



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

**DEPARTAMENTO DE
GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**

"Papel de rpS6 sobre la traducción"

T E S I S

Que presenta

M. en C. REYNALDO TIBURCIO FÉLIX

Para obtener el grado de

DOCTOR EN CIENCIAS

**EN LA ESPECIALIDAD DE
GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**

Director de tesis
DR. BULMARO CISNEROS VEGA



Este trabajo se realizó en los laboratorios 19 y 12 del Departamento Genética y Biología Molecular así como en el laboratorio 31 del Departamento de Toxicología del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional-Unidad Zacatenco

La investigación se realizó bajo la dirección de los Doctores: Samuel Zinker Ruzal, Bulmaro Cisneros Vega y Arturo Ortega Soto. Contando con la asesoría de los Doctores: Patricio Gariglio Vidal, José Efraín Garrido Guerrero, Jesús Valdés Flores y Everardo López Romero.

FINANCIAMIENTO

Durante la realización del presente trabajo, el autor contó con el apoyo de las siguientes becas:

1. Beca de doctorado número 472739 del Consejo Nacional para la Ciencia y la Tecnología (CONACyT).
2. Beca para tesis de doctorado con número de folio 18BTD0065 del Consejo Mexiquense de Ciencia y Tecnología (Comecyt).
3. Beca para obtención de grado del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional.

AGRADECIMIENTOS

A mis tutores de doctorado: Samuel Zinker Ruzal, Bulmaro Cisneros Vega y Dr. Arturo Ortega Soto.

A mi Asesores de tesis: Dr. Everardo López Romero, Patricio Gariglio Vidal, Efraín Garrido Guerrero y Jesús Valdéz Flores.

A mis compañeros: Laboratorios 19 y 12 de Genética y Biología Molecular y del Laboratorio 31 de Toxicología.

A mis amigos del posgrado.

Agradezco la asesoría técnica de Luisa Clara Regina Hernández Kelly, Blanca Rocío Ibarra López y Luis Ángel Cid Cid, del Departamento de Toxicología, Cinvestav-IPN y de la M. en C. Rosa María García Pérez del Departamento de Genética y Biología Molecular, Cinvestav-IPN por el entrenamiento en las metodologías realizadas en este trabajo.

Agradezco a Rosa María Cruces Angeles y Gabriela Mora Macías por el apoyo en la parte administrativa

DEDICATORIAS

A mis padres

A mis hermanos

A mis hijas



ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS.....	I
RESUMEN.....	III
ABSTRACT.....	IV
INTRODUCCIÓN.....	1
El cerebelo.....	2
Glía de Bergmann.....	5
Glutamato.....	9
Receptores de Glutamato.....	10
Transportadores de Glutamato.....	13
Señalización en Células Gliales de Bergmann.....	15
Glutamina sintetasa.....	16
Óxido nítrico y nNOS.....	22
Proteína ribosomal S6.....	25
Vía de señalización PI3K/AKT/mTOR.....	27
JUSTIFICACIÓN.....	33
HIPÓTESIS.....	33
OBJETIVO.....	34
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	35
MATERIAL Y MÉTODOS.....	36

RESULTADOS.....	41
DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	64
CONCLUSIONES.....	69
REFERENCIAS.....	70



LISTA DE ABREVIATURAS

5' TOP	Oligopirimidinas en el extremo 5'
Asp	Aspartato
CGB	Células gliales de Bergmann
CNQX	6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione
CHX	Cicloheximida
DL-TBOA	DL-threo- β -Benzyloxyaspartic acid
EAAT	Transportador de aminoácidos excitatorios
eIF-4E	Factor de inicio eucariota 4E
GLAST	Transportador de Glutamato y Aspartato
Gln	Glutamina
Glu	Glutamato
GluR	Receptores de Glutamato
GluT	Transportadores de Glutamato
GS	Glutamina sintetasa
iGluR	Receptores de Glutamato ionotrópicos
mGluR	Receptores de Glutamato metabotrópicos
MAPK	MAP cinasa
nNOS	Neural Óxido Nitrico Sintase
NO	Óxido nítrico
PIP2	Fosfatidil inositol 4,5-bifosfato
PIP3	Fosfatidil inositol 3,4,5-trifosfato
PKD	Cinasa 1, dependiente de fosfatidil inositol-3.
S6K	Cinasa de S6

LISTA DE ABREVIATURAS

rpS6	Proteína ribosomal S6
rRNA	RNA ribosomal
CNC	SNC
TOR	Blanco de rapamicina
TORC	Complejo TOR
TSC	Complejo de esclerosis tuberosa
tRNA	RNA de transferencia

RESUMEN

El glutamato media la mayor parte de sinapsis excitatorias del Sistema Nervioso Central y regula en gran medida información sensorial, motora, cognitiva, emocional y la memoria. También interviene procesos celulares como neuroplasticidad, diferenciación y neurodegeneración. El Glutamato ejerce su efecto mediante su unión con receptores y transportadores. Evidencias reciente ha demostrado que los sistemas de captura de glutamato, particularmente enriquecidos en células gliales, desencadenan cascadas bioquímicas de manera similar a los receptores. Una regulación estricta de los niveles extracelulares de glutamato previene la sobreestimulación neuronal y la muerte celular, y está involucrada de manera crítica en el recambio de glutamato. Un acoplamiento entre la captación de glutamato y la síntesis y liberación de glutamina se conoce comúnmente como la lanzadera glutamato/glutamina. La entrada de Glutamato genera el influjo de Ca^{2+} lo que puede activar cascadas de señalización derivadas de Ca^{2+} , como es el caso de cGMP. Aprovechando el modelo *in vitro* de Células Gliales de Bergmann, exploramos la regulación de la expresión génica de la Glutamina sintetasa y nNOS mediante la fosforilación de rpS6. Se encontró una regulación dependiente del tiempo y la dosis de ambas proteínas y los niveles de actividad. Además, la exposición al glutamato dio lugar a una regulación traduccional dependiente de la fosforilación de rpS6 del mRNA de la Glutamina sintetasa, mientras que el glutamato regula la expresión de nNOS inhibiendo su proteólisis y produciendo Óxido nítrico encargado de regular la expresión génica y sinapsis glutamatérgicas y GABAérgicas. Estos resultados demuestran con detalle los mecanismos de regulación traduccional y postraduccional dependientes de glutamato y refuerzan la noción de una interacción neuronal de glía exquisita en las sinapsis glutamatérgicas.

ABSTRACT

Glutamate mediates most excitatory synapses of the Central Nervous System and largely regulates sensory, motor, cognitive, emotional and memory. It also intervenes cellular processes such as neuroplasticity, differentiation and neurodegeneration. Glutamate exerts its effect through its binding with receptors and transporters. Recent evidence has shown that glutamate uptake systems, particularly enriched in glial cells, trigger biochemical cascades in a similar way to receptors. Strict regulation of extracellular glutamate levels prevents neuronal overstimulation and cell death, and is critically involved in glutamate turnover. A coupling between glutamate uptake and the synthesis and release of glutamine is commonly known as the glutamate/glutamine shuttle. The input of Glutamate generates the Ca^{2+} influx which can activate signaling cascades derived from Ca^{2+} , as is the case of cGMP. Taking advantage of the *in vitro* model of Bergmann Glial Cells, we explored the regulation of gene expression of Glutamine synthetase and nNOS by the phosphorylation of rpS6. A time-dose dependent regulation of both proteins and activity levels was found. In addition, glutamate exposure gave rise to a glutamate-dependent translational Control of Glutamine synthetase through rpS6 phosphorylation. On the other hand glutamate regulates nNOS expression by proteolysis inhibition of nNOS. Also the increase of nitric oxide production was demonstrated, it might cause gene expression and glutamatergic and GABAergic synapses regulation. These results demonstrate in detail the glutamate-dependent translational and posttranslational regulation mechanisms and reinforce the idea of an exquisite glia/neuronal interaction at glutamatergic synapses.



INTRODUCCIÓN

El sistema nervioso es una red compleja de estructuras especializadas que tienen como misión controlar y regular el funcionamiento de los diversos órganos y sistemas, coordinando su interrelación y la relación del organismo con el medio externo. El sistema nervioso está organizado para detectar cambios en el medio interno y externo, evaluar esta información y responder a través de cambios en músculos o glándulas. Desde que despertamos, estamos dando órdenes a nuestros músculos para que nos pongan en marcha. Bañarse, peinarse, vestirse, etc., son actividades que hacemos de manera rutinaria y hasta de forma automatizada, las cuales requirieron previamente de un periodo de aprendizaje. Explicar en qué parte del sistema nervioso sucede esto no es sencillo, ya que en realidad están involucradas muchas estructuras encefálicas. Por ejemplo, la corteza prefrontal es responsable de la planificación del movimiento, en tanto que la corteza premotora es necesaria para su programación (Kantak et al 2012). Por su parte la corteza motora envía los comandos a centros motores del tallo cerebral y de la medula espinal; ésta contiene a las motoneuronas que activan los músculos agonistas e interneuronas que inhiben a otras motoneuronas que inervan los músculos antagonistas. Esta sinergia muscular tan claramente en la actividad neuronal constituye la vía final común del movimiento (García R. 2008, Matt et al 2018) . A nivel subcortical, el cerebelo es una de las estructuras involucradas en el movimiento y en el aprendizaje motor. El aprendizaje motor puede definirse como un cambio en la ejecución motora con la práctica, y es mediante este proceso que el encéfalo aprende nuevos repertorios de movimientos mediante la ejecución repetida, lo cual involucra mecanismos de neuroplasticidad (Bastian 2007). Una de las estructuras que ha recibido mayor atención en las últimas décadas con respecto al aprendizaje motor es el cerebelo. Esta estructura es fundamental en el control del movimiento, el equilibrio y el aprendizaje motor.

EL CEREBELO

El cerebelo es un centro nervioso impar que se sitúa sobre el tronco del encéfalo. En los mamíferos, el cerebelo está formado por una sucesión de folios o láminas, que se repiten de adelante hacia atrás como las páginas de un libro, y emplazado transversalmente al eje longitudinal del tronco encefálico. El cerebelo está presente en todos los vertebrados. Las dimensiones relativas del cerebelo crecen con el proceso evolutivo. Por ejemplo, En muchas clases de peces, el cerebelo es tan sólo una lámina transversal en la porción dorsal del cerebro; pero, en ciertos peces eléctricos, el cerebelo alcanza un enorme desarrollo y cubre como un manto todo el resto del cerebro. En los anfibios y reptiles, el cerebelo forma una placa que se proyecta dorsalmente sobre el techo óptico. En las aves y, sobre todo, en los mamíferos, el cerebelo está más desarrollado; esto es, está formado por folios sucesivos que se disponen uno tras otro en el eje anteroposterior (Larsell 1951).

Desde el punto de vista de la organización del sistema nervioso central (SNC), el cerebelo se sitúa en una posición marginal con respecto a los grandes centros y vías sensoriales y motores. De ahí que, de siempre, al cerebelo se le haya asignado una función coordinadora o reguladora de los actos motores en realización o en preparación, pero no la de un elemento neuronal iniciador del movimiento. Su papel sería dar continuidad, suavidad y armonía al comportamiento motor (Keller 1989, Kimura 1988). Su lesión total o parcial perturba esta función de coordinación motora y produce, por lo tanto, alteraciones en la postura y el movimiento (Massaquoi 2012). Recientemente se ha extendido esta función reguladora a los procesos de carácter perceptivo y cognitivo. De este modo, el cerebelo se contempla hoy como una estructura especializada en la regulación de funciones perceptivas, cognitivas y motoras generadas en otras áreas del sistema nervioso (Strick et al 2009, Thach et al 1992).

Desde el punto de vista celular, el cerebelo se divide en tres capas que, de la superficie al interior, se denominan molecular, intermedia (o de las células de Purkinje) y de las células granulares. La capa molecular, compuesta de los

árboles dendríticos de las células de Purkinje y los axones ascendentes de las células granulares. En esta capa también se encuentran las fibras paralelas y tienen dos tipos de neuronas inhibitorias: a) las células estrelladas que están en la parte externa y b) las células canasta ubicadas más internamente así como los árboles dendríticos de las células de Purkinje. Tanto las células estrelladas como las 'en cesto' extienden sus axones en el plano sagital, pero se diferencian en que las estrelladas hacen sinapsis con las dendritas distales de las células de Purkinje, mientras que el axón de las células en cesto se extiende lateralmente por encima de los somas de las células de Purkinje y emite ramificaciones profusas sobre cada uno de estos, de manera que se forma una especie de canastilla o cesto que los envuelve casi completamente (D'Angelo 2018, Sotelo 2015). En la misma capa molecular se disponen también las dendritas de las células de Golgi, aunque sus somas se localizan en la capa de los granos. Dentro de la capa molecular se encuentran también las fibras paralelas, a las cuales debe su nombre. El soma de las células de los granos se localiza en la capa granular y su axón asciende perpendicular a la superficie cerebelosa y se ramifica en forma de T en la capa molecular en ambas direcciones del eje longitudinal del folio. Así, cada fibra paralela se extiende perpendicularmente entre los espacios que deja el árbol dendrítico de las células de Purkinje y hace sinapsis en su recorrido con 20-30 de ellas. A su vez, cada célula de Purkinje recibe contactos sinápticos de unas 200.000 fibras paralelas. Las fibras trepadoras terminan también en la capa molecular siguiendo las ramificaciones de las dendritas de cada célula de Purkinje. Cada fibra trepadora realiza 200-300 contactos sinápticos en la porción no espinosa del árbol dendrítico de una célula de Purkinje. Las fibras trepadoras envían también colaterales a las células estrelladas, en cesto y de Golgi. De esta manera, las células gliales de Bergmann (CGB) se encuentran rodeando a las sinapsis glutamatérgicas (Buffo & Rossi 2013, Delgado-García 2001, Stoodley & Limperopoulos 2016).

La capa intermedia entre la molecular y la granular está formada por los somas de las células de Purkinje, que se disponen de forma ordenada siguiendo el contorno de la superficie de cada folio. Son somas de gran tamaño (20-40 mm) y de ellos parten los árboles dendríticos hacia la capa molecular. El

axón de la célula de Purkinje se dirige a través de la capa granular hacia la sustancia blanca que ocupa la porción central del folio hasta alcanzar los núcleos cerebelosos. Por lo tanto, los axones de las células de Purkinje representan la única salida de la corteza del cerebelo. (Buffo & Rossi 2013, Kawamura et al 1990) La capa granular, situada inmediatamente por debajo de los somas de Purkinje, está formada principalmente por las células granulares, de tamaño pequeño (5-10 μm), pero tan numerosas (5×10^{11} en el hombre) que representan la mitad del total de neuronas del SNC. Estas células son el origen de los axones ascendentes hacia la capa molecular para formar las fibras paralelas. Las dendritas (4-5 por célula) de las células granulosas hacen sinapsis en las terminaciones engrosadas (rosetas) de las fibras musgosas y forman los glomérulos característicos de la capa granular. Los axones de las células de Golgi terminan también en los glomérulos y hacen sinapsis sobre las dendritas de las células granulares. En la capa granular existen otros dos tipos celulares poco conocidos en sus aspectos electrofisiológicos: las células de Lugaro y las células en cepillo. A las primeras se les supone una función similar a las células de Golgi. Por su parte, las células en cepillo reciben aferentes de las fibras musgosas y proyectan a su vez en forma de fibras musgosas sobre las dendritas de las células granulares (Mugnaini et al 1997, Mugnaini et al 1994).

Debajo de la corteza cerebelar se encuentra la sustancia blanca, en la cual se encuentran embebidos tres núcleos cerebelares profundos: el fastigio o medial, el interpósito o intermedio y el dentado o lateral. El núcleo fastigiado recibe información del vermis y proyecta hacia los núcleos vestibulares, ejerciendo influencia sobre las neuronas motoras de la médula espinal. El núcleo interpósito recibe aferencias de la zona intermedia y proyecta hacia el núcleo rojo contralateral, ejerciendo influencia sobre las motoneuronas flexoras de la médula espinal. Por último el núcleo dentado recibe información de los hemisferios laterales y proyecta a la corteza motora y premotora (Larsell 1951, Ramnani 2006).

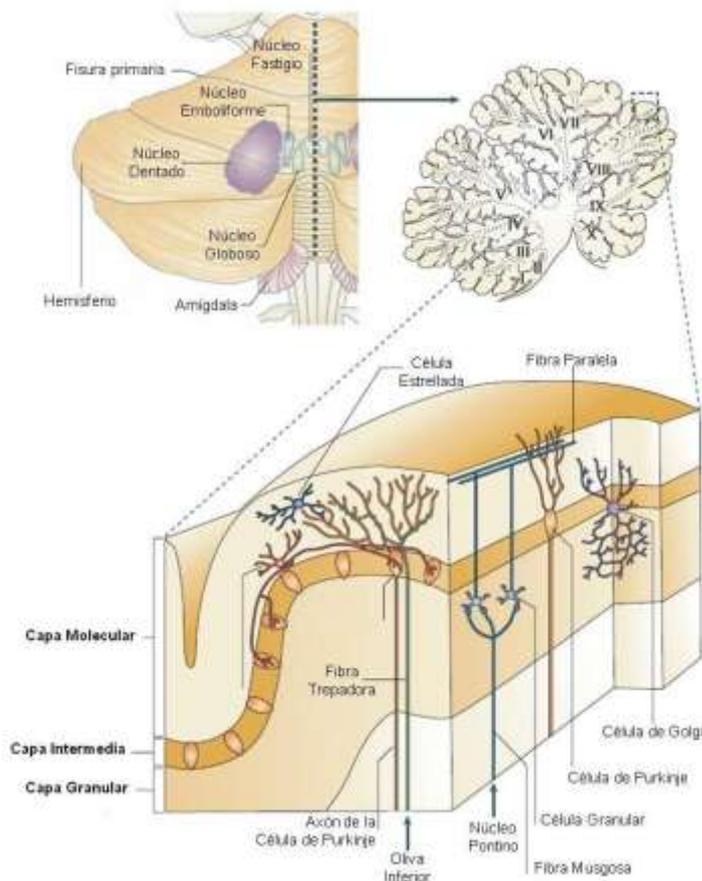


Figura 1. Arquitectura celular del cerebelo. Se muestran las distintas capas del cerebelo así como sus células constituyentes (Ramnani 2006).

GLIA DE BERGMANN

En el sistema nervioso existen dos clases de células: neuronas y células gliales, en el cual hay 100,000 millones de neuronas mientras que de células gliales hay 10 veces más. Las células gliales son clasificadas en dos grupos: microglía y macroglía. La macroglía es subdividida en glía ependimal, oligodendroglía, astroglia y células de Schwann. La glía ependimal incluye la glía radial que se expande desde el tubo neural durante el desarrollo del SNC y a las Células Gliales de Bergmann (CGB). Estas son el tipo de glía más abundante en la corteza del cerebelo de los vertebrados adultos y se le considera como un tipo de astrocito especializado. Respecto a su función como astrocito, se ha constatado que la CGB expresa proteínas que intervienen en el acoplamiento metabólico con las neuronas. Esta glía participa en la remoción

de neurotransmisores liberados en las sinapsis. Debido a la estrecha asociación con los neurotransmisores, se ha intensificado la investigación sobre estas células como elementos partícipes de la comunicación en el SNC (Yang et al 2008).

Los precursores de CGB provienen de la capa germinativa del cuarto ventrículo que migran hasta colocarse en la corteza del cerebelo. La presencia de CGB inmaduras se ha observado desde estadios del desarrollo tempranos como los días embrionarios 15 y 17 en ratones y ratas respectivamente. La diferenciación de la CGB está influenciada por las neuronas del cerebelo, como es el caso de su morfología radial, promovida por las células granulares, con lo cual se establece el andamio por lo que esta últimas migran desde la capa granular externa hasta la capa granular interna. De manera similar, señales de las células de Purkinje promueven la extensión de procesos laterales a partir de las ramas principales de la CGB, con lo que es posible construir la envoltura glial de las sinapsis que establecen las células de Purkinje con otras neuronas del cerebelo (Del Cerro & Swarz 1976, Lippman et al 2008)(Figura 2).

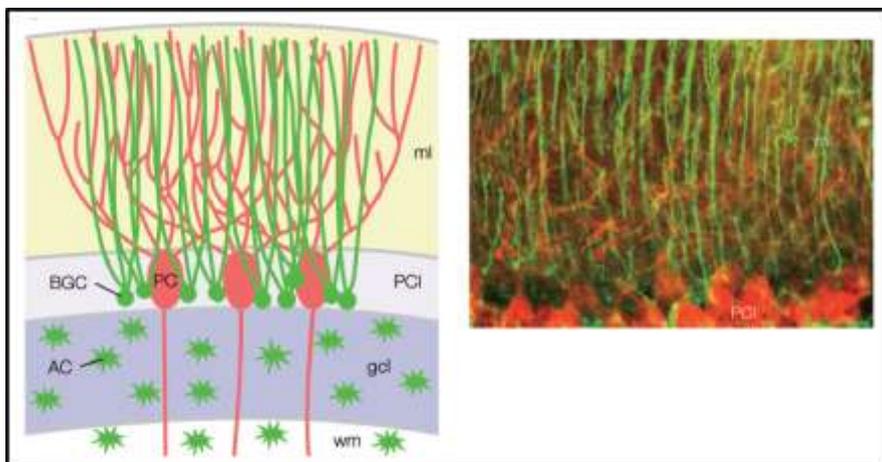


Figura 2. Localización de Células Gliales de Bergmann. Somas de las CGB están ubicados en la capa de células de Purkinje (PCI), en la capa molecular (ml) sus procesos se asocian con las espinas dendríticas de las células de Purkinje. Astrocitos cerebelares (AC), capa de células granulares (gcl), materia blanca (wm) (Tanaka et al 2008).

Debido a que las CGB no sufren la llamada “transformación astrocítica” después de la migración neuronal como normalmente lo hace la glía radial del cerebro en desarrollo, en el cerebelo maduro la CGB sigue siendo morfológicamente comparables a la glía radial, por lo que se ha propuesto que la CGB es un tipo de célula madre en potencia para el organismo adulto (Sottile et al 2006).

En su estado maduro, el soma de las CGB se encuentra en la capa de células de Purkinje y sus procesos se proyectan desde este punto hasta la superficie pial, atravesando completamente la capa molecular del cerebelo. Por su localización y morfología, las CGB tiene una estrecha relación con las células de Purkinje, hasta el punto de que sus procesos envuelven casi la totalidad de las sinapsis inhibitoras y excitadoras que la célula de Purkinje establece con otras neuronas del cerebelo. Se ha calculado que existen ocho CGB por cada célula de Purkinje, y que los procesos de una CGB pueden envolver entre 2,142 y 6,358 sinapsis de la capa molecular. Además, se ha descrito que el espacio extracelular que se encuentra entre los elementos presinápticos y la CGB adyacente puede ser aún más estrecho que el encontrado en el botón sináptico, por un factor de 1.9 veces (Reichenbach et al 1995)(Figura 3).

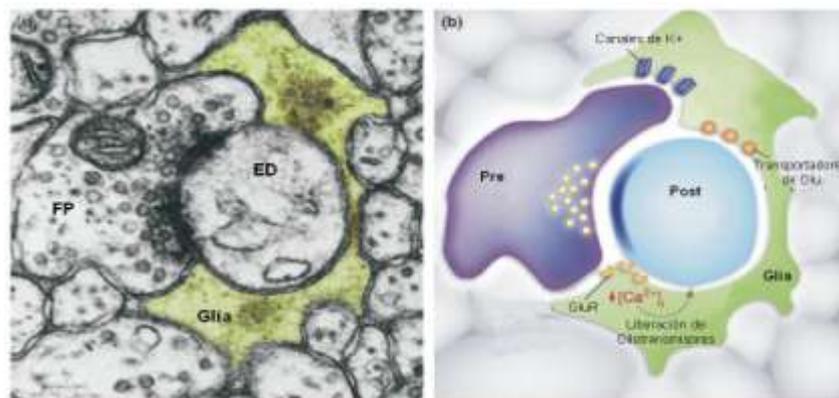


Figura 3. Glía de Bergmann. Micrografía electrónica en donde se observa a la Glía de Bergmann rodeando la sinapsis entre la Fibra Paralela (PF) y la Espina Dendrítica (ED)(Halassa et al 2007).

Pakhotin y Verkhratsky, pusieron de manifiesto la relación física más estrecha entre la CGB y la célula de Purkinje, describieron un acoplamiento eléctrico entre estas dos células en rebanadas de cerebelo de rata adultas. Este hecho está manifestado por corrientes generadas en alguna de las células cuando la otra era despolarizada o hiperpolarizada. Dichas corrientes son dependientes de uniones gap, además, estas uniones intercomunicantes permiten la difusión de colorantes entre las CGB y la célula de Purkinje. Estos autores propusieron que dichas uniones pueden participar en el procesamiento de la información en el cerebro. Debido a que las células de Purkinje integran las diferentes señales generadas en la corteza del cerebelo, las CGB se convierten en un elemento clave para la salida de información del cerebelo y con un gran potencial para regular la comunicación en este sistema. Las CGB cuenta con estructuras de interacción directa con la células de Purkinje; además, otro tipo de proteínas con las que cuenta son receptores y transportadores de neurotransmisores (como Glutamato), por lo que se propone que la CGB tiene una función reguladora de la actividad sináptica (Pakhotin & Verkhratsky 2005) (Figura 4).

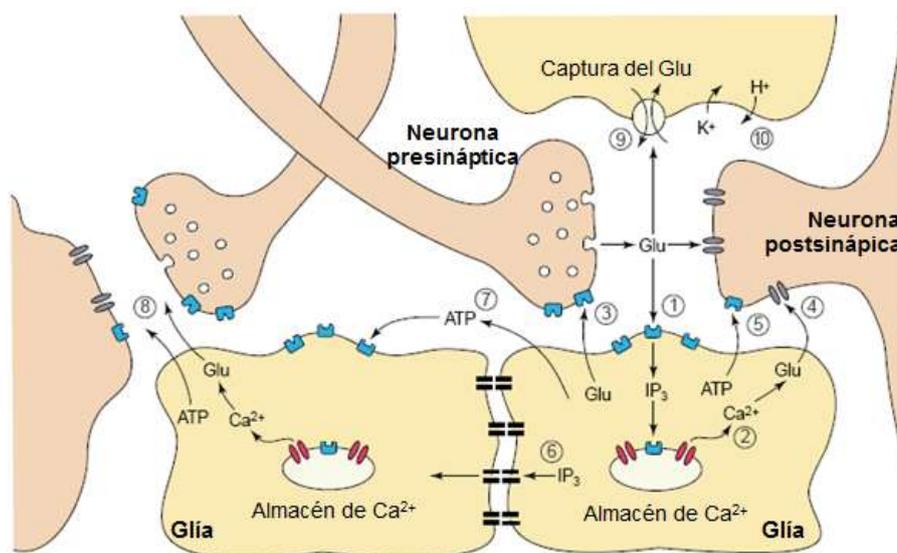


Figura 4. Funciones de la glía en la sinapsis. La liberación de Glu de la terminal presináptica activa los receptores gliales (1) evocando un incremento en los niveles de Ca²⁺ (2) y en la liberación de Glu de la glía. Este Glu puede activar a los receptores presinápticos (3), mientras que la activación de los receptores postsinápticos despolariza a las neuronas (4). La estimulación de la glía provoca la liberación de ATP (5 y 7). El Ca²⁺ se propaga entre la glía por difusión de IP₃ (6) a través de uniones comunicantes, resultando en la modulación de sinapsis

distantes (8). La glía además modula la transmisión sináptica por captura de Glu (9) y por regulación de K^+ y H^+ (10).

Las CGB expresan transportadores glutamatérgicos y GABAérgicos, también expresan receptores a Glu de tipo NMDA (NMDAR1 y NMDAR2), AMPA (iGluR1, iGluR3 e iGluR4) lo que las hace permeable a Ca^{2+} y algunos mGluR (mGluR1, mGluR3 y mGluR5). Lo anterior indica que CGB pueden responder a tratamientos con Glutamato, ya que activa diversos factores de transcripción que a su vez regulan la expresión de diversos genes (Lopez-Bayghen et al 2003a, Lopez-Bayghen et al 2003b, Lopez et al 1997).

GLUTAMATO

El Glutamato (Glu) es el principal neurotransmisor excitador en el SNC en vertebrados y es el aminoácido libre más abundante en el encéfalo, participa en el 80-90% de las sinapsis (Danbolt 2001). El Glu es el precursor inmediato para la síntesis de ácido- γ -aminobutírico (GABA) en neuronas y de glutamina (Gln) en astrocitos. El Glu puede ser sintetizado en las terminales nerviosas a partir de α -cetoglutarato, un intermediario del Ciclo de los Ácidos Tricarboxílicos (TCA), por la enzima Glu deshidrogenasa, y de glutamina por la enzima glutaminasa activada por fosfato (PAG) (McKenna 2007).

La concentración de Glu en plasma es de 30-80 μ M, mientras que en el cerebro es de 10-12 mM, pero solo de 0.5-2 μ M en fluidos extracelulares. En respuesta a la depolarización presináptica las vesículas que transportan el Glu liberan su contenido a la hendidura sináptica vía exocitosis, causando un incremento de 1000 en la concentración de Glu extracelular (Walton & Dodd 2007). Después de su liberación de las terminales nerviosas, el Glu es transportado por las células gliales y convertido a glutamina por la Glutamina sintetasa (Foster & Kemp 2006, McKenna 2007, Nedergaard et al 2002). La captura del Glu de la hendidura sináptica para mantener la baja concentración de éste (\sim 1-10 μ M), es una de las funciones más importantes de los astrocitos en el cerebro. La concentración de Glu aumenta dramáticamente durante la neurotransmisión (\sim 100 μ M-1 mM) y una falla de los astrocitos para remover

este exceso resulta en muerte neuronal en un fenómeno conocido como excitotoxicidad (McKenna 2007) (Figura 5).

El Glu juega un papel importante en la maduración del sistema nervioso, regulando la neurogénesis, el crecimiento de la neurita, la sinaptogénesis y la muerte celular programada. Además actúa como mediador de la transmisión sináptica, potenciación a largo plazo (LTP) y la depresión a largo plazo (LTD) (Mattson 2008).

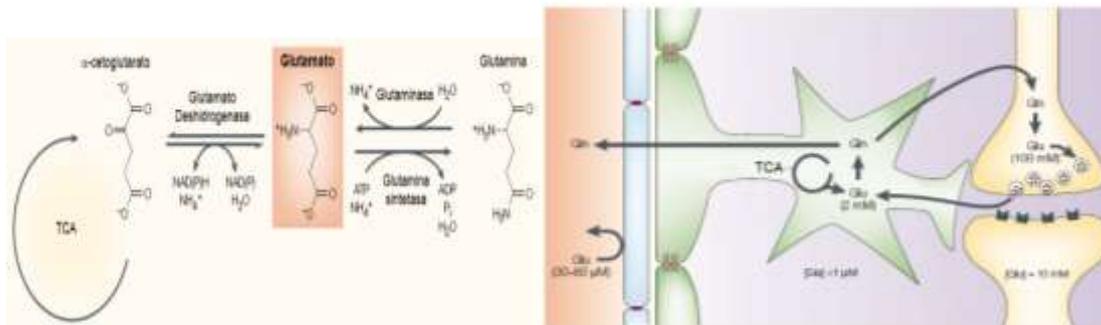


Figura 5. Compartimentalización y síntesis del Glu. La transaminación de α-cetoglutarato, un intermediario en el TCA, produce Glu, mientras que la glutamina es sintetizada por incorporación de un ion amonio en el Glu. En células gliales, el Glu es convertido a Gln antes de ser liberado al espacio extracelular. La Gln es tomada por neuronas y convertida a Glu antes de ser empaquetadas en las vesículas sinápticas (Nedergaard et al 2002).

RECEPTORES GLUTAMATÉRGICOS

Las acciones bioquímicas del Glu son mediadas por transportadores y receptores de Glu. Estos últimos son clasificados en dos grupos: receptores ionotrópicos (iGluRs) los cuales son canales iónicos abiertos por ligando y receptores metabotrópicos (mGluRs) que se encuentran

acoplados a proteínas G, actuando de manera pre o postsináptica (Bleakman et al 2006, Chen et al 2007).

Receptores Ionotrópicos

Los iGluRs son estructuras heterotetraméricas que poseen tres dominios transmembranales (M1, M3 y M4) y una asa reentrante (M2); este segmento M2 forma el poro del canal. Además, estos receptores poseen un dominio amino terminal (ATD) extracelular que es el sitio de acción de moléculas que modulan la función de este receptor; el dominio carboxilo terminal (CTD) es intracelular y contiene un número de motivos estructurales que permiten la interacción con moléculas señalizadoras y proteínas de andamiaje. También tiene un dominio de unión a ligando que consiste de dos regiones llamadas S1 y S2 (Chen & Wyllie 2006) (Figura 6).

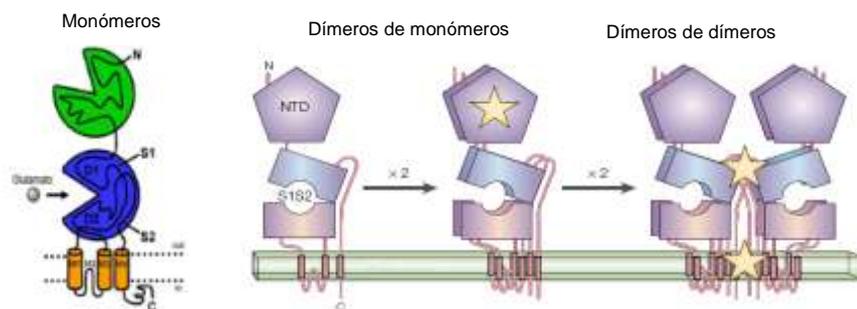


Figura 6. Estructura de los iGluRs. Todos los iGluRs comparten la misma estructura básica. El monómero posee: un dominio amino terminal (N); dos regiones S1 y S2; tres segmentos transmembranales (M1, M3 y M4) y uno reentrante (M2); y un dominio carboxilo terminal (C) (Madden 2002).

Los iGluRs se dividen de acuerdo a criterios farmacológicos y a su homología de secuencia en: receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) (GRIN), receptores L-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propianato (AMPA) (GRIA) y los receptores a kainato (KA) (GRIK) (Yi & Hazell 2006).

Los receptores GRIN o también llamados NMDA están compuestos por siete subfamilias, NR1 (sitio de unión a D-serina), NR2A-D (contienen el sitio de unión a Glu), NR3A y NR3B, el canal es altamente permeable a Ca^{2+} y en menor grado a Na^+ , en condiciones normales está bloqueado por Mg^{2+} . La activación de NMDAR requiere la ocupación simultánea de los co-agonistas Glu y D-Ser (McBain & Mayer 1994, Yi & Hazell 2006). Los receptores GRIA o también conocidos como AMPA (AMPA) conforman una familia de 4 subunidades GluR1-GluR4 que forman canales funcionales tanto en forma homodimérica como heterodimérica; si los canales son formados por las subunidades GluR1, GluR3 y GluR4 son altamente permeables a Ca^{2+} , sin embargo, la presencia de la subunidad GluR2 como parte del complejo heterodimérico hace que los canales disminuyan su permeabilidad a este catión (Geiger et al 1995). Los receptores KA (KAR) están compuestos por 5 subunidades, las cuales se clasifican de acuerdo a la afinidad que presentan. GluR5 y GluR6 son subunidades de baja afinidad que forman receptores homodiméricos así como receptores heterodiméricos en combinación con las subunidades de alta afinidad, KA-1 y KA-2, mientras que la subunidad GluR7 también de baja afinidad no forma receptores funcionales, de igual forma que los AMPAR, los KAR son altamente permeables a Na^+ y en menor grado a Ca^+ (Rosenmund et al 1998).

Receptores Metabotrópicos

El Glu puede modular la excitabilidad neuronal y transmisión sináptica por activación de receptores metabotrópicos, que pertenecen a la clase C de los receptores acoplados a proteínas G (GPCRc). Su señalización involucra procesos dependientes de fosfoinositol o AMP cíclico (cAMP). Los mGluRs están constituidos por una sola proteína con una región N-terminal que presenta sitios para N-glicosilación, una región central con siete segmentos transmembranales (M1-M7), entre el M5 y M6 de la cara interna de la membrana es donde la proteína G está acoplada (Coutinho & Knopfel 2002, Yi & Hazell 2006) (Figura 7).

Los ocho mGluRs conocidos están divididos en tres familias basados en su estructura, farmacología y transducción de señales: el grupo I (mGluR1 y mGluR5) acoplado a G_q , se asocian a la activación de fosfolipasa C (PLC) para la hidrólisis de fosfatidilinositol y movilizan Ca^{2+} intracelular; el grupo II (mGluR2 y mGluR3) acoplado a proteína G_i están asociados con la inhibición de adenilato ciclasa (AC); y el grupo III (mGluR4, mGluR6, mGluR7 y mGluR8) acoplado a proteína G_i tienen un efecto dual, activan PLC e inhiben AC (Foster & Kemp 2006, Yi & Hazell 2006).

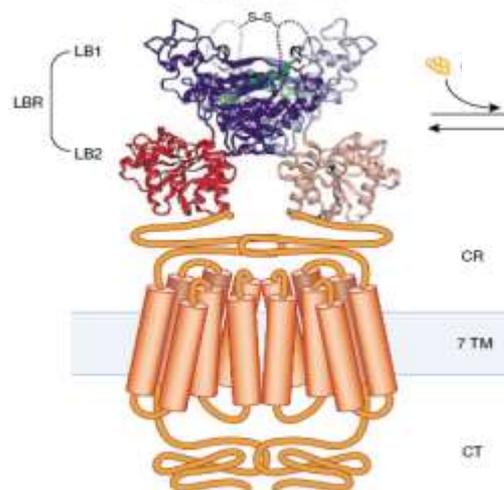


Figura 7. Estructura de los mGluRs. Estos receptores existen como homodímeros. Son caracterizados por un dominio extracelular largo, que es dividido en una región de unión a ligando (LBR) que a su vez se subdivide en LB1 y LB2; y una región rica en cisteína (CR). Además posee 7 dominios transmembranales (TM1-TM7) (Moepps & Fagni 2003).

TRANSPORTADORES DE GLUTAMATO

En la terminación de la transmisión glutamatergica participa la remoción de Glu del espacio extracelular, dicho proceso es llevado a cabo por transportadores de Glu dependientes de sodio (EAAT1-EAAT5), los cuales son expresados en varios tipos celulares como neuronas y astrocitos. De éstos, la captura por astrocitos mediante EAAT1 (GLAST) y EAAT2 (GLT-1) es cuantitativamente más importante para el mantenimiento de las concentraciones normales de Glu extracelular (Anderson & Swanson 2000).

Éstos transportadores poseen un sitio de unión para el aminoácido sustrato y otro para unión de cationes, el dominio C y N terminal están hacia el citoplasma creando una estructura de barril formado por ocho dominios transmembranales (TMDs), los TMD1-6 constituyen al N terminal y del TMD6-8 al C terminal (Grewer et al 2008) (Figura 8).

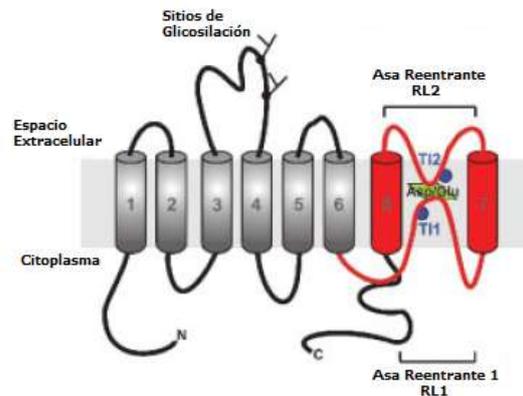


Figura 8. Estructura general de los transportadores de Glu. Dominio N-terminal (1-6), dominio C-terminal (7-8), Asa reentrante 1 (RL1), Asa reentrante 2 (RL2), Sitio de unión de cationes (T11 y T12) y sitio de unión de a.a. (Asp/Glu) (Grewer et al 2008).

La actividad de los transportadores depende del gradiente electroquímico generado por la ATPasa Na^+/K^+ . Una molécula de Glu es transportada al citoplasma junto dos iones sodio, mientras que un ion potasio es liberado al espacio extracelular. La recuperación del gradiente electroquímico de Na^+ después de la entrada de Glu lo realiza la ATPasa a expensas del consumo de ATP (Camacho & Massieu 2006) (Figura 9).

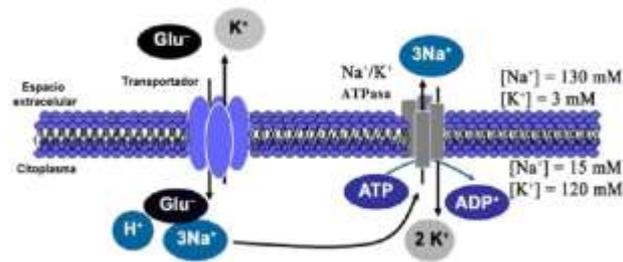


Figura 9. Captura de Glu extracelular. La concentración de Glu es regulado por los transportadores dependientes del gradiente electroquímico de Na^+ mantenido por la ATPasa de Na^+/K^+ (Camacho & Massieu 2006).

SEÑALIZACIÓN EN CÉLULAS GLIALES DE BERGMANN

Las CGB responden a la actividad neuronal, tanto a corto como a largo plazo (Fields & Stevens-Graham 2002). Una gran variedad de factores de transcripción están presentes en estas células y su actividad como activadores o represores resulta en la expresión diferencial de genes, utilizando diferentes vías de señalización. El Glu desencadena un influxo de Ca^{2+} seguido de la hidrólisis de fosfoinosítidos y la activación de PKC (Cid & Ortega 1993), MAPK (Lopez-Colome & Ortega 1997), PI3K (Millan et al 2004), CaMKII (Aguirre et al 2002); así mismo induce la unión al DNA de la proteína activadora (AP-1) (Sanchez & Ortega 1994) y provoca cambios en la expresión de sus receptores (Lopez et al 1998). Además se ha caracterizado una ruta de señalización inducida por Glu que conduce a una regulación transcripcional del gen *chkbp* (Aguirre et al 2000).

Diversas líneas de investigación sugieren que Glu puede inducir una inhibición en la síntesis de proteínas mediada por la regulación de la traducción (Marin et al 1997). Estudios previos realizados mediante RT-PCR e inmunoprecipitación en fase sólida, mostraron que tratamientos con Glu inducen un aumento en los niveles de mRNA y de la proteína de unión a kainato de pollo (KBP) (Aguirre et al 2000).

Por otro lado mientras que el mRNA de GRIA4 (iGluR4) aumenta, su proteína disminuye (Lopez et al 1998). Estos resultados sugerían una regulación a nivel traduccional inducida por Glu en las CGB. También se demostró que regula la fosforilación y defosforilación de algunos factores de la elongación de la traducción como son el eEF1A y eEF2 (Barrera et al 2010, Barrera et al 2008)(Figura 10).

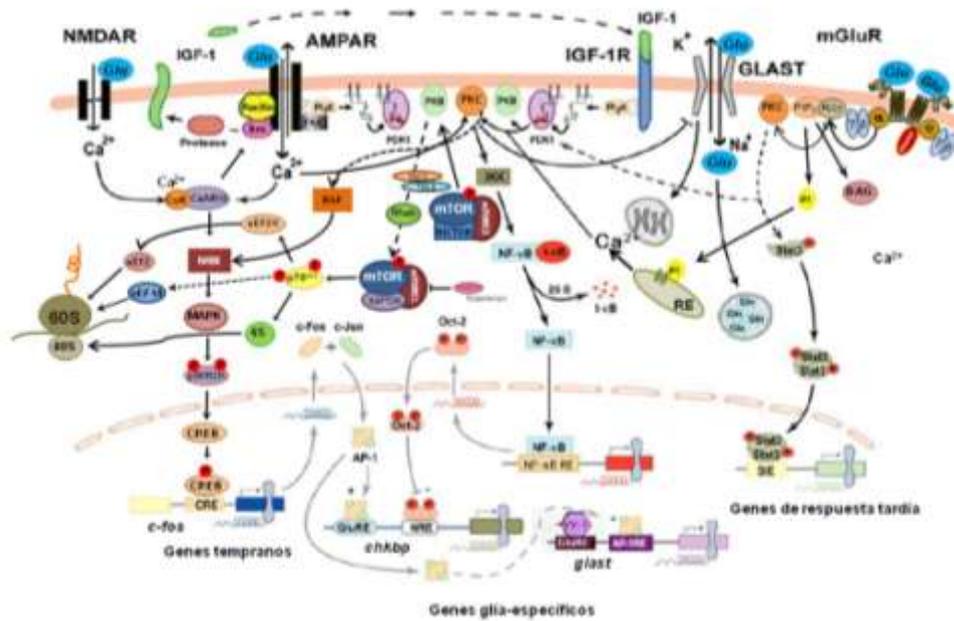


Figura 10. Señalización en CGB mediada por Glu. El Glu regula la señalización en CGB a nivel traduccional y transcripcional mediante receptores y transportadores de Glu. Modificado de (Mendez et al 2005).

GLUTAMINA SINTETASA

En el metabolismo del Glu a nivel del cerebro se deben tener en cuenta dos aspectos fundamentales, el primero hace relación al control de la concentración extracelular del neurotransmisor en el espacio sináptico, debido a que la sobre estimulación de los receptores ionotrópicos, especialmente de tipo NMDA, llevan eventualmente al daño neuronal, fenómeno conocido como excitotoxicidad (McKenna 2007) y el segundo tiene que ver con el delicado balance en la producción de iones amonio, cuyos excesos, también resultan en efectos deletéreos en el SNC (Brusilow et al 2010). Para mantener este fino mecanismo en condiciones óptimas existen principalmente dos estrategias que le permiten al cerebro reducir estos riesgos y prevenir el daño neuronal. La primera tiene que ver con la función de la BHE para limitar el transporte de Glu de la sangre al cerebro y la segunda es una estrategia de compartimentalización metabólica entre las neuronas y la glía. La concentración de Glu en la sinapsis es del orden de 2–5 μM y puede elevarse después de la despolarización en un rango de 0.1-1 mM; este Glu debe ser removido rápidamente de la sinapsis empleando tres sistemas: a) capturado por neuronas postsinápticas, b) capturado por neuronas presinápticas y c) removido por astrocitos (Figura 11) (Daikhin & Yudkoff 2000). Estos tres sistemas involucran mecanismos de compartimentalización metabólica para el Glu que ponen de manifiesto la participación activa de transportadores de alta afinidad para neurotransmisores excitadores (EAAT). EAAT-1 y EAAT-2 en astrocitos expresados en grandes áreas del cerebro como lóbulo frontal, corteza e hipocampo y cerebelo; es decir que estas zonas particularmente activas en sinapsis glutamatérgicas cuentan con un efectivo sistema de remoción de Glu. EAAT-3 se expresa en terminales nerviosas, pero no es considerado un mecanismo de transporte de Glu tan importante. EAAT-4 es un transportador neuronal limitado a células de Purkinje y EAAT-5 se expresa en retina (Pow & Barnett 2000).

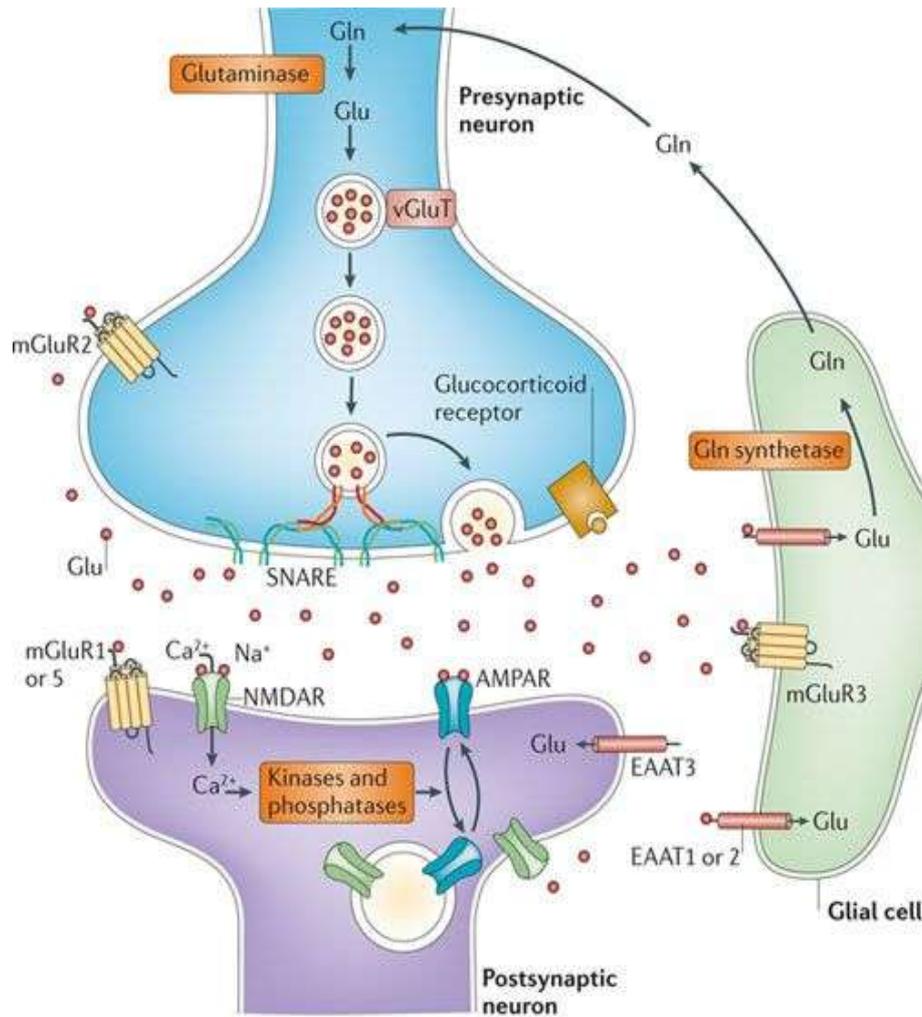


Figura 11. Lanzadera Glutamato/Glutamina en SNC. El Glu es liberado por terminales presinápticas en un proceso dependiente de la despolarización de membrana. El Glu ejerce su acción en células postsinápticas mediante su unión a receptores, el exceso de Glu es capturado por células gliales que recubren la sinapsis glutamatérgicas. En las células gliales se expresa GS que convierte al Glu en glutamina.

En el cerebro el tráfico de Glu y glutamina es crítico para el mantenimiento metabólico y el reservorio de neurotransmisores. El Glu es liberado por las neuronas en un proceso Ca^{+2} dependiente que involucra la fusión de vesículas y su exceso puede ser tomado por los astrocitos en un proceso Na^{+} dependiente y convertido en glutamina o en α -cetoglutarato. La conversión del Glu a glutamina ocurre en presencia de ATP y NH_4^{+} proveniente de la sangre o del metabolismo cerebral, esta reacción es catalizada por la enzima Glutamina sintetasaS (GS) (Figura 12) (Listrom et al 1997). GS está presente en todas las especies y diferentes estudios desde el punto de vista

estructural han permitido establecer que existen tres tipos de GS. Las enzimas bacterianas (GSI) son moléculas con 12 subunidades idénticas y ~469 residuos organizados en dos disposiciones hexagonales enfrentadas con un sitio activo en cada monómero y con residuos conservados en todos los tipos de GSI. La estructura del dodecámero es mantenida principalmente por interacciones hidrofóbicas (Eisenberg et al 2000). En el grupo de GS II, se encuentran enzimas eucariotas y de algunas bacterias. Las GS II de mamífero son octámeros organizados con subunidades micro heterogéneas y pesos moleculares de 45 KDa (Krajewski et al 2008). GS Homo sapiens (hsGS) fue purificada y está constituida por un octámero con subunidades de 44 kDa que presenta micro heterogeneidad al presentarse diferencias pequeñas en el punto isoeléctrico (Boksha et al 2002, Boksha et al 1995, Boksha et al 2000). (Figura 12) Se han descrito GS III típicas en cianobacterias y bacterias anaeróbicas caracterizadas como enzimas hexaméricas compuestas por subunidades de 75 kDa (Reyes et al 1997, van Rooyen et al 2011).

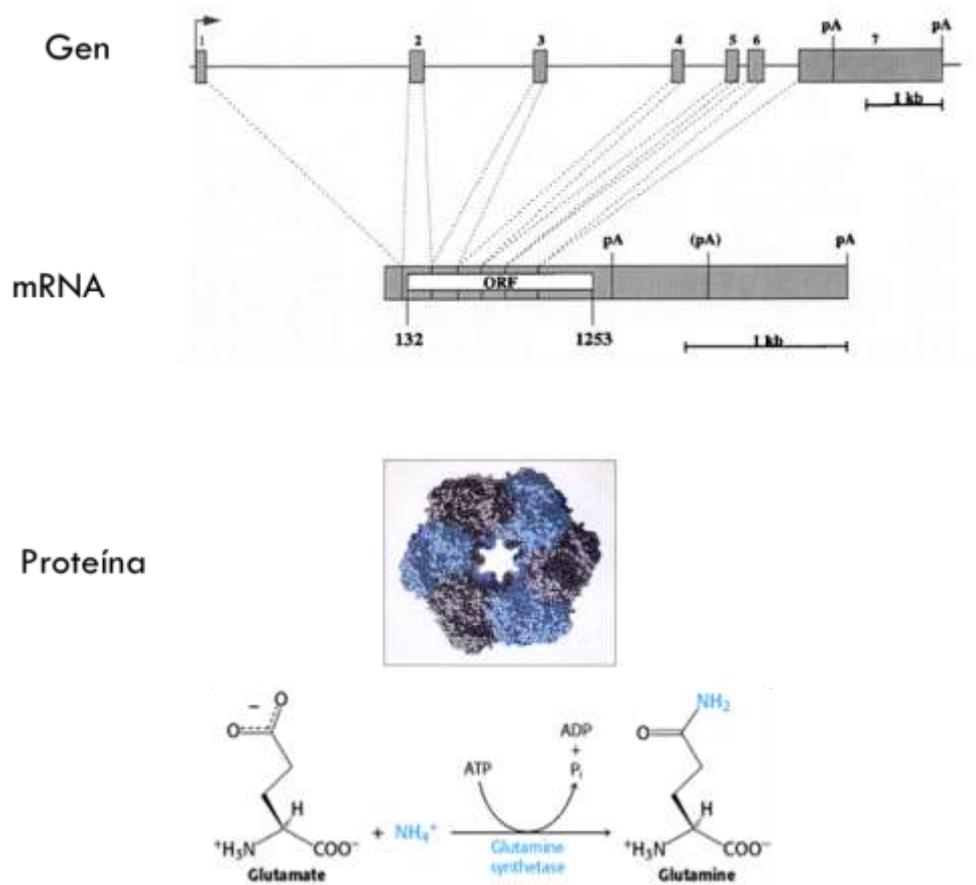


Figura 12. Estructura del gen, mRNA y proteína de GS. En eucariontes, el gen de GS es de aproximadamente 8000 Kb y consiste de siete exones. El mRNA tiene un marco abierto de lectura (ORF) y una cola de poliadenina. La proteína está formada por 8 subunidades formando un proteína globular con el sitio activo al centro de la estructura.

En el SNC esta enzima ha sido reportada casi de manera exclusiva en astrocitos y la actividad de la GS está relacionada con la maduración de los mismos. Se ha sugerido que los niveles extracelulares de Glu pueden regular la distribución de GS (Brusilow et al 2010, Caldani et al 1982, Schousboe et al 2014). Lo anterior evidencia la gran importancia de estos mecanismos de compartimentalización metabólica.

La vida media de la enzima es relativamente corta (13-22 horas) y los niveles de GS son altamente regulados. La expresión de GS y la actividad son modulados por hormonas como insulina, hormona tiroidea, hormonas corticoesteroides (Kumar et al 1986, Lie-Venema et al 1998).

La formación de Gln en astrocitos a partir del Glu liberado en las sinapsis es la base para el ciclo de la Glu/Gln. La compartimentalización de GS en astrocitos es consistente con la misión de reciclar Glu, manteniendo el tráfico funcional y la ausencia de GS en neuronas es consistente con la neurotransmisión excitadora en condiciones normales, sin embargo, en condiciones patológicas como en la enfermedad de Alzheimer, se ha encontrado expresión de GS en neuronas piramidales (Walton & Dodd 2007). Esta expresión alterada en condiciones patológicas muestra que el reciclaje de neurotransmisores en la sinapsis es crítico para mantener la baja concentración del mismo y por tanto podría funcionar como mecanismo de protección contra la sobre estimulación de receptores, que genera excitotoxicidad en estas condiciones.

La captura de Glu en los astrocitos proveniente de la actividad sináptica es un proceso energéticamente costoso, ya que cada molécula de Glu es co-transportada con 3 iones de sodio. Estos iones tienen que ser bombeados de los astrocitos en un intercambio con el potasio extracelular, a través de la acción de la Na^+/K^+ ATPasa. Además, la amidación de Glu para la producción de glutamina es dependiente de ATP. De esta manera, cada vuelta del ciclo Glu/Gln se gastan 4 ATP del metabolismo de los astrocitos; por lo tanto se requiere el acople de la utilización de glucosa en los astrocitos a la actividad neuronal (Hertz et al 2007, Pellerin et al 2007, Pellerin et al 1997, Prebil et al 2011).

ÓXIDO NITRICO Y ÓXIDO NITRICO SINTASA NEURONAL

Hasta hace pocos años, parecía impensable que una sustancia gaseosa tan tóxica en condiciones ambientales, pequeña y de estructura elemental como el óxido nítrico (NO) fuera un elemento biológico de nuestro organismo. El descubrimiento de las funciones fisiológicas y reguladoras que posee el óxido nítrico en los mamíferos se debe a los hallazgos realizados, en las dos últimas décadas, estudiando los sistemas vascular e inmunitario. Así, se identificó que él NO ejercía potentes propiedades vasodilatadores y tenía actividad bactericida, antitumoral además de que regula la sinapsis glutamatérgicas y GABAérgicas.

El NO es una molécula inorgánica, de tamaño muy pequeño, capaz de atravesar libremente las membranas biológicas debido a su gran liposolubilidad. Ejerce sus efectos biológicos sin la necesidad de unirse a un receptor de membrana. Además, debido a la presencia de un electrón extra en su molécula tiene una alta reactividad química (radical libre) (Calabrese et al 2007), presentando una elevada toxicidad y una vida media extremadamente corta en tejidos vivos (5-15 seg.) (McCann 1997)

En 1989 se observó que al estimular preparaciones celulares cerebrales con Glu se liberaba NO, efecto que coincidía con la activación de los receptores NMDA (Garthwaite et al 1989). Este trabajo inició la investigación encaminada a identificar las funciones neuronales del NO, habiéndose establecido que puede actuar como un mensajero intracelular y que participa en la plasticidad sináptica, la neuroprotección y la neurotoxicidad (Calabrese et al 2007). El estudio del NO también se ha centrado en diferentes trastornos psicopatológicos, como los trastornos afectivos, la esquizofrenia y la conducta adictiva (Figura 13).

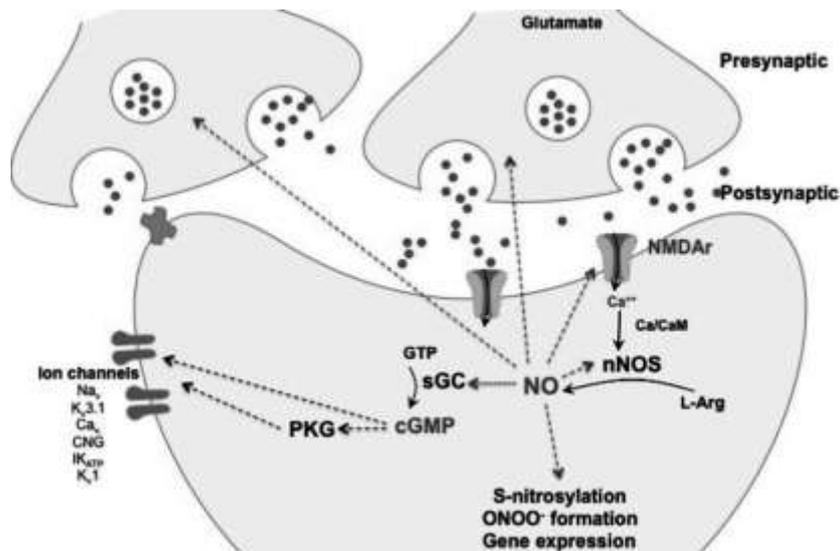


Figura 13. NO en el SNC. El óxido nítrico (NO) actúa como un mensajero extracelular, desinhibando la membrana presináptica. El óxido nítrico se libera tan pronto como se sintetiza y no se une a ningún receptor, sino que se difunde desde una neurona a otra. El principal blanco del óxido nítrico es la Guanilato ciclasa soluble (sGC) y promueve la formación de cGMP ya sea en neurona presináptica o postsináptica. Esta cascada de señalización promueve la potenciación a largo plazo (LTP). (<http://www.intechopen.com/books/nitric-oxide-synthase-simpleenzyme-complex-roles> 2017).

El NO se sintetiza a partir del aminoácido L-arginina a través de una reacción enzimática, catalizada por las NO sintasas (NOS), que requiere oxígeno y que produce L-Citrulina. Existen tres isoformas de NOS que se clasifican de acuerdo al tejido donde fueron encontradas. Para el caso de la Óxido nítrico sintetasa neuronal (nNOS) es una enzima constitutiva de células neuronales y dependientes del calcio ya que su actividad depende de su unión a la Calmodulina (Boehning & Snyder 2003).

El mecanismo que pone en marcha la producción de NO en las neuronas es la activación ejercida por el Glu sobre sus receptores, principalmente GRIN. El aumento del Ca^{2+} intracelular activa la proteína quinasa dependiente de calcio Calmodulina que interacciona a NOS iniciando la actividad enzimática y su disminución inactiva la reacción (Kasperska-Zajac & Brus 2000, Yamada et al 1996). El NO difunde rápidamente alcanzando terminales sinápticos y células gliales (astrocitos), donde estimula la síntesis de cGMP, por lo que se considera mensajero retrógrado. El cGMP producido

presinápticamente a su vez aumenta la liberación de Glu, cerrando así un ciclo que regula la potenciación a largo plazo, o bien, modifica la liberación de neurotransmisores como acetilcolina, aspartato, Glu o GABA (Boehning & Snyder 2003, Krukoff 1999). El NO no reactivo simplemente se difunde de las zonas de acción y, pocos segundos después de sintetizarse, se convierte en compuestos biológicamente inactivos.

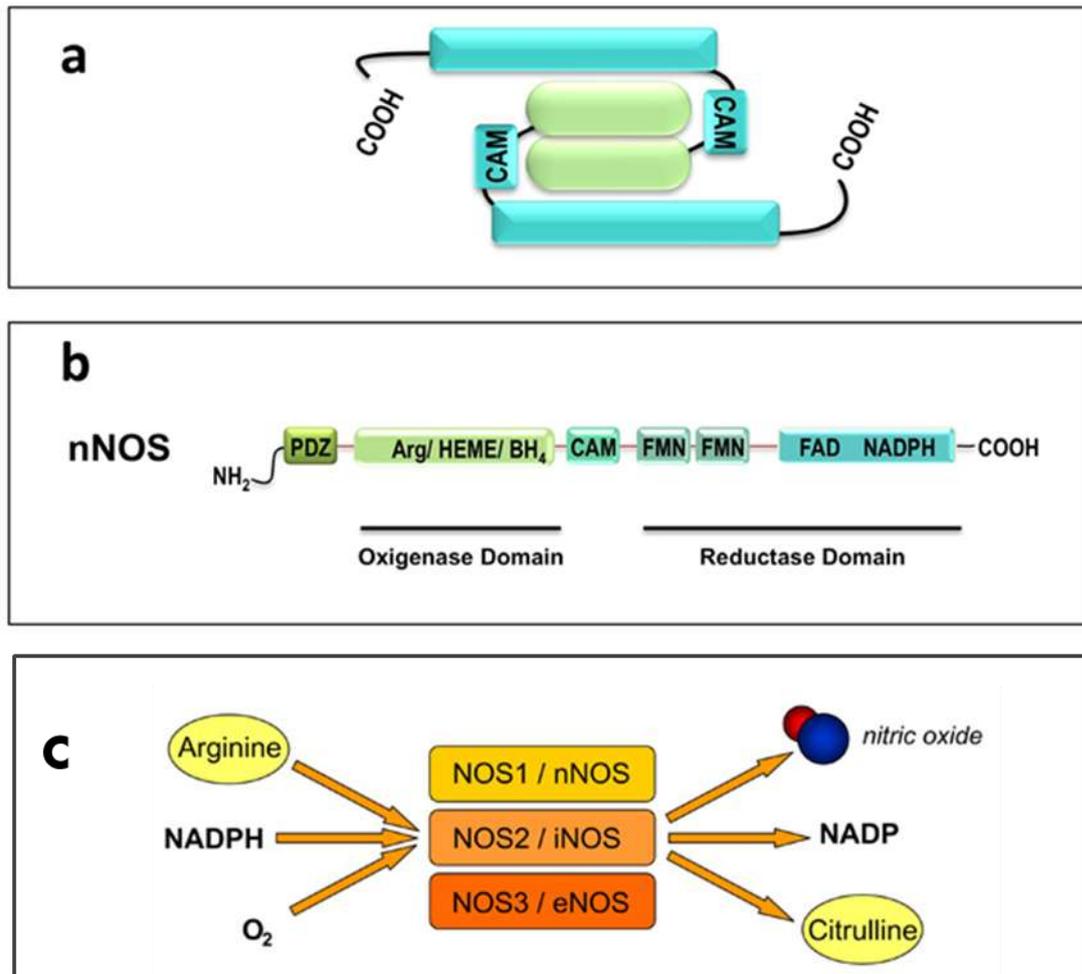


Figura 14. Estructura y mecanismo catalítico de NOS. A) Los monómeros de NOS pueden transferir electrones de las formas reducidas de NADPH, FAD, FMN. B) En presencia de un grupo hemo la NOS puede formar un dímero funcional y se favorece la transferencia de electrones. Una de las diferencias entre las sintetas constitutivas y la sintasa inducible, es que las primeras requieren de elevadas concentraciones de Ca₂⁺ para la unión a la Calmodulina, mientras que en la inducible hay una alta afinidad de la Calmodulina en ausencia de Ca₂⁺. C) Cuando el sustrato L-arginina y el cofactor BH₄ están presentes se lleva a cabo la síntesis de NO y L-Citrulina. (Tomado y modificado de Forstermann 2012).

PROTEÍNA RIBOSOMAL S6

A pesar de que se acepta ampliamente que el rRNA es el principal sintetizador de proteínas, más de 200 proteínas se ensamblan con el rRNA en el nucléolo para formar finalmente a los ribosomas maduros. Anteriormente se asumía que las riboproteínas estabilizaban a estructuras específicas de rRNA en las subunidades ribosomales maduras y de esta manera permitían un plegamiento correcto de los rRNA para optimizar su actividad durante la síntesis de proteínas. Ahora hay evidencia que indica la participación activa de un gran número de riboproteínas en la regulación de la traducción.

De las proteínas que forman parte de los ribosomas, rpS6 (ribosomal protein S6) tiene un interés especial debido a su capacidad de fosforilarse. rpS6 es una proteína evolutivamente conservada en eucariotas, desde las levaduras hasta las plantas, los invertebrados y vertebrados. rpS6 se localiza principalmente en ribosomas del citoplasma en donde en respuesta a mitógenos. (Franco & Rosenfeld 1990, Pende et al 2004).

La fosforilación de la proteína ribosomal S6 es uno de los eventos tempranos detectados en respuesta a estímulos mitogénicos. Esta fosforilación correlaciona con la iniciación de la síntesis de proteínas, y con base en estas observaciones se sugirió que los ribosomas con la proporción más alta de la rpS6 fosforilada debieran tener una ventaja selectiva de movilización hacia los polisomas. Múltiples estudios han demostrado que la estimulación mitogénica de células quiescentes induce la activación de S6K y como consecuencia la fosforilación de rpS6. La activación de la traducción de mRNA con un “motivo” de repeticiones de pirimidinas que se encuentra en el extremo 5' del mRNA (5' TOP) bajo estas circunstancias condujo a Thomas y colaboradores a proponer que la fosforilación de rpS6 incrementa la afinidad de los ribosomas por los mRNA 5'TOP, y por lo tanto facilitaría el inicio de su traducción (Meyuhas 2000). Los mRNA que contienen la secuencia de pirimidinas son aquellos que están relacionados con la síntesis de proteínas, es decir, las proteínas que intervienen en la maduración de ribosomas, los factores de inicio, elongación y

terminación de la traducción así como mRNA de proteínas estructurales como la actina y tubulina.

Tomando en cuenta que la fosforilación de rpS6 es uno de los primeros eventos detectados en respuesta a la estimulación con mitógenos y correlaciona con el inicio de la síntesis de las proteínas, se ha sugerido que los ribosomas con mayor proporción de fosforilación en la proteína rpS6 pueden unirse preferencialmente a algunos mRNA (Meyehuas et al., 2000), movilizándolos hacia los polisomas e induciendo una traducción selectiva (Hershey 1989).

rpS6 es el principal blanco de S6K y presenta 5 residuos de serina fosforilables en el extremo carboxilo terminal (Ser235, Ser236, Ser240, Ser244, y Ser247), aminoácidos que se encuentran conservados evolutivamente. Se ha propuesto que la fosforilación de rpS6 progresa de forma ordenada y que el primer sitio de fosforilación es la Ser236 seguido de la Ser235, Ser240, Ser244 y finalmente la Ser247 (Figura 15A) (Krieg et al 1988, Ruvinsky & Meyuhas 2006).

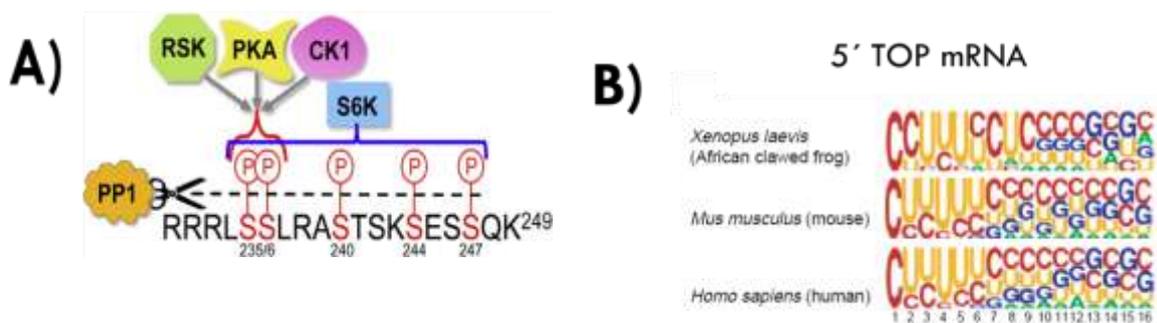


Figura 15. Esquema del extremo C-terminal de rpS6 y secuencia consenso de mRNA's 5'TOP. A) secuencia de aminoácidos en el extremo C-terminal. Se señalan las cinasas y fosfatasa que actúan sobre los residuos de serina en el C-terminal. B) secuencia consenso del tracto de oligopirimidinas en el extremo 5' (5'TOP) de los mRNA.

VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE PI3K/AKT/mTOR

La vía de señalización principal que participa en la fosforilación de rpS6 inicia por la unión de factores de crecimiento a receptores Tirosina-Cinasa (Figura 16). La ruta PI3K activada se inicia a través del reclutamiento de PI3K a la membrana plasmática a través de la unión de su dominio SH2 a proteínas tirosina-fosforiladas. Los residuos de tirosina fosforilados de los receptores tirosina cinasa interaccionan con la subunidad reguladora p85 de PI3K (Cantrell 2001). PI3K es un heterodímero que consiste en una subunidad reguladora, p85, y una subunidad catalítica, p110, encargada de transferir el grupo fosfato del ATP al fosfatidil inositol 4,5-bifosfato (PIP2), generando el fosfatidil inositol 3,4,5-trifosfato (PIP3) y ADP. Las actividades de cinasas son reguladas por las fosfatasas que actúan eliminando los fosfatos de las proteínas blanco. Existen evidencias de que la fosfatasa PTEN defosforila a PIP3, actuando por lo tanto como regulador negativo de la ruta de señalización de PI3K (Leslie & Downes 2002). PIP3 sirve como ligando para reclutar la serina/treonina cinasa Akt (c-Akt, también llamada proteína-cinasa B, (PKB) a la membrana plasmática a través de la interacción directa con el dominio con homología a Pleckstrina (PH) de Akt (Brazil & Hemmings 2001, Lawlor & Alessi 2001). Una vez en la cara interna de la membrana, Akt es fosforilada por una serina/treonina cinasa, la cinasa 1, dependiente de fosfatidil inositol-3 (PKD1), resultando en la activación de Akt (Belham et al 1999). Akt activada puede fosforilar en múltiples sitios al complejo de esclerosis tuberosa 2 (TSC2), dentro del atenuador supresor de TSC1-TSC2 tumoral (Inoki et al 2003, Potter et al 2002). Esto bloquea la capacidad de fosforilación de TSC2 para actuar como una proteína activadora de GTPasa (GAP) para Rev. (homólogo de Ras-enriquecido en el cerebro), permitiendo de este modo Rheb-GTP funcione como un activador del complejo sensible a rapamicina, TOR 1 (TORC1) (Avruch et al 2006).

La rapamicina es un inhibidor del complejo TOR-Raptor-LST8, también conocido como TOR1 (Bhaskar & Hay 2007, Yang & Guan 2007). Akt también puede activar independientemente de TORC1 a TSC1-TSC2 mediante la fosforilación de PRAS40, previniendo de este modo la inhibición mediada por PRAS40 de TORC1 (Sancak et al 2007, Vander Haar et al 2007). Por último, se

ha sugerido que la Akt puede activar a TORC1 no sólo por la fosforilación directa de TSC2, sino también mediante la elevación de la energía celular (Hahn-Windgassen et al 2005).

TORC1 activo, fosforila dos reguladores traduccionales, S6Ks y al factor de inicio eucariota 4E (eIF-4E) (Hay & Sonenberg 2004). La activación de S6Ks requiere también de la fosforilación de PDK1 en una reacción que no necesita la unión de PDK1 a PIP3 (Alessi et al 1998). Por último, S6K activada fosforila rpS6, así como muchos otros sustratos (Ruvinsky & Meyuhas 2006).

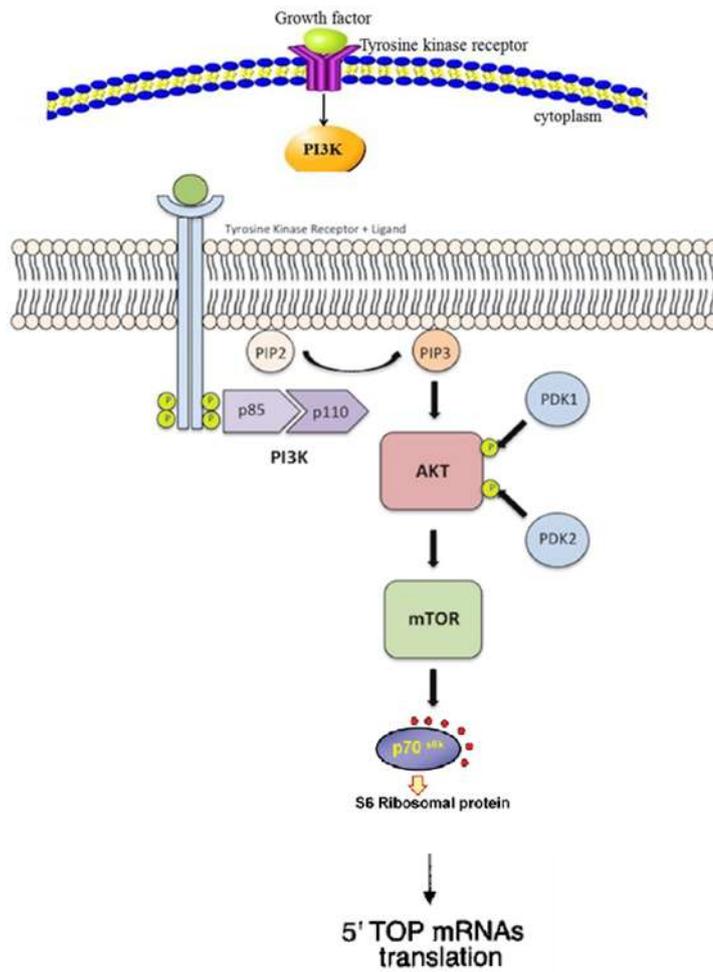


Figura 16. Vías de señalización necesarias para fosforilar a rpS6 en mamíferos.

ANTECEDENTES

En estudios sobre efecto que el Glu ejerce sobre la síntesis de proteínas en BGCs, se demostró que el Glu disminuye la tasa de incorporación de metionina radiomarcada [^{35}S]-Met en las proteínas después de 15 min de tratamiento con Glu 1mM. Dicha incorporación muestra una lenta fase de recuperación después de 30 min y luego de 2 h alcanza nuevamente niveles basales. Este efecto bifásico sugiere una regulación en la síntesis de proteínas a nivel de elongación (Gonzalez-Mejia et al., 2006)(Figura 17).

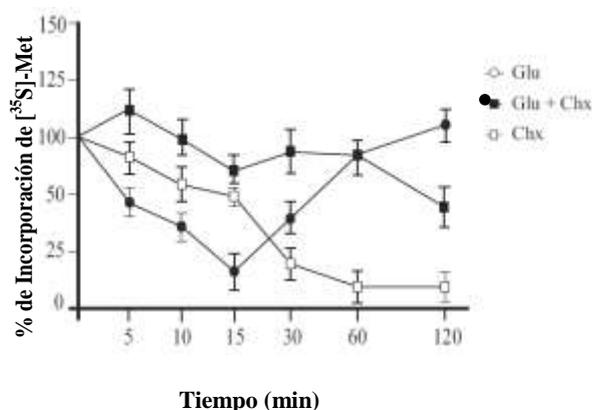


Figura 17. Incorporación de [^{35}S]-Met en proteínas después de exposición a Glu. Incorporación de [^{35}S]-Met en proteínas precipitadas con TCA de monocapas de BGC, tratadas por el tiempo indicado con Glu 1mM (círculos cerrados), Chx 1mM (cuadros abiertos) y Glu 1mM+Chx 1mM (cuadros cerrados) (Gonzalez-Mejia et al., 2006).

Al analizar el perfil polipeptídico se observó que a pesar de la disminución de [^{35}S]-Met, existen ciertos polipéptidos que son sintetizados después de 15 min de exposición a Glu (Gonzalez-Mejia et al., 2006) (Figura 18).

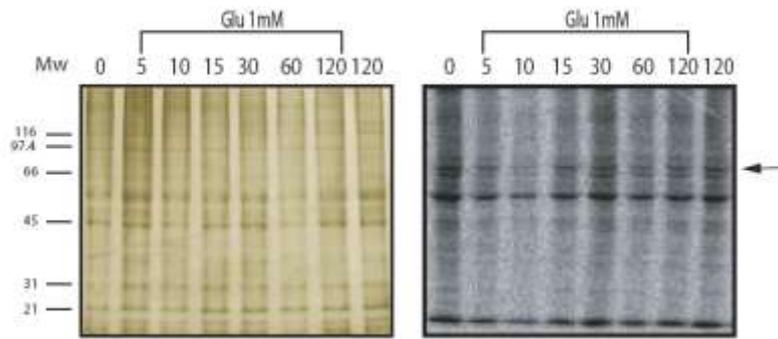


Figura 18. Perfil polipeptídico de BGC tratadas con Glu por incorporación de [³⁵S]-Met. Cantidades iguales de proteínas fueron analizadas mediante SDS-PAGE, los geles fueron teñidos con plata (izquierda) y expuestos con placas autorradiográficas (derecha) (Gonzalez-Mejia et al., 2006).

En BGCs se demostró que el Glu regula el Tiempo de Tránsito Ribosomal (RTT), el cual es el tiempo requerido para elongar y terminar una cadena polipeptídica. A menor tiempo mayor eficiencia traduccional. El tiempo en BGCs a los 15 min fue de 0.21 y 1.46 min para las no estimuladas y las tratadas con Glu respectivamente, habiendo un incremento de ~7 veces en el RTT. En cambio a los 60 min el RTT fue de 1.34 y 2.13 min para las no estimuladas y las tratadas con Glu respectivamente, observando un incremento de ~1.58, es decir a los 60 la síntesis de proteínas ha alcanzado una recuperación en comparación a los 15 min (Barrera et al., 2010). (Figura 19).

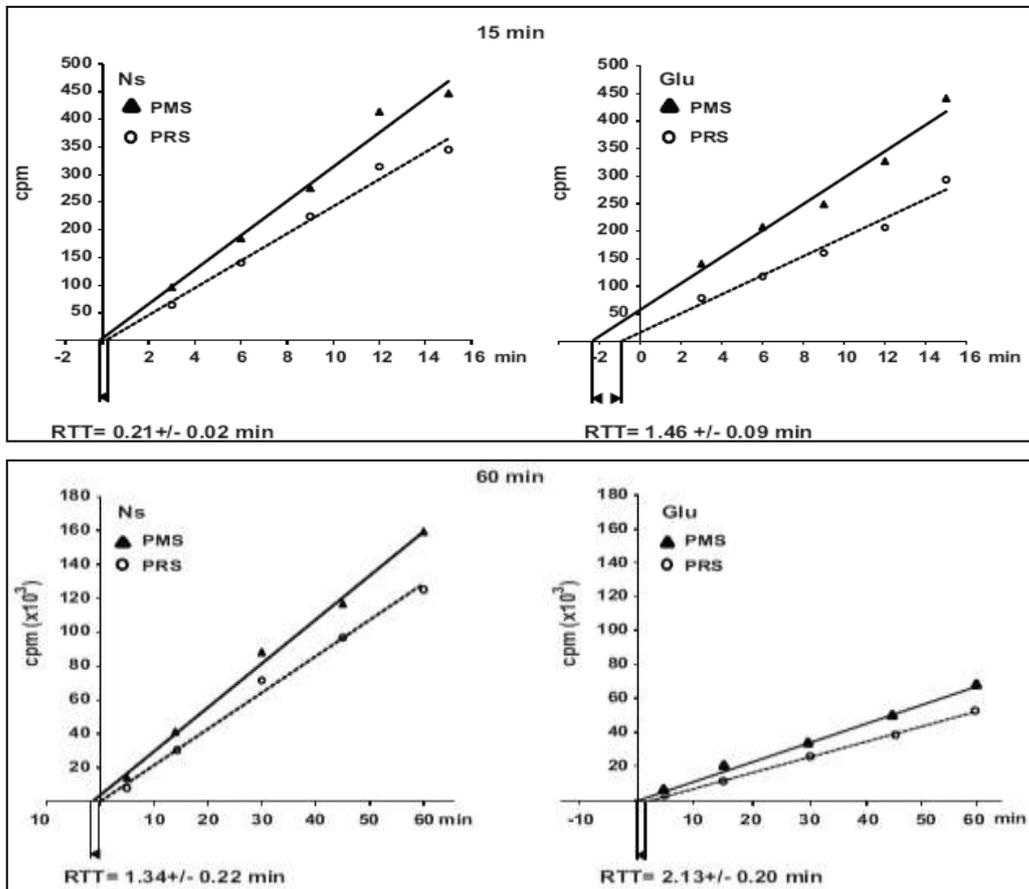


Figura 19. Tiempo de Tránsito Ribosomal en BGCs. Monocapas de BGC fueron tratadas con Glu 1mM por 15 ó 60 min. Triángulos representan a las proteínas finalizadas + las nacientes (PMS=Sobrenadante Post-Mitocondrial). Círculos representan a las proteínas finalizadas (PRS= Sobrenadante Post-Ribosomal) (Barrera et al., 2010).

JUSTIFICACIÓN

Se ha caracterizado parte de la respuesta bioquímica y molecular que induce el Glu en CGB. Glu activa la vía de señalización PI3K/AKT/mTOR pero también ocurre intercambio de iones a través de la membrana plasmática de Células Gliales. En este trabajo nos enfocaremos a continuar con la caracterización molecular dependiente de Glu en este tipo de células. Por una parte, se continuó con la caracterización de la fosforilación de rpS6, así como la regulación traduccional del mRNA de GS dependiente de la fosforilación de rpS6. Por otro lado, se abordó el efecto del Glu sobre la regulación post-traduccional de nNOS. Estos resultados servirán para conocer mejor las funciones de Células Gliales en el SNC.

HIPÓTESIS

Las CGB responderán a la exposición a Glu regulando la expresión de GS y nNOS, enzimas importantes para el óptimo funcionamiento de la sinapsis en el SNC. Debido a la rápida respuesta de los mecanismos moleculares en células Gliales se espera que la regulación génica de GS y nNOS sea a nivel traduccional y/o post-traduccional mediante la fosforilación de rpS6.

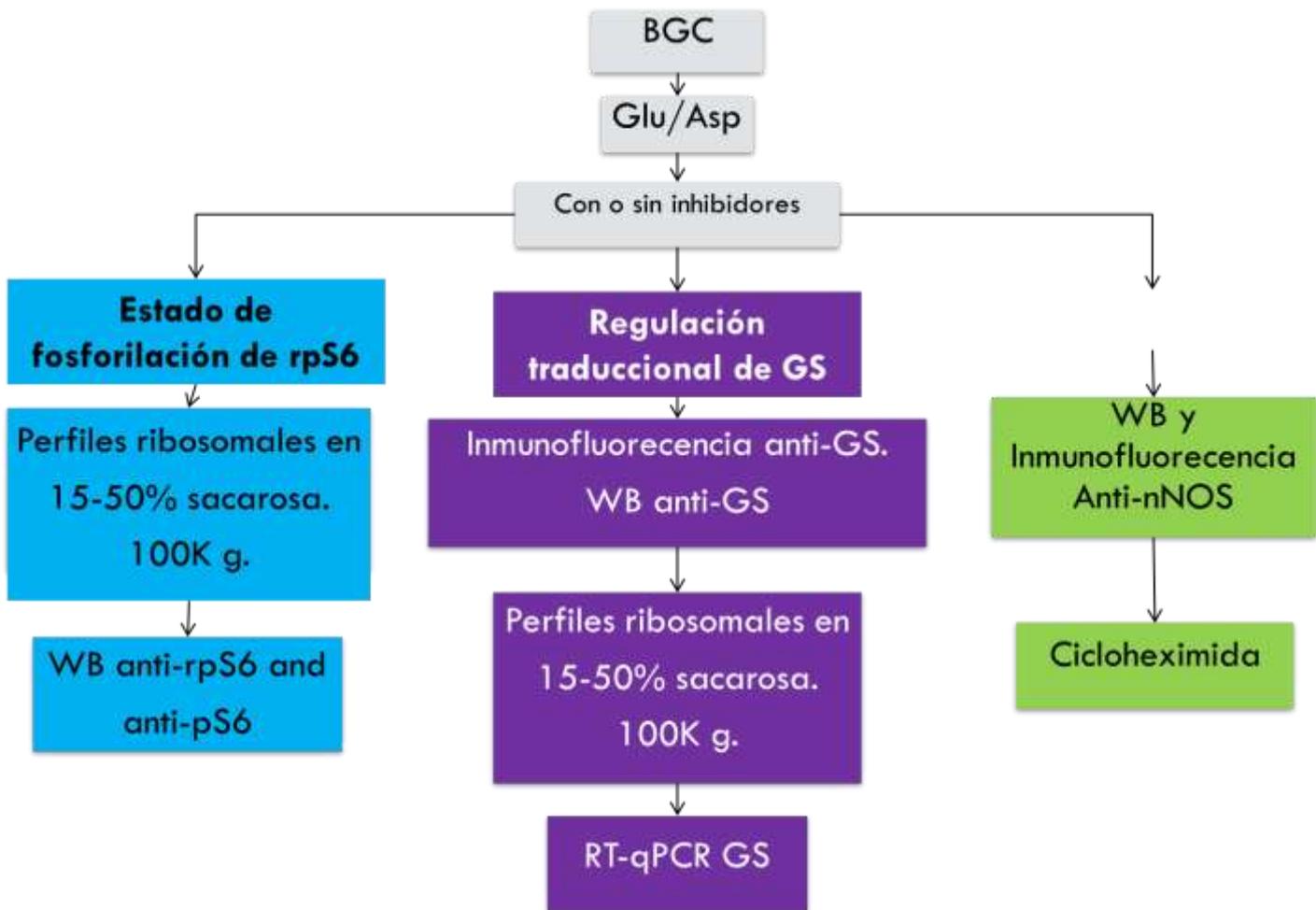
OBJETIVO GENERAL

Determinar la regulación génica dependiente de Glu a través de la fosforilación de rpS6.

Objetivo particular

1. Determinar el estado de fosforilación de rpS6 en el perfil ribosomal de CGB.
2. Determinar el efecto de receptores y transportadores de Glu sobre la fosforilación de rpS6.
3. Determinar los niveles de proteína y actividad de GS.
4. Evaluar el control traduccional dependiente de Glu de mRNA de GS.
5. Determinar el efecto de receptores y transportadores de Glu sobre la expresión de GS.
6. Evaluar el efecto del Glu sobre la expresión de nNOS.
7. Determinar el efecto de receptores y transportadores Glu sobre nNOS.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES

Los reactivos para los cultivo primarios se obtuvieron de GE Healthcare (Carlsbad, CA, EE. UU.). D-aspartato (Asp) y L-Glu (Glu) se obtuvieron de Tocris-Cookson (St. Louis, MO, EE. UU.). El reactivo de Griess se compró en Sigma #Cat 23479. Anti-rpS6 (cat. 2217) y Anti-Phospho-rpS6 (Cat. 4857) fueron obtenidos de Cell signalling, mientras que, policlonal anti-nNOS (Cat. Sc-648) y anti-GS fueron adquirido de Santa Cruz Biotechnology, USA. El anti-conejo, anti-ratón y el reactivo de quimioluminiscencia mejorado (ECL) se obtuvieron de Amersham Biosciences (Buckinghamshire, Reino Unido). Todos los demás productos químicos se compraron a Sigma (St. Louis, MO, EE. UU.).

PROTOCOLO DE CULTIVO Y ESTIMULACIÓN CELULAR

Los cultivos primarios de CGB de cerebelo se prepararon a partir de embriones de pollos de 14 días de edad, como se describió anteriormente por Ortega y cols. (Ortega et al 1991). Las monocapas de células se cultivaron en DMEM que contenía suero bovino fetal al 10%, 2 mM glutamina y gentamicina 50 µg/ml. Se utilizaron del 4 al 7 día después del cultivo, antes de cualquier tratamiento, las monocapas confluentes se cambiaron a medios DMEM con suero bovino al 0,5% durante 30 minutos y se trataron con Glu o Asp añadidos al medio de cultivo durante los períodos de tiempo indicados.

Inmunofluorescencia

Los CGB se sembraron en cubreobjetos, se fijaron por exposición a acetona helada durante 10 minutos y se secaron al aire durante 1 hora. Las células se enjuagaron con solución salina de fosfato (PBS) dos veces y se fijaron durante 10 minutos en paraformaldehído al 4%. Los cubreobjetos se enjuagaron de nuevo dos veces con solución salina de Tris (TBS) y una vez más con TBS/Tween 20 (0,05%). La unión no específica se evitó mediante incubación con BSA al 1% en TBS (BSA/TBS) durante 1 h. Las células se

expusieron a una dilución 1:100 del anticuerpo primario anti-GS o anti-nNOS, en BSA/TBS durante la noche a 4 °C, seguido de la incubación con los respectivos sueros anti-conejo de cabra marcados con fluoresceína en BSA/TBS (1:500) durante 2 h a temperatura ambiente. Las preparaciones se montaron con Fluoroshield/DAPI. Las preparaciones celulares se examinaron bajo un microscopio de fluorescencia (microscopio de Inmunofluorescencia Zeiss Axioskop 40 y el software AxioVision; Carl Zeiss, Inc., Thornwood, NY).

SDS-PAGE e Inmunodetección en fase sólida

Cada muestra se disolvió con tampón RIPA (Tris-HCl 50 mM, EDTA 1 mM, NaCl 150 mM, fenilmetilsulfonilo 1 mM, aprotinina 1 mg / ml, leupeptina 1 mg / ml, NP-40 al 1%, desoxicolato de sodio al 0,25%, NaF 10 mM, Na₂MoO₄ 1 mM y Na₃VO₄pH 1 mM 7,4). Se desnaturalizaron cantidades iguales de proteínas (50 µg según lo determinado por el método de Bradford) en el tampón de muestra de Laemmli. Las proteínas se separaron mediante un SDS-PAGE al 15% o 10% y luego se electrotransfirieron a membranas de nitrocelulosa. Las manchas se tiñeron con tinción de Ponceau S para confirmar que el contenido de proteína era igual en todos los carriles. Las membranas se empaparon en TBS-Tween al 0,1% para eliminar el Ponceau S y se incubaron en TBS-T al 0,1% que contenía leche desnatada en polvo al 5% para bloquear el exceso de sitios de unión a proteínas no específicas. Las membranas se incubaron durante la noche a 4 ° C con los anticuerpos primarios particulares seguidos de los anticuerpos secundarios. Los polipéptidos inmunorreactivos fueron detectados por quimioluminiscencia. Los análisis de densitometría se realizaron con el software ImageJ.

Perfiles ribosomales

Las monocapas confluentes de CGB se expusieron a una concentración 1 mM de Glu o Asp durante 0, 15 o 30 min. Las células fueron colectadas y lavadas con PBS suplementado con 100 µg/mL de cicloheximida, se centrifugaron a 16,000×g durante 7 min a 4 °C y se suspendieron en 200 µL de búfer de lisis RIPA (Tris-HCl 10 mM, pH 7,4, KCl 100 mM, 10 mM, MgCl₂, Tritón

X-100 al 1%, ditiotretitol 2 mM y 100 µg/mL de cicloheximida) que contiene inhibidores de la fosfatasa (NaF 10 mM, Na₂MoO₄ 1 mM y Na₃VO₄ 1 mM) y cóctel de inhibidores de la proteasas. Los perfiles ribosomales se obtuvieron usando las condiciones de Warner y cols. con algunas modificaciones (Zhao et al 2003) Se agregaron perlas de vidrio y las células se vortexearon cinco veces 30 s cada una. Las células fueron centrifugadas 10 min a 14,000×g. 15 unidades de D.O. del sobrenadante se colocaron sobre un gradiente de sacarosa de 15 a 50% y se centrifugaron a 141,000×g durante 5:30 h. Todos los gradientes se escanearon a 254 nm desde la parte superior con un colector de gradiente ISCO. Cada fracción se precipitó con etanol y se centrifugó a 16.000 x g durante 30 min para obtener proteínas o RNA.

Extracción de RNA y qRT-PCR

El RNA total se aisló de cultivos confluentes de CGB con o sin tratamiento de Glu o Aspartato utilizando el Reactivo TRIZOL (Sigma). La PCR se realizó en un volumen de reacción de 10 µL. La transcripción inversa-PCR (qRT-PCR) se realizó mediante un método de un paso con 20 ng de RNA total utilizando el sistema KAPA SYBR FAST One-Step qRT-PCR (Kapa Biosistemas). Las muestras fueron sometidas a PCR cuantitativa (qPCR) utilizando el sistema Step One Plus PCR tiempo real (Biosistemas aplicados). El perfil qPCR consistió en una síntesis inicial de cDNA por M-MuLV Reverse Transcriptase en 42 °C durante 5 min, una inactivación de la transcriptasa inversa a 95 °C durante 5 min, seguido de 40 ciclos de 95 °C durante 3 s, 60 °C 30 s. y una etapa de curva de fusión fue añadida. Para cuantificar los niveles de mRNA de GS se utilizaron oligonucleótidos previamente diseñados e informados: GS Forward 5'-ATGGAGGTCTCAAGCACATC-3' y GS Reverse 5'-GTTTCGTTGAGGAGACACGTA-3'. Como control endógeno se amplificó el mRNA de la proteína ribosomal S17 con los siguientes cebadores: S17 Forward 5'-CCGCTGGATGCGCTTCATCAG-3' y S17 Reverse 5'-TACACCCGTCTGGGCAAC-3'. La abundancia relativa de mRNA de GS se expresa en comparación del control normalizado con los niveles de mRNA de la proteína ribosomal S17 y se calculó como $2^{-\Delta\Delta CT}$. Los datos se presentan

como media \pm SD y analizados por la herramienta online BootstRatio. $p < 0.05$ fue considerado estadísticamente significativo (Clèries R 2012).

ACTIVIDAD DE GS

La actividad GS se determinó según lo descrito por Haghghat (Haghghat 2005). El ensayo de c-glutamyl transferasa catalizado por GS fue realizado en una placa de 12 pozos con cultivos de CGB. Las células se trataron con Glu 1 mM y se lavaron con PBS y 130 μ l de imidazol 50 mM a pH 6.8. Las placas de cultivo fueron congeladas a -80 °C durante 30 min y luego se incubó durante 15 min a temperatura ambiente. 30 μ L del cultivo fueron separados para cuantificar la concentración de proteína mediante el método de Bradford. 100 μ L de solución de ensayo fue añadido a cada pocillo (imidazol 50 mM, Na_2HSO_4 20 mM, ADP 0,16 mM, Gln 50 mM, hidroxilamina 25 mM y 2 MnCl_2) y se incubó durante 45 minutos a 37 °C. La reacción se detuvo con 400 μ L de solución de paro (2.42% de cloruro férrico, 1.45% de TCA y 1.82% de HCl). La absorbancia se leyó a 540 nm utilizando un lector de placa SpectraFluor Plus (Tecan). La actividad específica se expresa en nanomoles de γ -glutamyl hydroxamato por miligramo de proteína/45 min.

ETIQUETADO METABÓLICO E INMUNOPRECIPITACIÓN.

Las CGB se cultivaron en placas de 6 pocillos en DMEM. Las células se incubaron con 1,0 ml de medio sin metionina durante 60 minutos y luego se agregaron 80 μ Ci de [^{35}S] metionina. Después del período de marcaje, la síntesis de proteínas se detuvo con cicloheximida 300 μ g / μ L durante 15 minutos antes del tratamiento con Asp 1 mM durante un período de 60 minutos. A intervalos de tiempo apropiados, la persecución se terminó por solubilización con 100 μ L de solución de lisis RIPA. Los residuos celulares se eliminaron mediante centrifugación a 16,000 g en una microcentrífuga durante 10 min. nNOS fue inmuoadsorbido de los lisados celulares con 5 μ L de IgG anti-nNOS y 5 μ L de proteína A-sefarosa (GE Healthcare Cat. 28-9513-78). El pellet se lavó tres veces con solución TBS (50 mM Tris y 140 Na_2Cl) y el antígeno unido se eluyó de las perlas hirviendo en solución de Laemmli con ditiotreitól 100 mM

Las proteínas purificadas se separaron en geles de SDS-PAGE al 10% como se describe anteriormente.

CUANTIFICACIÓN DE LA LIBERACIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO.

La producción de NO se determinó midiendo la acumulación de nitrito y nitrato como metabolitos de óxido nítrico liberados al medio de cultivo. El ensayo de Griess (Sigma # Cat 23479) se realizó con 50 ml de medio cultivo en una placa de 96 pozos. Los metabolitos nítricos se combinan con 50 ml de sulfanilamida al 05% y 50 uL de naftiletilendiamina 1%. La mezcla se incubó en oscuridad durante 30 minutos y el producto colorimétrico se midió a 540 nm. La cantidad de nitrito se determinó por comparación con una curva estándar con NaNO_2 .

RESULTADOS

Fosforilación de rpS6 en CGB's

Para empezar a abordar los objetivos planteados, se determinó la fosforilación de rpS6 bajo las condiciones establecidas por Flores-Méndez (Flores-Mendez et al 2015), observando que una fosforilación máxima de rpS6 a los 15 min (Figura 20A). Para determinar que la fosforilación de rpS6 es dependiente de la actividad de mTOR se trataron monocapas de CGB con 100 nM de rapamicina 30 min antes del tratamiento con Glu 1 mM durante 60 min. En ensayos de inmunodetección en fase solida no se observan bandas correspondientes a rpS6 fosforiladas y junto con los análisis de densitometría se demuestra que la fosforilación de rpS6 depende de la actividad de mTOR (Figura 20B).

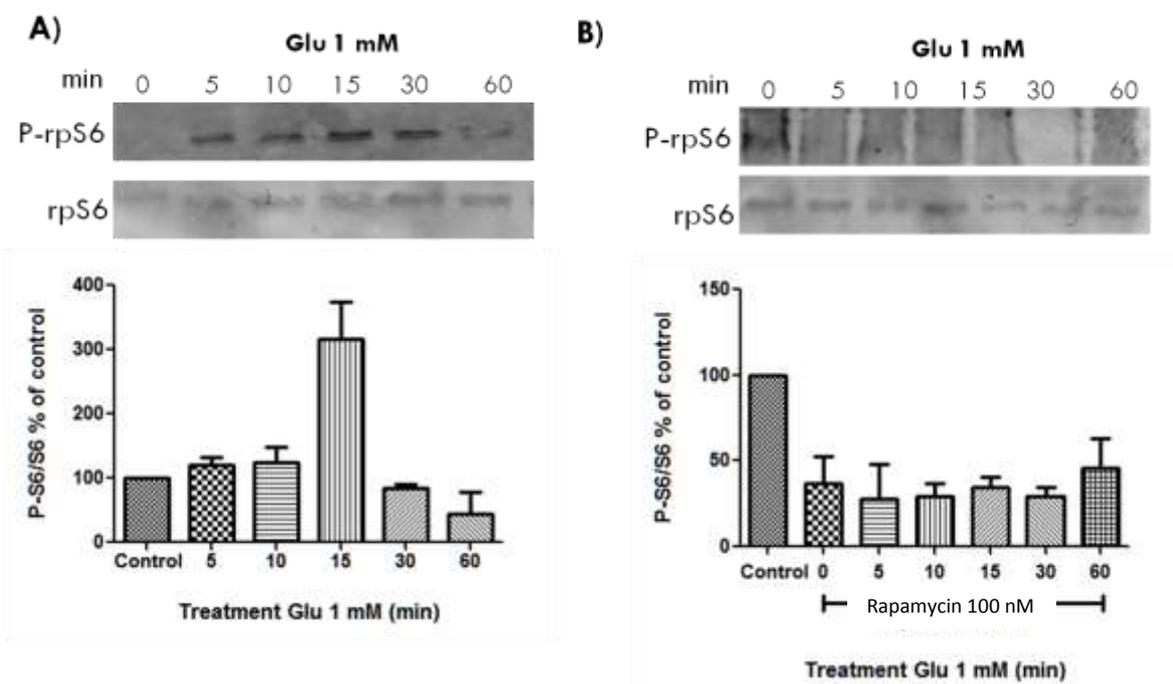


Figura 20. Fosforilación de rpS6 en CGB. A) Monocapas de CGB se trataron con Glu 1 mM por un periodo de 60 min. B) Monocapas de CGB fueron tratadas con 100 nM de rapamicina 30 min. antes del tratamiento con Glu 1 mM. El tiempo cero representan células no expuesta a Glu. En las condiciones experimentales indicadas, los extractos totales se inmunotransfirieron y se detectó la proteína con anti-Fosfo-rpS6. Los niveles rpS6 fosforilada se estandarizó con rpS6 tota como control de carga. La imagen de una membrana representativa se presenta en la parte superior del gráfico. Tres experimentos independientes \pm SD se graficaron para cada

grupo de datos como P-rpS6/rpS6 (% de control). El análisis estadístico se realizó utilizando ANOVA, con el software GraphPad Prism (*p<0.05).

Posteriormente se realizó la caracterización farmacológica de rpS6 en CGB usando el inhibidor para iGluRs, CNQX (6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione) y el inhibidor para GluTs DL-TBOA (DL-threo-beta-Benzoyloxyaspartate). La inmunodetección en fase sólida demuestra que la banda de rpS6 disminuye al momento de bloquear a los receptores, mientras que el inhibidor de transportadores TBOA no disminuye significativamente la intensidad de la banda a comparación de células tratadas con Glu 1 mM durante 15 min. (Figura 21). Estos resultados demuestran la importancia de los GluRs sobre la fosforilación de rpS6 y por lo tanto en la síntesis de proteínas.

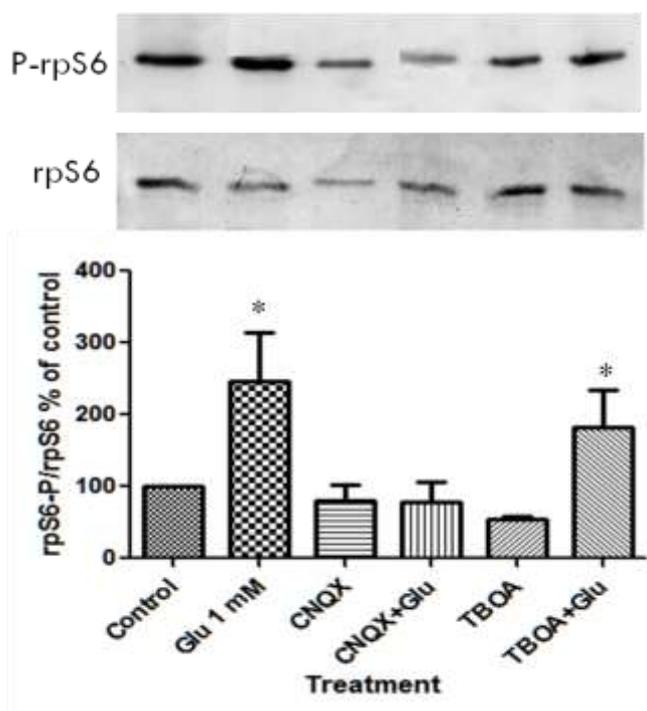


Figura 21. Caracterización farmacológica de la expresión de rpS6. CGB fueron tratadas con el bloqueador de EAAT ácido DL-treo-β-benciloxanásico (TBOA, 100 μM) y el antagonista de GRIA 6-ciano-7-nitroquinoxalina-2,3-diona (CNQX, 50 μM) antes del tratamiento con Glu 1 mM (15 min). El tiempo cero representa células no expuestas a Glu. En las condiciones experimentales indicadas, se realizó inmunotransferencia en fase solida de extractos totales de proteínas y se detectó la proteína con anti-Fosfo rpS6. Los niveles rpS6 fosforilada se estandarizó con rpS6 tota como control de carga. La imagen de una membrana representativa se presenta en la parte superior del gráfico. Tres experimentos independientes ±SD se

graficaron para cada grupo de datos como P-rpS6/rpS6 (% de control). El análisis estadístico se realizó utilizando ANOVA con el software GraphPad Prism (* $p < 0.05$ control y ** $p < 0.05$ Glu 1 mM por 15 min).

rpS6 regula el proceso de traducción en células eucariontes (Meyuhas 2015), ésta es una proteína estructural de la subunidad 40S ribosomal (Kruger et al 2007), y por lo tanto, puede estar en la subunidad nativa 40S, monosoma y polisomas. Por lo tanto, analizamos la presencia de rpS6 no fosforilada y los estados fosforilados en las fracciones del perfil ribosomal. Por una parte, el enriquecimiento de las fracciones del perfil ribosomal se determinaron mediante extracción de RNA y análisis en geles de agarosa al 1,2%. La fracción superior o sobrenadante (Sb) corresponde a proteínas citoplasmáticas que no entran en el gradiente de sacarosa debido a su bajo peso molecular, en esta fracción se aíslan los tRNA pero carece de rRNA. La siguiente fracción de perfil corresponde a la subunidad ribosómica 40S con su 18S rRNA seguido por la fracción de la subunidad ribosomal 60S identificada por 28S rRNA seguida de los monosomas (80S) y polisomas que tienen tanto 18S como 28S rRNAs. 15 minutos después de la estimulación con Glu 1 mM, la cantidad de fracción 80S aumenta y disminuye 30 minutos después del tratamiento. La fracción de polisomas aumentó solo 30 minutos después de la adición de Glu 1 mM

Por otro lado, rpS6 y rpS6 fosforilada en ser 235 236 se analizaron por inmunodetección en fase sólida usando anticuerpos anti rpS6 y anti P-rpS6. Interesantemente se observó una banda de rpS6 en la fracción sobrenadante y, como se esperaba, en las fracciones 40S ribosomal, monosomas y polisomas. Se encontró a rpS6 de monosomas y polisomas se fosforila (Figura 22). Todos estos datos sugieren que la velocidad de traducción disminuyó en células tratadas con Glu 15 mM y se recuperó la velocidad de síntesis de proteínas después de la fosforilación de rpS6. Además, la rpS6 libre que no se ensambló en las subunidades ribosómicas 40S probablemente tenga funciones extraribosómicas (Wool 1996).

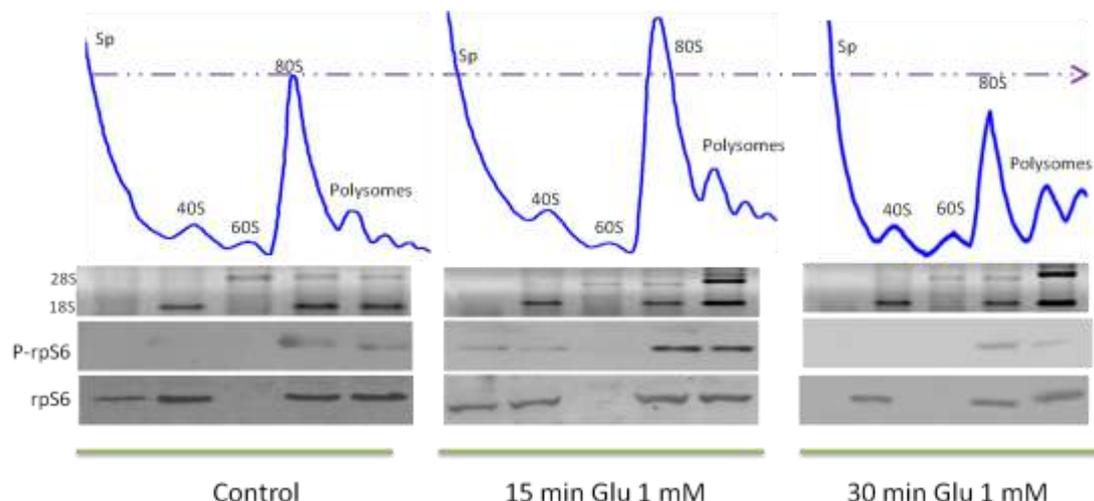
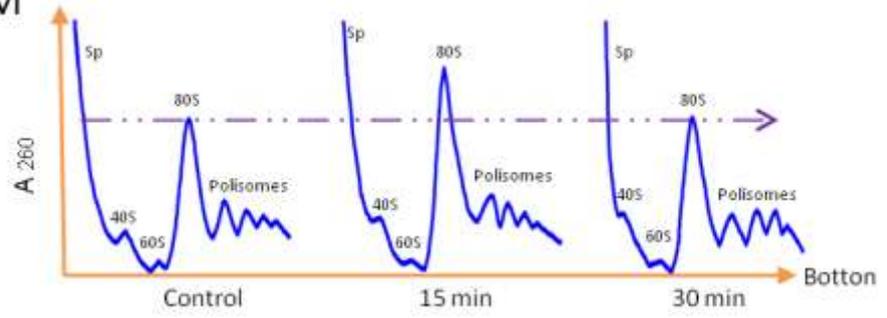


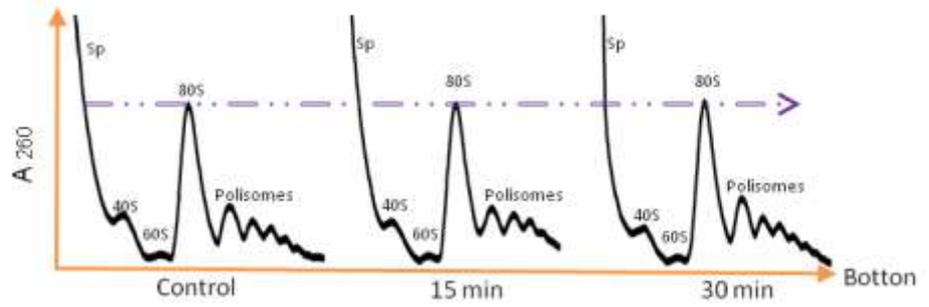
Figura 22. Perfil ribosomal de la fosforilación de rps6 en monocapas de CGB. Las células se suprimieron con DMEM que carecía de suero fetal bovino durante 30 minutos, luego los cultivos se trataron con Glu 1 mM durante 15 o 30 minutos con Glu 1 mM. 10 unidades de D.O.254nm fueron colocados en un gradiente continuo de sacarosa del 15-50% Los paneles superiores muestran la absorbancia del gradiente de sacarosa observando las distribución de las poblaciones de partículas ribosomales. El RNA se preparó y analizó en geles de agarosa, los rRNA 28S y 18S se muestran en la imagen. En la parte inferior de la imagen se observa la imagen de una inmunotransferencia en fase solida representativa de las fracciones de supernadante (Sp), 40S, 60S, 80S y polisomas usando anticuerpos anti-rpS6 y anti-Phospho.

Con el experimento de la figura 22 se observó que el Glu regula el patrón del perfil ribosomal y por lo tanto la síntesis de proteínas. El Glu activa a los GluRs y GluT, mientras que el aminoácido Aspartato (Asp) activa solamente a los GluT específicamente al GLAST (EAAT1) (Perego et al 2000). Para determinar la participación de los receptores y transportadores Glu en la biogénesis ribosomal, CGB se trataron con Glu o Asp (Figura 23). El perfil ribosomal muestra que solo Glu ejerce cambios en las fracciones del perfil ribosomal, siendo más evidente en la fracción de los monosomas después de 15 minutos de tratamiento (Figura 19A). Por el contrario, no se detectó ningún efecto sobre los perfiles ribosómicos en células tratadas con Aspartato (Figura 19B). Además se determinó que el efecto del Glu sobre el perfil ribosomal depende de la concentración de Glu desde una concentración de 100 nM (Figura 19C)

Glutamate 1 mM



Aspartate 1 mM



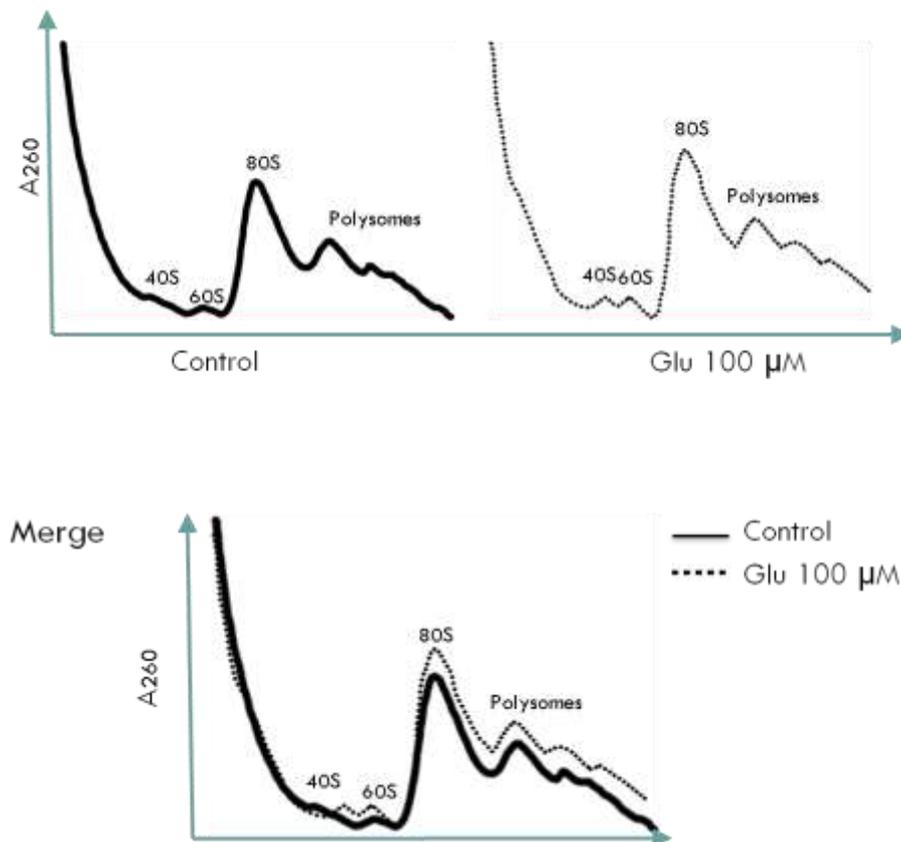


Figura 23. Efecto del Glu y Aspartato sobre el perfil ribosomal de CGB. Monocapas de CGB se suprimieron con DMEM que carecía de suero fetal bovino durante 30 minutos, luego los cultivos se trataron con Glu 1 mM durante 15 o 30 minutos con Glu 1 mM o Aspartato 1 mM. 10 unidades de D.O._{254nm} fueron colocados en un gradiente continuo de sacarosa del 15-50%. A) El perfil ribosomal de la parte superior corresponde a células expuestas con Glu 1 mM. B) Perfil ribosomal de células expuestas a Aspartato 1 mM. C) CGB tratadas con 100 nM de Glu por 15 min. Las figuras muestran un perfil de ribosomal representativo de 3 experimentos independientes.

Se ha sugerido que la fosforilación de rpS6 promueve la traducción de un conjunto de mRNA caracterizados por la presencia de un tramo 5' terminal de Oligopirimidinas (5' TOP), y por lo tanto, denominados mRNA TOP. Este dominio estructural comprende un elemento central regulador en cis de la traducción de mRNA (Geyer et al 1982). El control traduccional de los mRNA TOP se manifiesta por su reclutamiento selectivo hacia los polisomas una vez que las células reciben estímulos y nutrientes necesarios para entrar al ciclo

celular. Adicionalmente, la fosforilación de rpS6 por la actividad de S6K se correlaciona estrechamente con la regulación traduccional positiva de los mRNA TOP (Meyuhas 2008, Ruvinsky et al 2005). Es importante señalar que los mRNA que tienen la secuencia de oligopirimidinas en la región 5'UTR son aquellos que intervienen en el proceso de síntesis de proteínas, por ejemplo: los factores de la traducción, las proteínas ribosomales, las proteínas que participan en la maduración de ribosomas y algunos mRNA de proteínas estructurales como actina (Ruvinsky et al 2005). Esto sugiere que rpS6 está involucrada en la síntesis de proteínas indispensables para la sobrevivencia celular.

Debido lo anterior, fue de nuestro interés determinar la expresión de GS, ya que esta enzima es importante para el metabolismo del Glu en el SNC (Figura 24). Se empezó abordando esta aspecto con inmunofluorescencia para determinar la expresión y distribución de GS en CGB tratadas 15 min. con Glu 1 mM. En la Figura 24 se observan las células con contraste de fase con morfología típicas de células gliales bipolares y en algunos casos células estrelladas. El color azul indican los núcleos teñidos con DAPI, mientras que el color verde hace referencia a GS. sintetasa, observando una aumento de expresión en células tratadas con Glu 1 mM durante 15 min.

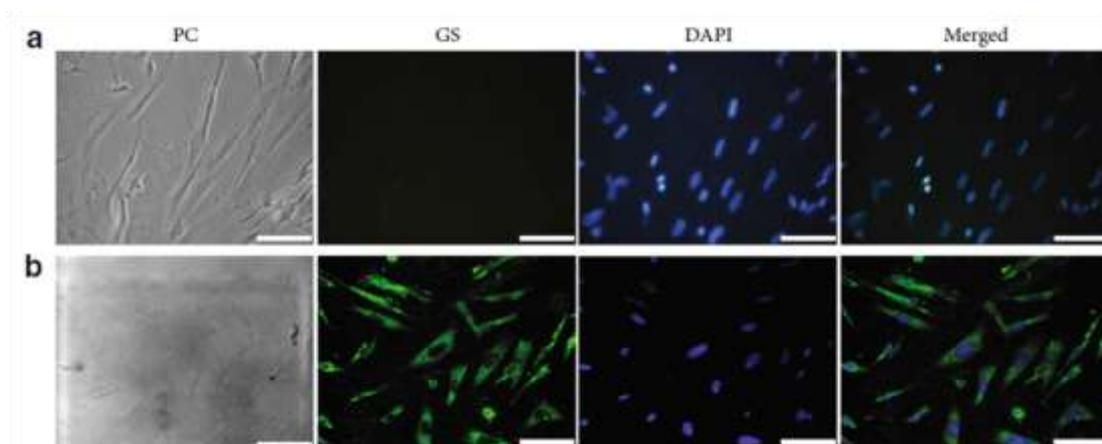


Figura 24. Inmunofluorescencia de GS en cultivos de CGB. Los cultivos primarios de CGB se incubaron con un anticuerpo anti-GS. A) Las células de control (sin Glu) y B) se trataron con Glu 1 mM durante 15 min. Los anticuerpos anti-nNOS se muestran en verde. También se muestran la microfotografía de contraste de fase (PC) de la morfología CGB, el núcleo teñido de DAPI (azul) y las imágenes fusionadas.

Análisis de inmunodetección en fase sólida de GS en CGB expuestas a Glu durante 120 min. mostraron que hay un nivel máximo de expresión a 30 min. de tratamiento con Glu y posteriormente se observa la expresión basal (Figura 25A). Por otro lado, ensayos de actividad de GS mostraron que a los 30 min. se tiene un aumento en la actividad de GS (Figura 25B). Este dato se correlaciona con el tiempo de mayor expresión de GS bajo las mismas condiciones.

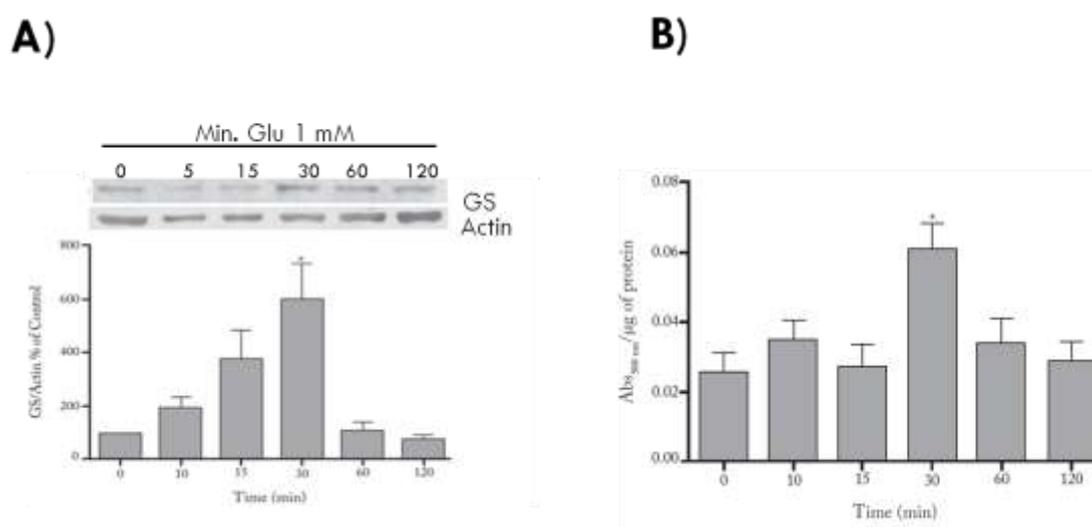


Figura 25. Niveles y actividad de GS en CGB. A) Niveles de GS en monocapas de CGB tratadas con Glu 1 mM durante 120 min. En las condiciones experimentales indicadas, los extractos totales se inmunotransfirieron y se detectó la proteína con anti-GS. Los niveles de GS normalizó con actina control de carga. La imagen de una membrana representativa se presenta en la parte superior del gráfico. B) Actividad enzimática de la GS en CGB en respuesta a la estimulación con Glu. La actividad enzimática de GS fue medido por la acumulación de γ -glutamihidroxamato como un índice de Actividad de GS registrando la absorbancia a 500 nm. El tiempo cero representan células no expuesta a Glu. Tres experimentos independientes \pm SD se graficaron para cada grupo de datos como. El análisis estadístico se realizó utilizando ANOVA, con el software GraphPad Prism (* $p < 0.05$).

Fue necesario determinar si el aumento de la proteína de GS se debe a una regulación transcripcional. En este sentido se midió la expresión relativa del mRNA de GS en CGB tratadas con 1 mM de Glu durante 60 min., observándose que no hay aumento significativo de este mRNA en las células tratadas (Figura 26).

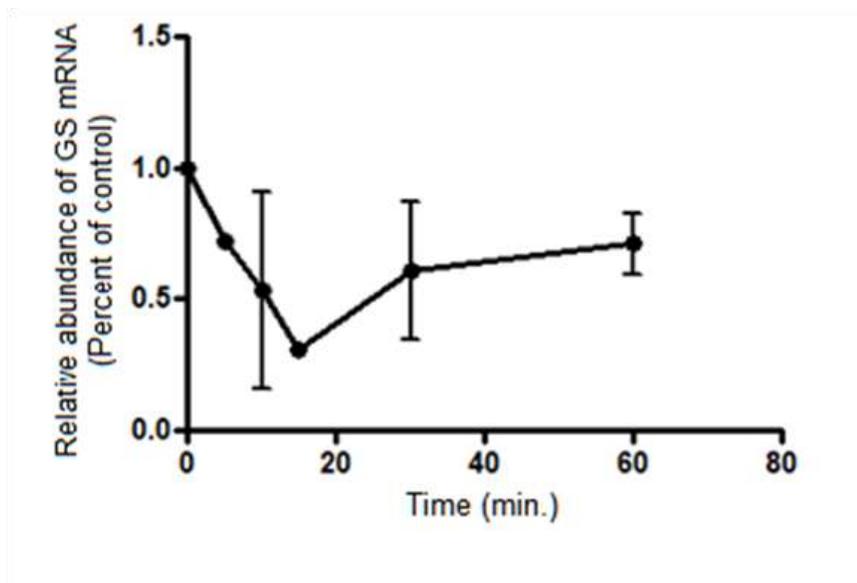


Figura 26. Expresión relativa de mRNA de GS en CGB. Monocapas de CGB fueron tratadas con Glu 1 mM durante 60 min. En las condiciones experimentales indicadas, se realizó RT-qPCR para determinar la expresión de mRNA de GS. Los niveles mRNA de GS se normalizó con la expresión del mRNA S17. Los datos fueron analizados por BootstRatio online resource (n=3, *p<0.05).

Por lo tanto decidimos analizar la expresión de GS a nivel de traducción. Un primer acercamiento consistió en inhibir la traducción con 300 $\mu\text{g/mL}$ de cicloheximida durante 30 min antes del tratamiento con Glu y determinar los niveles de proteína con inmunodetección en fase solida de extractos proteicos de las células tratadas. Se observa que los niveles de GS no aumentan en células tratadas con cicloheximida a pesar de la exposición de Glu sugiriendo que la regulación traduccional juega un papel importante para la expresión de esta enzima (Figura 27).

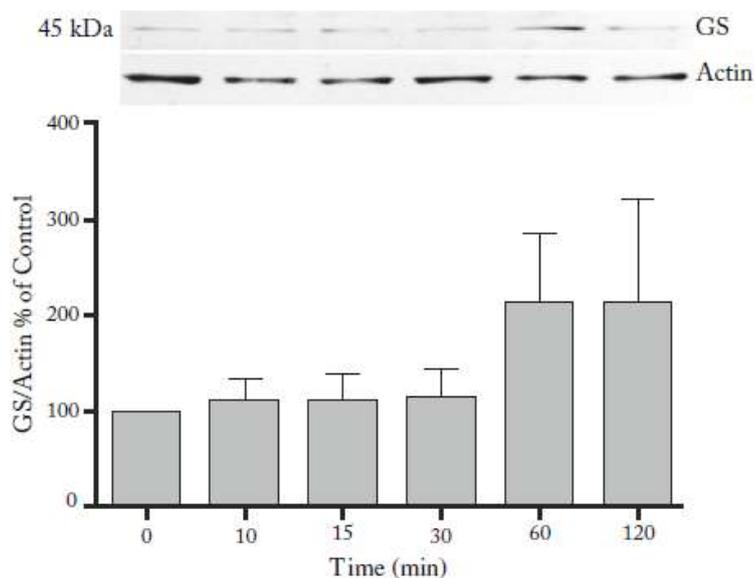
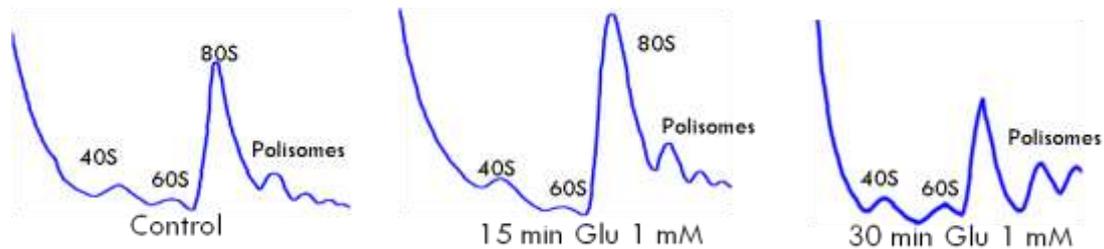


Figura 27. Regulación traduccional de GS en CGB. Niveles de GS en monocapas de CGB tratadas con Glu 1 mM durante 120 min. Las células fueron expuestas a 300 μ g/mL de Cicloheximida 30 min antes del tratamiento con Glu. En las condiciones experimentales indicadas, los extractos totales se inmunotransfirieron y se detectó la proteína con anti-GS. Los niveles de GS normalizó con actina control de carga. La imagen de una membrana representativa se presenta en la parte superior del gráfico. El tiempo cero representan células no expuesta a Glu. Tres experimentos independientes \pm SD se graficaron para cada grupo de datos como. El análisis estadístico se realizó utilizando ANOVA, con el software GraphPad Prism (* p <0.05).

El estudio de la regulación traduccional se abordó evaluando la cantidad de mRNA de GS unidos a polisomas mediante el uso de perfiles ribosomales. Esta técnica consiste en separar las particular ribosomales de acuerdo a su densidad a través de un gradiente continuo de sacarosa, de esta forma podemos aislar a los polisomas, que son muchos ribosomas unidos a un mRNA y cuantificar un determinado mRNA bajo diferentes condiciones. Además la traducción selectiva se ha abordado desde el punto de vista de la fosforilación de rpS6. Por lo anterior, se evaluó la cantidad relativa del mRNA de GS en fracciones polisomales de CGB tratadas con Glu 1 mM durante 15 y 30 min. El análisis de RT-qPCR muestra que aumenta más de 100% el mRNA en polisomas a los 15 min y disminuye a los 30 min. (Figura 28A). Una causa de este aumento radica en la fosforilación de rpS6, ya que esta proteína ribosomal promueve la traducción selectiva de 5'TOP mRNA. En este sentido se hicieron análisis bioinformático de la región 5'UTR del mRNA de GS con el

software Vector NTI. Se encontró una secuencia de oligopirimidinas de 16 nucleótidos CCCCUGCCCGCAGCCC a -48 pb (Figura 28B). Este resultado apoya la idea de que la fosforilación de rpS6 y la traducción de GS puede deberse a la secuencia oligopirimidinas presentes en el mRNA.



Effect of glutamate on Glutamine Synthetase mRNA abundance within polysome fraction

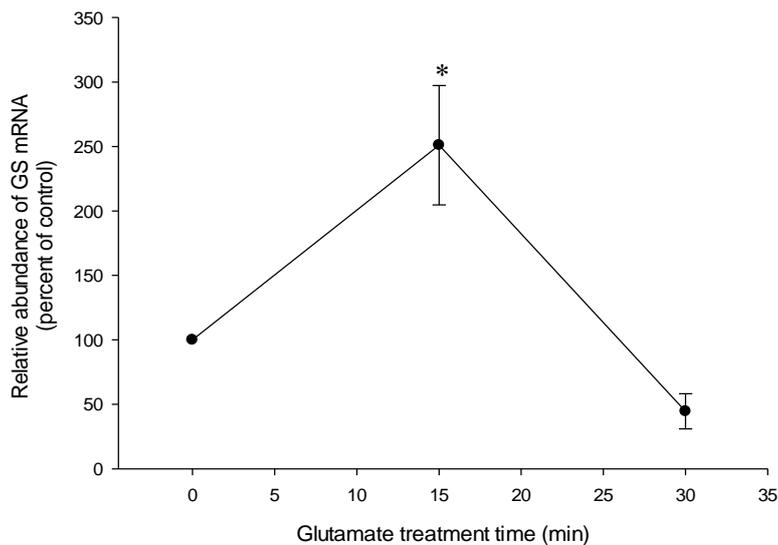


Figura 28. Traducción de mRNA de GS promovida por Glu. A) El mRNA de GS analizado por el software Vector NTI, en 5'UTR se encontró una secuencia de oligopirimidinas a -48 pb en el piso superior de ATG. B) La abundancia de mRNA de GS medida mediante SYBR Green

qRT-PCR dentro de la fracción polisomal aislada de CGB cultivada tratada o no con Glu 1 mM durante 15 o 30 min. Los datos se expresan como porcentaje de la muestra de control (sin tratamiento). Los datos fueron analizados por el recurso en línea BootstRatio (n=3) (*p<0.05).

Para conocer mejor la actividad de GluR y GluT sobre la expresión de GS se realizó la caracterización farmacológica usando los antagonistas CNQX para GluR y DL-TBOA para los EAAT. Las células fueron expuestas a los antagonistas por separado 30 minutos antes del tratamiento con Glu 1 mM. La inmunodetección en fase sólida mientras que inhibiendo la actividad de GLAS (EAAT) con DL-TBOA se inhibe la detección de GS pero no ocurre lo mismo inhibiendo a los GluR con CNQX (Figura 29) concluyendo que GluT, particularmente GLAST es el principal responsable de la regulación traduccional de GS bajo las condiciones descritas.

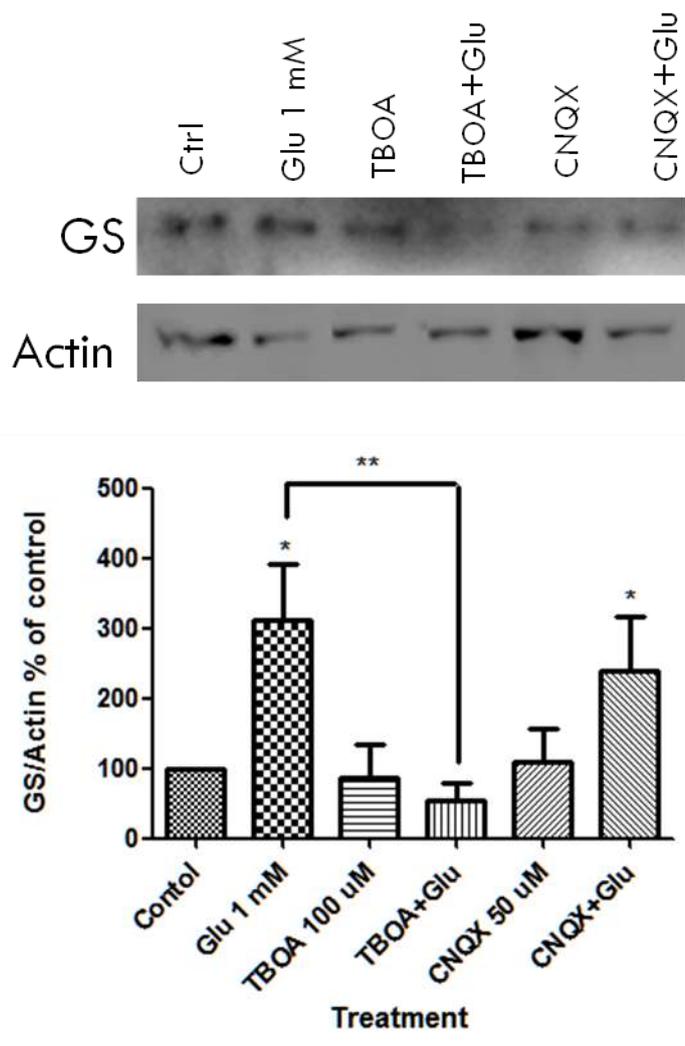


Figura 29. Caracterización farmacológica de GluR y EAAT en CGB. Monocapas de CGB se expusieron con el bloqueador EAAT DL threo-Ácido β -benciloxaspártico (TBOA, 100 μ M) y antagonista de GRIA 6-ciano-7-nitroquinoxalina-2,3-diona (CNQX, 50 μ M) antes del tratamiento con 1 mM de Glu (30 min). El tiempo cero representa CGB no expuesta a Glu. En las condiciones experimentales indicadas, extractos totales fueron inmunotransferidos con anti-GS y luego analizado. Anti-actina Western blots se utilizaron como controles de carga. Una membrana representativa se presenta en la parte superior del gráfico. Se grafican tres experimentos independientes \pm SD para cada punto de datos como GS/actina (% de control). El análisis estadístico se realizó utilizando ANOVA, con el software GraphPad Prism. * $p < 0.05$.

Por otro lado, se ha reportado la función de la cascada de señalización $\text{Ca}^{2+}/\text{NO}/\text{cGMP}/\text{PKG}$ en la regulación del transportador glutamatérgico GLAST/EAAT1, encontrándose un aumento dependiente de PKG en la actividad de captura de Glu debido al aumento de los transportadores GLAST/EAAT1 en la membrana plasmática (Balderas et al., 2014). El aumento de cGMP en CGB después de la activación de los GluR, asociado al hecho de que la exposición a un donante de Óxido nítrico como el nitroprusiato de sodio (SNP) conduce a un aumento en la captura de [^3H] D-aspartato en CGB. Estos hallazgos abrieron la posibilidad de que estas células podrían expresar la isoforma neuronal de óxido nítrico sintetasa (nNOS) (Baltrons and Garcia., 1997., Balderas et al., 2014). Nuestro primer enfoque fue realizar experimentos inmunocitoquímicos, y como se muestra en la Figura 30, en condiciones basales, se detecta una señal difusa, pero específica. Curiosamente, una exposición de 15 minutos a 1 mM Glu es suficiente para aumentar la señal citoplasmática (Figura 30). Se han identificado varias proteínas neuronales en la glía radial, como GRIN (Uchihori y Puro., 1993., López et al., 1997., Bagasrawala et al., 2017), el factor de transcripción Ying-yang 1 (YY1) (Rosas. et al., 2007., Karki et al., 2015) y muchos otros, por lo tanto, no fue sorprendente detectar nNOS en nuestros cultivos. Una explicación para la expresión glial radial de los genes neuronales es su potencial neurogénico sugerido (Tanaka et al., 1999., Parmigiani et al., 2015). El rápido aumento en la acumulación de nNOS en cultivos de CGB, sugiere que un evento post transcripcional desencadenado por Glu.

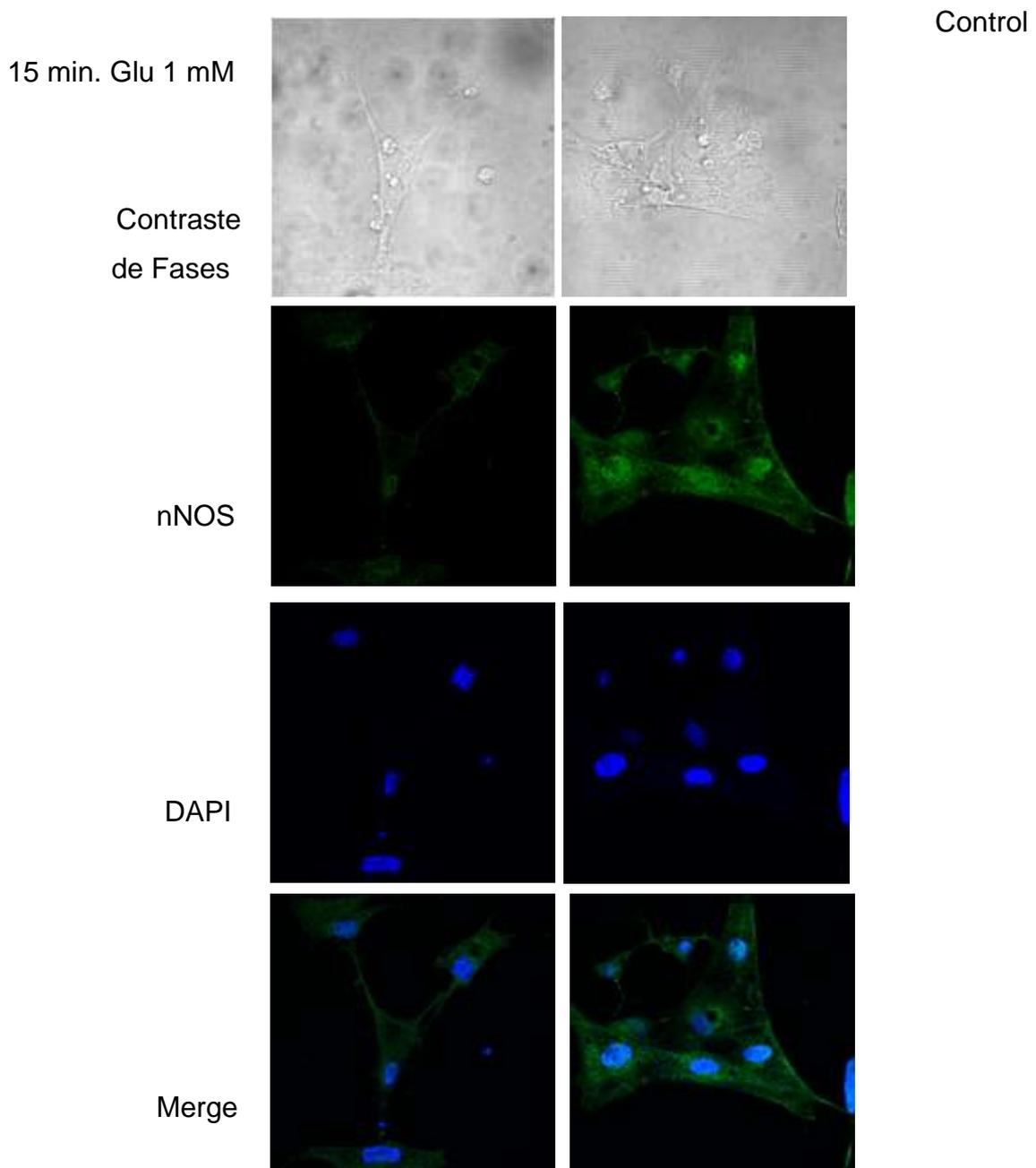


Figura 30. Inmunofluorescencia de nNOS en cultivos de CGB. Los cultivos primarios de CGB se incubaron con un anticuerpo nNOS. A) Las células control (sin Glu) y B) se trataron con Glu 1 mM durante 15 min. Los anticuerpos anti-nNOS se muestran en verde. También se muestran la microfotografía de contraste de fase (PC) de la morfología CGB, el núcleo teñido de DAPI (azul) y las imágenes fusionadas.

Con el fin de conocer el mecanismo molecular desencadenado por Glu que incrementa la expresión de nNOS, decidimos caracterizar el efecto temporal de este aminoácido excitador. Con esta finalidad, se expusieron CGB a Glu 1 mM durante un período de 60 minutos y se detectaron niveles de proteína nNOS a mediante inmunodetección en fase sólida (Figura 31). Como se muestra en el panel A de la Figura 31, a los 10 minutos de exposición a Glu, aumenta significativamente los niveles de nNOS, con un pico a los 15 minutos y un regreso a los niveles basales después de 60 minutos. Este efecto depende de la dosis, con un EC₅₀ de aproximadamente 50 μ M (Figura 31B).

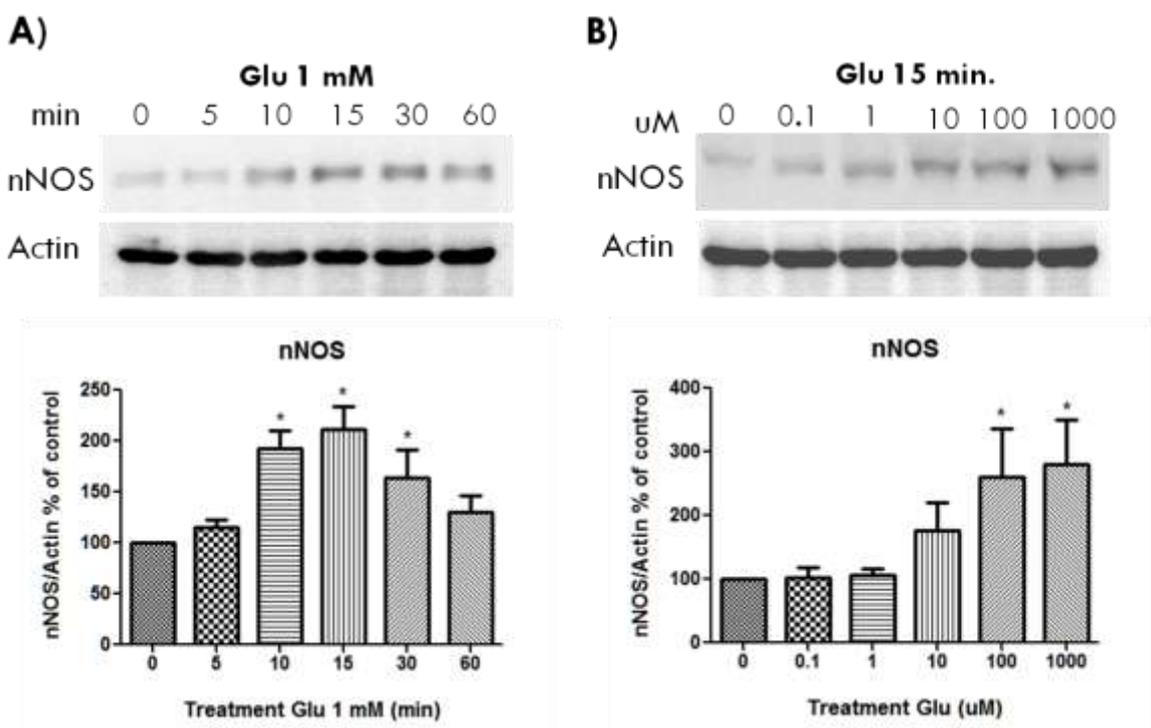


Figura 31. Los niveles de proteína nNOS dependen del tiempo y de la dosis. A) Las monocapas de CGB se trataron durante diferentes períodos de tiempo con una concentración de 1 mM de Glu. B) Los cultivos de CGB se trataron con concentraciones crecientes de Glu durante 15 min. El tiempo cero representa Glu no expuesto CGB. En las condiciones experimentales indicadas, los extractos totales se sometieron a inmunodetección en fase sólida con anti-nNOS y luego se analizaron. Se usó anti-actina como controles de carga. Una membrana representativa se presenta en la parte superior de la gráfica. Se graficaron tres experimentos independientes \pm SD para cada punto de datos como nNOS/Actina (% del

control). El análisis estadístico se realizó utilizando ANOVA, con el software GraphPad Prism. * $p < 0.05$

Estos resultados refuerzan aún más el carácter post-transcripcional del efecto de Glu y también son indicativos de un efecto mediado por el transportador, ya que la K_m de GLAST/EAAT1 se inicia en el rango μM (Ruiz y Ortega, 1995). Para probar esta última posibilidad, las monocapas de CGB se expusieron a 1 mM Glu en un medio sin Na^+ , y como se esperaba, no se encontró ningún aumento en los niveles de nNOS, ya que en ausencia de Na^+ extracelular, GLAST/EAAT1 no es capaz de transportar el aminoácidos. Por otra parte, el tratamiento con una concentración fija de 1 mM de D-aspartato para diferentes periodos de tiempo reproduce el aumento nNOS provocado por Glu en medio completo, lo que favorece nuevamente la noción de que el transporte de Glu activa la regulación ascendente de la nNOS (Figura 32B).

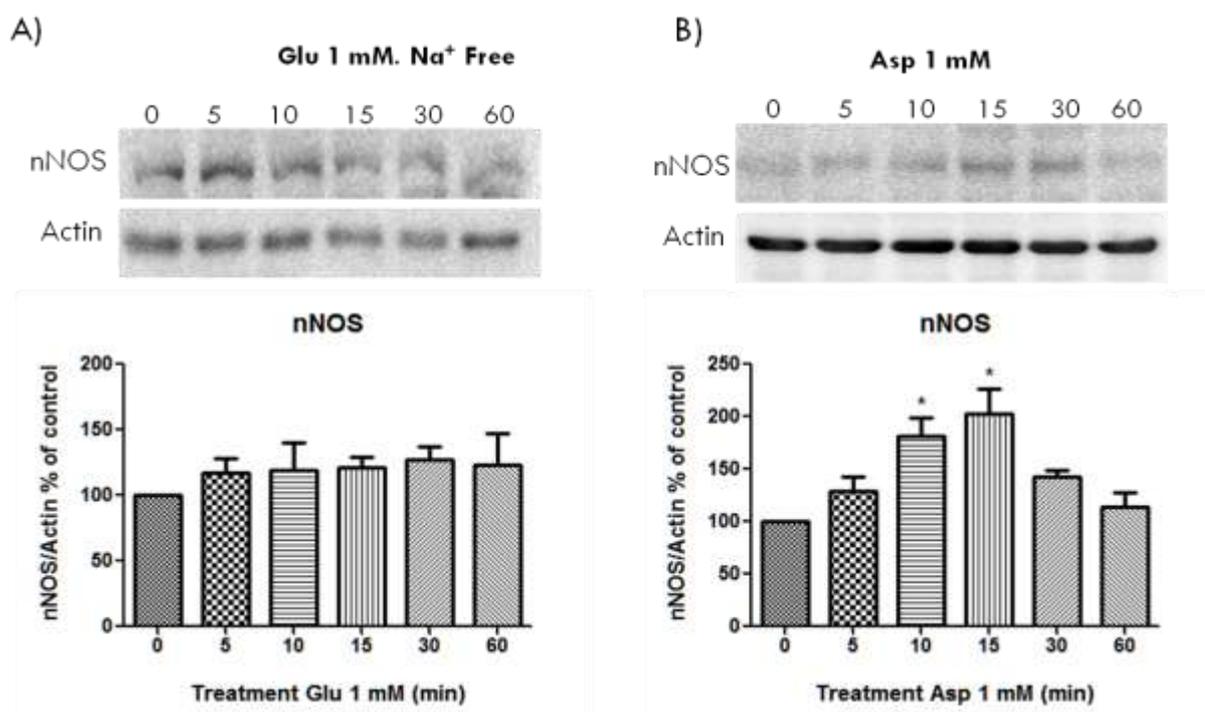


Figura 32. Actividad de GluR y EAAT sobre la expresión de nNOS. A) Las monocapas de CGB se trataron durante diferentes periodos de tiempo con una concentración de 1 mM de Glu en medio libre de Na^+ . B) Los cultivos de CGB se trataron con 1 mM de Asp durante 60 min. El tiempo cero representa CGB no expuestas a Glu. En las condiciones experimentales indicadas,

los extractos totales se sometieron a inmunodetección en fase solida con anti-nNOS y luego se analizaron. Se usó anti-actina como controles de carga. Una membrana representativa se presenta en la parte superior de la gráfica. Se graficaron tres experimentos independientes \pm SD para cada punto de datos como nNOS/Actina (% del control). El análisis estadístico se realizó utilizando ANOVA, con el software GraphPad Prism. * p <0.05.

Se buscó una evidencia farmacológica para esta interpretación. Como era de esperarse, el bloqueador competitivo de EAAT no transportable DL-threo- β -Benzyloxyaspartic acid (TBOA) inhibe completamente el efecto de D-Aspartato. En este mismo sentido, el antagonista de GRIA (antagonista de GluR), 6-ciano-7-nitroquinoxalina-2,3-diona (CNQX) redujo solo una pequeña fracción no significativa de la respuesta D-Aspartato (Figura 33). En conjunto, estos resultados demuestran que el aumento dependiente de Glu en los niveles de proteína nNOS es un efecto dependiente de GLAST/EAAT1.

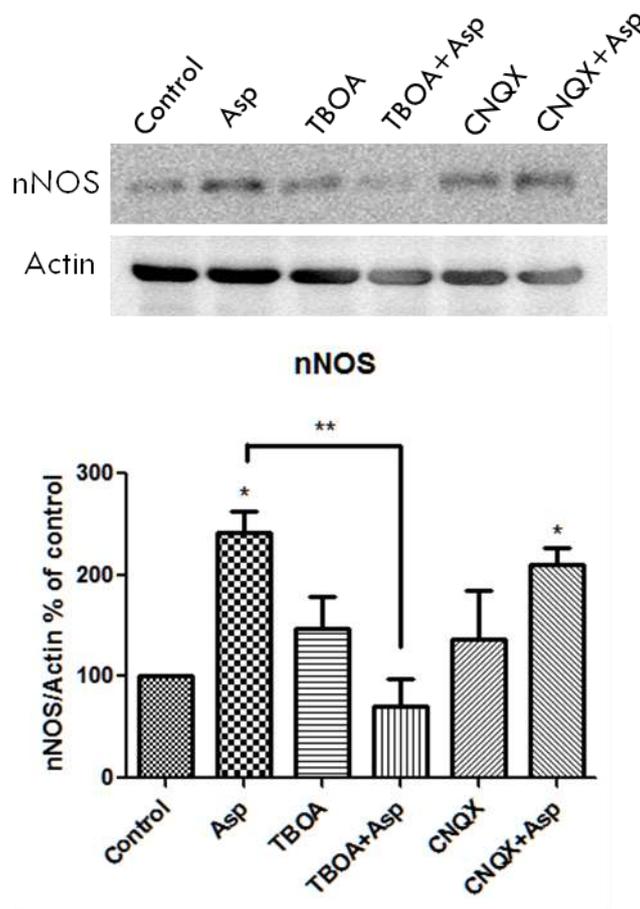


Figura 33. Caracterización farmacológica del efecto de GluR y EAAT sobre los niveles de nNOS en CGB. Monocapas de CGB se expusieron con el bloqueador EAAT DL threo-Ácido β -

benciloxaspártico (TBOA, 100 μ M) y antagonista de GRIA 6-ciano-7-nitroquinoxalina-2,3-diona (CNQX, 50 μ M) antes del tratamiento con 1 mM de Glu (30 min). El tiempo cero representa CGB no expuesta a Glu. En las condiciones experimentales indicadas, extractos totales fueron inmunotransferidos con anti-nNOS y luego analizado. Anti-actina se usó como control de carga. Una membrana representativa se presenta en la parte superior del gráfico. Se grafican tres experimentos independientes \pm SD para cada punto de datos como nNOS/actina (% de control). El análisis estadístico se realizó utilizando ANOVA, con el software GraphPad Prism. * $p < 0.05$.

Para establecer los mecanismos moleculares del efecto del Glu, se llevaron a cabo experimentos en presencia del inhibidor transcripcional Actinomicina D (ActD) o del bloqueador de la traducción de la proteína cicloheximida (CHX). ActD es un potente inhibidor de la transcripción e induce apoptosis en una gran variedad de células *in vivo* e *in vitro*. A concentraciones altas (>1 μ g/ml) de ActD se bloquea la transcripción de todos los tipos de RNA, mientras que a bajas dosis (<100 ng/ml) causa preferentemente inhibición de la síntesis del rRNA (Perry and Kelley, 1968, Perry and Kelley, 1970). En el caso de CHX es un inhibidor de la síntesis proteica en organismos eucariotas. Actúa interfiriendo la actividad peptidil transferasa del ribosoma 60S, bloqueando la elongación traduccional.

Los análisis de inmunodetección en fase sólida muestran que ninguno de estos inhibidores bloquea el aumento inducido por D-Aspartato en los niveles de proteína nNOS (Figura 34), indicando que el aumento de los niveles de nNOS no es consecuencia de la transcripción o traducción, sugiriendo que una vida media prolongada de la proteína sería responsable de los niveles aumentados de nNOS.

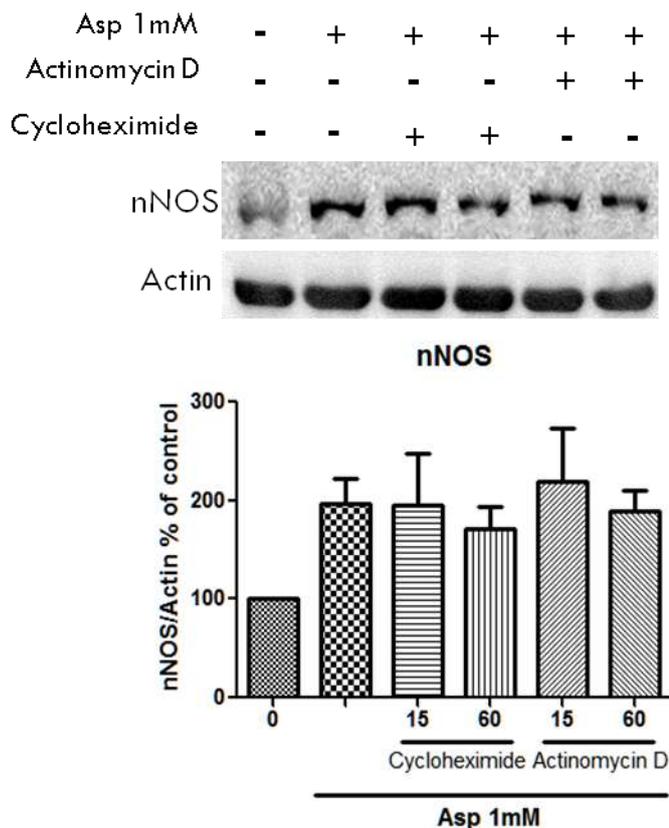


Figura 34. Los inhibidores transcripcionales y traduccionales no inhiben el aumento de nNOS en CGB. Las monocapas de CGB se expusieron a Actinomicina D 1 $\mu\text{g}/\text{uL}$ o cicloheximida 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 30 min antes de adicionar Asp 1 mM durante un período de 60 min. El tiempo cero representa Glu no expuesto CGB. En el momento indicado, los extractos totales se prepararon y se inmunotransfirieron con anti-nNOS. Se usó anti-actina como control de carga. Una membrana representativa se presenta en la parte superior de la gráfica. Se graficaron tres experimentos independientes \pm SD para cada punto de datos como nNOS/Actina (% del control). El análisis estadístico se realizó utilizando un ANOVA, con el software GraphPad Prism. * $p < 0.05$.

Para probar esta posibilidad, se llevaron a cabo experimentos de pulso-caza usando [^{35}S] Metionina. Las monocapas de CGB se marcaron durante 60 minutos en medio sin metionina, se lavaron y luego se suplementaron con medio completo durante varios períodos de tiempo, después de lo cual, se inmunoprecipitó nNOS. El análisis de electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida de los inmunoprecipitados, demostró claramente que el tratamiento con Asp resultó en una mayor cantidad de nNOS radiomarcados en comparación con las células control. La pérdida de nNOS radioactiva es aparentemente monofásica y una reacción de primer orden con una vida media

de aproximadamente 30 minutos en las células de control, mientras que en Asp la vida media de las células expuestas nNOS se duplicó (120 min) (Figura 35). Los aumentos en el Ca^{2+} intracelular activan el nNOS de una manera dependiente de la Calmodulina, a través de la unión del complejo Ca^{2+} /Calmodulina (CaM) y la homodimerización de la enzima (Peng et al., 2012). Es tentador especular que el flujo de Ca^{2+} a través del intercambiador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ activado por la captación de Glu en CGB (Martínez-Lozada et al., 2011), por un lado, activa nNOS mientras que en el otro, evita su degradación. Las alteraciones covalentes en el sitio de unión al sustrato nNOS conducen a su ubiquitinación por el extremo C de la proteína que interactúa con Hsc70 (CHIP), una ubiquitina-ligasa del tipo E3 que se une a Hsp70 y Hsp 90, lo que resulta en su degradación (Clapp et al. , 2012). En apoyo de nuestra interpretación, se encuentra la estabilización nNOS informada por Ca^{2+} /CaM a través de Hsp90 (Peng et al., 2009). Además, se ha demostrado que la inhibición de la degradación proteosomal nNOS mejora el transporte de glucosa (Mezghenna et al 2014), una característica en línea con nuestros hallazgos anteriores que vinculan la captura de Glu y glucosa en la glía de Bergmann (Méndez-Flores et al., 2016).

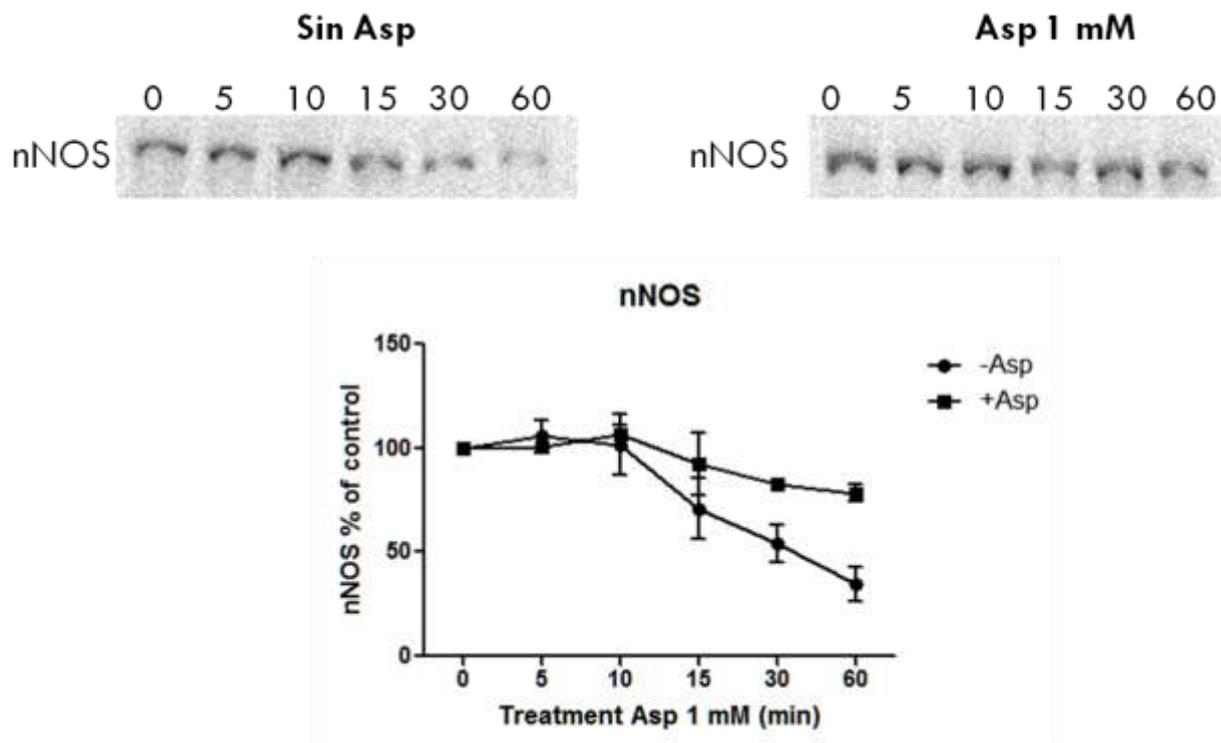
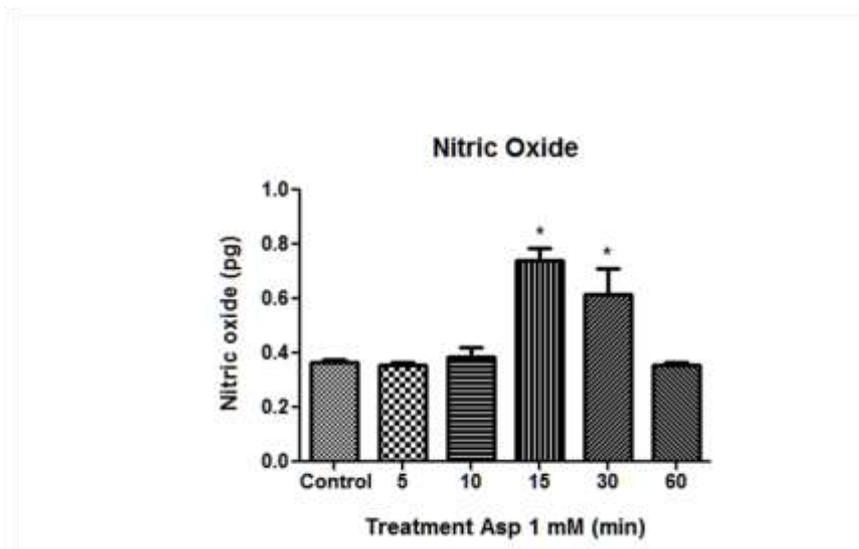


Figura 35. El tratamiento con Glu inhibe la proteólisis de nNOS en las CGB. Las monocapas de CGB se expusieron a 300 $\mu\text{g} / \mu\text{L}$ 15 minutos antes del tratamiento de Asp 1 mM durante un período de 60 minutos. El tiempo cero representa Glu no expuesto CGB. En el momento indicado, los extractos totales se prepararon y se inmunotransfirieron con anti-nNOS. Una membrana representativa se presenta en la parte superior de la gráfica. Se graficaron tres experimentos independientes $\pm\text{SD}$ para cada punto de datos. El análisis estadístico se realizó utilizando un ANOVA con el software GraphPad Prism. * $p < 0.05$.

Finalmente, evaluamos la cantidad de óxido nítrico en medios de cultivo de CGB durante 60 minutos expuestos a Asp 1 mM. El ensayo de Griess muestra que se detecta una cantidad de 0.4 pg. de óxido nítrico en las células de control, mientras que en las células estimuladas con Asp 1 mM se detecta un aumento máximo de 0.8 pg. de óxido nítrico a los 15 min. (figura 36). La producción máxima de óxido nítrico corresponde al aumento de los niveles de nNOS detectados en nuestras condiciones.



Figuras 36. La exposición a Glu aumenta la cantidad de óxido nítrico en las CGB. La producción de NO se determinó midiendo la acumulación de nitritos y nitratos como metabolitos de NO producidos en CGB. Las monocapas de CGB se expusieron a Asp 1 mM durante un período de 60 min. El tiempo cero representa el tratamiento de CGB no expuesto. En las condiciones experimentales indicadas, se tomaron 50 μ L de medio y se analizaron para nitrito y nitrato con el ensayo de Griess. La cantidad de nitrito se determinó por comparación con una curva estándar con NaNO_2 .

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La transmisión glutamatérgica representa el sistema excitador más abundante en el cerebro de vertebrados y es un buen ejemplo de la participación crítica de las células gliales en el SNC. Esta interpretación se apoya en el hecho de que la mayor parte de la actividad de captura de Glu tiene lugar en el compartimento glial por los transportadores de Glu en células gliales como EAAT1/GLAST y EAAT2/GLT-1 (Danbolt et al 2016).

Durante la última década, se ha establecido el rol de los transportadores gliales de Glu como entidades de señalización (Lopez-Colome et al 2016, Martinez-Lozada et al 2011, Martinez-Lozada & Ortega 2015). Las células de glía también expresan GluR funcionales de los subtipos ionotrópicos y metabotrópicos, por lo que estas células tienen moléculas de detección de Glu diferenciales que regulan su función en respuesta a la actividad neuronal. La abundancia de transportadores de Glu de la membrana plasmática favorece la idea de un papel importante de estas moléculas en la señalización glutamatérgica, aunque la presencia de receptores de Glu funcionales en estas células se ha demostrado claramente (Bordey & Sontheimer 2000, Muller et al 1992).

A pesar de que la funcionalidad e incluso la existencia de la lanzadera Glu/Gln han sido debatidos a lo largo de los años (McKenna et al 2016), los resultados descritos en esta tesis favorecen la importancia de esta cascada bioquímica para el correcto reciclaje de este neurotransmisor. En los últimos años, los hallazgos clave apoyan un acoplamiento eficiente del Glu capturado, la actividad de GS y la liberación de Gln en astrocitos que rodean las sinapsis glutamatérgicas como en la retina, tronco encefálico auditivo, el cáliz de la sinapsis de Held, y la corteza del cerebelo (Figura 37) (Martinez-Lozada et al 2013, Martinez-Lozada & Ortega 2015, Todd et al 2017, Uwechue et al 2012).

Un sistema apropiado, como cultivos de CGB, ha demostrado un acoplamiento entre la actividad de EAAT y la función de GS. Por otra parte, un

aumento en la captura de glucosa también se ha documentado como consecuencia de la actividad EAAT1/GLAST (Mendez-Flores et al 2016). Todos estos datos nos llevaron a estudiar la regulación de GS por Glu. Nuestros datos muestran aumento significativo en la actividad de GS y en los niveles de proteína después de 15 y 30 min. de tratamiento con el aminoácido excitador. (Figura 37). El rápido aumento en los niveles de proteína sugirió un incremento en la traducción o en una estabilización de la proteína.

Teniendo en cuenta que se ha reportado previamente que el Glu regula la síntesis de proteínas en CGB y después de 15 min. de exposición al este aminoácido, la traducción se detiene en la fase de alargamiento de síntesis de proteínas debido a la fosforilación del factor de alargamiento 2 eucariota (eEF2) (Barrera et al 2010, Gonzalez-Mejia et al 2006). Sin embargo, el mRNA de GS se comporta como los mRNA 5'TOP debido a que su regulación traduccional está correlacionada con la fosforilación de rpS6 a pesar de que la síntesis de proteínas se ve afectada con el tratamiento del Glu (Shin & Park 2004).

La proteína ribosomal S6 (rpS6) fue la primera proteína ribosomal en la que se demostró fosforilación dependiente a factores de crecimiento y nutrientes, y se ha sugerido que la fosforilación de rpS6 es crucial para la unión del mRNA a la subunidad 40S ribosomal, sugiriendo su implicación en la regulación de la traducción (Meyuhas 2015). Por lo tanto, una vez que pudimos demostrar que Glu modula los perfiles ribosomales, exploramos el estado de fosforilación de rpS6 en las fracciones ribosomales, curiosamente, después de 15 minutos de tratamiento con Glu, rpS6 de polisomas está fosforilada, posiblemente aumentando la unión de la subunidad 40S al mRNA de GS. Debido a esto pudimos detectar este mRNA con qRT-PCR en los polisomas, resultados mostrados en la figura 24. Es importante mencionar que el enriquecimiento de mRNA de GS en los polisomas está presente antes de alcanzar el nivel máximo de GS detectada, y esta cinética diferencial podría explicarse en términos de mayor sensibilidad de la técnica de PCR frente a la inmunodetección en fase sólida.

Con estos datos, es tentador especular que el Glu liberado en la corteza del cerebelo por las fibras paralelas es capturado por CGB a través de EAAT1/GLAST. Una fracción de este Glu se metaboliza a glutamina por la enzima GS traducido de Novo. La glutamina se libera a través de SNAT3 (Martinez-Lozada et al 2013).

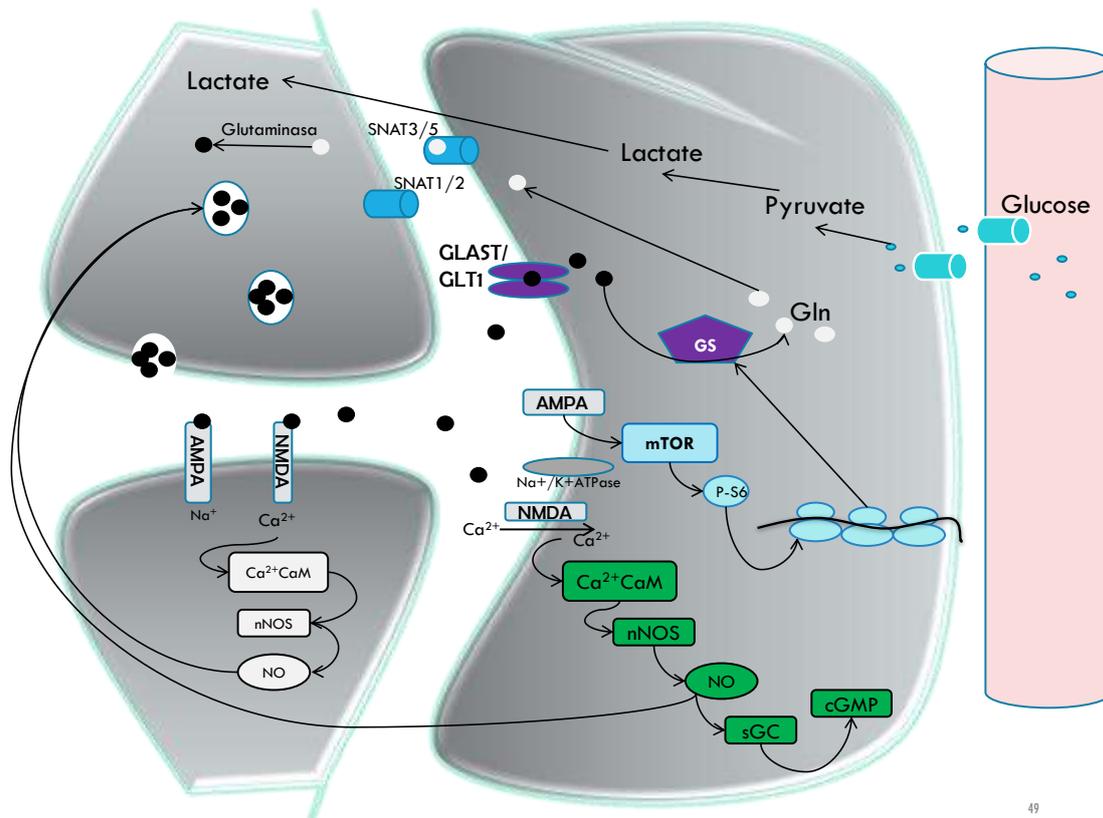
Es importante mencionar que en CGB, Glu ejerce sus acciones a través de la activación de GluR y GLAST/EAAT. Mediante el uso del bloqueador de transportadores Glu, TBOA, pudimos demostrar que el aumento en los niveles de GS es mediado por efecto de transportadores.

Por otra parte, el aumento reportado de cGMP en CGB después de la activación de GluR, junto con el hecho de que la exposición a nitroprusiato de sodio (donante de NO) conduce a un aumento en la captura de $^3\text{[H]-D}$ -aspartato en CGB, planteó la posibilidad de que estas células pudieran expresar la isoforma neuronal de óxido nítrico sintetasa (nNOS) (Balderas et al 2014, Baltrons & Garcia 1997). Varias proteínas neuronales han sido identificados en la glía radial, como GRIN (Lopez et al 1997, Uchihori & Puro 1993), el factor de transcripción Ying-Yang 1 (YY1) (Rosas et al 2007) y muchos otros. Por lo tanto, no fue sorprendente detectar nNOS en las células cultivadas. Una explicación plausible para la expresión de los genes neuronales en glial radial es su potencial neurogénico (Parmigiani et al 2015, Tanaka et al 1999), ya que CGB son consideradas células no diferenciadas completamente. La acumulación rápida de nNOS en cultivos de CGB sugiere que un evento post transcripcional desencadenado por Glu es responsable del incremento de nNOS.

Está probado que el influjo de Ca^{2+} a través del intercambiador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ activado por la captura de Glu en CGB (Martinez-Lozada et al 2011) activa a nNOS pero también, evita su degradación. Además, se ha demostrado que la inhibición de la degradación proteosomal de nNOS mejora el transporte de glucosa (Mezghenna et al 2014), una característica en línea con los

hallazgos previos que vinculan la captura de Glu y glucosa en la glía de Bergmann (Mendez-Flores et al 2016).

Finalmente en esta tesis se proponen mecanismos moleculares novedosos que activa el Glu en CGB. Como se observa en la figura 37, la cascadas de señalización están estrechamente involucradas y por lo menos las que se estudiaron en esta tesis (mTOR y Ca^{2+} /CaM) trabajan en conjunto para regular las sinapsis glutamatérgicas y por lo tanto numerosos procesos neuronales.



49

Figura 32. Cascadas de señalización generadas por el Glutamato en BGC. El glutamato genera una serie de vías de señalización en células gliales que involucra PI3K/AKT/mTOR. mTOR fosforila a rpS6, la cual moviliza a mRNA de Glutamina sintetasa hacia los polisomas, ocasionando mayor traducción de este mRNA. Glutamina sintetasa cataliza la reacción de Glu a Gln que es liberada hacia el exterior de la célula glial por SNAT 3/5. Por otra parte, el influjo de Ca^{2+} promueve la activación de nNOS. El Óxido nítrico producido por nNOS regula la sinapsis glutamatérgicas y activa a sGC, ocasionando expresión de genes.

CONCLUSIONES

1. La fosforilación de rpS6 es dinámica y se puede observar las serinas 235/236 fosforiladas solo cuando el ribosoma está traduciendo.
2. El Glu regula la fosforilación de rpS6 en la fracciones polisomales, presentando un máximo de fosforilación a los 1 min.
3. Los GluR regulan la síntesis de proteínas mediante la fosforilación de rpS6.
4. El Glu induce la expresión de GS en CGB, observando un máximo de expresión a los 30 min.
5. La fosforilación de rpS6 puede ser la responsable de la regulación traduccional de GS en CGB.
6. La región 5'UTR de mRNA de GS tiene una secuencia de 14 pirimidinas a -34 pb.
7. El aumento en la expresión de GS detectado con la exposición a Glu coincide con la actividad de GLAST/EAAT1.
8. El Glu induce la expresión de nNOS en CGB, observando un máximo de expresión a los 15 min.
9. El efecto de Glu, mediado por GLAS/EAAT1, favorece la estabilidad de nNOS aumentando la vida media de la proteína y evitando su degradación.
10. El tratamiento con Glu favorece la síntesis de Óxido nítrico en CGB, observando un máximo de síntesis a los 15 min de tratamiento con Glu.

CONCLUSIÓN GENERAL

El Glu regula procesos bioquímicos y moleculares que contribuyen a la regulación de las sinapsis glutamatérgicas de células gliales. Esta regulación puede llevarse a cabo mediante la regulación de la síntesis de proteínas a través de la vía de señalización PI3K/AKT/mTOR, favoreciendo la síntesis de proteínas esenciales del reciclaje de Glu, como la GS. Además, el Glu induce la expresión de nNOS y por lo tanto la síntesis de óxido nítrico. El Óxido nítrico puede ser un mensajero extracelular que posiblemente contribuya a la regulación de las sinapsis glutamatérgicas.

REFERENCIAS

- Aguirre A, Lopez-Bayghen E, Ortega A. 2002. Glutamate-dependent transcriptional regulation of the *chkbp* gene: signaling mechanisms. *J Neurosci Res* 70: 117-27
- 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: 39246-53
- Alessi DR, Kozlowski MT, Weng QP, Morrice N, Avruch J. 1998. 3-Phosphoinositide-dependent protein kinase 1 (PDK1) phosphorylates and activates the p70 S6 kinase in vivo and in vitro. *Curr Biol* 8: 69-81
- Anderson CM, Swanson RA. 2000. Astrocyte glutamate transport: review of properties, regulation, and physiological functions. *Glia* 32: 1-14
- Avruch J, Hara K, Lin Y, Liu M, Long X, et al. 2006. Insulin and amino-acid regulation of mTOR signaling and kinase activity through the Rheb GTPase. *Oncogene* 25: 6361-72
- Balderas A, Guillem AM, Martinez-Lozada Z, Hernandez-Kelly LC, Aguilera J, Ortega A. 2014. GLAST/EAAT1 regulation in cultured Bergmann glia cells: role of the NO/cGMP signaling pathway. *Neurochemistry international* 73: 139-45
- Baltrons MA, Garcia A. 1997. AMPA receptors are coupled to the nitric oxide/cyclic GMP pathway in cerebellar astroglial cells. *The European journal of neuroscience* 9: 2497-501
- Barrera I, Flores-Mendez M, Hernandez-Kelly LC, Cid L, Huerta M, et al. 2010. Glutamate regulates eEF1A phosphorylation and ribosomal transit time in Bergmann glial cells. *Neurochemistry international* 57: 795-803
- Barrera I, Hernandez-Kelly LC, Castelan F, Ortega A. 2008. Glutamate-dependent elongation factor-2 phosphorylation in Bergmann glial cells. *Neurochem Int* 52: 1167-75
- Bastian MMaAJ. 2007. Cerebellum and the deciphering of motor coding. *The Cerebellum* 6: 3-6
- Belham C, Wu SL, Avruch J. 1999. Intracellular signalling: PDK1 - a kinase at the hub of things. *Curr Biol* 9: R93-R96
- Bhaskar PT, Hay N. 2007. The two TORCs and Akt. *Dev Cell* 12: 487-502
- Bleakman D, Alt A, Nisenbaum ES. 2006. Glutamate receptors and pain. *Semin Cell Dev Biol* 17: 592-604
- Boehning D, Snyder SH. 2003. Novel neural modulators. *Annual review of neuroscience* 26: 105-31
- Boksha IS, Schonfeld HJ, Langen H, Muller F, Tereshkina EB, Burbaeva G. 2002. Glutamine synthetase isolated from human brain: octameric structure and homology of partial primary structure with human liver glutamine synthetase. *Biochemistry. Biokhimiia* 67: 1012-20
- Boksha IS, Tereshkina EB, Burbaeva G. 1995. [Isolation and certain properties of human brain glutamine synthetase]. *Biokhimiia* 60: 1697-705
- Boksha IS, Tereshkina EB, Burbaeva GS. 2000. Glutamine synthetase and glutamine synthetase-like protein from human brain: purification and comparative characterization. *Journal of neurochemistry* 75: 2574-82
- Bordey A, Sontheimer H. 2000. Ion channel expression by astrocytes in situ: comparison of different CNS regions. *Glia* 30: 27-38
- Brazil DP, Hemmings BA. 2001. Ten years of protein kinase B signalling: a hard Akt to follow. *Trends Biochem Sci* 26: 657-64
- Brusilow SW, Koehler RC, Traystman RJ, Cooper AJ. 2010. Astrocyte glutamine synthetase: importance in hyperammonemic syndromes and potential target for therapy. *Neurotherapeutics : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics* 7: 452-70
- Buffo A, Rossi F. 2013. Origin, lineage and function of cerebellar glia. *Progress in neurobiology* 109: 42-63

- Calabrese V, Mancuso C, Calvani M, Rizzarelli E, Butterfield DA, Stella AM. 2007. Nitric oxide in the central nervous system: neuroprotection versus neurotoxicity. *Nature reviews. Neuroscience* 8: 766-75
- Caldani M, Rolland B, Fages C, Tardy M. 1982. Glutamine synthetase activity during mouse brain development. *Experientia* 38: 1199-202
- Camacho A, Massieu L. 2006. Role of glutamate transporters in the clearance and release of glutamate during ischemia and its relation to neuronal death. *Arch Med Res* 37: 11-8
- Cantrell DA. 2001. Phosphoinositide 3-kinase signalling pathways. *J Cell Sci* 114: 1439-45
- Cid ME, Ortega A. 1993. Glutamate stimulates [³H]phorbol 12,13-dibutyrate binding in cultured Bergmann glia cells. *Eur J Pharmacol* 245: 51-4
- Clapp KM, Peng HM, Jenkins GJ, Ford MJ, Morishima Y, et al. 2012. Ubiquitination of neuronal nitric-oxide synthase in the calmodulin-binding site triggers proteasomal degradation of the protein. *The Journal of biological chemistry* 287: 42601-10
- Clèries R GJ, Espino M et al. 2012. BootstRatio: a webbased statistical analysis of fold-change in qPCR and RT-qPCR data using resampling methods. *Comput Biol Med* 42: 438-45
- Coutinho V, Knopfel T. 2002. Metabotropic glutamate receptors: electrical and chemical signaling properties. *Neuroscientist* 8: 551-61
- Chen L, Tracy T, Nam CI. 2007. Dynamics of postsynaptic glutamate receptor targeting. *Curr Opin Neurobiol* 17: 53-8
- Chen PE, Wyllie DJ. 2006. Pharmacological insights obtained from structure-function studies of ionotropic glutamate receptors. *Br J Pharmacol* 147: 839-53
- D'Angelo E. 2018. Physiology of the cerebellum. *Handbook of clinical neurology* 154: 85-108
- Daikhin Y, Yudkoff M. 2000. Compartmentation of brain glutamate metabolism in neurons and glia. *The Journal of nutrition* 130: 1026S-31S
- Danbolt NC. 2001. Glutamate uptake. *Prog Neurobiol* 65: 1-105
- Danbolt NC, Furness DN, Zhou Y. 2016. Neuronal vs glial glutamate uptake: Resolving the conundrum. *Neurochemistry international* 98: 29-45
- Del Cerro M, Swarz JR. 1976. Prenatal development of Bergmann glial fibres in rodent cerebellum. *J Neurocytol* 5: 669-76
- Delgado-Garcia JM. 2001. [Structure and function of the cerebellum]. *Revista de neurologia* 33: 635-42
- Eisenberg D, Gill HS, Pfluegl GM, Rotstein SH. 2000. Structure-function relationships of glutamine synthetases. *Biochimica et biophysica acta* 1477: 122-45
- Fields RD, Stevens-Graham B. 2002. New insights into neuron-glia communication. *Science* 298: 556-62
- Flores-Mendez M, Escalante-Lopez M, Martinez-Lozada Z, Hernandez-Kelly LC, Najimi M, et al. 2015. Glutamate-dependent translational control through ribosomal protein S6 phosphorylation in cultured bergmann glial cells. *Neurochemical research* 40: 915-23
- Foster AC, Kemp JA. 2006. Glutamate- and GABA-based CNS therapeutics. *Curr Opin Pharmacol* 6: 7-17
- Franco R, Rosenfeld MG. 1990. Hormonally inducible phosphorylation of a nuclear pool of ribosomal protein S6. *J Biol Chem* 265: 4321-5
- García R. HE, Concha A., Pérez C. 2008. The cerebellum and its functions. *Rev Med UV*: 24-30
- Garthwaite J, Garthwaite G, Palmer RM, Moncada S. 1989. NMDA receptor activation induces nitric oxide synthesis from arginine in rat brain slices. *European journal of pharmacology* 172: 413-6
- Geiger JR, Melcher T, Koh DS, Sakmann B, Seeburg PH, et al. 1995. Relative abundance of subunit mRNAs determines gating and Ca²⁺ permeability of AMPA receptors in principal neurons and interneurons in rat CNS. *Neuron* 15: 193-204

- Geyer PK, Meyuhas O, Perry RP, Johnson LF. 1982. Regulation of ribosomal protein mRNA content and translation in growth-stimulated mouse fibroblasts. *Molecular and cellular biology* 2: 685-93
- 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: 1389-98
- Grewer C, Gameiro A, Zhang Z, Tao Z, Braams S, Rauen T. 2008. Glutamate forward and reverse transport: from molecular mechanism to transporter-mediated release after ischemia. *IUBMB Life* 60: 609-19
- Haghighat N. 2005. Estrogen (17beta-estradiol) enhances glutamine synthetase activity in C6-glioma cells. *Neurochemical research* 30: 661-7
- Hahn-Windgassen A, Nogueira V, Chen CC, Skeen JE, Sonenberg N, Hay N. 2005. Akt activates the mammalian target of rapamycin by regulating cellular ATP level and AMPK activity. *J Biol Chem* 280: 32081-9
- Halassa MM, Fellin T, Haydon PG. 2007. The tripartite synapse: roles for gliotransmission in health and disease. *Trends Mol Med* 13: 54-63
- Hay N, Sonenberg N. 2004. Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev* 18: 1926-45
- Hershey JW. 1989. Protein phosphorylation controls translation rates. *J Biol Chem* 264: 20823-6
- Hertz L, Peng L, Dienel GA. 2007. Energy metabolism in astrocytes: high rate of oxidative metabolism and spatiotemporal dependence on glycolysis/glycogenolysis. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 27: 219-49
- <http://www.intechopen.com/books/nitric-oxide-synthase-simpleenzyme-complex-roles>. 2017. Role of Nitric Oxide Synthase in the Function of the Central Nervous System under Normal and Infectious Conditions.
- Inoki K, Zhu T, Guan KL. 2003. TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell* 115: 577-90
- Kantak SS, Stinear JW, Buch ER, Cohen LG. 2012. Rewiring the brain: potential role of the premotor cortex in motor control, learning, and recovery of function following brain injury. *Neurorehabilitation and neural repair* 26: 282-92
- Kasperska-Zajac A, Brus R. 2000. [The role of nitric oxide (NO) in central nervous system (CNS)]. *Neurologia i neurochirurgia polska* 34: 743-54
- Kawamura K, Murase S, Yuasa S. 1990. Development of the rodent cerebellum and synaptic reformation of donor climbing terminals on spines of the host Purkinje dendrites after chemical deafferentation. *The Journal of experimental biology* 153: 289-303
- Keller EL. 1989. The cerebellum. *Reviews of oculomotor research* 3: 391-411
- Kimura H. 1988. [Neurotransmitters and modulators in the cerebellum]. *Nihon yakurigaku zasshi. Folia pharmacologica Japonica* 92: 337-47
- Krajewski WW, Collins R, Holmberg-Schiavone L, Jones TA, Karlberg T, Mowbray SL. 2008. Crystal structures of mammalian glutamine synthetases illustrate substrate-induced conformational changes and provide opportunities for drug and herbicide design. *Journal of molecular biology* 375: 217-28
- Krieg J, Hofsteenge J, Thomas G. 1988. Identification of the 40 S ribosomal protein S6 phosphorylation sites induced by cycloheximide. *J Biol Chem* 263: 11473-7
- Kruger T, Zentgraf H, Scheer U. 2007. Intranucleolar sites of ribosome biogenesis defined by the localization of early binding ribosomal proteins. *The Journal of cell biology* 177: 573-8
- Krukoff TL. 1999. Central actions of nitric oxide in regulation of autonomic functions. *Brain research. Brain research reviews* 30: 52-65

- Kumar S, Holmes E, Scully S, Birren BW, Wilson RH, de Vellis J. 1986. The hormonal regulation of gene expression of glial markers: glutamine synthetase and glycerol phosphate dehydrogenase in primary cultures of rat brain and in C6 cell line. *Journal of neuroscience research* 16: 251-64
- Larsell O. 1951. *The comparative anatomy and histology of the cerebellum*. Minneapolis.
- Lawlor MA, Alessi DR. 2001. PKB/Akt: a key mediator of cell proliferation, survival and insulin responses? *J Cell Sci* 114: 2903-10
- Leslie NR, Downes CP. 2002. PTEN: The down side of PI 3-kinase signalling. *Cell Signal* 14: 285-95
- Lie-Venema H, Hakvoort TB, van Hemert FJ, Moorman AF, Lamers WH. 1998. Regulation of the spatiotemporal pattern of expression of the glutamine synthetase gene. *Progress in nucleic acid research and molecular biology* 61: 243-308
- Lippman JJ, Lordkipanidze T, Buell ME, Yoon SO, Dunaevsky A. 2008. Morphogenesis and regulation of Bergmann glial processes during Purkinje cell dendritic spine ensheathment and synaptogenesis. *Glia* 56: 1463-77
- Listrom CD, Morizono H, Rajagopal BS, McCann MT, Tuchman M, Allewell NM. 1997. Expression, purification, and characterization of recombinant human glutamine synthetase. *The Biochemical journal* 328 (Pt 1): 159-63
- Lopez-Bayghen E, Aguirre A, Ortega A. 2003a. Transcriptional regulation through glutamate receptors: Involvement of tyrosine kinases. *J Neurosci Res* 74: 717-25
- Lopez-Bayghen E, Espinoza-Rojo M, Ortega A. 2003b. Glutamate down-regulates GLAST expression through AMPA receptors in Bergmann glial cells. *Brain Res Mol Brain Res* 115: 1-9
- Lopez-Colome AM, Lopez E, Mendez-Flores OG, Ortega A. 2016. Glutamate Receptor Stimulation Up-Regulates Glutamate Uptake in Human Muller Glia Cells. *Neurochemical research* 41: 1797-805
- Lopez-Colome AM, Ortega A. 1997. Activation of p42 mitogen-activated protein kinase by glutamate in cultured radial glia. *Neurochem Res* 22: 679-85
- Lopez T, Lopez-Colome AM, Ortega A. 1997. NMDA receptors in cultured radial glia. *FEBS letters* 405: 245-8
- 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: 40-6
- Madden DR. 2002. The structure and function of glutamate receptor ion channels. *Nat Rev Neurosci* 3: 91-101
- Marin P, Nastsiuk KL, Daniel N, Girault JA, Czernik AJ, et al. 1997. Glutamate-dependent phosphorylation of elongation factor-2 and inhibition of protein synthesis in neurons. *J Neurosci* 17: 3445-54
- Martinez-Lozada Z, Guillem AM, Flores-Mendez M, Hernandez-Kelly LC, Vela C, et al. 2013. GLAST/EAAT1-induced glutamine release via SNAT3 in Bergmann glial cells: evidence of a functional and physical coupling. *Journal of neurochemistry* 125: 545-54
- Martinez-Lozada Z, Hernandez-Kelly LC, Aguilera J, Lopez-Bayghen E, Ortega A. 2011. Signaling through EAAT-1/GLAST in cultured Bergmann glia cells. *Neurochemistry international* 59: 871-9
- Martinez-Lozada Z, Ortega A. 2015. Glutamatergic Transmission: A Matter of Three. *Neural plasticity* 2015: 787396
- Massaquoi SG. 2012. Physiology of clinical dysfunction of the cerebellum. *Handbook of clinical neurology* 103: 37-62
- Matt E, Amini A, Aslan T, Schmidhammer R, Beisteiner R. 2018. Primary motor cortex deactivation as a new mechanism of motor inhibition in conversion paralysis. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*

- Mattson MP. 2008. Glutamate and neurotrophic factors in neuronal plasticity and disease. *Ann N Y Acad Sci* 1144: 97-112
- McBain CJ, Mayer ML. 1994. N-methyl-D-aspartic acid receptor structure and function. *Physiol Rev* 74: 723-60
- McCann SM. 1997. The nitric oxide hypothesis of brain aging. *Experimental gerontology* 32: 431-40
- McKenna MC. 2007. The glutamate-glutamine cycle is not stoichiometric: fates of glutamate in brain. *Journal of neuroscience research* 85: 3347-58
- McKenna MC, Stridh MH, McNair LF, Sonnewald U, Waagepetersen HS, Schousboe A. 2016. Glutamate oxidation in astrocytes: Roles of glutamate dehydrogenase and aminotransferases. *Journal of neuroscience research* 94: 1561-71
- Mendez-Flores OG, Hernandez-Kelly LC, Suarez-Pozos E, Najimi M, Ortega A. 2016. Coupling of glutamate and glucose uptake in cultured Bergmann glial cells. *Neurochemistry international* 98: 72-81
- Mendez JA, Lopez-Bayghen E, Ortega A. 2005. Glutamate activation of Oct-2 in cultured chick Bergmann glia cells: involvement of NFkappaB. *J Neurosci Res* 81: 21-30
- Meyuhas O. 2000. Synthesis of the translational apparatus is regulated at the translational level. *Eur J Biochem* 267: 6321-30
- Meyuhas O. 2008. Physiological roles of ribosomal protein S6: one of its kind. *International review of cell and molecular biology* 268: 1-37
- Meyuhas O. 2015. Ribosomal Protein S6 Phosphorylation: Four Decades of Research. *International review of cell and molecular biology* 320: 41-73
- Mezghenna K, Leroy J, Azay-Milhau J, Tusch D, Castex F, et al. 2014. Counteracting neuronal nitric oxide synthase proteasomal degradation improves glucose transport in insulin-resistant skeletal muscle from Zucker fa/fa rats. *Diabetologia* 57: 177-86
- Millan A, Arias-Montano JA, Mendez JA, Hernandez-Kelly LC, Ortega A. 2004. Alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptors signaling complexes in Bergmann glia. *J Neurosci Res* 78: 56-63
- Moepps B, Fagni L. 2003. Mont Sainte-Odile: a sanctuary for GPCRs. Confidence on signal transduction of G-protein-couple receptors. *EMBO Rep* 4: 237-43
- Mugnaini E, Dino MR, Jaarsma D. 1997. The unipolar brush cells of the mammalian cerebellum and cochlear nucleus: cytology and microcircuitry. *Progress in brain research* 114: 131-50
- Mugnaini E, Floris A, Wright-Goss M. 1994. Extraordinary synapses of the unipolar brush cell: an electron microscopic study in the rat cerebellum. *Synapse* 16: 284-311
- Muller T, Moller T, Berger T, Schnitzer J, Kettenmann H. 1992. Calcium entry through kainate receptors and resulting potassium-channel blockade in Bergmann glial cells. *Science* 256: 1563-6
- Nedergaard M, Takano T, Hansen AJ. 2002. Beyond the role of glutamate as a neurotransmitter. *Nat Rev Neurosci* 3: 748-55
- Ortega A, Eshhar N, Teichberg VI. 1991. Properties of kainate receptor/channels on cultured Bergmann glia. *Neuroscience* 41: 335-49
- Pakhotin P, Verkhratsky A. 2005. Electrical synapses between Bergmann glial cells and Purkinje neurones in rat cerebellar slices. *Mol Cell Neurosci* 28: 79-84
- Parmigiani E, Leto K, Rolando C, Figueres-Onate M, Lopez-Mascaraque L, et al. 2015. Heterogeneity and Bipotency of Astroglial-Like Cerebellar Progenitors along the Interneuron and Glial Lineages. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 35: 7388-402
- Pellerin L, Bouzier-Sore AK, Aubert A, Serres S, Merle M, et al. 2007. Activity-dependent regulation of energy metabolism by astrocytes: an update. *Glia* 55: 1251-62

- Pellerin L, Stolz M, Sorg O, Martin JL, Deschepper CF, Magistretti PJ. 1997. Regulation of energy metabolism by neurotransmitters in astrocytes in primary culture and in an immortalized cell line. *Glia* 21: 74-83
- Pende M, Um SH, Mieulet V, Sticker M, Goss VL, et al. 2004. S6K1(-)/S6K2(-) mice exhibit perinatal lethality and rapamycin-sensitive 5'-terminal oligopyrimidine mRNA translation and reveal a mitogen-activated protein kinase-dependent S6 kinase pathway. *Mol Cell Biol* 24: 3112-24
- Perego C, Vanoni C, Bossi M, Massari S, Basudev H, et al. 2000. The GLT-1 and GLAST glutamate transporters are expressed on morphologically distinct astrocytes and regulated by neuronal activity in primary hippocampal cocultures. *Journal of neurochemistry* 75: 1076-84
- Potter CJ, Pedraza LG, Xu T. 2002. Akt regulates growth by directly phosphorylating Tsc2. *Nat Cell Biol* 4: 658-65
- Pow DV, Barnett NL. 2000. Developmental expression of excitatory amino acid transporter 5: a photoreceptor and bipolar cell glutamate transporter in rat retina. *Neuroscience letters* 280: 21-4
- Prebil M, Jensen J, Zorec R, Kreft M. 2011. Astrocytes and energy metabolism. *Archives of physiology and biochemistry* 117: 64-9
- Ramnani N. 2006. The primate cortico-cerebellar system: anatomy and function. *Nature reviews. Neuroscience* 7: 511-22
- Reichenbach A, Siegel A, Rickmann M, Wolff JR, Noone D, Robinson SR. 1995. Distribution of Bergmann glial somata and processes: implications for function. *J Hirnforsch* 36: 509-17
- Reyes JC, Muro-Pastor MI, Florencio FJ. 1997. Transcription of glutamine synthetase genes (glnA and glnN) from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 is differently regulated in response to nitrogen availability. *Journal of bacteriology* 179: 2678-89
- Rosas S, Vargas MA, Lopez-Bayghen E, Ortega A. 2007. Glutamate-dependent transcriptional regulation of GLAST/EAAT1: a role for YY1. *Journal of neurochemistry* 101: 1134-44
- Rosenmund C, Stern-Bach Y, Stevens CF. 1998. The tetrameric structure of a glutamate receptor channel. *Science* 280: 1596-9
- Ruvinsky I, Meyuhas O. 2006. Ribosomal protein S6 phosphorylation: from protein synthesis to cell size. *Trends Biochem Sci* 31: 342-8
- Ruvinsky I, Sharon N, Lerer T, Cohen H, Stolovich-Rain M, et al. 2005. Ribosomal protein S6 phosphorylation is a determinant of cell size and glucose homeostasis. *Genes & development* 19: 2199-211
- Sancak Y, Thoreen CC, Peterson TR, Lindquist RA, Kang SA, et al. 2007. PRAS40 is an insulin-regulated inhibitor of the mTORC1 protein kinase. *Molecular Cell* 25: 903-15
- Sanchez G, Ortega A. 1994. AMPA/KA receptor induced AP-1 DNA binding activity in cultured Bergmann glia cells. *Neuroreport* 5: 2109-12
- Schousboe A, Scafidi S, Bak LK, Waagepetersen HS, McKenna MC. 2014. Glutamate metabolism in the brain focusing on astrocytes. *Advances in neurobiology* 11: 13-30
- Shin D, Park C. 2004. N-terminal extension of canine glutamine synthetase created by splicing alters its enzymatic property. *The Journal of biological chemistry* 279: 1184-90
- Sotelo C. 2015. Molecular layer interneurons of the cerebellum: developmental and morphological aspects. *Cerebellum* 14: 534-56
- Sottile V, Li M, Scotting PJ. 2006. Stem cell marker expression in the Bergmann glia population of the adult mouse brain. *Brain Res* 1099: 8-17
- Stoodley CJ, Limperopoulos C. 2016. Structure-function relationships in the developing cerebellum: Evidence from early-life cerebellar injury and neurodevelopmental disorders. *Seminars in fetal & neonatal medicine* 21: 356-64

- Strick PL, Dum RP, Fiez JA. 2009. Cerebellum and nonmotor function. *Annual review of neuroscience* 32: 413-34
- Tan DH, Peng SQ, Wu YL, Wang YM, Lu CF, Yan CH. 2009. Chronic organophosphate (OP)-induced neuropsychiatric disorder is a withdrawal syndrome. *Medical hypotheses* 72: 405-6
- Tanaka M, Kadokawa Y, Hamada Y, Marunouchi T. 1999. Notch2 expression negatively correlates with glial differentiation in the postnatal mouse brain. *Journal of neurobiology* 41: 524-39
- 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: 225-33
- Thach WT, Goodkin HP, Keating JG. 1992. The cerebellum and the adaptive coordination of movement. *Annual review of neuroscience* 15: 403-42
- Todd AC, Marx MC, Hulme SR, Broer S, Billups B. 2017. SNAT3-mediated glutamine transport in perisynaptic astrocytes in situ is regulated by intracellular sodium. *Glia* 65: 900-16
- Uchihori Y, Puro DG. 1993. Glutamate as a neuron-to-glial signal for mitogenesis: role of glial N-methyl-D-aspartate receptors. *Brain research* 613: 212-20
- Uwechue NM, Marx MC, Chevy Q, Billups B. 2012. Activation of glutamate transport evokes rapid glutamine release from perisynaptic astrocytes. *The Journal of physiology* 590: 2317-31
- van Rooyen JM, Abratt VR, Belrhali H, Sewell T. 2011. Crystal structure of Type III glutamine synthetase: surprising reversal of the inter-ring interface. *Structure* 19: 471-83
- Vander Haar E, Lee SI, Bandhakavi S, Griffin TJ, Kim DH. 2007. Insulin signalling to mTOR mediated by the Akt/PKB substrate PRAS40. *Nat Cell Biol* 9: 316-23
- Walton HS, Dodd PR. 2007. Glutamate-glutamine cycling in Alzheimer's disease. *Neurochemistry international* 50: 1052-66
- Yamada K, Hiramatsu M, Noda Y, Mamiya T, Murai M, et al. 1996. Role of nitric oxide and cyclic GMP in the dizocilpine-induced impairment of spontaneous alternation behavior in mice. *Neuroscience* 74: 365-74
- Yang CZ, Zhao R, Dong Y, Chen XQ, Yu AC. 2008. Astrocyte and neuron intone through glutamate. *Neurochem Res* 33: 2480-6
- Yang Q, Guan KL. 2007. Expanding mTOR signaling. *Cell Res* 17: 666-81
- Yi JH, Hazell AS. 2006. Excitotoxic mechanisms and the role of astrocytic glutamate transporters in traumatic brain injury. *Neurochem Int* 48: 394-403
- Zhao Y, Sohn JH, Warner JR. 2003. Autoregulation in the biosynthesis of ribosomes. *Molecular and cellular biology* 23: 699-707

