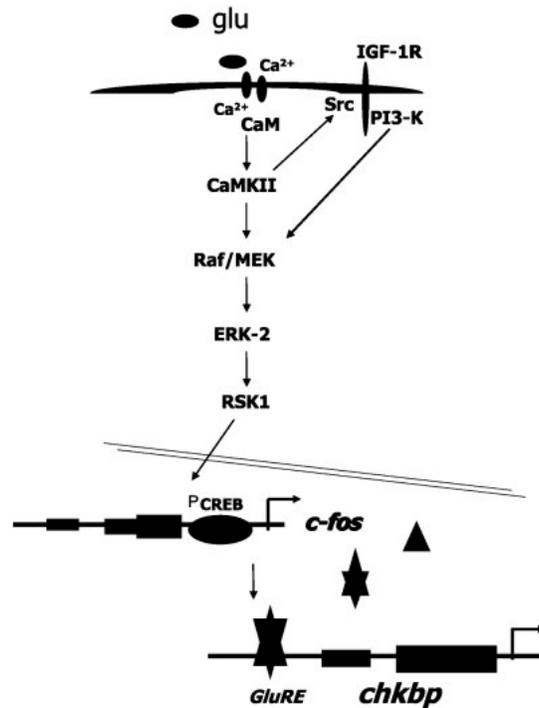


Figura 11. Modelo de las vías de señalización que participan en la regulación transcripcional de *chkbp* dependiente de glutamato (López-Bayghen et al, 2003).

La regulación negativa de *chkbp* por Glu parece estar mediada por al menos dos secuencias presentes en el promotor. La primera es una secuencia octamérica presente en la región nts -250 a -170 de *chkbp*, la cual es regulada por el factor Oct-2, en una vía de señalización dependiente de PI3K/PKC/NFkB (Méndez et al, 2005). La segunda es una secuencia consenso de unión para el factor de transcripción Sox10, localizada en la región nts -435 a -250 de *chkbp* (Cruz-Solís et al, 2009).

Si bien la caracterización de la vía de señalización que media la activación transcripcional dependiente de Glu de *chkbp*, reveló la participación de la cinasa ERK1/2 en este proceso, el uso del inhibidor específico de esta vía PD98052 (PD), y la co-transfección de la mutante negativa de RSK (p112), reducen la actividad transcripcional de gen reportero, sin embargo ninguna de estas estrategias permite abatir por completo la actividad transcripcional, lo cual sugiere que otra vía de señalización participa en la activación transcripcional de *chkbp* (Figura 12) (Aguirre et al, 2002).

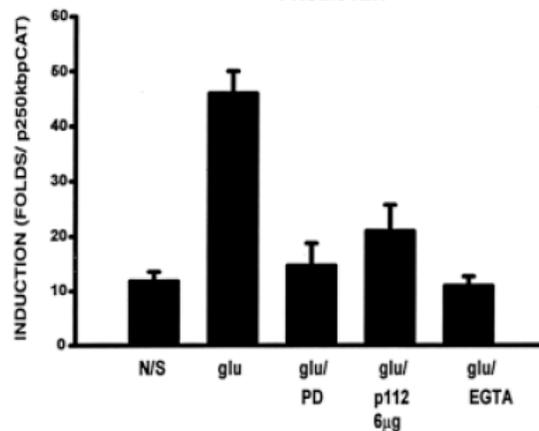


Figura 12. ERK1/2 participa en la activación de *chkbp*. BGC fueron transfectadas con la construcción que contiene el sitio chAP-1 del promotor de *chkbp* (chAP-1/250kbpCAT) o co-transfectadas con chAP-1/250kbpCAT y el plásmido que expresa la mutante negativa de la enzima RSK (p112), y tratadas con Glu 1 mM en medio libre de Ca^{2+} (EGTA 1 mM) o en presencia de PD98059 (10 μM , 30 min antes de Glu). Las actividades relativas están expresadas como en relación a la actividad de la construcción 250kbpCAT en células no estimuladas. (Aguirre et al, 2002).

1.6 p38 MAPK

Las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK), comprenden una familia de cinasas que tienen el papel fundamental de transducir señales extracelulares en respuestas celulares. Hasta el momento se han caracterizado cuatro subfamilias de MAPKs: ERK1/2, ERK5, JNK y p38. Las MAPKs son proteínas cinasas que fosforilan en residuos de serina y treonina seguidos de residuos ricos en prolina. Las MAPKs pueden ser activadas por una gran variedad de estímulos extracelulares, pero en general, ERK1/2 y ERK 5 son activadas preferencialmente en respuesta a factores de crecimiento y ésteres de forbol, mientras que las cinasas JNK y p38 responden fácilmente a estímulos de estrés celular, como choque osmótico o radiación ionizante. Las cuatro subfamilias de MAPK poseen características que las identifican unas de otras, sin embargo comparten algunas otras como la forma de activación (Roux y Blenis, 2004).

La proteína p38 MAPK fue inicialmente descubierta en *Saccharomyces cerevisiae* como una proteína cinasa activada por hiperosmolaridad y fue llamada Hog1 (Han et al, 1994). Posteriormente, su ortólogo, fue identificado como una proteína de 38 kDa que se fosforila en respuesta a la estimulación con lipopolisacárido (LPS). De manera simultánea el homólogo de p38 MAPK en humanos fue clonado como una molécula que une compuestos derivados de pirimidil imidazol (Han et al, 1995), los cuales inhiben la producción de interleucina-1 (IL-1) y el factor de necrosis tumoral (TNF) en monocitos (Raman et

al, 2007). A la fecha se han identificado cuatro isoformas, codificadas en diferentes genes, denominadas α , β , γ y δ . Las cinasas p38 α y β , son expresadas de manera ubicua, mientras que las isoformas γ y δ se expresan diferencialmente dependiendo del tejido: p38 γ se expresa principalmente en músculo esquelético y se regula positivamente durante la diferenciación muscular, mientras que p38 δ es regulada durante el desarrollo en pulmón, riñón, órganos endócrinos e intestino delgado (Ono y Han, 2000). La isoforma α de p38 es la mejor caracterizada y aparentemente la isoforma de mayor relevancia fisiológica, debido a su expresión ubicua y a la diversidad de funciones en las que participa (Nebreda y Porras, 2000).

La homología de secuencia entre estas cinasas es de aproximadamente 60%, mientras que comparten entre el 40-45% con miembros de las otras subfamilias de MAPKs. Sin embargo podemos mencionar que las isoformas α y β son más parecidas, debido a que comparten el 75% de identidad de secuencia de aminoácidos, y a que ambas isoformas son inhibidas por compuestos derivados de pirimidil imidazol como SB203580 y SB202190, mientras que las isoformas γ y δ comparten el 70% de identidad de secuencia de aa y no son susceptibles a este tipo de inhibición (Tabla 3) (Cuenda y Rousseau, 2007).

Isoforma	Otros nombres	No. de aa	Tamaño del mRNA (kb)	Peso molecular (kDa)	Sensibilidad a pirimidil imidazoles
p38 α	p38, CSBP, MPK2, RK, Mxi2	360	3.5	38	+
p38 β	p38-2, p38 β_2	364	2.5	39	+
p38 γ	ERK6, SAPK3	367	2.0	43	-
p38 δ	SAPK4	266	1.8	40	-

Tabla 3. Propiedades de las isoformas de la proteína p38 MAPK (Tomado de Cuenda y Rousseau, 2007).

La enzima p38 MAPK comparte características estructurales con los otros miembros de esta familia. Su estructura tridimensional revela que consta de dos dominios separados por un segmento flexible que permite el cambio en la conformación de la molécula, de tal manera que los dominios pueden rotar liberando a sus sustratos o juntarse para acercar el sitio activo. El dominio amino terminal está compuesto por 135 aa, y contiene el sitio de unión para ATP y el dominio para interacción con proteínas de andamiaje, proteínas activadoras, fosfatasa o blancos de p38 MAPK. Mientras que el extremo carboxilo terminal de 225 residuos, contiene el asa de activación con el tripéptido Thr-Gly-Tyr y el sitio de unión para Mg^{2+} . El dominio catalítico se encuentra entre los dos dominios. Todos los subtipos de p38 MAPKs son activados por la fosforilación del tripéptido de activación (Wilson et al, 1996).

En mamíferos, las isoformas de p38 MAPK son activadas por estrés celular (como radiación UV, choque osmótico, hipoxia, entre otros), citocinas proinflamatorias y en menor medida por estímulos mitogénicos. En respuesta a

estos estímulos se inicia la cascada de activación de p38 MAPK: MAPKKK/MAPKK/MAPK. Las MAPKKKs que participan en la activación de p38 MAPK incluyen la cinasa que activa al factor de crecimiento transformante β -1 (TAK1), la cinasa de linaje mezclado (MLK), cinasa reguladora de la señal de apoptosis (ASK1/MAPKKK5), cinasas de doble cremallera de leucina (DLK), MEKKK4 (revisado en Gallo y Johnson, 2002). También contribuyen a la activación cascada arriba de p38 MAPK algunas proteínas de la familia de Rho como Rac1 y Cdc42. Las MAPKKs específicas que se encargan de fosforilar a p38 MAPK en los residuos Thr180 y Tyr182 son MEK3 y MEK6. En ausencia de estas cinasas p38 δ puede ser fosforilada por MEK4 y MEK7, cinasas que fosforila a JNK. Mientras que MEK6 activa todas las isoformas de p38, MEK3 fosforila preferencialmente a las isoformas α y β (Roux y Blenis, 2004).

La actividad de p38 MAPK está regulada por sus interacciones proteicas. Las proteínas de andamiaje cumplen la función de integrar estos grupos de proteínas de señalización. A diferencia de los otros miembros de la familia de MAPKs, se han identificado pocas proteínas de andamiaje específicas para p38 MAPK. Una de estas es la proteína de andamiaje sensible a osmolaridad (OSM), que forma un complejo proteico con las proteínas MEKK3, MEK3 y p38 MAPK. En que en respuesta a estrés osmótico, OSM se une a Rac en la membrana plasmática y recluta al complejo de p38 MAPK, lo cual permite tener a p38 MAPK y otras cinasas asociadas en proximidad con el citoesqueleto de actina, el cual debe ser reorganizado para permitir la adaptación de la célula ante el estrés osmótico. Algunas otras proteínas de andamiaje como proteína que interactúa con

JNK 2 (JIP2), JIP4 y JSAP, inicialmente descritas como proteínas de andamiaje para JNK, también participan en la formación de complejos de señalización de las isoformas de p38 MAPK (revisado en Cuenda y Rousseau, 2007; Raman et al, 2007).

La localización de p38 MAPK y su re-localización después de su activación no es del todo clara. Estudios de inmunofluorescencia han demostrado la presencia de p38 MAPK tanto en el citoplasma como en el núcleo de células activadas. No obstante también se ha reportado que p38 MAPK se transloca al núcleo en respuesta a ciertos estímulos de estrés celular, como el estrés isquémico en el miocardio (revisado en Raman et al, 2007). En contraste, p38 MAPK se encuentra en el núcleo de células 293T en reposo y es exportada al citoplasma después de la estimulación con una gran variedad de agentes. Aún cuando el mecanismo de regulación de la localización subcelular de p38 MAPK no se ha establecido, al parecer las interacciones proteicas son importantes. Ejemplo de ello es que el sitio de unión para MK3 en p38 MAPK, se sobrelapa con la señal de localización nuclear (NLS). Debido a esto, la unión de p38 MAPK y MK3 inhibe su importe nuclear, regulando la localización subcelular de estas enzimas y por lo tanto impidiendo la accesibilidad a blancos nucleares (Tanoue et al, 2001).

Aunado a la localización subcelular, las isoformas α y β de p38 MAPK se regulan de manera diferencial en el cerebro adulto de rata, lo cual sugiere que las isoformas de p38 MAPK podrían tener funciones fisiológicas específicas dentro de un mismo tipo celular, aumentando la complejidad de la regulación de p38 MAPK

(Zarubin y Han, 2005). Además, se ha demostrado que la pérdida de las isoformas β , γ o δ no altera el desarrollo normal de los organismos, lo cual indica que existe redundancia en la función de estas cinasas. Por el contrario, la eliminación de p38 α es letal para el embrión, demostrando que algunas funciones no pueden ser compensadas por los otros miembros de esta familia (revisado en Thornton y Rincón, 2009).

La activación de p38 MAPK ha sido asociada tradicionalmente a la respuesta a estrés celular y a procesos apoptóticos (Zarubin y Han, 2005). Sin embargo la función de p38 MAPK se extiende a su participación en la regulación de procesos como proliferación, diferenciación y supervivencia celular (Thornton y Rincón, 2009). La expresión diferencial de las isoformas de p38 MAPK, así como la activación y especificidad por sus sustratos tiene como resultado la diversidad de sus funciones biológicas (Ono y Han, 2000). Por ejemplo, los factores de transcripción MEF2A y MEF2C son preferencialmente fosforilados y activados por p38 α y β , pero no por p38 γ o δ . En neutrófilos humanos, han sido detectados solamente p38 α y δ , sin embargo p38 α es la cinasa involucrada en la adhesión celular, activación de NF κ B y síntesis de TNF α , en respuesta a LPS (Nebreda y Porras, 2000).

El primer sustrato descrito para p38 MAPK fue la proteína cinasa activada por MAPK 2 (MK2). La cinasa MK2 activa a la proteína de choque térmico 27 (HSP27) y la proteína específica de linfocitos 1 (LSP1), a los factores de transcripción: CREB, factor activador de la transcripción 1 (ATF1), el factor de

respuesta a suero (SRF) y a la enzima tirosina hidroxilasa. Además p38 MAPK, a través de la fosforilación de MK2, participa en la estabilización de mRNA. Otro sustrato de p38 MAPK es la proteína MNK1, cuya activación está estrechamente relacionada con la regulación del inicio de la traducción, ya que fosforila al factor de inicio de la traducción eucariótico 4E (eIF-4E) (Zarubin y Han, 2005). Otro ejemplo de la participación de p38 MAPK en la regulación de la traducción, es el hecho de que fosforila a la cinasa del factor de elongación eucariótico 2 (eEF2K) (Knebel et al, 2001). Otros blancos de p38 MAPK son los factores de transcripción: ATF-2, ATF-1, SRF, CHOP, C/EBP β , MEF2C y MEF2A (Ono y Han 2000). El factor de transcripción AP-1, es un elemento *trans* muy importante en la regulación de una gran variedad de genes. La cinasa p38 MAPK media la activación de AP-1 a través de la fosforilación de varias de las proteínas que forman al dímero AP-1, por ejemplo ATF-2, FOS y JUN (Zarubin y Han, 2005; Tanos et al, 2005; Pramanik et al, 2003).

Un factor importante en la regulación de genes es la remodelación de la cromatina, que permite el acceso de los factores de transcripción al DNA. La proteína p38 MAPK puede promover la fosforilación de las histonas por medio de la activación de las cinasas MSK-1 y RSK2 (Turjanski et al, 2007; Brami-Cherrier et al, 2007).

Al igual que las otras MAPKs, p38 MAPK se expresa ampliamente en SNC, tanto en neuronas como en células gliales. La mayor parte de la información acerca de la función de p38 MAPK en el SNC de vertebrados, proviene del estudio

de numerosos modelos de muerte neuronal, en los cuales p38 MAPK participa activando caspasas y factores de transcripción (Mukherjee et al, 1999, Chen et al., 2003; Ferrer et al, 2001; Cao et al, 2004). La activación de p38 MAPK en células gliales se presenta principalmente en microglía. En este tipo celular p38 MAPK regula la liberación de moléculas pro-inflamatorias citotóxicas contribuyendo de esta manera a la muerte neuronal (revisado en Watkins y Maier, 2003). Además podemos mencionar la participación de p38 MAPK en el mecanismo de LTD en hipocampo (Bolshakov et al, 2000) y en el aprendizaje asociativo en conejo (Zhen et al, 2001).

2. JUSTIFICACIÓN

El Glu está implicado en una gran variedad de eventos en el SNC, los cuales incluyen plasticidad sináptica, aprendizaje y memoria, desórdenes neurodegenerativos y neurotoxicidad. El Glu activa vías de señalización por la unión a los diferentes tipos de GluRs expresados en neuronas y células gliales. Mientras que la señalización glutamatérgica en neuronas ha sido extensamente estudiada, aquella que se establece en células gliales ha sido poco explorada. La activación de p38 MAPKs en células gliales ha sido principalmente caracterizada en procesos de muerte celular, sin embargo su participación en la señalización por Glu, que conlleva a la expresión génica en BGC aún se desconoce. Debido a lo anterior, en este trabajo de investigación se evaluó la activación de p38 MAPK por Glu en BGC y su participación en la regulación de la transcripción de *chkbp*.

3. HIPÓTESIS

La proteína p38 MAPK activada por la estimulación de receptores glutamatérgicos en células gliales de Bergmann, participa en la regulación transcripcional de *chkbp*.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Estudiar la participación de p38 MAPK en la regulación de la transcripción de *chkbp* dependiente de glutamato en células gliales de Bergmann

4.2 Objetivos particulares

- 4.2.1 Determinar la activación de p38 MAPK en respuesta a glutamato
- 4.2.2. Establecer la cinética de activación de p38 MAPK por glutamato
- 4.2.3 Caracterizar el(los) subtipo(s) de receptor(es) a glutamato involucrados en la activación de p38 MAPK
- 4.2.4 Investigar la participación de Ca^{2+} en la activación de p38 MAPK dependiente de Glu
- 4.2.5 Evaluar la participación de p38 MAPK en la unión de AP-1 al DNA dependiente de glutamato
- 4.2.6 Analizar la participación de p38 MAPK en la regulación transcripcional de *chkbp* por glutamato

5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

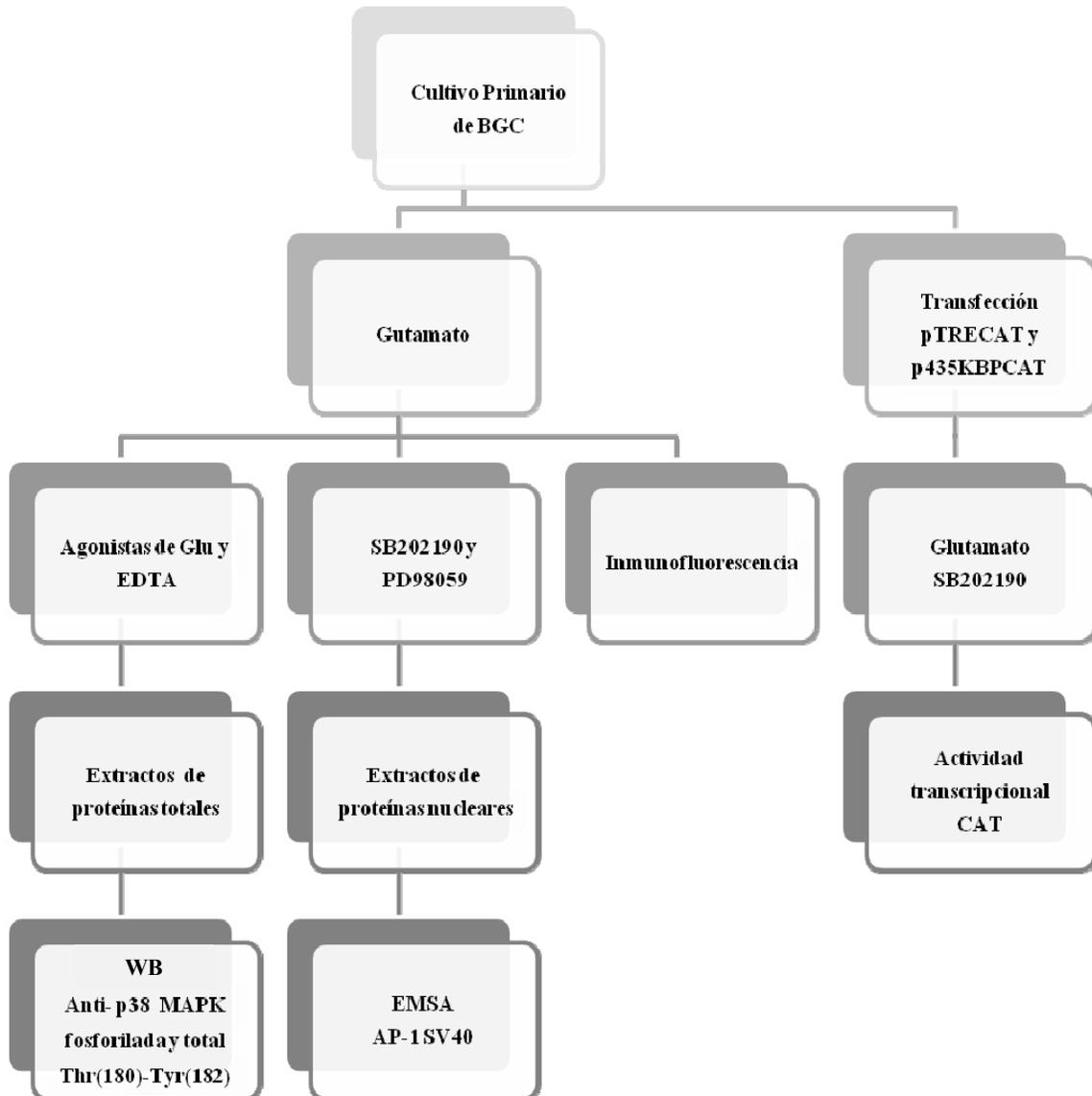


Figura 13. Diagrama correspondiente a la estrategia experimental desarrollada durante el presente trabajo

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Animales

Se utilizaron embriones de pollo, los cuales fueron donados por la empresa Avimex, S. A. de C.V. Los embriones se mantuvieron a 37 °C hasta el momento de ser sacrificados.

6.2 Materiales

Los reactivos para el cultivo primario de BGC se obtuvieron de Invitrogen (Gaithersburg, MD, USA). Los reactivos para la determinación de proteínas, geles de poliacrilamida e inmunoprecipitación en fase sólida fueron obtenidos de Bio-Rad (Hercules, CA, USA). Los anticuerpos anti-fosfo-p38 MAPK (Thr180/Tyr182) monoclonal (No. Cat. 9215) y anti-p38 MAPK policlonal (No. Cat. 9212) fueron obtenidos en Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA), los anticuerpos anti-conejo policlonal acoplado a peroxidasa y anti-conejo policlonal acoplado a fluoresceína (FITC) fueron obtenidos en Laboratorios Zymed (San Francisco, CA, USA). El equipo de reactivos de quimioluminiscencia ECL fue obtenido de GE Healthcare (Chalfont St. Giles UK). Los bloqueadores PD98059 (2-(2-Amino-3-metoxifenil)-4H-1-benzopiran-4-ona), SB202190 (4-[4-(4-Fluorofenil)-5-(4-piridinil)-1H-imidazol-2-il] fenol) fueron obtenidos de Tocris Cookson Ltd (Bristol, UK). Los demás reactivos utilizados fueron obtenidos de Sigma (St. Louis, MO, USA).

6.3 Cultivo primario de células gliales de Bergmann

Los cultivos celulares representan una herramienta invaluable en el estudio de un gran número de procesos fisiológicos. Los cultivos celulares facilitan el análisis de propiedades y procesos biológicos que no son accesibles para su estudio a nivel del organismo completo. Además, los cultivos celulares facilitan la obtención de una gran cantidad de células un solo tipo celular o cultivos mixtos de células, según se requiera. El crecimiento de células en cultivo se logra añadiendo líquidos obtenidos de sistemas vivientes, como linfa, suero sanguíneo, etc., además de una gran variedad de nutrientes como hormonas y factores de crecimiento. Además las células requieren de una superficie apropiada sobre la cual crecer. Existen diferentes tipos de cultivos celulares: cultivos primarios, cultivos secundarios y cultivos de células inmortalizadas. Los cultivos primarios se obtienen a partir de células de propio organismo, en su mayoría de embriones (Helgason y Miller, 2005).

El cultivo primario de células gliales de Bergmann fue realizado como detallan Ortega y colaboradores (1991). Cerebelos de embriones de pollo de 14 días fueron disecados y homogenizados mecánicamente con agujas en medio mínimo Eagle modificado por Dulbecco (DMEM). El homogenado se dejó sedimentar durante 10 min para eliminar residuos de tejidos y agregados celulares. Posteriormente, se aspiró el sobrenadante y el sedimento se centrifugó 5 min a 3000 g, para coleccionar las células, las cuales se resuspendieron en DMEM. El número de células viables se determinó por exclusión con azul de tripano. Las

células fueron sembradas a una densidad de 8×10^5 /ml en medio DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino y 1% de antibióticos (50 µg/ml de gentamicina, 10,000 U de penicilina sódica), incubadas a 37°C en 5% de CO₂ y utilizadas después de 5-6 días de cultivo. Se realizaron determinaciones inmunocitoquímicas y de los flujos iónicos inducidos por kainato, que demostraron que la mayoría de las células corresponden a células gliales de Bergmann (Ortega et al, 1991). Las monocapas confluentes de células gliales de Bergmann fueron preincubadas con albúmina sérica bovina al 0.5% en DMEM, durante dos horas y tratadas como se indica.

6.4 Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) e inmunodetección en fase sólida

La electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) permite la separación de proteínas mediante el movimiento de las proteínas en una matriz porosa por la aplicación de una corriente eléctrica. El dodecil sulfato de sodio (SDS) es un detergente aniónico que se une fuertemente a las proteínas formando complejos SDS-proteína, los cuales tienen aproximadamente la misma carga negativa por aa, así como la misma conformación. De esta manera una mezcla de proteínas puede ser separada en geles de poliacrilamida, los cuales consisten de polímeros de acrilamida y bis-acrilamida. Estos geles forman una matriz en la cual el tamaño de los poros es inversamente proporcional a la concentración de acrilamida. Las proteínas son separadas por el patrón de migración de acuerdo al peso molecular: las proteínas de menor peso molecular migran más rápidamente

que aquellas de mayor peso molecular. Una vez separadas, las proteínas pueden ser electrotransferidas a membranas de nitrocelulosa o polivinilideno fluoruro (PVDF) e incubadas con anticuerpos específicos para las proteínas que se desea estudiar, detectándose la inmunoreactividad de la proteína contra el anticuerpo utilizado por la incubación con un segundo anticuerpo que reconoce al anticuerpo primario y que está conjugado con un sistema de detección (Davis, 1994).

Cantidades iguales de proteína (aproximadamente 50 μ g) fueron analizadas en geles de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio (SDS) al 12% y transferidas a membranas de nitrocelulosa. Las membranas fueron teñidas con Ponceau S para comprobar que la cantidad de proteínas en las muestras era igual. Las membranas fueron desteñidas con solución amortiguadora salina de fosfatos (PBS). Las membranas fueron incubadas con leche semidescremada al 10% en TBS y 0.1% de Tween 20, para bloquear el exceso de sitios de unión inespecíficos. Las membranas fueron incubadas durante toda la noche a 4°C con los anticuerpos específicos anti-fosfo-p38 MAPK o anti-p38 MAPK, seguido de los anticuerpos secundarios. Los péptidos inmunoreactivos fueron detectados utilizando el equipo de quimioluminiscencia (ECL) (GE Healthcare, Chalfont St. Giles UK) y placas autoradiográficas Kodak X-OMAT. Las densidades ópticas de fosfo-p38 MAPK fueron normalizadas con las densidades obtenidas de p38 MAPK.

6.5 Inmunocitoquímica

Este método permite detectar la presencia así como la localización subcelular de una molécula de interés, en células en suspensión o cultivos celulares mediante el uso de anticuerpos específicos que reconocen a la proteína. Los anticuerpos son detectados utilizando diversos métodos como marcadores fluorescentes, enzimas, isótopos radioactivos y oro coloidal (Javois, 1999).

Las células fueron cultivadas en portaobjetos tratados con poli-L-lisina (0.01 mg/mL). Las células control (NE) o tratadas con Glu 1 mM 30 min, fueron fijadas con metanol a -20 °C durante 10 min. Las células fueron permeabilizadas con Tritón X-100 0.5% en PBS y bloqueadas con BSA 0.5% por 60 min. Las células fueron incubadas con anti-fosfo-p38 MAPK (Thr180/Tyr182), en una dilución 1:20 durante 60 min, a temperatura ambiente. Las células fueron lavadas tres veces con BSA/PBS e incubadas con anticuerpo secundario anti-conejo acoplado a fluoresceína (FITC) 1:100 durante 60 min a temperatura ambiente. Los núcleos fueron teñidos con 4',6-diamidino-2-fenilindol diclorhidrato (DAPI). Los portaobjetos fueron montados con Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Las preparaciones celulares fueron analizadas con un microscopio de fluorescencia Zeiss Axioscope 40 y el programa Axiovision (Carl Zeiss, Inc., Thornwood, NY, USA).

6.6 Ensayos de retardamiento de entrada al gel

Diversos mecanismos nucleares involucran las interacciones DNA-proteína, las cuales pueden ser medidas utilizando ensayos de movilidad electroforética también llamados de retardamiento de entrada al gel (EMSA). Este método se basa en que las proteínas de diferentes tamaños, pesos moleculares y carga isoelectrónica tienen migran de manera diferente en matrices de geles no desnaturizantes. En el caso de los complejos DNA-proteína, la presencia de una proteína unida al DNA causa que este migre más lentamente que el DNA solo. El cambio en la movilidad de los complejos DNA-proteína son observables debido a que los oligonucleótidos específicos son marcados con un isótopo radioactivo (Moss, 2001).

6.6.1 Marcaje de sonda

Fueron mezcladas cantidades equimolares de la sonda AP-1 SV40: 5'-CTAGTATAATATGACTAAGCTGTG-3', en ambos sentidos y fue hibridada incubando la mezcla a 90 °C durante 5 min y bajando la temperatura lentamente hasta los 37 °C. Los extremos de los oligonucleótidos hibridados son rellenados con el fragmento Klenow de la DNA polimerasa I de *E. coli*. Se marcaron de 100-150 ng de DNA, el cual se llevó a un volumen final de 10 µl, con una concentración final de 10 mM de los nucleótidos dGTP, dTTP, dCTP, 10 µCi de α -[³²P]-dATP y 1 µl de solución de marcaje 10X (50 mM de NaCl pH 7.6). Esta mezcla se incubó

con 1U de enzima Klenow por 40 min a temperatura ambiente. Finalmente se diluyó la sonda marcada a una concentración final de 2 ng/μl.

6.6.2 Preparación de extractos nucleares

Después del periodo de estimulación, las células fueron cambiadas con medio DMEM, y mantenidas en incubadora durante 1 h. Las células fueron cosechadas con medio Tris Dulbecco, y homogenizadas en 400 μl de solución amortiguadora A (10 mM HEPES pH 7.9, 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 1 mM DTT, 0.1 mM PMSF). Posteriormente se incubaron 15 min a 4 °C y se adicionaron 25 μl de Nonidet 40 (NP40) al 10 % y se agitó por 10 seg. El homogenizado se centrifugó por 1 min a 10,500 g. Las pastillas obtenidas fueron resuspendidas en 50 μl de solución amortiguadora C (20 mM HEPES, pH 7.9, 0.42 M NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 1 mM PMSF) fría y agitadas en un vortex a 4 °C por 30 min. Los homogenados fueron centrifugados por 5 min a 8500 g. Los sobrenadantes (extracto nuclear) fueron separadas en fracciones de 10 μl y guardados a -70 °C hasta su uso. La concentración de proteínas nucleares se determinó por el método de Bradford (1976).

6.6.3 Interacciones proteína-DNA y electroforesis en geles nativos

Aproximadamente 20 μg de extracto nuclear fueron incubados 20 min en hielo con 1 μg de poli[(dl-dC)] como competidor no específico, en un medio con 4 mM de espermidina, 5 mM de DTT en un volumen final de 25 μl de solución

amortiguadora de unión (20 mM tris HCl pH 7.9, 2 mM MgCl₂, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 % glicerol, 0.1% NP40, 50 µg/mL BSA). Posteriormente se añadió 1 ng del oligonucleótido de AP-1 SV40 marcado con [³²P]. La mezcla de reacción fue incubada durante 30 min en hielo. Los complejos fueron analizados por electroforesis en geles de poliacrilamida al 6% de baja fuerza iónica (0.5 X de tris de boratos y EDTA, TBE). Los geles fueron secados al vacío y expuestos a placas autorradiográficas Kodak X-OMAT toda la noche.

6.6.4 Transfecciones transitorias

La transfección es el proceso por medio del cual se introduce DNA en el interior de células eucariotas por métodos no virales. Este método típicamente involucra la apertura temporal de poros en la membrana celular para permitir la entrada del material genético. Este material puede ser plásmidos de DNA o construcciones de siRNA, o incluso proteínas como anticuerpos. Existen varios métodos de transfección que permiten la apertura de los poros membranales, entre ellos podemos mencionar la electroporación, el fosfato de calcio o la mezcla de lípidos catiónicos para producir liposomas, los cuales se fusionan con la membrana plasmática y depositan el material (Davis et al, 1994).

Para estos ensayos fueron utilizados los plásmidos p435kbpCAT y pTRE-CAT. Para generar las construcciones de la región reguladora *chkbp* 5'-3', se clonó la región completa del promotor con los extremos *SphI-XbaI* en el vector pCAT-BASIC (Promega, Madison, WI, USA), dando origen a la construcción

p435kbpCAT (Aguirre y cols., 2002). Mientras que el plásmido pTRE-CAT contiene cinco copias del sitio AP-1 clonado frente al promotor de TK y el gen reportero CAT (Rutberg et al, 1997). La transfección de BGC se llevó a cabo cuando las células alcanzaron el 60% de confluencia. Se utilizaron 6 µg del plásmido p435kbpCAT o 1 µg del plásmido pTRE-CAT. El DNA plasmídico se mezcló en CaCl₂ 0.25 M, y se adicionó por goteo a un tubo que contenía un volumen de solución He BS 2X (Hepes 0.05 M, NaCl 0.28 M, Na₂HPO₄ 1.5 mM), agitando constantemente en un agitador. Esta mezcla se incubó durante 20 min y posteriormente los cultivos de BGC fueron expuestos a la mezcla de transfección por 5 horas. Bajo esas condiciones la eficacia de transfección es de aproximadamente 50%, lo cual fue determinado en cada ensayo utilizando un control interno de transfección de β-gal. Los tratamientos con el bloqueador de p38 MAPK o Glu fueron llevados a cabo 24 horas post-transfección, por los periodos y en las concentraciones indicadas.

6.6.5 Ensayo de la actividad cloranfenicol acetil transferasa (CAT)

La enzima CAT cataliza la transferencia del grupo acetil del Acetil CoA al cloranfenicol. Puede formar dos tipos de cloranfenicol, en función de la cantidad de grupos acetil que tenga. Estos distintos tipos de cloranfenicol se podrán distinguir por cromatografía en capa fina, y si se emplea ¹⁴C se observa por autorradiografía. Cuanto más CAT haya más acetilación del cloranfenicol se producirá, de manera que podremos diferenciar los dos tipos de cloranfenicol, ya que migrarán de diferente manera. El vector CAT que se emplea contiene la

región que se va a estudiar, al lado del gen *cat*, de manera que se exprese este. Si se realiza un análisis por deleciones de la región reguladora, tendremos diferentes tipos de vectores CAT (Davis et al, 1994).

Las células fueron cosechadas con solución amortiguadora TEN (40 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA, 15 mM NaCl), lisadas con tres ciclos de cambios de temperatura en 0.25M Tris-HCl pH 8.0 y centrifugados a 12000 g por 3 min. La concentración de proteínas fue determinada utilizando el método de Bradford (Bradford, 1976). Cantidades iguales de lisados protéicos, aproximadamente 80 µg, fueron incubados con 0.25 µCi de [¹⁴C]-cloranfenicol (50 mCi/mmol) y 0.8 mM acetil coenzima A a 37 °C por 16 h. Al término de este tiempo, se adicionaron 500 µl de acetato de etilo para detener la reacción. La mezcla se centrifugó a 13,000 g por 5 min y se recuperó la fase orgánica, en un tubo nuevo. El acetato de etilo se evaporó en un concentrador de vacío. Posteriormente la pastilla se resuspendió en 30 µl de acetato de etilo y cada muestra se aplicó en una placa de sílica gel (fase fija) en puntos de 1.5 cm de distancia entre una muestra y la otra. La cromatografía se corrió en una mezcla de cloroformo : metanol, en proporción 19:1 (equilibrada dos horas antes). La placa se secó al aire y se realizó la cuantificación de las formas de cloranfenicol-¹⁴C acetilado y no acetilado usando un escáner óptico. La actividad de CAT fue determinada tomando la fracción acetilada corregida con la actividad en el vector pCAT-BASIC y fueron expresadas como la actividad relativa de las células control no tratadas.

6.7 Análisis estadístico

Los datos fueron expresados como el promedio \pm error estándar. Se realizó el análisis de varianza no paramétrico Kruskal-Wallis seguido de la prueba *post-hoc* de Dunn's para determinar las diferencias entre los grupos. El análisis estadístico fue llevado a cabo con el programa Prisma 4.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

7. Resultados

7.1 *El Glu induce la fosforilación de p38 MAPK en BGC*

La señalización mediada por las MAPKs participa en una variedad de funciones celulares, al fosforilar sustratos como cinasas, fosfolipasas, factores de transcripción y proteínas de citoesqueleto. En células gliales, la función de p38 MAPK más allá de su participación en muerte celular, inflamación y dolor, aún no se conoce. Debido a lo anterior, decidimos evaluar la activación de p38 MAPK por Glu en BGC. La activación de p38 MAPK requiere de la fosforilación en los residuos Thr180 y Tyr182, por lo que se evaluó el patrón de fosforilación de p38 MAPK en respuesta a la activación de receptores de Glu, con un anticuerpo que reconoce la forma fosforilada de los residuos Thr180 y Tyr182. Para tal objetivo, se utilizaron cultivos primarios de BGC, tratados con vehículo (NE) o Glu 1 mM (Glu), durante 30 min. El tratamiento de BGC con Glu aumentó la fosforilación de p38 MAPK, tal como era de esperarse. La cantidad p38 MAPK no cambia con el tratamiento (Figura 14A). La activación de p38 MAPK fue corroborada utilizando inmunocitoquímica. En la Figura 14B se muestran fotomicrografías de cultivos primarios de BGC (Contraste de fase) tratadas con vehículo (NE) o Glu 1 mM durante 30 min. En las células tratadas con Glu se observa mayor inmunorreactividad de p-p38 MAPK, en comparación a los cultivos que no fueron estimulados (NE) (Figura 14B). Aunado a lo anterior, se observó un cambio en la localización subcelular de p38 MAPK, del citoplasma hacia el núcleo inducido por el tratamiento con Glu (Figura 14B).

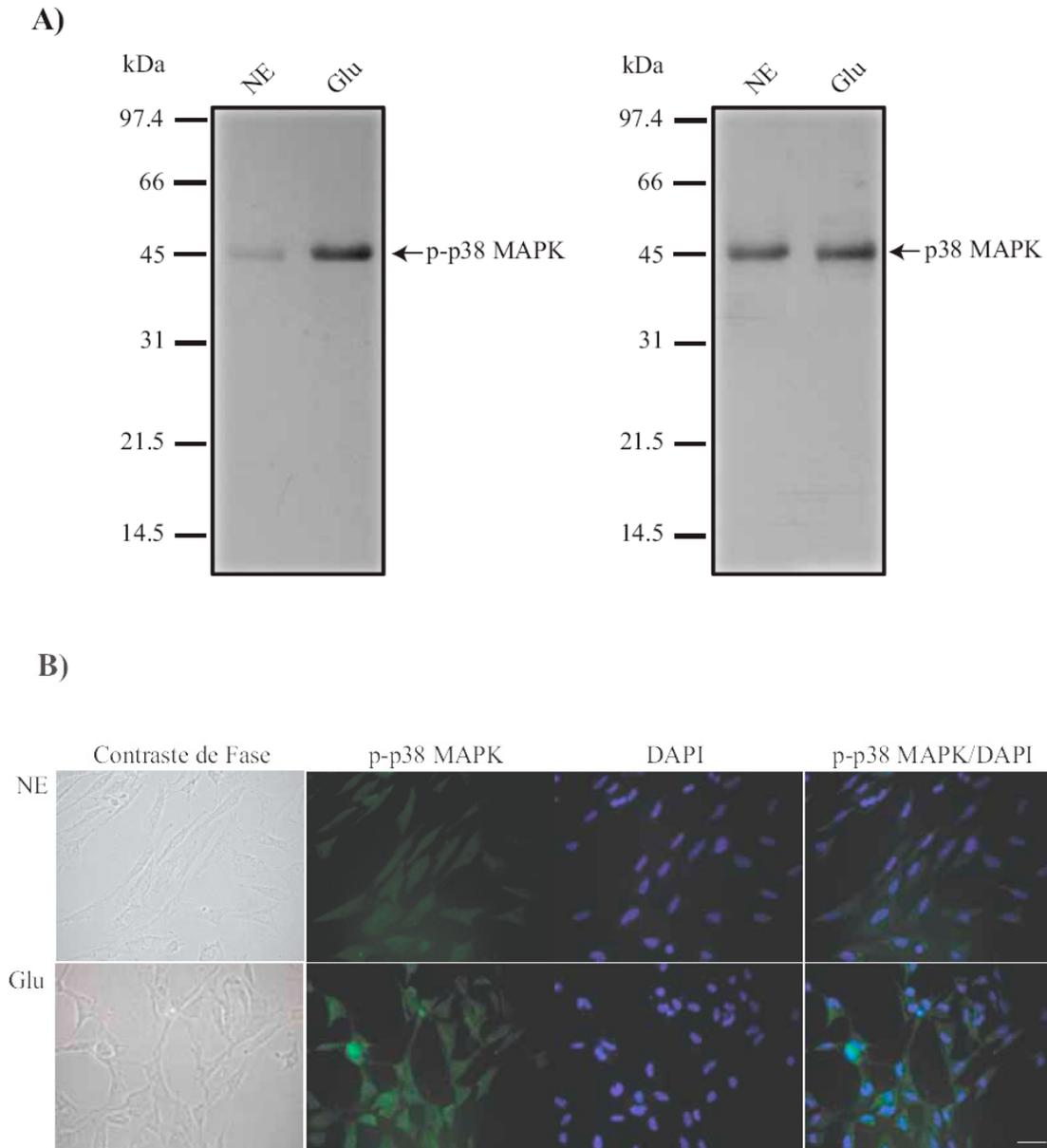


Figura 14. El Glu induce la fosforilación de p38 MAPK en BGC. A) Monocapas de BGC fueron tratadas con vehículo (NE) o Glu 1mM por 30 min. Los extractos totales de proteína fueron analizados por inmunodetección en fase sólida. Las membranas fueron incubadas con una dilución 1:500 de un anticuerpo monoclonal anti-fosfo p38 MAPK (Thr180/Tyr182) (izquierda), y anti-p38 (derecha). Los polipéptidos inmunopositivos fueron visualizados con anticuerpo anti-conejo acoplado a peroxidasa utilizando el equipo de reactivos de quimioluminiscencia (ECL) y expuestas a placas autorradiográficas. Se muestra un autorradiograma de un experimento típico. B) Fotomicrografías de monocapas de BGC (Contraste de fase), tratadas con vehículo (NE) o Glu 1 mM por 30 min e incubadas con el anticuerpo anti-fosfo-p38 MAPK (Thr180/Tyr182), diluido 1:20. Las células inmunorreactivas fueron observadas usando un anticuerpo policlonal anti-conejo conjugado con FITC. Los núcleos de BGC fueron teñidos con DAPI (2 μ g/ml). En el panel final se muestran las imágenes de la superposición de p-p38 MAPK/DAPI. La barra corresponde a 50 μ M.

7.2 La fosforilación de p38 MAPK es dependiente del tiempo y de la dosis de Glu

Una vez que se determinó que el Glu induce la fosforilación de p38 MAPK en BGC, se decidió establecer la cinética de fosforilación en respuesta a la estimulación glutamatérgica. Para tal efecto cultivos primarios de BGC fueron tratados con Glu 1 mM durante diferentes periodos de tiempo. El tratamiento con Glu aumentó la fosforilación de p38 MAPK, desde los 15 min y que se sostuvo durante todo el tiempo de estimulación, observándose un máximo de 300 % a los 120 min de tratamiento (Figura 15A). Se realizó un ensayo dosis-respuesta para la fosforilación de p38 MAPK, utilizando diferentes concentraciones de Glu durante 30 min. El aumento en la fosforilación de p38 MAPK fue acorde con la concentración de Glu aplicada, lo anterior demuestra que es un efecto mediado por receptores (Figura 15B). Todos los tratamientos subsecuentes se realizaron durante 30 min, con una concentración de 1 mM de Glu.

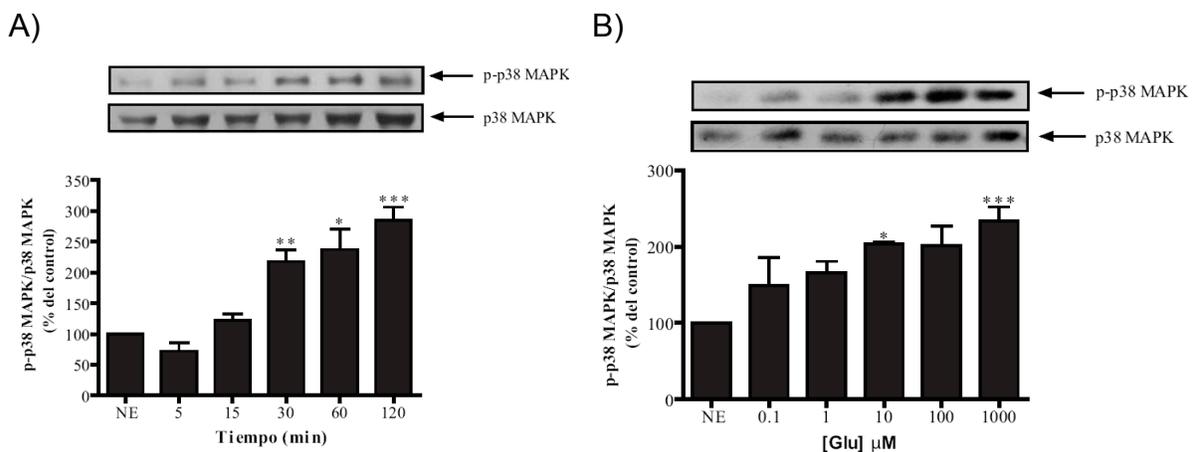


Figura 15. La fosforilación de p38 MAPK es dependiente del tiempo y de la dosis de Glu. A) Monocapas de BGC fueron tratadas a diferentes periodos de tiempo con vehículo solo (NE) o con Glu 1 mM. Se obtuvieron extractos de proteína total y fueron analizados como se describe en la

Figura 14. La cantidad de p38 MAPK fosforilada (p-p38 MAPK) se representa como una fracción del contenido de p38 MAPK (p38 MAPK) y es expresada en relación al control tratado con vehículo (NE, % del control). Los datos fueron expresados como el promedio \pm error estándar, del al menos tres experimentos independientes. Se realizó un análisis de varianza no paramétrico Kruskal-Wallis seguido de una prueba post-hoc de Dunn's para comparar cada grupo contra el control no estimulado (NE) (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$). B) Monocapas de BGC fueron tratadas con concentraciones crecientes de Glu. Los niveles de fosforilación de p38 MAPK fueron detectados como en (A). Se muestran autorradiogramas típicos para p-p38 MAPK y p38-MAPK (panel superior). Los resultados fueron expresados y analizados como en (A) (*, $P < 0.05$; ***, $P < 0.001$).

7.3 *Los receptores glutamatérgicos de tipo ionotrópico y metabotrópico están involucrados en la fosforilación de p38 MAPK*

Con la intención de profundizar en el tipo de receptor involucrado en la fosforilación de p38 MAPK, se estableció el perfil farmacológico utilizando agonistas glutamatérgicos. Se utilizaron los agonistas: AMPA (500 μ M), NMDA+Gly (500 μ M, 10 μ M) y DHPG (50 μ M). Los resultados sugieren que la fosforilación de p38 MAPK por Glu es mediada por receptores de tipo metabotrópico y ionotrópico de tipo AMPA (Figura 16A).

Debido a que el resultado anterior reveló que al menos dos tipos de receptores glutamatérgicos están involucrados en la activación de p38 MAPK, se decidió evaluar la activación de p38 MAPK por agonistas, ionotrópicos y metabotrópicos de manera conjunta. Para tal efecto se trataron monocapas de BGC con vehículo (Ns), Glu 1 mM, AMPA (500 μ M), DHPG (25 μ M) y AMPA más DHPG (AMPA+DHPG). El efecto del tratamiento conjunto de agonistas de los receptores ionotrópicos y metabotrópicos de Glu sobre la fosforilación de p38 MAPK en los residuos Thr180/Tyr182 no es sumatorio (Figura 16B).

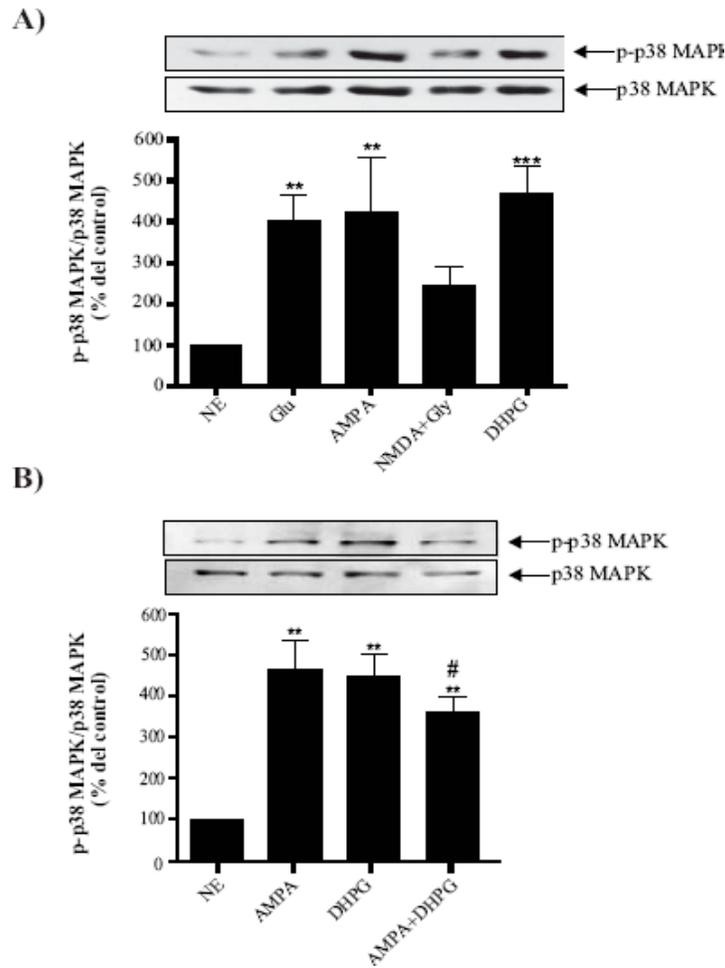


Figura 16. Los receptores glutamatergicos del tipo ionotrópico y metabotrópico están involucrados en la fosforilación de p38 MAPK. A) Monocapas de BGC fueron tratadas por 30 min con vehículo (NE), Glu (1 mM) o sus agonistas AMPA (500 μ M), NMDA+Gly (500 μ M, 10 μ M) y DHPG (25 μ M). Los niveles de fosforilación de p38 MAPK fueron detectados como se indica en la Figura 14 (**, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$). B) Monocapas de BGC fueron co-tratadas (AMPA+DHPG) con agonistas de los receptores glutamatergicos de tipo ionotrópico (AMPA) y metabotrópico (DHPG) por 30 min. Los resultados fueron expresados y analizados como en la Figura 15 (**, $P < 0.01$ vs NE). No se encontró diferencia significativa entre los grupos AMPA+DHPG y AMPA o DHPG (#).

7.4 El Ca^{2+} extracelular participa en la fosforilación de p38 MAPK mediada por Glu

El Ca^{2+} es un mensajero intracelular que participa en un gran número de funciones celulares. La señalización glutamatérgica en BGC incluye el flujo de Ca^{2+} a través de iGluRs de tipo AMPA y la movilización de Ca^{2+} intracelular por la activación de los mGluRs. Para tratar de establecer el papel del Ca^{2+} en la fosforilación de p38 MAPK se trataron cultivos primarios de BGC con vehículo (NE), Glu (1 mM) o Glu y el quelante de Ca^{2+} extracelular EDTA (500 μM) en solución de ensayo sin Ca^{2+} . La fosforilación de p38 MAPK por Glu es abatida cuando se utiliza el quelante de Ca^{2+} (Figura 17). Lo anterior demuestra la importancia del influjo de Ca^{2+} en la activación de la vía de p38 MAPK.

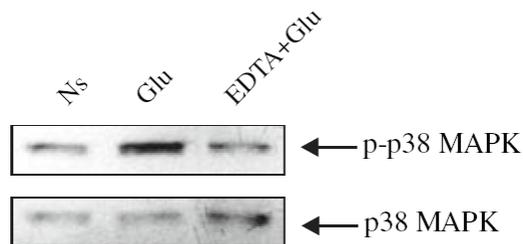


Figura 17. El Ca^{2+} extracelular participa en la fosforilación de p38 MAPK. Monocapas de BGC fueron incubadas por 30 min con Glu (1 mM) o Glu y EDTA100 μM (Glu+EDTA). Los niveles de fosforilación de p38 MAPK fueron detectados como se indica en la Figura 14. Se muestra un autorradiograma representativo de p-p38 MAPK y p38 MAPK.

7.5 p38 MAPK participa en la actividad de unión de AP-1 al DNA inducida por Glu en BGC

Debido a que el factor de transcripción AP-1 se une al GluRE en el promotor de *chkbp* aumentando su transcripción (Aguirre et al, 2000), evaluamos la participación de p38 MAPK en la actividad de unión de AP-1 al DNA. Cultivos primarios de BGC fueron tratados con Glu (1 mM) durante 30 min, y se obtuvieron extractos nucleares 90 min después del tratamiento. En la Figura 18A se observa que el tratamiento con Glu promueve la formación de un complejo retardado AP-1/DNA (AP-1 cx). Este complejo desaparece cuando es competido con un exceso (100x) de la sonda AP-1 sin marcar, demostrando la especificidad del complejo (Figura 18A).

Posteriormente, cultivos primarios de BGC fueron pre-incubados durante 30 min con el inhibidor específico de p38 MAPK: 4-[4-(4-Fluorofenil)-5-(4-piridinil)-1H-imidazol-2-il] fenol (SB202190, 1 μ M). La unión de AP-1 al DNA inducido por Glu, fue claramente reducido con el pre-tratamiento con SB202190 (Figura 18B). Se utilizó 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA, 100 nM) como control positivo de la formación del complejo AP-1/DNA (Aguirre et al, 2000). Debido a que la regulación de *chkbp* por Glu, es mediada por la ERK1/2 (Aguirre et al, 2002), se utilizó además el inhibidor de la vía de ERK1/2 MAPK (PD98059), así como los inhibidores de ambas vías de manera conjunta. Como era de esperarse, el pre-tratamiento de cultivos primarios de BGC con PD98059 (25 μ M), disminuye la unión del factor de transcripción AP-1 al DNA, inducido por Glu. Es de resaltar que

la inhibición de ambas vías de señalización (p38 y ERK1/2 MAPK), bloquea por completo la formación del complejo AP-1/DNA (Figura 18C).

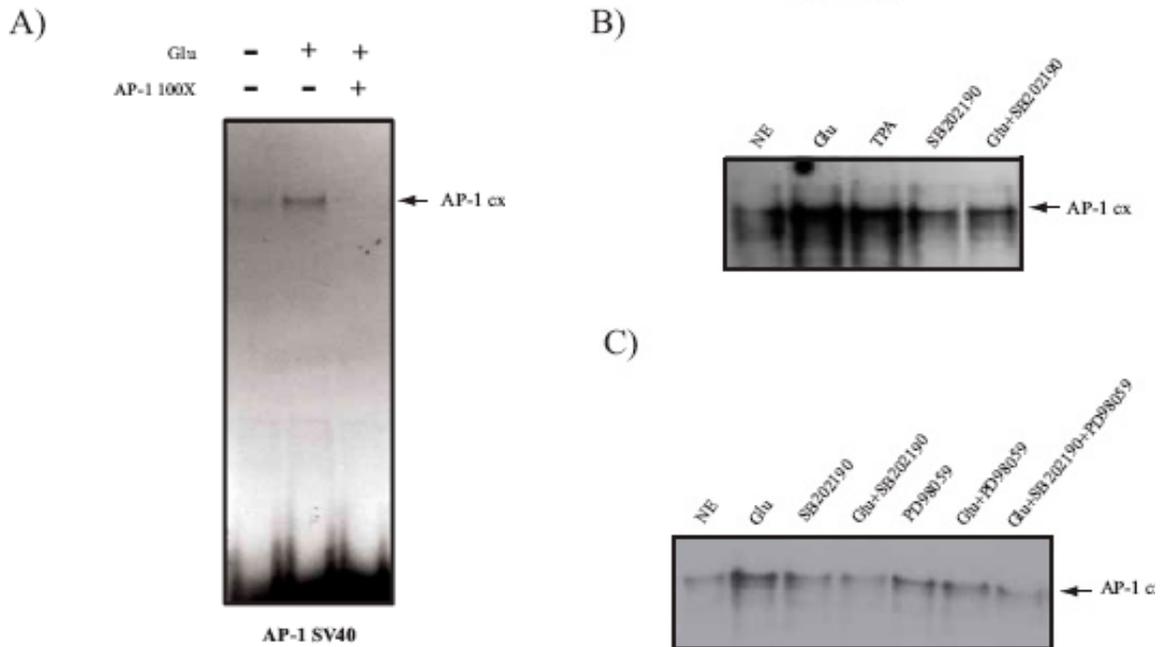


Figura 18. p38 MAPK participa en la actividad de unión de AP-1 al DNA inducida por Glu en BGC. En los tres paneles se muestran ensayos de EMSA utilizando oligonucleótidos de AP-1 SV40 marcados con ^{32}P como sonda. A) Se obtuvieron extractos nucleares de BGC tratadas durante 30 min con vehículo (NE) o Glu (1 mM), 90 min después de los tratamientos. Se agregó un exceso del oligonucleótido de AP-1 SV40 sin marcar (100X) como competidor específico. B) Se obtuvieron extractos nucleares de BGC tratadas durante 30 min con vehículo (NE), Glu (1 mM) o 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA, 10 nM), 90 min después de los tratamientos. El inhibidor específico de p38 MAPK SB202190 se agregó 30 min antes del tratamiento con Glu (Glu+SB202190) o el vehículo solo (SB202190, 1 μM). C) Se obtuvieron extractos nucleares de BGC tratadas durante 30 min con vehículo (NE) o Glu (1 mM), 90 min después de los tratamientos. Los inhibidores específicos de p38 MAPK y ERK1/2 MAPK (SB202190 y PD98059 respectivamente) se agregaron 30 min antes del tratamiento con Glu (Glu+SB202190, Glu+PD98059, 25 μM) o el vehículo solo (SB202190, PD98059). Se usó el mismo procedimiento para el grupo Glu+SB202190+PD98059. En cada panel se muestra un autorradiograma típico de al menos tres experimentos independientes.

7.6 *p38 MAPK participa en el control transcripcional de *chkbp* inducido por Glu*

Como se mencionó en la introducción, la regulación transcripcional de *chkbp* inducida por Glu, incluye la activación de al menos una de las vías de las MAPKs: ERK1/2 (Aguirre et al, 2002; López-Bayghen et al 2003). Debido a que p38 MAPK media el incremento de la actividad de unión al DNA de AP-1, inducida por Glu, decidimos evaluar la participación p38 MAPK en la activación transcripcional dependiente de Glu del gen *chkbp*. Para lograr ese objetivo, se utilizaron las construcciones p435KBP-CAT que contiene la región 5' no codificante del promotor de *chkbp* y pTRE-CAT, que contiene cinco sitios de unión para AP-1, las cuales fueron transfectadas a BGC. Las monocapas de BGC fueron tratadas 24 h post-transfección con el inhibidor específico de p38 MAPK SB202190 (1 μ M) 30 min antes del tratamiento con Glu 1 mM. El inhibidor específico de p38 MAPK reduce la actividad transcripcional de *chkbp* inducida por Glu (Figura 19A). Asimismo, la inhibición de p38 MAPK, reduce la actividad dependiente de Glu de la construcción que contiene solo los sitios de unión para AP-1 clonados en frente al gen reportero CAT (p-TRE-CAT, Figura 19B). Lo anterior indica que p38 MAPK participa en la regulación transcripcional de *chkbp*.

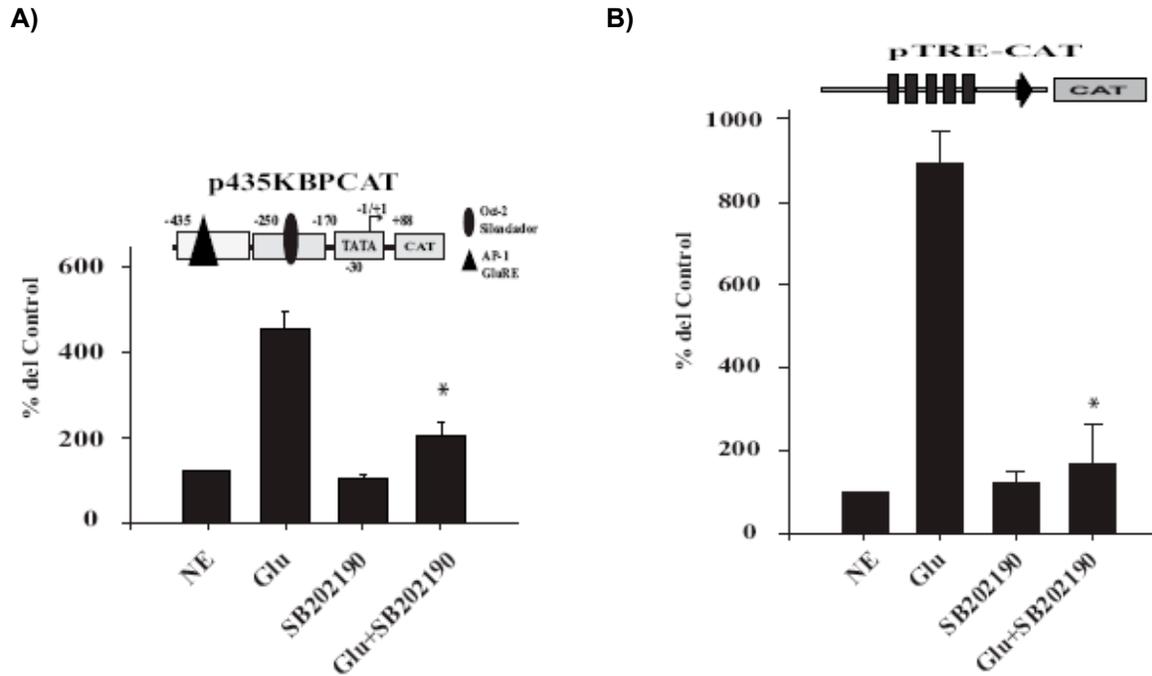


Figura 19. p38 MAPK participa en el control transcripcional de *chkbp* inducido por glutamato. Monocapas de BGC fueron transfectadas con las siguientes construcciones: A) p435KBP-CAT o B) pTRE-CAT. Las células fueron tratadas 24 h post-transfección durante 30 min con Glu 1 mM. El inhibidor específico de p38 MAPK SB202190 (1 μ M), se adicionó 30 min antes del tratamiento con Glu (Glu+SB202190) o vehículo (SB202190). Las células fueron cosechadas 48 h post-transfección y procesadas para ensayos de actividad de CAT. Los resultados fueron representados como la relación de la actividad relativa de CAT con el control no estimulado (NE). Los datos son el promedio \pm error estándar de al menos seis experimentos independientes. Se realizó un análisis estadístico utilizando la prueba *t*-student (vs Glu; *, $P < 0.001$). Se incluyen esquemas representativos de las construcciones transfectadas: A) Región 5' no codificante del promotor de *chkbp*, B) Sitios de unión para AP-1 (rectángulos negros).

8. Discusión

La función del SNC depende del mantenimiento del microambiente neuronal, lo cual requiere de la regulación de la composición extracelular que comprende: osmolaridad, composición iónica, pH, y la prevención de la acumulación de neurotransmisores en el espacio sináptico. En este contexto, las interacciones neurona-glia son de crucial importancia para el adecuado funcionamiento del SNC y cada día existe mayor evidencia de que las células gliales son elementos clave para la función adecuada del mismo. En este sentido la neurotransmisión glutamatergica representa un factor importante en la comunicación entre neuronas y células gliales (revisado en Verkhratsky y Kirchhoff, 2007). Las BGC expresan GluRs que les permiten sensor la actividad neuronal y de esta manera cambiar su repertorio proteínico (Iino et al, 2001; Takayasu et al, 2006). Las vías de señalización activa Glu y que tienen como consecuencia la regulación de la expresión génica en BGC son muy diversas, aunque en la mayoría de los casos son eventos dependientes de Ca^{2+} e involucran a la vía de las MAPKs (Wang et al, 2007).

Uno de los miembros de esta familia la proteína p38 MAPK se activa como resultado de estrés celular y en respuesta a la estimulación por citocinas en diversos tipos celulares (Zarubin y Han, 2005). En neuronas, p38 MAPK está involucrada en muerte celular (Nozaki et al, 2001; Nakatsu et al, 2006; Segura Torres et al, 2006). Aunado a lo anterior, el tratamiento con Glu de células granulares cerebelares promueve la activación rápida de p38 MAPK α , misma que

se ha vinculado con excitotoxicidad mediada por Glu (Semenova et al, 2007). En este trabajo se demostró que el Glu induce la activación de p38 MAPK en células de glía radial. En contraste, con trabajos previos, nuestros resultados demostraron que en BGC, las cuales se encuentran en estrecha proximidad con las neuronas granulares, la activación de p38 MAPK dependiente de Glu promueve la transducción de vías de señalización que llevan a la regulación de la expresión de genes. Sin embargo no es del todo claro si esta divergencia en la función de p38 MAPK en neuronas y células gliales, está relacionada con la resistencia de las BGC a la toxicidad mediada por Glu (González-Mejía, 2006), La diferencia en la cinética de activación de p38 MAPK, que en neuronas es rápida y transitoria (Semenova et al, 2007), comparada con la fosforilación en BGC, la cual es lenta y sostenida (reportada en el presente trabajo), podría explicar este efecto. Lo anterior puede deberse al hecho de que p38 MAPK es capaz de activar una gran variedad de sustratos incluyendo factores de transcripción y otras moléculas involucradas en eventos plásticos (Cuenda y Rousseau, 2007). Ejemplo de ello es la activación de p38 MAPK en astrocitos de médula espinal de rata, en los cuales esta proteína participa en una forma de potenciación a largo plazo (LTP) inducida por ATP (Ikeda et al, 2007).

La localización subcelular de p38 MAPK impacta directamente en la accesibilidad hacia una gran variedad de sustratos. Mientras que en el citoplasma p38 MAPK fosforila a proteínas involucradas en la regulación de la traducción, como MNK1 (Zarubin y Han, 2005) y eIF-4E (Knebel et al, 2001), en el núcleo fosforila cinasas nucleares y factores de transcripción (Ono y Han, 2000). La

relocalización de p38 MAPK en respuesta a la estimulación glutamatérgica observada en BGC y reportada en este trabajo, nos sugiere su participación en la fosforilación de proteínas nucleares y en consecuencia en la regulación de la transcripción.

Además, en el presente trabajo se estableció que la fosforilación de p38 MAPK depende del tiempo de incubación y la dosis de Glu aplicada, lo cual permitió demostrar la participación de GluRs. Asimismo, a través del uso de agonistas de los iGluRs y mGluRs se demostró la participación de los iGluRs del tipo AMPA y mGluRs del grupo I en la activación de p38 MAPK. En trabajos previos, nuestro grupo estableció que las BGC expresan GluRs de tipo ionotrópico y metabotrópico (López et al 1994, 1997, 1998). Los iGluRs permeables a Ca^{2+} , activan la vía de MAPKs a través de la activación de RasGRF dependiente de la vía: Ca^{2+} /CaMKII/PI3K (Wang et al, 2007), así como por la transactivación de receptores con actividad de tirosina cinasa intrínseca (RTK), como el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y el receptor IGF-1R (Gu et al, 2007; López-Bayghen et al, 2003). Por su parte los mGluRs activan a las MAPKs por medio de diversos mecanismos, los cuales incluyen la activación de PLC y la producción DAG e IP3, con la subsecuente liberación de Ca^{2+} intracelular y la activación de RasGRF, y la transactivación de RTKs, por las vías de señalización dependientes de la activación de Src y PKA (revisado en Wang et al, 2007; Goldsmith y Dhanasekaran, 2007).

Cuando las células fueron tratadas con agonistas de los receptores AMPA y de los mGluRs de grupo I, no se observó un efecto sumatorio en la fosforilación de p38 MAPK. Estos resultados sugieren la existencia de un punto de convergencia cascada abajo de la activación de los receptores o bien de la posibilidad de que exista una transactivación de los mGluRs. Diversos estudios han demostrado que los mGluRs post-sinápticos pueden co-activar y modular la actividad de los iGluRs (Heidinger et al, 2002; Attuci et al, 2002), sin embargo el mecanismo aún no es claro. Al respecto, se han propuesto varios mecanismos. En células piramidales CA3 la activación de los mGluR1 potencia las corrientes evocadas por los receptores NMDA, de manera independiente de proteínas G, a través de la señalización dependiente de la cinasa Src (Heidinger et al, 2002). En contraste, el aumento producido por los receptores mGluR5 sobre las corrientes producidas por los receptores NMDA, requiere de la activación de proteínas G y la subsecuente señalización (Benquet et al, 2002). Se ha descrito recientemente, que existe interacción física entre mGluR5a y los receptores NMDA (NR1/NR2B), la cual parece inhibir a ambos subtipos de receptores (Pierroy et al, 2008). De manera similar, se describió la interacción entre iGluRs y mGluRs en BGC: ambos tipos de receptores participan en la fosforilación de p70^{S6K}, regulando de esta manera la síntesis de proteínas (González-Mejía et al, 2006). No obstante, es necesario establecer la vía de señalización precisa activada por Glu que lleva a la fosforilación de p38 MAPK.

Nuestros resultados demuestran que la activación de p38 MAPK por Glu es dependiente de Ca^{2+} . Lo anterior concuerda con que de manera general, las MAPKs señalizan en respuesta a altas concentraciones de Ca^{2+} (Chuderland et al, 2008). En particular, en neuronas p38 MAPK es activada por Glu de una manera dependiente de Ca^{2+} (Semenova et al, 2007). La señalización por Ca^{2+} en células gliales es una consecuencia de la activación de los GluRs presentes en estas células. En concordancia, mediante estudios en rebanadas de cerebro y co-cultivos de neuronas-astrocitos, se ha demostrado que el aumento de la concentración de Ca^{2+} en células gliales, es mediado por el Glu liberado de las terminales sinápticas, ya que es mimetizado por agonistas de los GluRs e inhibido con antagonistas de los iGluRs y mGluRs (revisado en Verkhratsky et al, 1998). A diferencia de las neuronas, los receptores de tipo AMPA que expresan las células gliales presentan una alta permeabilidad a Ca^{2+} , debido a que no expresan la subunidad GluR2 (Müller et al, 1992). De esta manera, la señalización por Ca^{2+} es de gran importancia en la organización estructural y funcional de las células gliales de Bergmann (Metea y Newman, 2006; Iino et al, 2001). La activación de p38 MAPK en BGC es dependiente del influjo de Ca^{2+} . Este es un resultado inesperado, debido a que los mGluRs del grupo I están acoplados al metabolismo de fosfoinosítidos (Pin y Acher, 2002) y por lo tanto sería de esperarse que al menos una parte del efecto de Glu fuese independiente de la entrada de Ca^{2+} . El hecho de que la activación de p38 MAPK dependiente de Glu sea dependiente del influjo de Ca^{2+} , favorece la posibilidad de que exista un mecanismo de transactivación, considerando que el influjo de Ca^{2+} a través de los receptores AMPA resulte en la activación de los mGluRs. Sin embargo es necesario realizar

más experimentos para esclarecer el mecanismo completo de activación de los GluRs.

La proteína p38 MAPK se expresa abundantemente en el SNC (Lee et al, 2000) y la aplicación del bloqueador de p38 MAPK SB203580 únicamente, inhibe la depresión a largo plazo (LTD) en el hipocampo, de manera dependiente de la activación de mGluRs (Bolshakov et al, 2000). Lo anterior sugiere que está involucrada en plasticidad sináptica. Debido a que la fase tardía de la plasticidad sináptica involucra la regulación de la expresión génica (Wu et al, 2007), consideramos de suma importancia investigar si la activación de p38 MAPK en BGC participa en el control transcripcional mediado por Glu.

El Glu regula positivamente la transcripción de *chkbp* por medio del GluRE. Este elemento es un sitio de unión para el factor de transcripción AP-1 (Aguirre et al, 2000). Previamente se demostró que la activación de los receptores AMPA/KA aumenta la actividad de unión de AP-1 al DNA (Sánchez y Ortega, 1994). Nuestros resultados demuestran que el tratamiento con el inhibidor de p38 MAPK SB202190, reduce la formación del complejo AP-1/DNA. La regulación de *chkbp* por Glu, es mediada por la vía ERK1/2 (Aguirre et al, 2002). Cabe resaltar que la inhibición de ambas vías de señalización (p38 y ERK1/2 MAPK), bloquea por completo la formación del complejo AP-1/DNA. En este sentido y más allá de la función opuesta de las diferentes cinasas de la familia MAPK, bajo ciertas circunstancias ERK y p38 MAPK pueden cooperar en la regulación de la expresión de *c-fos* (Price et al, 2006; Chen et al, 1999). Además, las proteínas

blanco de las MAPKs suelen tener múltiples sitios de fosforilación, lo cual permite que las MAPKs actúen de manera sinérgica para promover la expresión génica (Monje et al, 2003).

La proteína p38 MAPK tiene varios puntos de incidencia en la regulación de la expresión génica, ya que fosforila factores de transcripción y cinasas nucleares como RSK2 y MSK1, las que a su vez fosforilan a las histonas, promoviendo la remodelación de la cromatina (Turjanski et al, 2007, Bremi-Cherrier et al, 2007; Zhao et al, 2008).

Por otro lado, además de la diferencia en la cinética de activación de p38 MAPK en neuronas y células gliales en la función pleiotrópica de p38 MAPK, se suma el hecho de que las diferentes isoformas parecen activar de manera diferencial a sus sustratos. La isoforma β incrementa la activación del factor AP-1, aumentando la fosforilación de c-Jun, mientras que las isoformas γ y δ disminuyen la actividad de AP-1, por medio de la regulación negativa de la transcripción de *c-jun* (Pramanik et al, 2003). En este sentido, algunos autores han sugerido que p38 β podría actuar como un factor mitógeno o anti-apoptótico (Nemoto et al, 1998; Alvarado-Kristensson et al, 2004), mientras que p38 γ podría ser la isoforma involucrada en la respuesta al estrés (Wang et al, 2000). La especificidad de las isoformas de p38 MAPK nos ayuda a explicar la diversidad de funciones en los diversos tipos celulares. Aún cuando no podemos saber con certeza la o las isoformas que se activan en nuestro sistema, sí podemos especular que se trata de las isoformas α o β , ya que solo estas isoformas son inhibidas por compuestos

derivados de pirimidil imidazol como SB202190 (Cuenda y Rousseau, 2007), el cual bloquea la unión de AP-1 al DNA en respuesta a Glu en BGC. Aún cuando p38 α es la isoforma más ubicua en el organismo y de alta expresión en SNC (Lee et al, 2006), es también la isoforma que presenta el menor efecto en la activación de AP-1 (Pramanik et al, 2003).

Existen evidencias que sugieren que las MAPKs participan en mecanismos que conllevan a modificaciones de la eficiencia sináptica y a la formación de la memoria a corto y largo plazo, regulando la funcionalidad de los sistemas de neurotransmisión y controlando la transcripción de genes (Levenson et al, 2004; Kelleher et al, 2004; Miller y Marshall, 2005, Sweatt, 2001). De manera particular p38 MAPK participa en la extinción y la re-adquisición de la memoria en el modelo de evitación inhibitoria en el hipocampo (Alonso et al, 2003; Rossato et al, 2006) y en el aprendizaje asociativo (Zhen et al, 2001). La inhibición de p38 MAPK claramente suprime el efecto activador de Glu sobre la transcripción de *chkbp*. Lo anterior permite considerar que al menos parte del repertorio de proteínas requeridas para el almacenamiento de la información a largo plazo en el cerebro puede tener lugar en las células gliales. Esta interpretación se apoya en el hecho de la interacción metabólica que existe entre las neuronas y las células gliales en las sinapsis glutamatérgicas, la cual ha sido ampliamente caracterizada. Prueba de ello son las lanzaderas Glu-Gln y lactato astrocito-neurona, las cuales son elementos clave en el funcionamiento apropiado de las neuronas glutamatérgicas (Bak et al, 2005; Pellerin et al, 2007).

En resumen, en la presente investigación demostramos que la señalización por Glu involucra la activación de p38 MAPK, ésta participa en la regulación de la expresión de genes dependiente de Glu en BGC. La disección de la ruta de activación de p38 MAPK y sus blancos cascada abajo, contribuirá a elucidar la participación de las BGC en las funciones superiores del SNC como el aprendizaje asociativo.

9. Conclusiones

Los resultados obtenidos en el presente trabajo permitieron establecer las siguientes conclusiones:

- El glutamato induce la activación de p38 MAPK en células gliales de Bergmann
- La activación de p38 MAPK es un evento dependiente del tiempo de incubación y de la dosis de glutamato aplicada
- La fosforilación de p38 MAPK inducida por glutamato depende de la activación de receptores ionotrópicos del tipo AMPA y metabotrópicos del Grupo I
- La activación de p38 MAPK es dependiente de Ca^{2+}
- La activación de p38 MAPK inducida por glutamato aumenta la actividad unión de AP-1 al DNA
- La proteína p38 MAPK participa en la regulación transcripcional de *chkbp* dependiente de glutamato

10. Perspectivas

- Disecar la vía de señalización que repercute en la activación de p38 MAPK en respuesta a la estimulación glutamatérgica
- Caracterizar el mecanismo de activación de los GluRs en BGC
- Establecer las proteínas que son blancos directos de p38 MAPK
- Determinar la/las isoformas de p38 MAPK que participan en la regulación transcripcional de *chkbp* dependiente de Glu

11. Referencias

- Abe, K. Saito, H. 2001. Possible linkage between glutamate transporter and mitogen-activated protein kinase cascade in cultured rat cortical astrocytes. *J Neurochem.* 76 . 1:217-23
- Aguilera, P. Ortega, A. 1999. Stat3 participates in the metabotropic glutamate signaling pathway in Bergmann glial cells. *Neurochem Res.* 24(8): 981-6
- Aguirre, A. López, T. López-Bayghen, E. Ortega, A. 2000. Glutamate regulates kainate-binding protein expression in cultured chick Bergmann glia through an activator protein-1 binding site. *J Biol Chem.* 275(50):39246-53
- Aguirre, A. López-Bayghen, E. Ortega, A. 2002. Glutamate-dependent transcriptional regulation of the *chkbp* gene: signaling mechanisms. *J Neurosci Res.* 70(1): 117-27
- Aguirre, G. Rosas, S. Lopez-Bayghen, E. Ortega, A. 2008. Valproate-dependent transcriptional regulation of GLAST/EAAT1 expression: involvement of Ying-Yang 1. *Neurochem Int.* 52(7): 1322-31
- Alvarado-Kristensson, M. Melander, F. Leandersson, K. Rönstrand, L. Wernstedt, C. Andersson T. 2004. p38-MAPK Signals Survival by Phosphorylation of Caspase-8 and Caspase-3 in Human Neutrophils. *J Exp Med.* 199(4):449-58
- Arias, J. M. 1995. Fosforilación de la proteína que une ácido kaínico del cerebelo de pollo. Tesis de maestría. Cinvestav-IPN. México
- Attucci, S. Carla, V. Mannaioni, G. Moroni, F. 2001. Activation of type 5 metabotropic glutamate receptors enhances NMDA responses in mice cortical wedges. *Br J Pharmacol.* 132, 799-806
- Bak, L. K. Sickmann, H. M. Schousboe, A. Waagepetersen, H. S. 2005. Activity of the lactate-alanine shuttle is independent of glutamate-glutamine cycle activity in cerebellar neuronal-astrocytic cultures. *J Neurosci Res.* 79(1-2):88-96
- Beierlein, M. Regehr, W. G. 2006. Brief bursts of parallel fiber activity trigger calcium signals in bergmann glia. *J Neurosci.* 26(26): 6958-67
- Bellamy, T. C. 2007. Presynaptic modulation of parallel fibre signalling to Bergmann glia. *Neuropharmacology.* 52(2): 368-75
- Benquet, P. Gee, C.E. Gerber. U. 2002. Two Distinct Signaling Pathways Upregulate NMDA Receptor Responses via Two Distinct Metabotropic Glutamate Receptor Subtypes. *J Neurosci.* 22(22):9679–86

Bolshakov, V. Y. Carboni, L. Cobb, M. H. Siegelbaum, S. A. Belardetti, F. 2000. Dual MAP kinase pathways mediate opposing forms of long-term plasticity at CA3-CA1 synapses. *Nat Neurosci.* 3(11):1107-12

Bordey, A. Sontheimer, H. 2003. Modulation of glutamatergic transmission by bergmann glial cells in rat cerebellum in situ. *J Neurophysiol.* 89(2): 979-88

Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72: 248-54

Brami-Cherrier, K. Lavaur, J. Pages, C. Arthur, J. S. Caboche, J. 2007. Glutamate induces histone H3 phosphorylation but not acetylation in striatal neurons: role of mitogen- and stress-activated kinase-1. *J Neurochem.* 101(3):697-708

Bredt, D. S. Nicoll, R. A. 2003. AMPA receptor trafficking at excitatory synapses *Neuron.* 40(2):361-79

Brockhaus, J. Deitmer, J. W. 2002. Long-lasting modulation of synaptic input to Purkinje neurons by Bergmann glia stimulation in rat brain slices. *J Physiol.* 545 (Pt 2): 581-93

Cao, J. Semenova, M. M. Solovyan, V. T. Han, J. Coffey, E. T. Courtney, M. J. 2004. Distinct requirements for p38alpha and c-Jun N-terminal kinase stress-activated protein kinases in different forms of apoptotic neuronal death. *J Biol Chem.* 279(34):35903-13

Chen, R. W. Qin, Z. H. Ren, M. Kanai, H. Chalecka-Franaszek, E. Leeds, P. Chuang, D. M. 2003. Regulation of c-Jun N-terminal kinase, p38 kinase and AP-1 DNA binding in cultured brain neurons: roles in glutamate excitotoxicity and lithium neuroprotection. *J Neurochem.* 84(3): 566-75

Chuderland, D. Marmor, G. Shainskaya, A. Seger, R. 2008. Calcium-mediated interactions regulate the subcellular localization of extracellular signal-regulated kinases. *J Biol Chem.* 283(17):11176-88

Cid, M. E. Ortega, A. 1993. Glutamate stimulates [³H]phorbol 12,13-dibutyrate binding in cultured Bergmann glia cells. *Eur J Pharmacol.* 245(1): 51-4

Coutinho, V. Knopfel, T. 2002. Metabotropic glutamate receptors: electrical and chemical signaling properties. *Neuroscientist.* 8(6): 551-61

Cruz-Solís, I. Zepeda, R. C. Ortiz, S. Aguilera, J. López-Bayghen, E. Ortega, A. 2009. Glutamate-dependent transcriptional control in Bergmann glia: Sox10 as a repressor. *J Neurochem.* 109(3):899-910

Cuenda, A. Rousseau, S. 2007. p38 MAP-kinases pathway regulation, function and role in human diseases. *Biochim Biophys Acta*. 1773(8):1358-75

Danbolt, N. C. 2001 Glutamate uptake. *Prog Neurobiol*. 65(1):1-105

Davis LG., Kuehl WM, Battey JF. Eds. *Basic Methods in Molecular Biology*. Second Edition. Appleton & Lange. 1994.

Dingledine, R. Borges, K. Bowie, D. Traynelis, S. F. 1999. The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol Rev*. 51(1): 7-61

Eshhar, N. Hunter, C. Wenthold, R. J. Wada, K. 1992. Structural characterization and expression of a brain specific gene encoding chick kainate binding protein *FEBS Lett*. 297(3):257-62

Evans, G. J. 2007. Synaptic signalling in cerebellar plasticity. *Biol Cell*. 99(7): 363-78

Fagni, L. Ango, F. Perroy, J. Bockaert, J. 2004. Identification and functional roles of metabotropic glutamate receptor-interacting proteins. *Semin Cell Dev Biol*. 15(3):289-98

Ferrer, I. Blanco, R. Carmona, M. 2001. Differential expression of active, phosphorylation-dependent MAP kinases, MAPK/ERK, SAPK/JNK and p38, and specific transcription factor substrates following quinolinic acid excitotoxicity in the rat. *Brain Res Mol Brain Res*. 94(1-2): 48-58

Gallo, K. A. Johnson, G. L. 2002. Mixed-lineage kinase control of JNK and p38 MAPK pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 3(9):663-72

Gegelashvili, M. Rodriguez-Kern, A. Sung, L. Shimamoto, K. Gegelashvili, G. 2007. Glutamate transporter GLAST/EAAT1 directs cell surface expression of FXD2/gamma subunit of Na, K-ATPase in human fetal astrocytes. *Neurochem Int*. 50(7-8): 916-20

González-Mejía, M.E. 2006. Regulación de la traducción por receptores glutamatérgicos en células de glía de Bergmann. Tesis de doctorado. Cinvestav-IPN. México

González-Mejía, M. E. Morales, M. Hernández-Kelly, L. C. Zepeda, R. C. Bernabé, A. Ortega, A. 2006. Glutamate-dependent translational regulation in cultured Bergmann glia cells: involvement of p70S6K. *Neuroscience*. 141(3)1389-98

Goldsmith, Z. G. Dhanasekaran, D. N. 2007. G protein regulation of MAPK networks. *Oncogene*. 26(22):3122-42

Gouaux, E. 2004. Structure and function of AMPA receptors. *J Physiol.* 554(Pt 2): 249-53

Gregor, P. Eshhar, N. Ortega, A. Teichberg, V. I. 1988. Isolation, immunochemical characterization and localization of the kainate sub-class of glutamate receptor from chick cerebellum. *Embo J.* 7(9): 2673-9

Gregor, P. Mano, I. Maoz, I. McKeown, M. Teichberg, V. I. 1989. Molecular structure of the chick cerebellar kainate-binding subunit of a putative glutamate receptor. *Nature.* 342(6250): 689-92

Gregor, P. Yang, X. Mano, I. Takemura, M. Teichberg, V. I. Uhl, G. R. 1992. Organization and expression of the gene encoding chick kainate binding protein, a member of the glutamate receptor family. *Brain Res Mol Brain Res.* 16(3-4): 179-86

Grosche, J. Kettenmann, H. Reichenbach, A. 2002. Bergmann glial cells form distinct morphological structures to interact with cerebellar neurons. *J Neurosci Res.* 68(2): 138-49

Grosche, J. Matyash, V. Moller, T. Verkhratsky, A. Reichenbach, A. Kettenmann, H. 1999. Microdomains for neuron-glia interaction: parallel fiber signaling to Bergmann glial cells. *Nat Neurosci.* 2(2): 139-43

Gu, L. Li, B. Yang, X. Hu, X. Huang, X. Hertz, L. Peng, L. 2007. Depolarization-induced, glutamate receptor-mediated, and transactivation-dependent extracellular-signal regulated kinase phosphorylation in cultured cerebellar granule neurons. *Neurosci.* 147(2):342-53

Hampson, D. R. Wenthold, R. J. 1988. A kainic acid receptor from frog brain purified using domoic acid affinity chromatography. *J Biol Chem.* 263(5): 2500-5

Han, J. Lee, J. D. Bibbs, L. Ulevitch, R. J. 1994. A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. *Science.* 265(5173): 808-11

Han, J. Richter, B. Li, Z. Kravchenko, V. Ulevitch, R. J. 1995. Molecular cloning of human p38 MAP kinase. *Biochim Biophys Acta.* 1265(2-3): 224-7

Hatten, M. E. Mason, C. A. 1990. Mechanisms of glial-guided neuronal migration in vitro and in vivo. *Experientia.* 46(9): 907-16

Hayashi, T. Umemori, H. Mishina, M. Yamamoto, T. 1999. The AMPA receptor interacts with and signals through the protein tyrosine kinase Lyn. *Nature.* 397(6714): 72-6

Heidinger, V. Manzerra, P. Wang, X. Strasser, U. Yu, S. Choi, D.W. Behrens, M.M. 2002. Metabotropic Glutamate Receptor 1-Induced Upregulation of NMDA

Receptor Current: Mediation through the Pyk2/Src-Family Kinase Pathway in Cortical Neurons. *J Neurosci.* 22(13):5452–61

Helgason CD y Miller CL, Eds. *Basic Cell Culture Protocols, Methods and Protocols Vol. 290. Third Edition.* Humana Press. 2005.

Henley, J. M. 1994. Kainate-binding proteins: phylogeny, structures and possible functions. *Trends Pharmacol Sci.* 15(6): 182-90

Hollmann, M. Heinemann, S. 1994. Cloned glutamate receptors. *Annu Rev Neurosci.* 17: 31-108

Iino, M. Goto, K. Kakegawa, W. Okado, H. Sudo, M. Ishiuchi, S. Miwa, A. Takayasu, Y. Saito, I. Tsuzuki, K. Ozawa, S. 2001. Glia-synapse interaction through Ca²⁺-permeable AMPA receptors in Bergmann glia. *Science.* 292(5518): 926-9

Ikeda, H. Tsuda, M. Inoue, K. Murase, K. 2007. Long-term potentiation of neuronal excitation by neuron-glia interactions in the rat spinal dorsal horn. *Eur J Neurosci.* 25(5): 1297-306

Javois LC, Ed. *Immunocytochemical, Methods and Protocols Vol. 115. Second Edition.* Humana Press. 1999.

Kandel, E., Schwartz, J. y Jessell, T. Eds. *Principles of Neural science,* New York. 2000.

Kelleher, R.J. Govindarajan, A. Jung, H.Y. Kang, H. Tonegawa, S. 2004. Translational control by MAPK signaling in long-term synaptic plasticity and memory. *Cell.* 116:467–479

Kennedy, M. B. Beale, H. C. Carlisle, H. J. Washburn, L. R. 2005. Integration of biochemical signalling in spines. *Nat Rev Neurosci.* 6(6): 423-34

Kimura, N. Kurosawa, N. Kondo, K. Tsukada, Y. 1993. Molecular cloning of the kainate-binding protein and calmodulin genes which are induced by an imprinting stimulus in ducklings. *Brain Res Mol Brain Res.* 17(3-4): 351-5

Kirischuk, S. Kirchhoff, F. Matyash, V. Kettenmann, H. Verkhratsky, A. 1999. Glutamate-triggered calcium signalling in mouse bergmann glial cells in situ: role of inositol-1,4,5-trisphosphate-mediated intracellular calcium release. *Neuroscience.* 92(3): 1051-9

Knebel, A. Morrice, N. Cohen, P. 2001. A novel method to identify protein kinase substrates: eEF2 kinase is phosphorylated and inhibited by SAPK4/p38delta. *Embo J.* 20(16): 4360-9

Kostenis, E. Zeng, F. Y. Wess, J. 1999. Structure-function analysis of muscarinic receptors and their associated G proteins. *Life Sci.* 64(6-7): 355-62

Kubo, M. Ito, E. 2004. Structural dynamics of an ionotropic glutamate receptor *Proteins.* 56(3):411-9

Lee, S.H. Park, J. Che, Y. Han, P.L. Lee, J.K. 2000. Constitutive activity and differential localization of p38alpha and p38beta MAPKs in adult mouse brain. *J Neurosci Res.* 60(5):623-31

Lerma, J. Paternain, A. V. Rodríguez-Moreno, A. López-García, J. C. 2001. Molecular physiology of kainate receptors. *Physiol Rev.* 81(3): 971-98

Levenson, J.M. O'Riordan, K.J. Brown, K.D. Trinh, M.A. Molfese, D.L. Sweatt, J.D. 2004. Regulation of histone acetylation during memory formation in the hippocampus. *J Biol Chem.* 279:40545–40559

López, T. López-Colomé, A. M. Ortega, A. 1994. AMPA/KA receptor expression in radial glia. *Neuroreport.* 5(4): 504-6

López, T. López-Colomé, A. M. Ortega, A. 1997. NMDA receptors in cultured radial glia. *FEBS Lett.* 405(2): 245-8

López, T. López-Colomé, A. M. Ortega, A. 1998. Changes in GluR4 expression induced by metabotropic receptor activation in radial glia cultures. *Brain Res Mol Brain Res.* 58(1-2): 40-6

López-Bayghen, E. Aguirre, A. Ortega, A. 2003. Transcriptional regulation through glutamate receptors: Involvement of tyrosine kinases. *J Neurosci Res.* 74(5): 717-25

López-Bayghen, E. Ortega, A. 2004. Glutamate-dependent transcriptional regulation of GLAST: role of PKC. *J Neurochem.* 91(1): 200-9

López-Bayghen, E. Rosas, S. Castelán, F. Ortega, A. 2007. Cerebellar Bergmann glia: an important model to study neuron-glia interactions. *Neuron Glia Biol.* 3(2): 155-67

López-Colomé, A. M. Ortega, A. 1997. Activation of p42 mitogen-activated protein kinase by glutamate in cultured radial glia. *Neurochem Res.* 22(6): 679-85

López-Colomé, A. M. Ortega, A. Fragoso, G. Trueba, E. 1997. Excitatory amino acid receptors coupled to the phosphoinositide pathway in Bergmann glia. *Neurochem Res.* 22(3): 305-12

Lordkipanidze, T. Dunaevsky, A. 2005. Purkinje cell dendrites grow in alignment with Bergmann glia. *Glia.* 51(3): 229-34

Luque, J. M. Richards, J. G. 1995. Expression of NMDA 2B receptor subunit mRNA in Bergmann glia. *Glia*. 13(3): 228-32

Madden, D. R. 2002. The structure and function of glutamate receptor ion channels *Nat Rev Neurosci*. 3(2): 91-101

Mao, L. Yang, L. Tang, Q. Samdani, S. Zhang, G. Wang, J. Q. 2005. The scaffold protein Homer1b/c links metabotropic glutamate receptor 5 to extracellular signal-regulated protein kinase cascades in neurons. *J Neurosci*. 25(10): 2741-52

Matsui, K. Jahr, C. E. Rubio, M. E. 2005. High-concentration rapid transients of glutamate mediate neural-glia communication via ectopic release. *J Neurosci*. 25(33): 7538-47

Mayer, M. L. Armstrong, N. 2004. Structure and function of glutamate receptor ion channels. *Annu Rev Physiol*. 66:161-81

Meldrum, B. S. 2000. Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. *J Nutr*. 130. 4S Suppl. 1007S-15S

Méndez, J. A. López-Bayghen, E. Ortega, A. 2005. Glutamate activation of Oct-2 in cultured chick Bergmann glia cells: involvement of NFkappaB. *J Neurosci Res*. 81(1): 21-30

Méndez, J. A. López-Bayghen, E. Rojas, F. Hernández, M. E. Ortega, A. 2004. Glutamate regulates Oct-2 DNA-binding activity through alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionate receptors in cultured chick Bergmann glia cells. *J Neurochem*. 88(4): 835-43

Michaelis, E. K. 1997. L-glutamate and N-methyl-D-aspartate receptors: learning, growth, and death in the mammalian brain. *Nutrition*. 13(7-8): 696-7

Millán, A. Aguilar, P. Méndez, J. A. Arias-Montano, J. A. Ortega, A. 2001. Glutamate activates PP125(FAK) through AMPA/kainate receptors in Bergmann glia. *J Neurosci Res*. 66(4): 723-9

Millán, A. Arias-Montano, J. A. Méndez, J. A. Hernández-Kelly, L. C. Ortega, A. 2004. Alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptors signaling complexes in Bergmann glia. *J Neurosci Res*. 78(1): 56-63

Miller, C.A. Marshall, J.F. 2005. Molecular substrates for retrieval and reconsolidation of cocaine-associated contextual memory. *Neuron*. 47:873-884

Morales, M. González-Mejía, M. E. Bernabé, A. Hernández-Kelly, L. C. Ortega, A. 2006. Glutamate activates protein kinase B (PKB/Akt) through AMPA receptors in cultured Bergmann glia cells. *Neurochem Res*. 31(3):423-9

Moss T. Ed. DNA-Protein Interactions Principles and Protocols. Methods in Molecular Biology. Vol. 148. Second edition. Humana Press. 2001

Mukherjee, P. K. DeCoster, M. A. Campbell, F. Z. Davis, R. J. Bazan, N. G. 1999. Glutamate receptor signaling interplay modulates stress-sensitive mitogen-activated protein kinases and neuronal cell death. *J Biol Chem.* 274(10): 6493-8

Muller, T. Kettenmann, H. 1995. Physiology of Bergmann glial cells. *Int Rev Neurobiol.* 38:341-59

Muller, T. Moller, T. Scnitzer, J. Kettenmann, H. 1992. Calcium entry through kainate receptors and resulting potassium-channel blockade in Bergmann glial cells. *Science.* 256: 1563-6

Nakatsu, Y. Kotake, Y. Komasa, K. Hakozaki, H. Taguchi, R. Kume, T. Akaike, A. Ohta, S. 2006. Glutamate excitotoxicity is involved in cell death caused by tributyltin in cultured rat cortical neurons. *Toxicol Sci.* 89(1):235-42

Nebreda, A. R. Porras, A. 2000. p38 MAP kinases: beyond the stress response. *Trends Biochem Sci.* 25(6): 257-60

Nedergaard, M. Takano, T. Hansen, A. J. 2002. Beyond the role of glutamate as a neurotransmitter. *Nat Rev Neurosci.* 3(99): 748-55

Nemoto, S. Xiang, J. Huang, S. Lin, A. 1998. Induction of apoptosis by SB202190 through inhibition of p38beta mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem.* 273(26):16415-20

Nozaki, K. Nishimura, M. Hashimoto, N. 2001. Mitogen-activated protein kinases and cerebral ischemia. *Mol Neurobiol.* 23(1): 1-19

Ono, K. Han, J. 2000. The p38 signal transduction pathway: activation and function *Cell Signal.* 12(1): 1-13

Ortega, A. Eshhar, N. Teichberg, V. I. 1991. Properties of kainate receptor/channels on cultured Bergmann glia. *Neuroscience.* 41(2-3): 335-49

Ortega, A. Teichberg, V. I. 1990. Phosphorylation of the 49-kDa putative subunit of the chick cerebellar kainate receptor and its regulation by kainatergic ligands. *J Biol Chem.* 265(35):21404-6

Ozawa, S. Kamiya, H. Tsuzuki, K. 1998. Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Prog Neurobiol.* 54(5): 581-618

Pellerin, L. Bouzier-Sore, A. K. Aubert, A. Serres, S. Merle, M. Costalat, R. Magistretti, P. J. 2007. Activity-dependent regulation of energy metabolism by astrocytes: an update. *Glia.* 55(12): 1251-62

Perego, C. Vanoni, C. Bossi, M. Massari, S. Basudev, H. Longhi, R. Pietrini, G. 2000. The GLT-1 and GLAST glutamate transporters are expressed on morphologically distinct astrocytes and regulated by neuronal activity in primary hippocampal cocultures. *J Neurochem.* 75(3): 1076-84

Perkinton, M. S. Ip, J. K. Wood, G. L. Crossthwaite, A. J. Williams, R. J. 2002. Phosphatidylinositol 3-kinase is a central mediator of NMDA receptor signalling to MAP kinase (Erk1/2), Akt/PKB and CREB in striatal neurons. *J Neurochem.* 80(2): 239-54

Perroy, J. Raynaud, F. Homburger, V. Rousset, M.C. Telley, L. Bockaert, J. Fagni, L. 2008. Direct Interaction Enables Cross-talk between Ionotropic and Group I Metabotropic Glutamate Receptors. *J Biol Chem.* 283(11):6799–805

Pin, J. P. Acher, F. 2002. The metabotropic glutamate receptors: structure, activation mechanism and pharmacology. *Curr Drug Targets SNC Neurol Disord.* 1(3): 297-317

Pin, J. P. Kniazeff, J. Goudet, C. Bessis, A. S. Liu, J. Galvez, T. Acher, F. Rondard, P. Prezeau, L. 2004. The activation mechanism of class-C G-protein coupled receptors. *Biol Cell.* 96(5): 335-42

Pramanik, R. Qi, X. Borowicz, S. Choubey, D. Schultz, R. M. Han, J. Chen, G. 2003. p38 isoforms have opposite effects on AP-1-dependent transcription through regulation of c-Jun. The determinant roles of the isoforms in the p38 MAPK signal specificity. *J Biol Chem.* 278(7): 4831-9

Raman, M. Chen, W. Cobb, M. H. 2007. Differential regulation and properties of MAPKs. *Oncogene.* 26(22): 3100-12

Ramírez-Sotelo, G. López-Bayghen, E. Hernández-Kelly, L. C. Arias-Montano, J. A. Bernabé, A. Ortega, A. 2007. Regulation of the mouse Na⁺-dependent glutamate/aspartate transporter GLAST: putative role of an AP-1 DNA binding site. *Neurochem Res.* 32(1): 73-80

Rosas, S. Vargas, M. A. Lopez-Bayghen, E. Ortega, A. 2007. Glutamate-dependent transcriptional regulation of GLAST/EAAT1: a role for YY1. *J Neurochem.* 101(4): 1134-44

Rossato, J. I. Bevilaqua, L. R. M. Lima, R. H. Medina, J. H. Izquierdo, I. Cammarota, M. 2006. On the participation of hippocampal p38 mitogen-activated protein kinase in extinction and reacquisition of inhibitory avoidance memory. *Neurosci.* 143. 15–23

Roux, P. P. Blenis, J. 2004. ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol Mol Biol Rev* 68(2): 320-44

Rutberg, S. E. Saez, E. Lo, S. Jang, S. I. Markova, N. Spiegelman, B. M. Yuspa, S. H. 1997. Opposing activities of c-Fos and Fra-2 on AP-1 regulated transcriptional activity in mouse keratinocytes induced to differentiate by calcium and phorbol esters. *Oncogene*. 15(11): 1337-46

Sanchez, G. Ortega, A. 1994. AMPA/KA receptor induced AP-1 DNA binding activity in cultured Bergmann glia cells. *Neuroreport*. 5(16): 2109-12

Schmidt, C. Werner, M. Hollmann, M. 2006. Revisiting the postulated "unitary glutamate receptor": electrophysiological and pharmacological analysis in two heterologous expression systems fails to detect evidence for its existence. *Mol Pharmacol*. 69(1): 119-29

Schousboe, A. 1981. Transport and metabolism of glutamate and GABA in neurons and glial cells. *Int Rev Neurobiol*. 22:1-45

Seeburg, P. H. Hartner, J. 2003. Regulation of ion channel/neurotransmitter receptor function by RNA editing. *Curr Opin Neurobiol*. 13(3): 279-83

Segura-Torres, J. E. Chaparro-Huerta, V. Rivera Cervantes, M. C. Montes-Gonzalez, R. Flores Soto, M. E. Beas-Zarate, C. 2006. Neuronal cell death due to glutamate excitotoxicity is mediated by p38 activation in the rat cerebral cortex. *Neurosci Lett*. 403(3): 233-8

Semenova, M. M. Maki-Hokkonen, A. M. Cao, J. Komarovski, V. Forsberg, K. M. Koistinaho, M. Coffey, E. T. Courtney, M. J. 2007. Rho mediates calcium-dependent activation of p38alpha and subsequent excitotoxic cell death. *Nat Neurosci*. 10(4): 436-43

Strutz, N. Villmann, C. Breitingner, H. G. Werner, M. Wenthold, R. J. Kizelsztejn, P. Teichberg, V. I. Hollmann, M. 2002. Kainate-binding proteins are rendered functional ion channels upon transplantation of two short pore-flanking domains from a kainate receptor. *J Biol Chem*. 277(50): 48035-42

Sweatt, D.J. 2001. The neuronal MAP kinase cascade: a biochemical signal integration system subserving synaptic plasticity and memory. *J Neurochem*. 76:1-10

Takayasu, Y. Iino, M. Shimamoto, K. Tanaka, K. Ozawa, S. 2006. Glial glutamate transporters maintain one-to-one relationship at the climbing fiber-Purkinje cell synapse by preventing glutamate spillover. *J Neurosci*. 26(24): 6563-72

Tanoue, T. Maeda, R. Adachi, M. Nishida, E. 2001. Identification of a docking groove on ERK and p38 MAP kinases that regulates the specificity of docking interactions. *EMBO J*. 20: 466-79

Tanaka, M. Yamaguchi, K. Tatsukawa, T. Theis, M. Willecke, K. Itohara, S. 2008. Connexin43 and bergmann glial gap junctions in cerebellar function. *Front Neurosci.* 2(2): 225-33

Tanos, T. Marinissen, M. J. Leskow, F. C. Hochbaum, D. Martinetto, H. Gutkind, J. S. Coso, O. A. 2005. Phosphorylation of c-Fos by members of the p38 MAPK family. Role in the AP-1 response to UV light. *J Biol Chem.* 280(19): 18842-52

Teichberg, V. I. 1991. Glial glutamate receptors: likely actors in brain signaling. *Faseb J.* 5(15): 3086-91

Thomas, U. 2002. Modulation of synaptic signalling complexes by Homer proteins. *J Neurochem.* 81(3): 407-13

Thornton, TM, Rincon, M. 2009. Non-classical p38 map kinase functions: cell cycle checkpoints and survival. *Int J Biol Sci.* 5(1):44-51

Turjanski, A. G. Vaque, J. P. Gutkind, J. S. 2007. MAP kinases and the control of nuclear events. *Oncogene.* 26(22): 3240-53

Verkhatsky, A. Kirchhoff, F. 2007. Glutamate-mediated neuronal-glia transmission. *J Anat.* 210(6):651-60

Verkhatsky, A. Orkand, R. K. Kettenmann, H. 1998. Glial Calcium: Homeostasis and Signaling Function. *Physiol Rev.* 78(1):99-141

Villmann, C. Bull, L. Hollmann, M. 1997. Kainate binding proteins possess functional ion channel domains. *J Neurosci.* 17(20): 7634-43

Voogd, J. Glickstein, M. 1998. The anatomy of the cerebellum. *Trends Neurosci.* 21(9): 370-5

Wang, J. Q. Fibuch, E. E. Mao, L. 2007. Regulation of mitogen-activated protein kinases by glutamate receptors. *J Neurochem.* 100(1): 1-11

Wang, X. McGowan, CH. Zhao, M. He, L. Downey, JS. Fearn, C. Wang, Y. Huang, S. Han, J. 2000. Involvement of the MKK6-p38gamma cascade in gamma-radiation-induced cell cycle arrest. *Mol Cell Biol.* 20(13):4543-52.

Watkins, L. R. Milligan, E. D. Maier, S. F. 2003. Glial proinflammatory cytokines mediate exaggerated pain states: implications for clinical pain. *Adv Exp Med Biol.* 521: 1-21

Wilson, K. P. Fitzgibbon, M. J. Caron, P. R. Griffith, J. P. Chen, W. McCaffrey, P. G. Chambers, S. P. Su, M. S. 1996. Crystal structure of p38 mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem.* 271(44): 27696-700

Wo, Z. G. Oswald, R. E. 1994. Transmembrane topology of two kainate receptor subunits revealed by N-glycosylation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91(15): 7154-8

Wu, H. Zhou, Y. Xiong, Z. Q. 2007. Transducer of regulated CREB and late phase long-term synaptic potentiation. *Febs J.* 274(13): 3218-23

Xia, Z. Dudek, H. Miranti, C. K. Greenberg, M. E. 1996. Calcium influx via the NMDA receptor induces immediate early gene transcription by a MAP kinase/ERK-dependent mechanism. *J Neurosci.* 16(17): 5425-36

Zarubin, T. Han, J. 2005. Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. *Cell Res.* 15(1): 11-8

Zepeda, R. C. Barrera, I. Castelán, F. Suárez-Pozos, E. Melgarejo, Y. González-Mejía, M.E. Hernández-Kelly, L. C. R. López-Bayghen, E. Aguilera, J. Ortega, A. 2009. Glutamate-dependent phosphorylation of the mammalian target of rapamycin (mTOR) in Bergmann glial cells. *Neurochem Int.* En Prensa

Zhao, Q. Barakat, B.M. Qin, S. Ray, A. El-Mahdy, M.A. Wani, G. Arafa, E. Mir, S. N. Wang, Q. Wani, A. A. 2008. The p38 Mitogen-activated Protein Kinase Augments Nucleotide Excision Repair by Mediating DDB2 Degradation and Chromatin Relaxation. *J Biol Chem.* 283(47):32553–32561

Zhen, X. Du, W. Romano, A.G. Friedman, E. Harvey, J.A. 2001. The p38 mitogen-activated protein kinase is involved in associative learning in rabbits. *J Neurosci.* 21(15):5513-9

12. Anexo

Artículo:

Zepeda RC, Barrera I, Castelán F, Soto-Cid A, Hernández-Kelly LCR, López-Bayghen E and Ortega A. Glutamate-Dependent Transcriptional Regulation in Bergmann Glia Cells: Involvement of p38 MAP kinase. *Neurochem Res.* 2008. 33(7):1277-85

Glutamate-Dependent Transcriptional Regulation in Bergmann Glia Cells: Involvement of p38 MAP Kinase

Rossana C. Zepeda · Iliana Barrera · Francisco Castelán · Abraham Soto-Cid · Luisa C. Hernández-Kelly · Esther López-Bayghen · Arturo Ortega

Accepted: 26 December 2007 / Published online: 13 February 2008
© Springer Science+Business Media, LLC 2008

Abstract Glutamate (Glu) is the major excitatory neurotransmitter in the Central Nervous System (CNS). Ionotropic and metabotropic glutamate receptors (GluRs) are present in neurons and glial cells and are involved in gene expression regulation. Mitogen-activated protein kinases (MAPK) are critical for all the membrane to nuclei signaling pathways described so far. In cerebellar Bergmann glial cells, glutamate-dependent transcriptional regulation is partially dependent on p42/44 MAPK activity. Another member of this kinase family, p38 MAPK is activated by non-mitogenic stimuli through its Thr180/Tyr182 phosphorylation and phosphorylates cytoplasmic and nuclear protein targets involved in translational and transcriptional events. Taking into consideration that the role of p38MAPK in glial cells is not well understood, we demonstrate here that glutamate increases p38 MAPK phosphorylation in a time and dose dependent manner in cultured chick cerebellar Bergmann glial cells (BGC). Moreover, p38 MAPK is involved in the glutamate-induced transcriptional activation in these cells. Ionotropic as well as metabotropic glutamate receptors participate in p38 MAPK activation. The present findings demonstrate the involvement of p38 MAPK in glutamate-dependent gene expression regulation in glial cells.

Keywords p38 MAPK · Gene expression regulation · Transcriptional control · Cerebellar glia · Glutamate receptors

Introduction

L-Glutamate (Glu) is the main excitatory amino acid in Central Nervous System (CNS) of vertebrates where it exerts its effects through specific membrane receptors expressed in neurons and glia cells. Glutamate receptors (GluRs) are classified according to their transduction systems into ionotropic and metabotropic receptors. Ionotropic receptors are ligand-gated ion channels involved in fast synaptic transmission and include *N*-methyl-D-aspartate (NMDA), α -amino-3-hidroxy-5-metyl-4-isoxazolepropionate (AMPA) and kainate (KA) receptors. In contrast, metabotropic receptors are G-protein coupled receptors able to modulate synaptic transmission through phosphoinositide metabolism (group I) or inhibition of adenylate cyclase (groups II and III) [1].

Bergmann glia cells (BGC) surround the synapses established between the terminals of the granule neurons, the parallel fibers and the Purkinje cells in the molecular layer of the cerebellum [2]. The repertoire of glutamatergic receptors in these cells includes both ionotropic and metabotropic Glu receptors [3, 4]. Glu released from the parallel fibers depolarizes the BGC triggering not only a significant Ca^{2+} influx [5] but also a membrane to nuclei cascade that is implicated in transcriptional [6] and translational [7] control. Interestingly, both ionotropic as well as metabotropic Glu receptors are involved in these processes and their activation lead to the recruitment and activation of transduction molecules [8, 9].

R. C. Zepeda · I. Barrera · F. Castelán ·
L. C. Hernández-Kelly · E. López-Bayghen · A. Ortega (✉)
Departamento de Genética y Biología Molecular, Centro de
Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico
Nacional (Cinvestav-IPN), Apartado Postal 14-740, Mexico, DF
07000, Mexico
e-mail: arortega@cinvestav.mx

A. Soto-Cid
Facultad de Química Farmacéutica Biológica, Universidad
Veracruzana, Xalapa, Veracruz, Mexico

Mitogen-activated Protein Kinases (MAPK) comprise a family of protein Ser/Thr kinases activated rapidly in response to diverse stimuli that are critical for membrane to nuclei signaling pathways [10]. Four well-characterized subfamilies of MAPK exist: ERK1/2, ERK5, JNKs and p38s. Integral to all MAPKs pathways, are central three-tiered core signaling modules consisting of MAPK kinase kinases (MKKKs), MAPK kinases (MKKs) and MAPKs. The MAPKs are activated by a dual phosphorylation of tyrosine and threonine residues in a conserved Thr-X-Tyr (where X represents any amino acid) in the activation loop of the kinase. MAPK phosphatases reverse the phosphorylation and return MAPKs to their inactive state. MAPKs phosphorylation is catalyzed by subfamily-specific dual specificity kinases MKKs, which in turn are activated upon Ser/Thr phosphorylation by MKKKs.

Four p38 MAPKs have been described in vertebrates: α , β , γ and δ . The best characterized is p38 α that has ubiquitous expression [11]. Environmental stresses and inflammatory cytokines are strong p38 MAPK inducers although growth factors and neurotransmitters have also been described as inducers, albeit to a lower extent [12]. Upon activation, the dually phosphorylated enzyme goes through conformational changes that enhance access to its substrates thereby increasing its enzymatic activity. MEK3 and MEK6 catalyze p38 phosphorylation in a specific manner, neither JNKs nor ERK1/2 are substrates of these enzymes [13]. Once activated, p38 MAPKs phosphorylate cytoplasmic and nuclear proteins participating in transcriptional and translational control [14].

Glu-dependent transcriptional regulation of the chicken kainate binding protein gene (*chkbp*) involves a complex Ca²⁺-dependent signaling with a differential time frame that either increases or represses transcription [15, 16]. Both effects are dependent on the activation of AMPA receptors. Concerning the activation process, Ca²⁺ influx, via Ca²⁺/calmodulin (CaM) kinase II transactivates the insulin-like growth factor receptor I resulting in p42/44 MAPK activation and downstream activation of p90^{RSK}, Ca²⁺/cAMP responsive element binding protein (CREB) phosphorylation and *c-fos* transcriptional activation, resulting in an AP-1 complex that binds to the *chkbp* promoter and thereby increases the transcription of this gene. Of relevance is the fact that treatment of BGC cultures with the MEK inhibitor PD98059 reduces although does not abolish the transcriptional activation of *chkbp* suggesting the involvement of other MAPK members [17].

Taking into consideration p38 MAPK is involved in the Glu-dependent histone H3 phosphorylation in striatal neurons [18], and therefore in Glu-dependent transcription, we decided to explore its participation in the Glu-mediated transcriptional regulation of *chkbp*. The results reported herein demonstrate the involvement of p38

MAPK in Glu-dependent transcriptional regulation in glial cells.

Experimental Procedure

Materials

Tissue culture reagents were obtained from Invitrogen (Gaithersburg, MD, USA). Monoclonal anti-phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182) (Cat. No. 9215) and polyclonal anti-p38 MAPK antibodies (Cat No. 9212) were purchased from Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA). Horseradish peroxidase-linked anti-rabbit antibodies were obtained from Zymed Laboratories (San Francisco, CA, USA). The Bradford and SDS-PAGE reagents were obtained from Bio-Rad (Hercules, CA, USA). The enhanced chemiluminescence (ECL) Western blot detection kit was obtained from GE Healthcare (Chalfont St. Giles United Kingdom). PD98059 (2-(2-Amino-3-methoxyphenyl)-4H-1-benzopyran-4-one), SB 202190 (4-[4-(4-Fluorophenyl)-5-(4-pyridinyl)-1H-imidazol-2-yl] phenol), were from Tocris Cookson Ltd (Bristol, UK). All other chemicals were from Sigma (St. Louis, MO, USA).

Cell Culture and Stimulation Protocol

Chick cerebellar BGC were prepared as detailed elsewhere [19]. Briefly, 14-day-old chick embryos were used, and the cerebellum was dissected and homogenized mechanically. Cells were plated at a density of $8 \times 10^5 \text{ ml}^{-1}$ in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum, 2 mM glutamine, 100 units/ml penicillin, and 100 $\mu\text{g/ml}$ streptomycin. The cells were incubated at 37°C in 5% CO₂ and used after 5–6 days in culture. Immunocytochemical and kainate-induced ion fluxes of these primary cultures have shown that the vast majority of the cultured cells are Bergmann glia cells [19]. Confluent monolayers were pre-exposed to 0.5% BSA in DMEM for 2 h and treated as indicated.

SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis and Western Blots

Cell lysates from the cultured cells were prepared by scraping the cells in 50 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA; 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF); 5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ of leupeptin, aprotinin and pestatin; 10 mM NaF; 1 mM Na₃VO₄; and 1 mM Na₂MoO₄, pH 7.2 (lysis buffer), and solubilized in 200 μl of RIPA buffer [50 mM Tris-HCl, pH 7.2, 150 mM NaCl, 2% Triton X-100, 0.2% sodium

dodecyl sulphate (SDS)]. Equal amounts of protein (approximately 50 µg) were denatured in Laemmli's sample buffer and resolved through 12% SDS-polyacrylamide gels and electroblotted to nitrocellulose membranes. Blots were stained with Ponceau S stain to confirm that protein content was equal in all lanes. Membranes were soaked in PBS to remove the Ponceau S and incubated in TBS containing 10% dried skimmed milk and 0.1% Tween 20 for 60 min to block the excess of nonspecific protein binding sites. Membranes were then incubated overnight at 4°C with the primary antibodies, followed by secondary antibodies. Immunoreactive polypeptides were detected using the ECL chemiluminescence kit (GE Healthcare) exposed then to Kodak X-OMAT X-ray film. Densitometry was performed and the data analyzed with the Prism, GraphPad Software (San Diego, CA, USA). The optical densities of phospho-p38 MAPK were normalized to the densities of total p38 MAPK content.

Staining Procedures

Cells were grown on ethanol-washed and poly-lysine treated (0.01 mg ml⁻¹) glass coverslips. Control or treated (1 mM Glu, 30 min) were fixed with methanol at -20°C for 10 min. Coverslips were permeabilized with 0.5% Triton X-100 in PBS and blocked with 0.5% BSA for 60 min. Cells were exposed to a 1:10 dilution of anti-phospho-p38 (Thr180/Tyr182) antibodies for 60 min at room temperature, washed three times with BSA/PBS and incubated with a 1:100 dilution of affinity-purified FITC conjugated secondary antibodies. BGC nuclei were stained with 4,6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI). Coverslips were mounted with Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Cell preparations were analyzed with a Zeiss AxioScope 40 fluorescent microscope and the Axiovision software (Carl Zeiss, Inc., Thornwood, NY).

Electrophoretic Mobility Shift Assays (EMSA)

After the stimulation period, the cells were shifted to complete culture media for 1 h and nuclear extracts were prepared as described previously [20]. All buffers contained a protease inhibitors cocktail to prevent nuclear factor proteolysis. Protein concentration was measured by the Bradford method [21]. Nuclear extracts (approximately 20 µg) from control or treated BGC were incubated on ice with 500 ng of poly[(dI-dC)] as non-specific competitor (GE Healthcare) and 1 ng of [³²P]-end labeled double stranded AP-1 (SV40) oligonucleotide (5'-CTAGTATA-ATATGACTAAGCTGTG-3')

The reaction mixtures were incubated for 20 min on ice, electrophoresed in 6% polyacrylamide gels using a low ionic strength 0.5× TBE buffer. The gels were then vacuum-dried and exposed to an autoradiographic film overnight.

Transient Transfections and CAT Assays

The p435 kbpCAT plasmid contains the entire chick KBP 5'-non-coding region cloned in the pCAT-BASIC vector (Promega, Madison, WI) [17] and TRE-CAT contains five copies of AP-1 site cloned in front of the TK promoter and the CAT reporter gene [22]. Transient transfections and CAT assays were performed in 60% confluent BGC cultures using calcium phosphate protocol with 6 µg of p435 kbpCAT reporter plasmid or 1 µg of the TRE-CAT construct. Under such conditions, the transfection efficacy is approximately 50% determined in every cell batch by an internal transfection control (β -gal). Treatment with p38 MAPK antagonist or Glu was performed 24 h post-transfection for the indicated time periods and concentrations. Protein lysates were obtained as follows: cells were harvested in TEN buffer (40 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA, 15 mM NaCl), lysed with three freeze-thaw cycles in 0.25 M Tris-HCl pH 8.0 and centrifuged at 12,000g for 3 min. Equal amounts of protein lysates (approximately 80 µg) were incubated with 0.25 µCi of [¹⁴C]-chloramphenicol (50 mCi/mmol, GE Healthcare) and 0.8 mM Acetyl-CoA (Sigma) at 37°C. Acetylated forms were separated by thin-layer chromatography and quantified using a Typhoon Optical Scanner (Molecular Dynamics, GE Healthcare). CAT activities were expressed as the acetylated fraction corrected for the activity in the pCAT-BASIC vector and are expressed as relative activities to non-treated control cell lysates.

Statistical Analysis

Data are expressed as the mean \pm SEM at least of three independent experiments. To determine differences between groups, Kruskal-Wallis test with Dunn's post-hoc was performed using GraphPad version 4.00 for Mac (GraphPad Software).

Results

Glu Increases p38 MAPK Phosphorylation

Transcriptional control provides the framework of long lasting changes in the protein repertoire of nerve cells. By expressing neurotransmitter receptors, glia cells sense

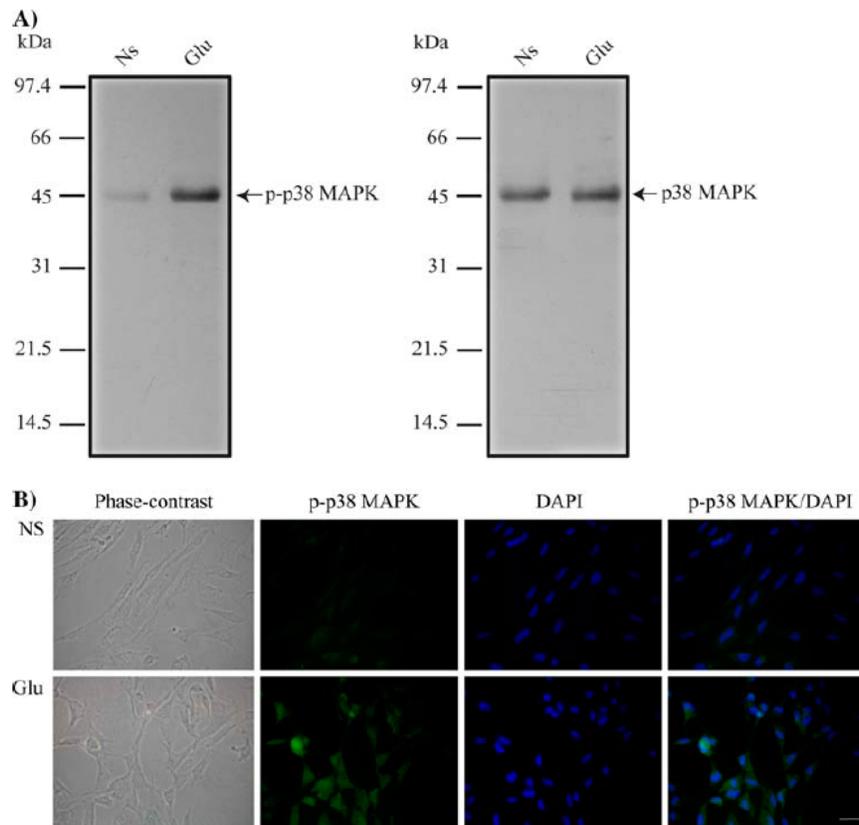


Fig. 1 Glutamate induces p38 MAPK phosphorylation. (a) Cell monolayers of Bergmann glia cells (BGC) were exposed to 1 mM Glu for 30 min (Glu) or to vehicle alone (NS). BGC total protein extracts were subjected to Western blot analysis. Membranes were incubated either with a monoclonal anti-phospho (Thr180/Tyr182)-p38 MAPK (p-p38 MAPK) diluted 1:500 (*left*) or a polyclonal antibody (1:500) against total p38 MAPK (*right*). Immunopositive polypeptides were visualized using a peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG polyclonal antibody and an ECL kit. An autoradiogram of a typical experiment is

shown. (b) p-p38 MAPK immunofluorescence. BGC monolayers (Phase-Contrast) were incubated with the monoclonal anti-phospho (Thr180/Tyr182)-p38 MAPK (p-p38 MAPK) diluted 1:10. Cell immunoreactivity was observed using a FITC-linked anti-rabbit IgG polyclonal antibody. No fluorescence was detected in cells incubated only with FITC-linked antibody (not shown). BGC nuclei were stained with 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). A merge of p-p38 MAPK and DAPI fluorescence is shown (p-p38 MAPK/DAPI). Scale bar 50 μm

neuronal activity and respond to it. Our previous findings concerning the Glu-dependent transcriptional regulation of the *chkbp* gene suggested that, besides a pivotal role of p42/44 in this regulation, other MAPK members might be participating. An attractive candidate to be involved is p38 MAPK. Our first approach was to examine whether Glu exposure of cultured BGC could lead to p38 MAPK phosphorylation. Using a phospho-specific antibody we were able to detect a robust phosphorylated band in extracts prepared from cells treated with 1 mM Glu for 30 min. As expected, no change in p38 MAPK levels were detected upon Glu treatment (Fig. 1a).

Immunocytochemical evidence of the mentioned results was sought. To this end, confluent BGC monolayers were exposed to Glu under the same conditions and the cells

fixed. As depicted in the bottom panel of Fig. 1b, Glu treatment results in a dramatic increase in the fluorescence signal. Note the apparent nuclear localization of the immunoreactivity.

The time-dependency of the Glu effect was established. As shown in Fig. 2a, as early as 15 min after Glu exposure a tendency of increase in phospho-p38 MAPK levels is detected, reaching the maximal phosphorylation after 120 min (Fig. 2a). As clearly shown in Fig. 2b, a dose-dependency of the Glu effect could be established, it is important to mention that a rather low Glu concentration (100 nM) is capable to induce p38 MAPK phosphorylation, and since metabotropic receptors display a higher affinity for Glu than ionotropic receptors [1], it may well be that metabotropic receptors participate in the Glu effect.

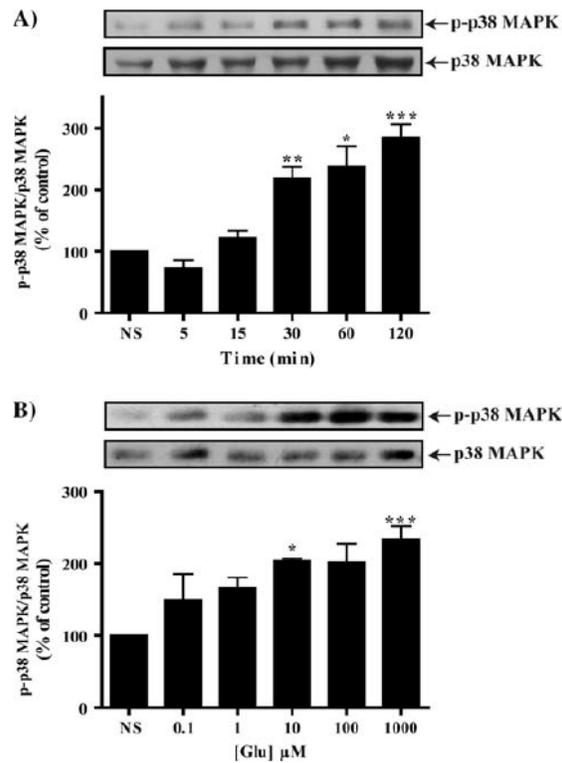


Fig. 2 p38 MAPK phosphorylation is time and dose dependent. (a) BGC were treated for different time periods with a fixed Glu concentration (1 mM). Total proteins extracts were subjected to Western blot analysis as in Fig. 1a. p38 MAPK phosphorylation (p-p38 MAPK) was represented as fraction of total p38 MAPK (p38 MAPK) which was phosphorylated in response to Glu-exposure and in relation to non-stimulated (NS) BGC used as control group (% of the control). Typical autoradiograms for p-p38 MAPK and p38 MAPK are shown (upper). Data are expressed as mean ± SE from at least of three independent experiments. A non-parametric Kruskal–Wallis test followed by a Dunn’s post-hoc for comparing each group against NS were performed to analyze the data (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$). (b) BGC monolayers were treated with increasing Glu concentrations. Levels of phosphorylation were detected as in (a). Typical autoradiograms for p-p38 MAPK and p38 MAPK are shown (upper). Results are expressed and analyzed as in (a) (*, $P < 0.05$; ***, $P < 0.001$)

Metabotropic and Ionotropic Glu Receptors Mediate p38 MAPK Phosphorylation

In order to gain insight into the identity of the Glu receptors involved in p38 MAPK phosphorylation a battery of glutamatergic ligands was used. Confluent BGC cultures were stimulated with 1 mM Glu and its analogues AMPA (500 μM), NMDA + Gly (500 μM + 10 μM) and (RS)-DHPG (50 μM) for 30 min. As shown in Fig. 3a, both AMPA and DHPG were capable to mimic Glu effect. When the cells were stimulated with AMPA + DHPG no

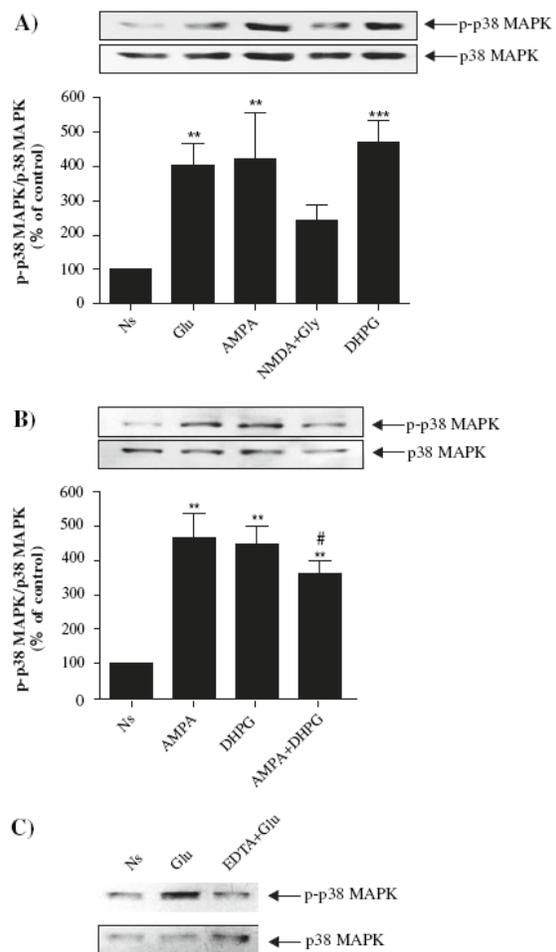


Fig. 3 Glutamate ionotropic and metabotropic receptors are involved in p38 MAPK phosphorylation. (a) BGC monolayers were incubated for 30 min with vehicle (NS), Glu (1 mM) or its analogues α -amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid (AMPA), 500 μM; *N*-methyl-D-aspartic acid 500 μM plus glycine 10 μM (NMDA + Gly) and (RS)-3,5-dihydroxyphenylglycine (DHPG), 50 μM. Levels of phosphorylation were detected as in Fig. 2. Typical autoradiograms for p-p38 MAPK and p38 MAPK are shown (upper). Results are expressed and analyzed as in Fig. 2. (**, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$). (b) BGC monolayers were co-treated (AMPA + DHPG) with ionotropic (AMPA) and group I metabotropic (DHPG) Glu receptor agonists for 30 min. Results are expressed and analyzed as in Fig. 2. (**, $P < 0.01$ against NS). No significant difference (#) was observed between AMPA + DHPG and AMPA or DHPG groups. (c) BGC monolayers were incubated for 30 min with 1 mM Glu (Glu) or Glu plus 100 μM ethylenediaminetetraacetic acid (Glu + EDTA). Phosphorylation of p38 MAPK was analyzed by Western blot. Representative autoradiograms for p-p38 MAPK and p38 MAPK are shown

further increase in phospho-p38 MAPK was detected (Fig. 3b). Note that NMDA treatment also increased p38 MAPK phosphorylation although this effect is not

significantly different from the control. Taking into consideration that Bergmann glia AMPA receptors are Ca^{2+} permeable, we decided to explore the effect of removing extracellular Ca^{2+} in the Glu-dependent p38 MAPK phosphorylation. As shown in Fig. 3c, when Ca^{2+} was removed from the media the Glu effect was completely blocked.

Involvement of p38 MAPK in Glu-Dependent Transcriptional Control

Inducible transcription factors are often substrates of enzymes involved in post-translational modifications such as kinases, phosphatases, acetylases, etc. In fact, these post-translational modifications regulate their activity in most of the cases. In this context, we decided to explore if a well-established p38 MAPK inhibitor such as 4-[4-(4-Fluorophenyl)-5-(4-pyridinyl)-1H-imidazol-2-yl]phenol (SB 202190) could reduce our previously reported finding of a Glu-dependent increase in Activator Protein 1 (AP-1) DNA binding activity. The results are shown in Fig. 4, as already reported, exposure of confluent BGC monolayers to 1 mM Glu, results in the appearance of a retarded AP-1/DNA complex (Fig. 4a). This protein/DNA complex is specific since a 100-fold excess of unlabeled AP-1 oligonucleotide is sufficient to abolish the radioactive band. When the cells were pre-treated with SB 202190 (1 μM) and exposed the cells to 1 mM Glu, a clear reduction in AP-1 DNA binding was obtained (Fig. 4b). As expected from our previous findings, the pre-incubation with the MEK inhibitor 2'-amino-3'-methoxyflavone (PD98059, 25 μM) also reduced the Glu-dependent AP-1 DNA binding activity. Interestingly, the combination of both inhibitors blocked the Glu effect completely (Fig. 4c).

At this stage, it became imperative to test if the p38 MAPK blocker could modify the promoter activity of a Glu-regulated gene such as *chkbp*. To this end, we transfected BGC cultures with the p435kbpCAT construct that contains the entire chick *kbp* 5'-non-coding region. As expected, Glu treatment resulted in a threefold increase in transcriptional activity. Pre-treatment with SB 202190 reduces the Glu effect significantly (Fig. 5a). As expected from the EMSA results represented in Fig. 4, Glu treatment also resulted in an augmentation of the transcriptional activity of pTRE-CAT, response also sensitive to the p38 MAPK inhibitor (Fig. 5b).

Discussion

It has become evident in the recent years that glial cells are key elements for the proper function of the nervous system. In addition to Glu transporters, BGC harbors Glu receptors

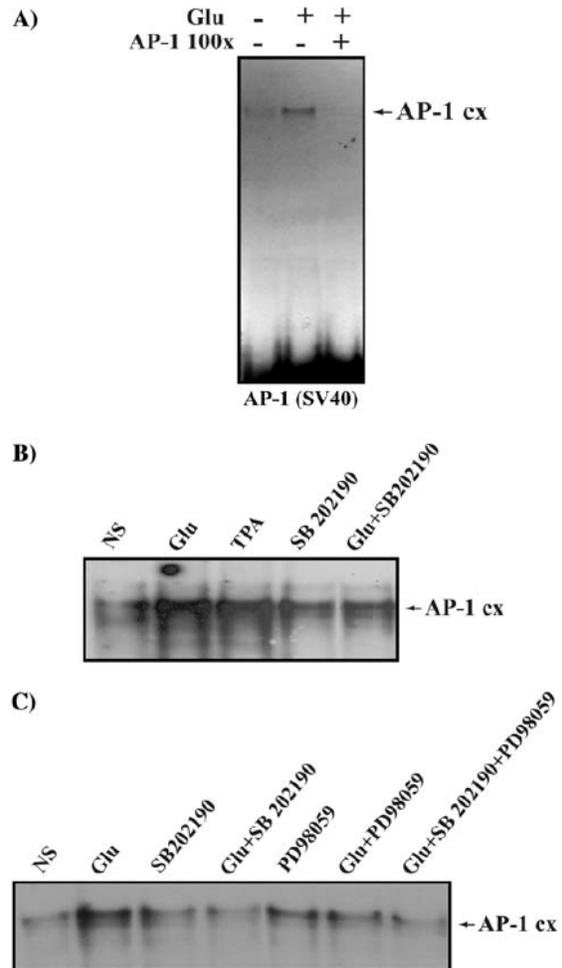


Fig. 4 AP-1 DNA binding is activated by p38 MAPK induced by Glu. Gel shift assays were performed in all three panels using AP-1 SV40 oligonucleotide as ^{32}P -end-labeled probe. (a) Nuclear extracts from Bergmann glia cells treated for 30 min with vehicle (NS) or Glu (1 mM) were obtained 90 min after treatment. AP-1 SV40 non-labeled oligonucleotide (100-fold excess) was included as a specific competitor. (b) Nuclear extracts from BGC treated for 30 min with vehicle (NS), Glu (1 mM), 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA, 10 nM) were obtained 90 min after treatment. The p38 MAPK inhibitor 4-[4-(4-Fluorophenyl)-5-(4-pyridinyl)-1H-imidazol-2-yl]phenol (SB 202190) 1 μM was added 30 min before either Glu (Glu + SB 202190) or only vehicle (SB 202190). (c) Nuclear extracts used in gel shift were from BGC treated for 30 min with vehicle (NS) and Glu (1 mM) were obtained 90 min after treatment. SB 202190 and the ERK1/2 inhibitor, 2'-amino-3'-methoxyflavone (PD98059; 25 μM) were added 30 min. The same procedure was used for Glu + SB 202190 + PD98059 group. For each, a typical autoradiogram at least of three experiments is shown

that confer them the ability to sense neuronal activity and shape its protein repertoire accordingly [23, 24]. The signaling transactions used by this excitatory amino acid to

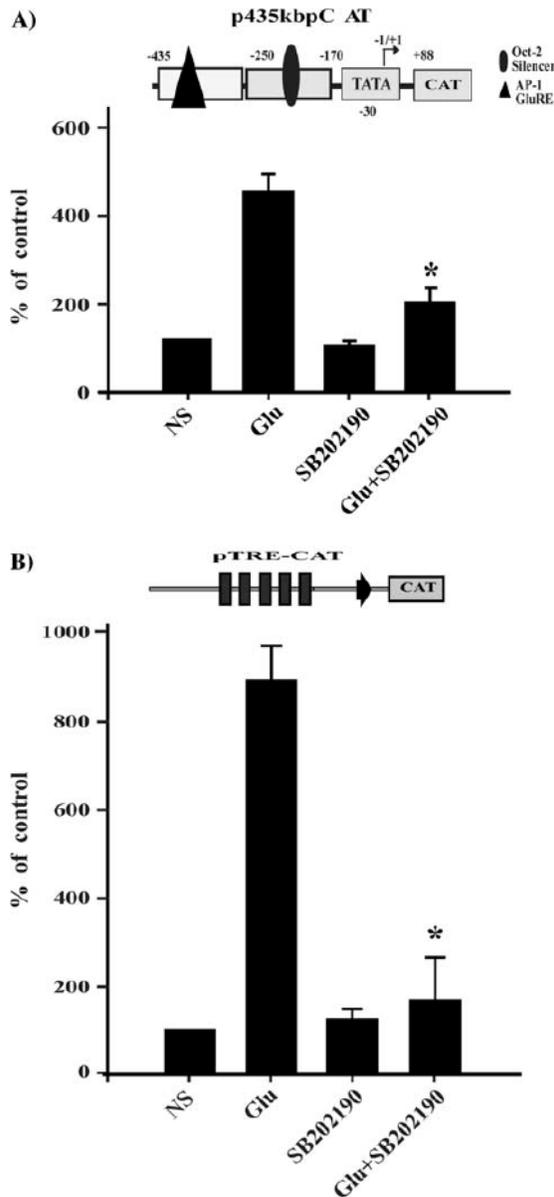


Fig. 5 p38 MAPK activation induced by Glu participates in transcriptional control. BGC monolayers were transfected with either (a) p435KBP-CAT construct or (b) pTRE-CAT. Sixteen hours post-transfection, cells were treated for 30 min with 1 mM Glu or the p38 MAPK inhibitor SB 202190 (1 μ M) or Glu + SB 202190 combination, added 30 min before Glu treatment. Cells were harvested 48 h after transfection and processed for CAT activity assays. Results represent the ratio of relative CAT activity to that of non-stimulated control (NS). Data are the mean \pm SE of at least six independent experiments. Statistical analysis was performed using a Student *t*-test (versus Glu; *, *P* < 0.001). Schematic representations of the 5' non-coding region of *chkbp* promoter or AP-1 binding sites (black boxes) of transfected constructs are included

regulate gene expression are diverse, but in most of the cases are Ca²⁺-dependent and involve MAPK [25].

It has been traditionally assumed that p38 MAPK is activated as a result of cellular stressors as well as in response to cytokines. This report demonstrates that Glu, through ionotropic and metabotropic receptors, induces the activation of p38 MAPK in cerebellar radial glia cells. In neurons, such activation is involved in cell death [26–28]. It is relevant to mention that Glu treatment of rat cerebellar granule cells results in a rapid p38 MAPK α activation that participates in the excitotoxic effect of this neurotransmitter [12]. Our results suggest that at least in BGC that are in close proximity to granular neurons, Glu-dependent p38 MAPK activation triggers a signal transduction pathway capable to converge upstream of transcriptional control. Whether this differential downstream output is related to the BGC resistance to Glu toxicity [7], is not known at this moment, but the difference in the kinetic profile of p38 MAPK activation, the fast and transient activation in neurons [12] compared to the slower and sustained phosphorylation detected in this contribution (Fig. 2) could explain this effect. In support of this interpretation is the fact that phosphorylated p38 MAPK is able to activate a variety of substrates, including transcription factors and other molecules involved in plastic events [11]. Of relevance is to mention that in rat spinal dorsal horn astrocytes, p38 MAPK activation is necessary for the induction of an ATP-induced form of LTP [29].

A time- and dose-dependency could be established for the Glu response. Furthermore, through the use of glutamatergic agonists we could conclude that Glu receptors involved are AMPA and metabotropic receptors of the group I subtype. Previous work from our group has established that BGC express these receptors [3, 30]. When the cells were treated with both agonists, no further increase in p38 MAPK phosphorylation was achieved. These results suggest the existence convergence point downstream of the receptors or that a transactivation event is taking place. The fact that Glu-dependent activation of p38 MAPK is strictly dependent on Ca²⁺ influx, favors the interpretation of a transactivation effect. It is possible that Ca²⁺ influx through AMPA receptors results in Group I metabotropic receptors activation. A similar cross-talk between ionotropic and metabotropic receptors has been described in BGC in the context of p70^{S6K} phosphorylation [7]. Work currently in progress in our lab is aimed as to establish the complete signaling cascade that links Glu receptors activation and p38 MAPK activity.

The prominent expression of p38 MAPK in brain suggests its involvement in synaptic plasticity. In fact, a form of hippocampal long term depression (LTD) that is triggered by metabotropic Glu receptors is inhibited by the p38

MAPK blocker SB 203580 [31]. Since the late phases of synaptic plasticity involve regulation of gene expression [32], it became important to test if p38 MAPK activation in glial cells participate in Glu-mediated transcriptional control. As clearly shown in Figs. 4 and 5, inclusion of a p38 MAPK inhibitor is sufficient to suppress the stimulatory effect of Glu in AP-1 activation and *chkbp* transcription. It is tempting to speculate that at least, part of the protein repertoire required for long-term information storage in the brain could take place in glial cells. This provocative interpretation is supported by the well-characterized metabolic interplay of glutamatergic synapses. The Glu-glutamine and the astrocyte-neuron lactate shuttles are key participants in the proper function of glutamatergic neurons [33, 34].

In summary, we demonstrate here that Glu signaling involves p38 MAPK activation and that this enzyme is involved Glu-dependent gene expression regulation in cerebellar BGC. The dissection of the route by which p38 MAPK is activated and its downstream targets will certainly shed some light into the participation of Bergmann cells in Glu signaling in the cerebellum.

Acknowledgments We thank Dr. Tatiana Olivares for a critical reading of this article. This work was supported by grants from Conacyt-México to A.O. (43164 and 54004), R.C.Z., I.B. and F.C. are supported by Conacyt-México. The technical assistance of Luis Cid and Blanca Ibarra is acknowledged. This work was submitted in partial fulfillment of the requirements for the Ph.D. degree for R.C.Z. at Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México.

References

- Kew JN, Kemp JA (2005) Ionotropic and metabotropic glutamate receptor structure and pharmacology. *Psychopharmacology (Berl)* 179:4–29
- Matsui K, Jahr CE (2004) Differential control of synaptic and ectopic vesicular release of glutamate. *J Neurosci* 24:8932–8939
- Lopez T, Lopez-Colome AM, Ortega A (1998) Changes in GluR4 expression induced by metabotropic receptor activation in radial glia cultures. *Brain Res Mol Brain Res* 58:40–46
- Seifert G, Steinhauser C (2001) Ionotropic glutamate receptors in astrocytes. *Prog Brain Res* 132:287–299
- Oheim M, Kirchhoff F, Stuhmer W (2006) Calcium microdomains in regulated exocytosis. *Cell Calcium* 40:423–439
- Rosas S, Vargas MA, Lopez-Bayghen E, Ortega A (2007) Glutamate-dependent transcriptional regulation of GLAST/EAAT1: a role for YY1. *J Neurochem* 101:1134–1144
- Gonzalez-Mejia ME, Morales M, Hernandez-Kelly LC, Zepeda RC, Bernabe A, Ortega A (2006) Glutamate-dependent translational regulation in cultured Bergmann glia cells: involvement of p70S6K. *Neuroscience* 141:1389–1398
- Besshoh S, Bawa D, Teves L, Wallace MC, Gurd JW (2005) Increased phosphorylation and redistribution of NMDA receptors between synaptic lipid rafts and post-synaptic densities following transient global ischemia in the rat brain. *J Neurochem* 93:186–194
- Millan A, Arias-Montano JA, Mendez JA, Hernandez-Kelly LC, Ortega A (2004) Alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole-propionic acid receptors signaling complexes in Bergmann glia. *J Neurosci Res* 78:56–63
- Roux PP, Blenis J (2004) ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol Mol Biol Rev* 68:320–344
- Cuenda A, Rousseau S (2007) p38 MAP-kinases pathway regulation, function and role in human diseases. *Biochim Biophys Acta* 1773:1358–1375
- Semenova MM, Maki-Hokkonen AM, Cao J, Komarovski V, Forsberg KM, Koistinaho M, Coffey ET, Courtney MJ (2007) Rho mediates calcium-dependent activation of p38alpha and subsequent excitotoxic cell death. *Nat Neurosci* 10:436–443
- Raingeaud J, Whitmarsh AJ, Barrett T, Derijard B, Davis RJ (1996) MKK3- and MKK6-regulated gene expression is mediated by the p38 mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *Mol Cell Biol* 16:1247–1255
- Zarubin T, Han J (2005) Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. *Cell Res* 15:11–18
- Aguirre A, Lopez T, Lopez-Bayghen E, Ortega A (2000) Glutamate regulates kainate-binding protein expression in cultured chick Bergmann glia through an activator protein-1 binding site. *J Biol Chem* 275:39246–39253
- Mendez JA, Lopez-Bayghen E, Rojas F, Hernandez ME, Ortega A (2004) Glutamate regulates Oct-2 DNA-binding activity through alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionate receptors in cultured chick Bergmann glia cells. *J Neurochem* 88:835–843
- Aguirre A, Lopez-Bayghen E, Ortega A (2002) Glutamate-dependent transcriptional regulation of the *chkbp* gene: signaling mechanisms. *J Neurosci Res* 70:117–127
- Brami-Cherrier K, Lavaur J, Pages C, Arthur JS, Caboche J (2007) Glutamate induces histone H3 phosphorylation but not acetylation in striatal neurons: role of mitogen- and stress-activated kinase-1. *J Neurochem* 101:697–708
- Ortega A, Eshhar N, Teichberg VI (1991) Properties of kainate receptor/channels on cultured Bergmann glia. *Neuroscience* 41:335–349
- Lopez-Bayghen E, Vega A, Cadena A, Granados SE, Jave LF, Gariglio P, Alvarez-Salas LM (1996) Transcriptional analysis of the 5'-noncoding region of the human involucrin gene. *J Biol Chem* 271:512–520
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254
- Rutberg SE, Saez E, Lo S, Jang SI, Markova N, Spiegelman BM, Yuspa SH (1997) Opposing activities of c-Fos and Fra-2 on AP-1 regulated transcriptional activity in mouse keratinocytes induced to differentiate by calcium and phorbol esters. *Oncogene* 15:1337–1346
- Iino M, Goto K, Kakegawa W, Okado H, Sudo M, Ishiuchi S, Miwa A, Takayasu Y, Saito I, Tsuzuki K, Ozawa S (2001) Glia-synapse interaction through Ca²⁺-permeable AMPA receptors in Bergmann glia. *Science* 292:926–929
- Takayasu Y, Iino M, Shimamoto K, Tanaka K, Ozawa S (2006) Glial glutamate transporters maintain one-to-one relationship at the climbing fiber-Purkinje cell synapse by preventing glutamate spillover. *J Neurosci* 26:6563–6572
- Wang JQ, Fibuch EE, Mao L (2007) Regulation of mitogen-activated protein kinases by glutamate receptors. *J Neurochem* 100:1–11
- Segura Torres JE, Chaparro-Huerta V, Rivera Cervantes MC, Montes-Gonzalez R, Flores Soto ME, Beas-Zarate C (2006) Neuronal cell death due to glutamate excitotoxicity is mediated by

- p38 activation in the rat cerebral cortex. *Neurosci Lett* 403: 233–238
27. Nakatsu Y, Kotake Y, Komasa K, Hakozaki H, Taguchi R, Kume T, Akaike A, Ohta S (2006) Glutamate excitotoxicity is involved in cell death caused by tributyltin in cultured rat cortical neurons. *Toxicol Sci* 89:235–242
 28. Nozaki K, Nishimura M, Hashimoto N (2001) Mitogen-activated protein kinases and cerebral ischemia. *Mol Neurobiol* 23:1–19
 29. Ikeda H, Tsuda M, Inoue K, Murase K (2007) Long-term potentiation of neuronal excitation by neuron-glia interactions in the rat spinal dorsal horn. *Eur J Neurosci* 25:1297–1306
 30. Lopez T, Lopez-Colome AM, Ortega A (1994) AMPA/KA receptor expression in radial glia. *Neuroreport* 5:504–506
 31. Bolshakov VY, Carboni L, Cobb MH, Siegelbaum SA, Belardetti F (2000) Dual MAP kinase pathways mediate opposing forms of long-term plasticity at CA3-CA1 synapses. *Nat Neurosci* 3:1107–1112
 32. Wu H, Zhou Y, Xiong ZQ (2007) Transducer of regulated CREB and late phase long-term synaptic potentiation. *FEBS J* 274:3218–3223
 33. Bak LK, Sickmann HM, Schousboe A, Waagepetersen HS (2005) Activity of the lactate-alanine shuttle is independent of glutamate-glutamine cycle activity in cerebellar neuronal-astrocytic cultures. *J Neurosci Res* 79:88–96
 34. Pellerin L, Bouzier-Sore AK, Aubert A, Serres S, Merle M, Costalat R, Magistretti PJ (2007) Activity-dependent regulation of energy metabolism by astrocytes: an update. *Glia* 55:1251–1262