

CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS AVANZADOS DEL
INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

**“Regulación de la fosforilación de la proteína ribosomal
S6 por glutamato en células gliales de Bergmann”**

TESIS

Que presenta

IBQ. MIGUEL ÁNGEL ESCALANTE LÓPEZ

Para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE

GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

Directores de tesis:

Dr. Jaime García Mena

Dr. Arturo Ortega Soto

AGRADECIMIENTOS

Gracias, de corazón, a mis tutores, los doctores Jaime García Mena y Arturo Ortega Soto. Gracias por su paciencia, dedicación, motivación, criterio y aliento. Ha sido un privilegio poder contar con su guía y ayuda.

De la misma forma, agradezco a doctores Bulmaro Cisneros Vega y Samuel Zinker Ruzal por enriquecer mi formación profesional con sus observaciones y enseñanzas.

Agradezco la asesoría técnica de Luisa Clara Regina Hernández Kelly, Blanca Roció Ibarra López y Luis Ángel Cid Cid, del Departamento de Toxicología, Cinvestav-IPN por el entrenamiento en las metodologías realizadas en este trabajo.

A mi familia. Mis abuelos, Oscar y Yolanda, han sido mi mayor ejemplo a seguir desde que tengo memoria. Me enseñaron que una persona puede ser extraordinaria haciendo cosas ordinarias; y siempre han estado a mi lado apoyándome, cuidándome, amándome y dándome lecciones día a día. No tengo palabras para agradecer todo lo que han hecho por mi.

De mi madre, Patricia, aprendí a trabajar arduamente, siempre con un objetivo a cumplir. Gracias por cada sacrificio y momento que hemos compartido juntos. Estoy seguro que no podría estar escribiendo esto sin todo el apoyo y cariño que me haz brindado.

A mi padre, José Antonio, agradezco sus consejos y enseñanzas. Gracias por creer en mi, y al mismo tiempo exigir más de mi.

A mi hermano, Toño, le agradezco haberme soportado durante toda nuestra infancia, se que fue un poco difícil. Gracias por tantos momentos de diversión y por todo tu apoyo.

A mis amigos; siempre he tenido la firme convicción que ellos han moldeado mi vida de alguna u otra forma. Gracias Marc, Zila, Bruno, Edna, Orquidia y Donna por hacer del laboratorio un segundo hogar para mi. Y gracias Adriana (a.k.a Kurna), Josué, Adrián, Jorge, Lalo, Susana, Karina, Raquel, Beto, Alan, Gaby, Adib, Mich, Lobo, Karla, Carlota, Luis Enrique, Lilian, Luigi y Jerson por su amistad y confianza.

Y por ultimo, pero no menos importante, quiero agradecer especialmente a Carla. Gracias por ser mi mejor amiga, mi confidente, mi apoyo y mi motivo más hermoso para seguir adelante. Estoy totalmente seguro que tu eres la mujer con la que me gustaría compartir el resto de mi vida. Gracias por hacerme una mejor persona en todos los aspectos. Gracias por tu amor, tu cariño, tu tiempo, tu confianza, tus consejos, tus regaños, tu soporte y tu amistad. En otras palabras, gracias por existir. ¡Te amo exagerada y desmesuradamente!

El presente trabajo fue realizado en los Departamentos de Genética y Biología Molecular y de Toxicología del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del I.P.N. bajo la dirección de los Doctores Jaime García Mena y Arturo Ortega Soto, y con la asesoría de los Doctores Bulmaro Cisneros Vega y Samuel Zinker Ruzal.

Durante la realización del presente trabajo el autor contó con el apoyo de la beca 368543 del Consejo Nacional para la Ciencia y la Tecnología (CONACYT)

ÍNDICE DE CONTENIDOS

AGRADECIMIENTOS	2
RESUMEN	5
ABSTRACT	6
INTRODUCCIÓN	7
EL GLUTAMATO COMO NEUROTRANSMISOR	7
RECEPTORES GLUTAMATÉRGICOS	8
<i>Receptores ionotrópicos</i>	9
<i>Receptores metabotrópicos</i>	10
REMOCIÓN DEL GLUTAMATO EXTRACELULAR	11
<i>Transportadores de aminoácidos excitadores</i>	12
CÉLULAS GLIALES	14
<i>Células gliales de Bergmann</i>	16
CONTROL DE LA EXPRESIÓN GÉNICA	17
<i>Regulación de la traducción</i>	18
<i>Proteína ribosomal S6</i>	24
<i>Fosforilación de rpS6</i>	25
<i>Importancia fisiológica de la fosforilación de rpS6</i>	28
ANTECEDENTES	29
JUSTIFICACIÓN	33
OBJETIVO GENERAL	34
OBJETIVOS PARTICULARES	34
ESTRATEGÍA EXPERIMENTAL	35
MATERIALES Y MÉTODOS	36
MATERIALES	36
ANIMALES	36
CULTIVO CELULAR Y PROTOCOLO DE ESTIMULACIÓN	36
EXTRACTOS TOTALES	37
FRACCIONAMIENTO SUBCELULAR	37
DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS	38
INMUNODETECCIÓN EN FASE SÓLIDA	38
DESNUDAMIENTO DE LAS MEMBRANAS	39
INMUNOCITOQUÍMICA	40
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	40
RESULTADOS	41
EL GLU INDUCE LA FOSFORILACIÓN DE RPS6 EN CÉLULAS GLIALES BERGMANN	41
SEÑALIZACIÓN EN LA FOSFORILACIÓN DE RPS6 MEDIADA POR GLU	43
LA PROTEÍNA RIBOSOMAL S6 FOSFORILADA SE LOCALIZA PRINCIPALMENTE EN EL CITOPLASMA	45
DISCUSIÓN	47
CONCLUSIONES	51
PERSPECTIVAS	52
BIBLIOGRAFÍA	53

RESUMEN

El glutamato (Glu) es el principal neurotransmisor excitador del sistema nervioso central, regula la expresión genética a diferentes niveles a través de la activación de receptores y transportadores membranales específicos expresados tanto en neuronas y células gliales. En cultivos primarios de células gliales de Bergmann, obtenidas a partir de cerebelos de embriones de pollo, se ha descrito que este neurotransmisor puede desencadenar transducción de señales. Además, también se ha descrito que la activación de los receptores glutamatérgicos está vinculada a la modulación de incorporación de [³⁵S]-Met en los polipéptidos recién sintetizados. Con el fin de comprender mejor la transducción de señales que participa en este efecto, en el presente estudio se caracterizó la fosforilación de un componente crítico de la maquinaria traduccional, es decir, la proteína ribosomal S6 (rpS6). Se ha establecido que los sitios de fosforilación de rpS6 se encuentran en cinco residuos agrupados: Ser235, Ser236, Ser240, Ser244 y Ser247. Sin embargo, la fosforilación en Ser236 es el sitio de fosforilación primario. Las cinasas responsables de realizar esta modificación son: p70^{S6K} y p90^{RSK}. La fosforilación de rpS6 aumenta la afinidad de la subunidad ribosomal 40S hacia los ARN mensajeros, y por lo tanto facilita el inicio de la traducción. La exposición a glutamato produce un aumento en la fosforilación de rpS6, dependiente tanto de la dosis como del tiempo, en cultivos primarios de células gliales de Bergmann. Este efecto se observa principalmente en el citoplasma, e involucra la participación de la vía de señalización de la fosfatidilinositol-3-cinasa (PI3K/PKB). Estos resultados favorecen la noción de una continua señalización entre neuronas y células gliales, que regula el proteoma de estas células tanto a nivel transcripcional y traduccional.

ABSTRACT

Glutamate (Glu) the main excitatory neurotransmitter of the central nervous system regulates gene expression at different levels through the activation of specific membrane receptors and transporters expressed in neurons and glial cells. A membrane to nucleus signaling cascade triggered by this neurotransmitter has been described in cultured cerebellar Bergmann glia cells isolated from chick embryos. Furthermore, it has also been described that Glu receptors activation is linked to a modulation of [³⁵S]-methionine incorporation into newly synthesized polypeptides. In order to gain insight into the signal transduction cascades that participate in this effect, in the present study we characterized the phosphorylation of a critical component of the translational machinery, namely the ribosomal protein S6 (rpS6). The phosphorylation sites in rpS6 have been mapped to five clustered residues, Ser235, Ser236, Ser240, Ser244 and Ser247. Nevertheless, Ser236 phosphorylation is the primary phosphorylation site. The kinases responsible of this modification are p70^{S6K} and p90^{RSK}. rpS6 phosphorylation increases the affinity of 40S subunit for mRNAs and thus facilitates translational initiation. Glutamate exposure of cultured cerebellar Bergmann glial cells results in a time- and dose- dependent increase in rpS6 phosphorylation. This effect is mainly observed at cytoplasm, and involves the phosphoinositol-3 kinase/protein kinase B pathway. These results favor the notion of a continuous neuronal signaling to glia cells that regulates the proteome of these cells not only at the transcriptional level but also at the level of protein synthesis.

INTRODUCCIÓN

El glutamato como neurotransmisor

El amino ácido L-glutamato es considerado el principal mediador de la neurotransmisión excitatoria rápida en el Sistema Nervioso Central (SNC) de vertebrados, excitando virtualmente a cada neurona [1]. Aproximadamente el 80-90% de las sinapsis establecidas en el cerebro son glutamatérgicas, y por lo tanto el glutamato (Glu) está implicado en la mayoría de los aspectos relacionados con la función normal del cerebro, incluyendo la cognición, la memoria y el aprendizaje [2]. El Glu también desempeña un papel importante en el desarrollo del SNC, participando en la inducción y eliminación de sinapsis, migración, diferenciación y muerte celular.

El cerebro contiene enormes cantidades de Glu (aproximadamente 5-15 mmol por kg de peso húmedo, dependiendo de la región), pero sólo una pequeña fracción de este Glu está normalmente presente extracelularmente (normalmente alrededor de 3-4 μM). La concentración de Glu aumenta dramáticamente durante la neurotransmisión ($\sim 100\text{-}1000 \mu\text{M}$); y la repolarización de las membranas, que son despolarizadas durante la actividad glutamatérgica, puede representar hasta el 80% del gasto de energía en el cerebro [3]. Por lo tanto, el alto consumo de glucosa y oxígeno en el cerebro provee en gran medida la energía necesaria para la actividad glutamatérgica.

El Glu participa en muchas reacciones llevadas a cabo en el cerebro (Fig. 1). Es sintetizado a partir del α -cetoglutarato, y es un precursor del ácido γ -aminobutírico (GABA) en las neuronas GABAérgicas, y de glutamina en las células gliales [4], además de ser un constituyente de las proteínas y péptidos, por ejemplo: glutatión (γ -glutamil-cisteinil-glicina), que es una defensa importante contra el estrés oxidativo en las células.

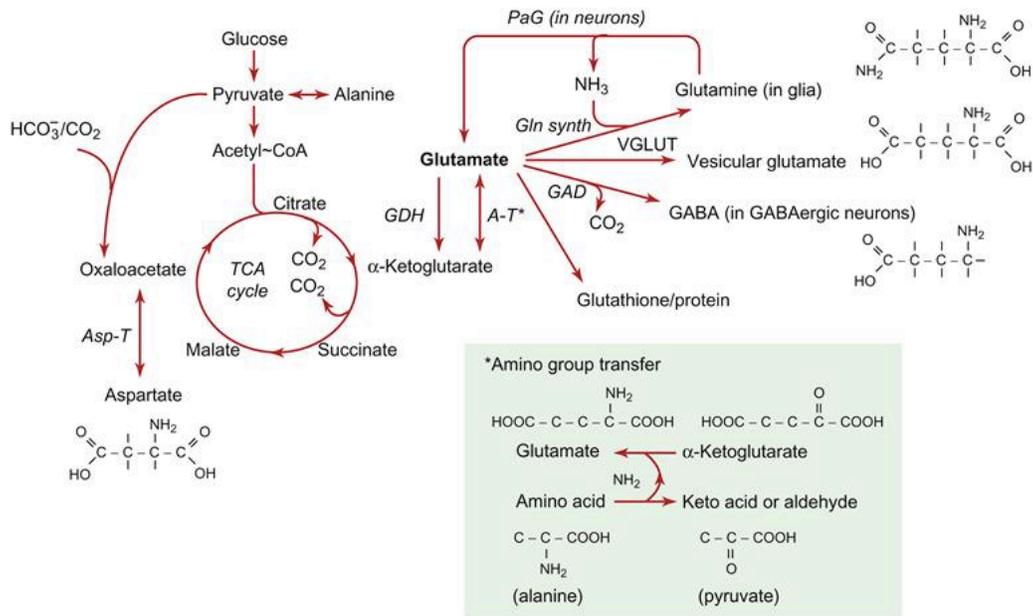


Figura 1. Síntesis, metabolismo y participación del glutamato en diferentes reacciones llevadas a cabo en el cerebro [5].

Tradicionalmente, se pensaba que el Glu ejercía sus funciones a través de la activación de receptores de membrana específicos, clasificados en dos grupos principales. Sin embargo, los recientes hallazgos sugieren la participación de los transportadores de Glu en la transducción de señales activada por este aminoácido. Estos receptores y transportadores se encuentran en la superficie, tanto de las células neuronales y gliales.

Receptores glutamatérgicos

Los receptores glutamatérgicos se han dividido en dos grandes grupos de acuerdo con su estructura y el sistema de traducción empleado. Los receptores ionotrópicos están formados por 4-5 subunidades que constituyen un canal iónico, mientras que los receptores metabotrópicos forman dímeros que se encuentran acoplados a proteínas G triméricas [6].

Receptores ionotrópicos

Los receptores ionotrópicos se han subdividido según sus propiedades electrofisiológicas, farmacológicas y la homología entre sus secuencias en subfamilias. La primera subdivisión depende de un criterio farmacológico bien establecido, su activación por el N-metil-D-aspartato (NMDA). Este criterio, conformado a mediados de la década de los cincuenta del siglo pasado, concuerda perfectamente con el criterio molecular; sin embargo, la variedad molecular y el ensamblaje diferencial de las subunidades que componen estos receptores rebasa ampliamente la variedad farmacológica. Molecularmente se han descrito tres subfamilias de receptores NMDA y tres de receptores no NMDA [6].

Los receptores NMDA son canales iónicos abiertos por ligando y regulados por voltaje. En condiciones de reposo, el canal está bloqueado por Mg^{2+} de una manera dependiente de voltaje. Además, el canal requiere de glicina para activarse eficientemente; asimismo es regulado por poliaminas y Zn^{2+} . Los receptores NMDA están formados por cuatro subunidades y por lo menos una de estas subunidades debe ser la subunidad GluN1 [6].

Los receptores no NMDA están formados por dos subgrupos, los receptores al ácido α -amino-3-hidroxi-5-isoxazol propiónico (AMPA) y los receptores kainato [7]. La familia de los receptores AMPA está formada por cuatro subunidades denominadas GluA1, GluA2, GluA3 y GluA4. Estas subunidades pueden ensamblarse entre sí y generar canales con diferentes propiedades electrofisiológicas. Además, cada subunidad presenta dos variantes de corte y empalme alternativo, las isoformas denominadas *flip/flop*. Por otra parte, el ARN mensajero (ARNm) de la subunidad GluA2 puede ser editado por la adenosina deaminasa tipo 2 (ADAR2), cuyo sustrato es una adenosina no apareada en una estructura del ARN que no presenta estructura de dúplex. La desaminación de la adenina la transforma en inosina, con la consecuente modificación del anticodón correspondiente, lo que durante el proceso de la traducción origina el cambio de una glutamina por un arginina en el segmento reentrante TMII y provoca un

cambio en la selectividad del poro iónico, haciendo que el canal sea más permeable a sodio. Es de esta manera que los receptores que contienen al menos una subunidad GluA2 son preferentemente permeables a sodio [6].

Los receptores KA están constituidos por dos subfamilias, los receptores KA de baja afinidad y los receptores KA de alta afinidad. Las subunidades GluK1, GluK2 y GluK3 constituyen los receptores de baja afinidad, ya que en ensayos de unión de [³H]-KA presentan una constante de afinidad de alrededor de 80 nM. Al coensamblarse, éstos forman canales iónicos funcionales. Dentro de esta familia génica se encuentra la denominada proteína de unión a KA (KBP), que no forma canales funcionales ni al coensamblarse con las otras subunidades. Los receptores de alta afinidad corresponden a las subunidades GluK4 y GluK5, que en ensayos de unión presentan una afinidad de 5 nM, pero que por sí solas no forman canales funcionales. Sin embargo, al coexpresarse con las subunidades GluK1, GluK2 o GluK3, cambian los parámetros cinéticos del canal iónico, por lo que se dice que son subunidades moduladoras [8].

Receptores metabotrópicos

Los receptores metabotrópicos son proteínas de siete segmentos transmembranales acoplados a proteínas G y presentan un extremo aminoterminal extenso. La homología con otros receptores acoplados a proteínas G (GPCR) es baja, de hecho constituyen una familia génica diferente de la cual también es miembro el receptor de Ca²⁺. De acuerdo con su secuencia, los receptores glutamatérgicos metabotrópicos se han dividido en tres clases. La clase I está constituida por mGlu1 y mGlu5. Al expresarse en sistemas heterólogos, estos receptores se acoplan al metabolismo de los fosfoinosítidos. Presentan cuatro variantes de procesamiento (dos por cada subunidad) y son activados preferencialmente por el ácido quisquálico y por otros agonistas tales como la 3,5-dihidroxiifenilglicina (DHPG). Al parecer es necesario que formen homodímeros para activarse [9]. La clase II está formada por las subunidades mGlu2 y mGlu3; estos receptores están acoplados a

proteínas G_i; al parecer no presentan isoformas por corte y empalme alternativo y su principal agonista es el ácido 2R, 4R-4-amino pirrolidon-2,4-dicarboxílico (2R, 4R-4-ACPD). Al la clase III pertenecen las subunidades mGlu4, mGlu6 y mGlu8, y aunque también están acoplados a la inhibición de la adenilato ciclasa, su agonista principal es el ácido L-amino-4-fosfonobutírico (L-AP4).

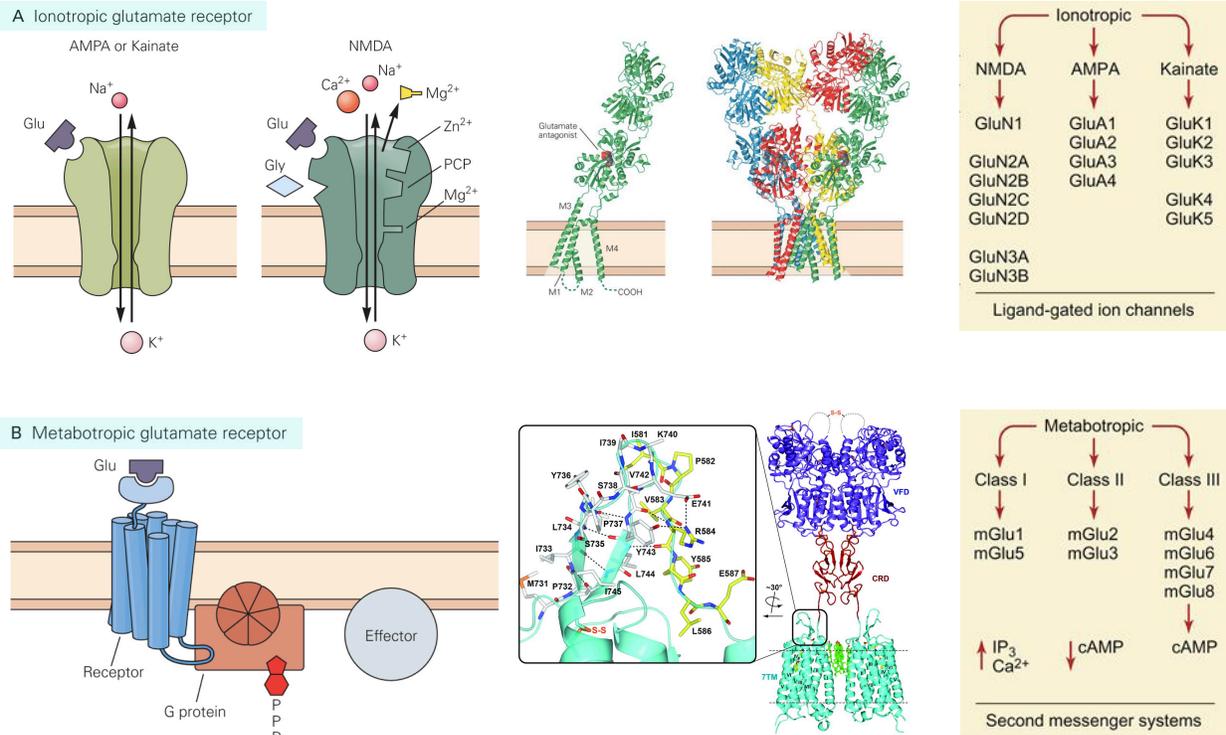


Figura 2. Receptores glutamatergicos y sus familias moleculares. Tanto los receptores ionotrópicos y metabotrópicos se subdividen en tres grupos. Estos grupos se componen de numerosas subunidades codificadas en genes diferentes. A. receptores ionotrópicos; B receptores metabotrópicos (Adaptado de [10]).

Remoción del glutamato extracelular

La activación excesiva de los receptores de Glu es dañina, puede matar neuronas [11] y oligodendrocitos [12].

Se ha demostrado que la activación de receptores glutamatergicos ionotrópicos incrementa el consumo de energía [13,14] lo que lleva a un influjo de Na⁺ y Ca²⁺ que tiene que ser contrarrestado con un proceso dependiente de energía, lo cual

hace que las neuronas sean vulnerables al Glu después de periodos largos de privación de energía [15]. La activación de receptores de Glu genera especies reactivas de oxígeno [16]. Por lo que, es de suma importancia mantener baja la concentración extracelular de este neurotransmisor.

No se ha encontrado ninguna enzima extracelular capaz de metabolizar significativamente el Glu; en consecuencia, la única manera rápida para retirarlo del medio de extracelular es por captura celular [17]. La captura de Glu es llevada a cabo por proteínas integrales de membrana, que utilizan los gradientes electroquímicos a través de las membranas plasmáticas como fuerza motriz para la internalizar a este neurotransmisor.

Transportadores de aminoácidos excitadores

Hasta la fecha se han caracterizado cinco subtipos de transportadores de Glu, denominados transportadores de aminoácidos excitadores (EAAT-1 a 5) (Fig 3). Estos transportadores presentan patrones de distribución y propiedades cinéticas diferentes en las distintas regiones del cerebro.

Los transportadores EAAT-1 y EAAT-2, conocidos como GLAST y GLT-1, respectivamente, se expresan casi de forma exclusiva en células gliales [18]. GLAST se expresa abundantemente en el cerebelo, mientras que GLT-1 está presente sobre todo en el cerebro anterior. Los transportadores EAAT-3 y EAAT-4 son de expresión neuronal. Particularmente, EAAT-4 se expresa en las células de Purkinje en el cerebelo, mientras que EAAT-3 es abundante en neuronas corticales. Por otra parte, la expresión de EAAT-5 es casi exclusiva de la retina.

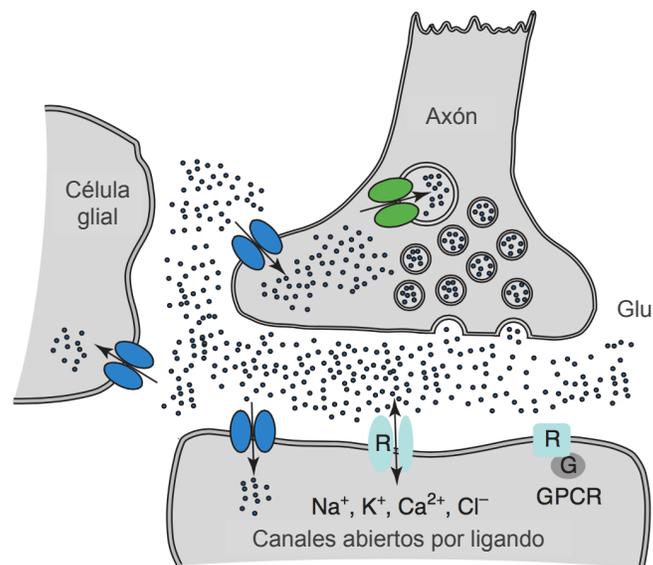
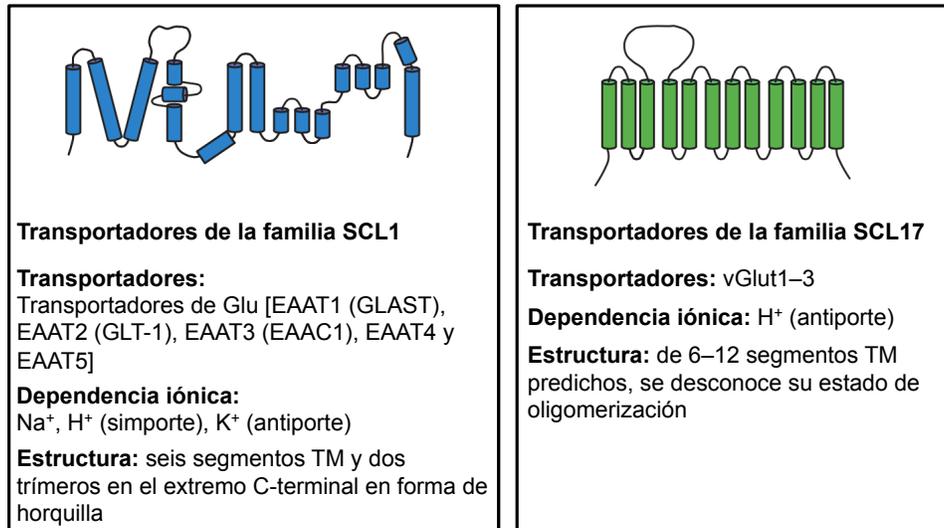


Figura 3. Familias de transportadores glutamatergicos. En las terminales nerviosas pre-sinápticas de sinapsis glutamatergicas, los transportadores vesiculares de glutamato (vGlut1-3; verde), pertenecientes a la familia de genes SCL17, acumulan el Glu en vesículas sinápticas para poder ser liberado posteriormente. El glutamato ejerce sus funciones a través de los receptores ionotrópicos y metabotrópicos (cian). Los transportadores responsables de remover el Glu del medio extracelular pertenecen a la familia de genes SCL1 (EAATs1-5; azul), y están presentes en las membranas plasmáticas de neuronas pre-sinápticas, células gliales adyacentes y neuronas post-sinápticas. (Adaptado de [19]).

De manera general, los transportadores glutamatergicos comparten varias características, como su peso molecular, en el rango de 65 a 77 kDa y que varía de acuerdo con el grado de glicosilación; aunque presentan una homología del

50% en su estructura, sus propiedades y su regulación son diferentes. Por ejemplo, mientras que para GLT-1 se conocen las consecuencias funcionales de su fosforilación (un incremento en su actividad de captura de Glu), no ha podido caracterizarse el efecto de la fosforilación de GLAST. La mutación 'sitiodirigida' de los residuos que se fosforilan en GLAST no impide la disminución en su actividad. Al parecer, diversas cinasas actúan sobre las moléculas responsables de la inserción o remoción de los transportadores en la membrana plasmática [20].

Células gliales

Existen dos tipos de células gliales: microglía y macroglía. Las células macrogliales comprenden los oligodendrocitos y los astrocitos. Los oligodendrocitos son células especializadas en la formación de la capa de mielina que rodea los axones de algunas neuronas. Por su parte, los astrocitos participan en la formación de la barrera hematoencefálica, la supervivencia y la diferenciación neuronales, la regulación de la concentración de iones, el volumen extracelular, la regeneración, la migración neuronal y la captura de glucosa, entre otras muchas funciones [21].

En las primeras etapas del desarrollo, la denominada glía radial es uno de los primeros tipos gliales en aparecer. Estas células presentan una morfología bipolar y expresan marcadores específicos como tenascina y vimentina, fundamentales para determinar los patrones de migración neuronal [22]. A partir del nacimiento, estas células inician un proceso denominado 'conversión astrocítica', pierden su morfología bipolar, además de la expresión de vimentina, y aumenta la expresión de la proteína acídica fibrilar glial (GFAP). Esta conversión es reversible y regulada por factores secretados por las neuronas [23].

Tanto en el cerebelo como en la retina hay poblaciones de glía radial que permanecen en el individuo adulto: las células de Müller en la retina y las células de Bergmann en el cerebelo [24]. Ambos tipos celulares rodean sinapsis

glutamatérgicas; las células de Müller circundan dos sinapsis, las establecidas entre las células bipolares y el fotorreceptor, y las formadas por las células ganglionares y las mencionadas células bipolares [25]. Por otra parte, las células de Bergmann se ubican en la capa molecular de la corteza cerebelosa, donde envuelven las sinapsis formadas por los axones de las células granulares (también llamadas fibras paralelas) y las dendritas de las células de Purkinje (Figs. 4 y 5) [26].

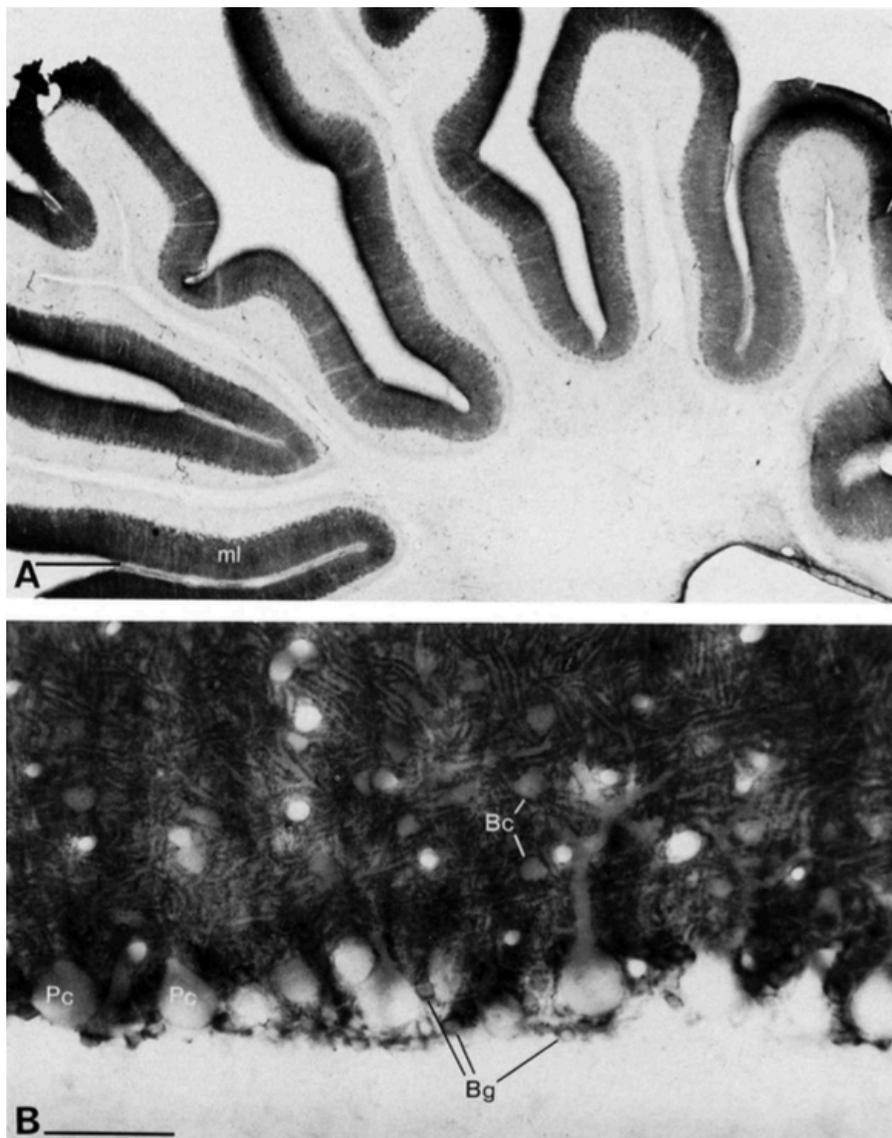


Figura 4. Rebanadas (50 μm de espesor) de cerebelo de pollo de 17 días de edad. A. La inmunorreactividad detectada por el anticuerpo IX-50 se localiza en las capas molecular (ml) y de

Purkinje. Los puntos en la capa granular, en la sustancia blanca y en los núcleos profundos del cerebelo no son sitios inmunorreactivos. Representan glóbulos rojos, ya que presentan actividad de la enzima peroxidasa. (B) A mayor magnificación, la inmunorreactividad esboza las células de Purkinje (PC), sus dendritas, células en canasta (Bc), y también parece estar asociada con las células gliales de Bergmann (Bg). Barras de escala: A = 500 μ m; B = 50 μ m [26].

Células gliales de Bergmann

Las células gliales de Bergmann (CGB) es el tipo de célula glial más abundante en la corteza del cerebelo de los vertebrados adultos y se la considera como un tipo de astrocito especializado .

Durante el desarrollo, los procesos de las CGB proveen soporte estructural en la placa cerebelar, sus pies terminales se adhieren para formar una capa continua de glía limitando el cerebelo. Las fibras radiales de las CGB también actúan como una guía esencial para la migración de las células granulares [27]. Una vez terminada la morfogénesis cerebelar, las CGB permanecen como un soporte estructural importante, pero además tienen papeles adicionales en el mantenimiento, función y plasticidad de la sinapsis [28].

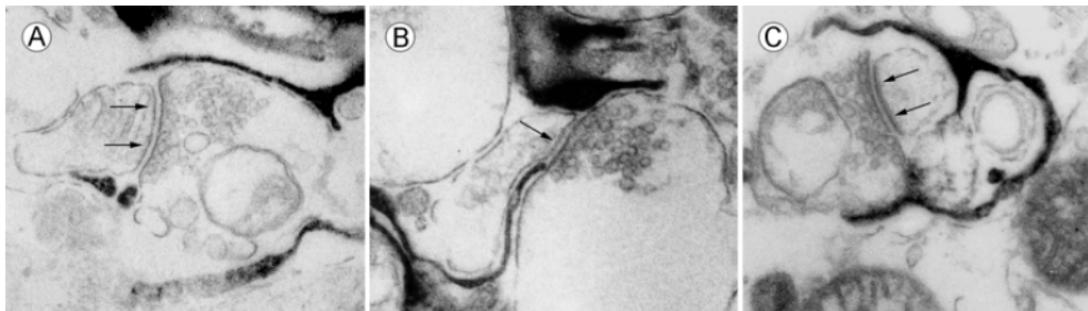


Figura 5. Imágenes de rebanadas de cerebelo de un ratón adulto (p30) obtenidas por MET. En los paneles A–C se observan sinapsis rodeadas por CGB (en negro). Las membranas post-sinápticas están marcadas por flechas [29].

El cerebelo es un sistema donde predominan las señales excitadoras, y las CGB participan en la regulación de estas señales al limitar la difusión del Glu liberado durante la actividad sináptica por medio de su captura, manteniendo así bajas las concentraciones extracelulares de dicho neurotransmisor. Diversos estudios

han estimado que el 20% del Glu liberado durante una transmisión sináptica es removido por el compartimiento neuronal post-sináptico, mientras que el 80% restante es captado por las CGB [30]. Esto es importante debido a que las células de Purkinje son susceptibles a excitotoxicidad ocasionada por la excesiva estimulación de sus receptores glutamatérgicos [31].

Estudios recientes sugieren que las CGB también tienen papeles más activos en la sinapsis. Se ha demostrado que las células de Bergmann responden a la actividad neuronal glutamatérgica, por medio de la estimulación de los receptores glutamatérgicos que expresan, provocando un influjo de Ca^{2+} , seguido de la hidrólisis de fosfoinosítidos y la activación de PKC [32], MAPK [33], PI3K [34] y CaMKII [35]. La transducción de señales mediada por la activación de los receptores glutamatérgicos modifica la expresión de genes en múltiples modelos de aprendizaje, plasticidad sináptica e isquemia, durante el envejecimiento y en alteraciones neurológicas, tales como la epilepsia, la esquizofrenia y la enfermedad de Alzheimer. En CGB, el tratamiento con glutamato induce cambios en el patrón de expresión de genes [36-43], que influye en la modulación de la transmisión y plasticidad sináptica.

Control de la expresión génica

La regulación de la expresión génica es fundamental para diversos procesos biológicos, incluyendo el crecimiento y la división celular, la adaptación al estrés ambiental, así como la diferenciación y el desarrollo. Se sabe que la expresión de genes está regulada en múltiples niveles, y los diversos procesos que intervienen en esta regulación se integran entre sí [44-50]. La regulación génica se puede dividir en control transcripcional y postranscripcional. Por otra parte, las propias proteínas pueden ser reguladas por modificaciones postraduccionales y proteólisis.

Cabe señalar que la mayoría de estudios enfocados a la regulación de la expresión génica, se dedican al estudio de este proceso a nivel transcripcional a través de los dos estudios tradicionales de un solo gen y enfoques de genoma

completo, incluyendo perfiles de expresión, estudios de unión de factores de transcripción, e identificación de los elementos de regulación, así como análisis de remodelación de la cromatina y epigenética. En comparación, el control postranscripcional se ha estudiado menos extensivamente.

Los mecanismos de regulación postranscripcional comprenden diversos procesos, tales como (2) el procesamiento del ARNm (poliadenilación, adición al extremo 5' de la estructura denominada *cap*, corte y empalme), (3) el transporte y localización del ARNm, (4) la degradación del ARNm y (5) la traducción del ARNm (Fig. 6).

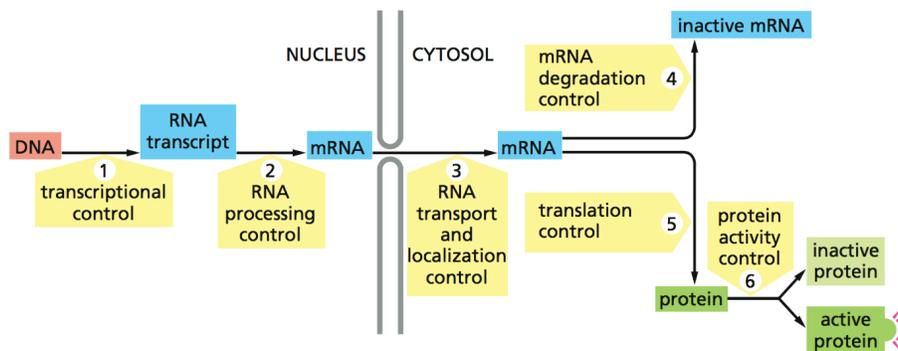


Figura 6. La expresión génica en eucariotas puede ser controlada en distintos niveles. Se conocen ejemplos de regulación en cada uno de los pasos, sin embargo, para la mayoría de los genes el sitio principal del control es el paso 1: la transcripción de una secuencia de ADN en ARN [51].

A pesar de esta variedad de mecanismos de regulación, todos ellos tienen una cosa en común: en última instancia, controlar sí, dónde y cómo, de manera eficiente, un ARNm determinado se traduce en proteína. En consecuencia, la traducción y control de la traducción son fundamentales para la regulación postranscripcional de la expresión génica.

Regulación de la traducción

La traducción es el proceso por el cual la información contenida en el ARNm se convierte en una secuencia polipeptídica. Este proceso celular juega un papel

evolutivamente conservado en la regulación de la expresión génica [52]. De hecho, recientes hallazgos indican que la traducción desempeña un papel importante en la determinación de los niveles de expresión proteica en células de mamíferos [53]. La medición amperométrica del consumo de oxígeno en timocitos de rata reveló que la traducción consume aproximadamente el 20% del ATP celular, siendo así el proceso celular más demandante de energía [54]. Por lo tanto, no es sorprendente que la traducción represente un proceso celular estrictamente regulado.

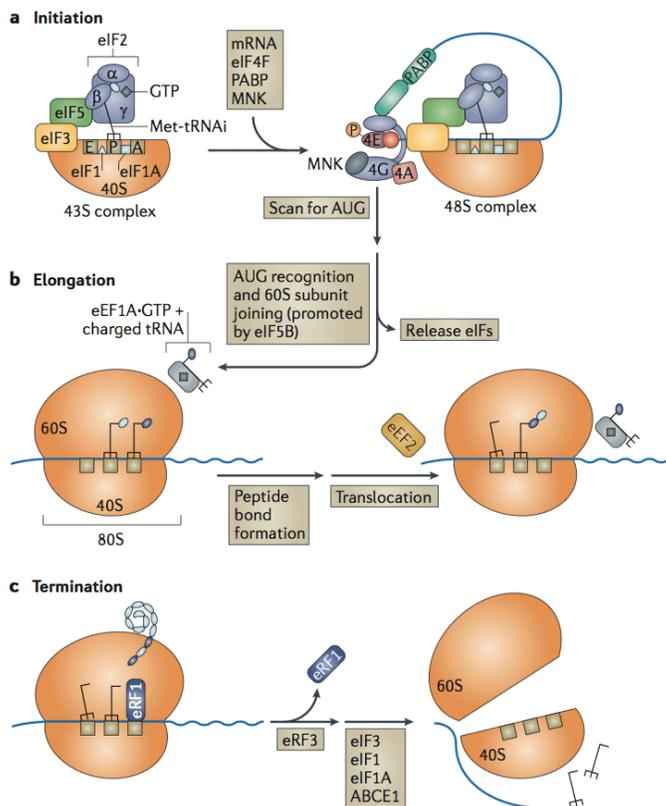


Figura 7. Síntesis de proteínas en eucariontes. La traducción tiene tres fases: (a) inicio, (b) elongación y (c) terminación. Cada etapa requiere factores de traducción específicos [55].

La traducción se puede dividir en tres pasos principales: inicio, elongación y terminación. El inicio de la traducción comprende los acontecimientos que conducen a la colocación del ribosoma 80S en el codón de inicio del ARNm. La síntesis de polipéptidos se lleva a cabo durante la fase de elongación. Y finalmente, el polipéptido completo se libera después de que el ribosoma se

encuentra con un codón de paro durante la terminación de la traducción (Fig. 7).

En principio, el control de traduccional puede dividirse en regulación global de la traducción y la regulación de específica de ARNm [56]. La regulación global afecta la eficacia de traducción de la mayoría de los ARNm a través de una afinación general de la traducción, mientras que la regulación específica de ARNm sólo afecta a la traducción de ciertos ARNm.

La regulación global de la traducción está mediada generalmente a través de la fosforilación de algunos de los componentes de la maquinaria traduccional [57], por diversas vías de señalización [58,59]. Con respecto a la regulación del inicio de la traducción mediada por el *cap*, la fosforilación de los factores eucarióticos de inicio eIF4E, eIF4G y eIF4B, cuya función es unir el ARNm a las subunidades ribosomales, regula su actividad de una manera tal que sus niveles de fosforilación correlacionan directamente con el estado traduccional y, por tanto, con el crecimiento celular. Diversos estímulos, como las infecciones víricas, los choques térmicos, los factores de crecimiento, las hormonas y algunos neurotransmisores, alteran el estado de fosforilación de estos factores [57].

Adicionalmente, la fosforilación de los factores relacionados con el reclutamiento del Met-ARNt al ribosoma, participa en el control traduccional de manera relevante. La fosforilación de la subunidad α de eIF2 (eIF2 α) en Ser51 impide su reciclaje al bloquear el intercambio de GDP por GTP, evitando la formación del complejo ternario Met-ARNt-GTP-eIF2, e inhibiendo la síntesis proteica (Fig.8). Hasta la fecha se han descrito cuatro proteincinasas que fosforilan este factor: PKR (proteincinasa regulada por ARN), HRI (cinasa regulada por el inhibidor hemo), PERK (cinasa 3 del factor eIF2 α) y GCN2 (cinasa no reprimible del factor 2), todas ellas activadas por factores de estrés como las infecciones víricas, el plegamiento incorrecto de proteínas en el retículo endoplásmico y la falta de aminoácidos.

Otro factor relacionado con eIF2, también regulado por fosforilación, es eIF2B, que intercambia GDP por GTP de eIF2; al ser fosforilado en la subunidad ϵ por la glicógeno sintetasa 3 β (GSK-3 β) se inhibe su función [60].

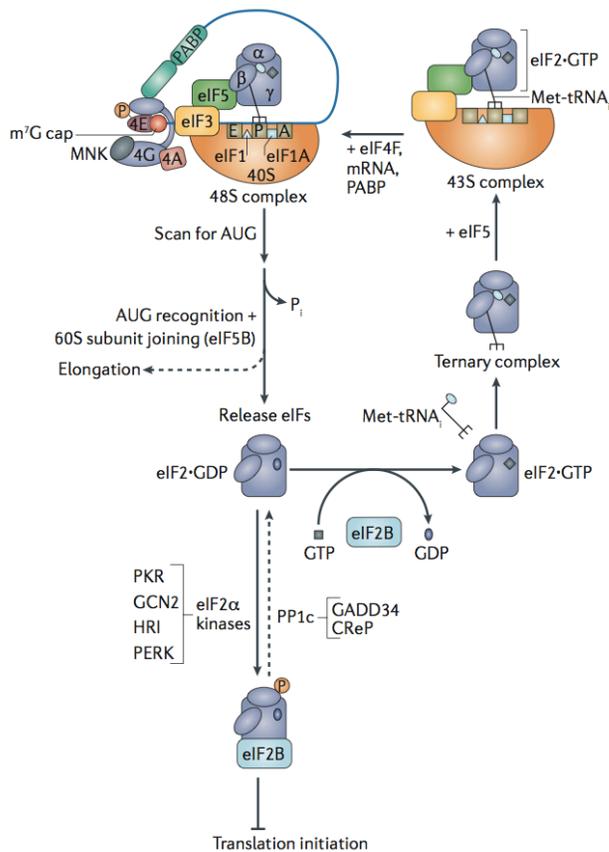


Figura 8. El reclutamiento del primer ARNt a la subunidad 40S, es regulado por la fosforilación de eIF2 α (Adaptado de [55]).

Otro punto de control en el inicio es la fosforilación del complejo 4EBP1 que modula la integridad del complejo eIF4F, responsable del reconocimiento y del posicionamiento del ribosoma en el codón de inicio del ARNm a ser traducido (Fig. 9). El factor 4EBP1 compite por la unión de eIF4E con el eIF4G para formar el complejo eIF4F. La unión entre 4EBP1 y eIF4E es regulada por la fosforilación del primero. Cuando 4EBP1 se encuentra hipofosforilado, se une a eIF4E inhibiendo la traducción, mientras que la forma hiperfosforilada evita la unión de eIF4E, permitiendo la formación del complejo eIF4F y la síntesis de proteínas. La fosforilación de 4EBP1 está regulada por vías de señalización que incluyen a las cinasas ERK, PI3K y el complejo 1 de la cinasa blanco de rapamicina (mTORC1) [61].

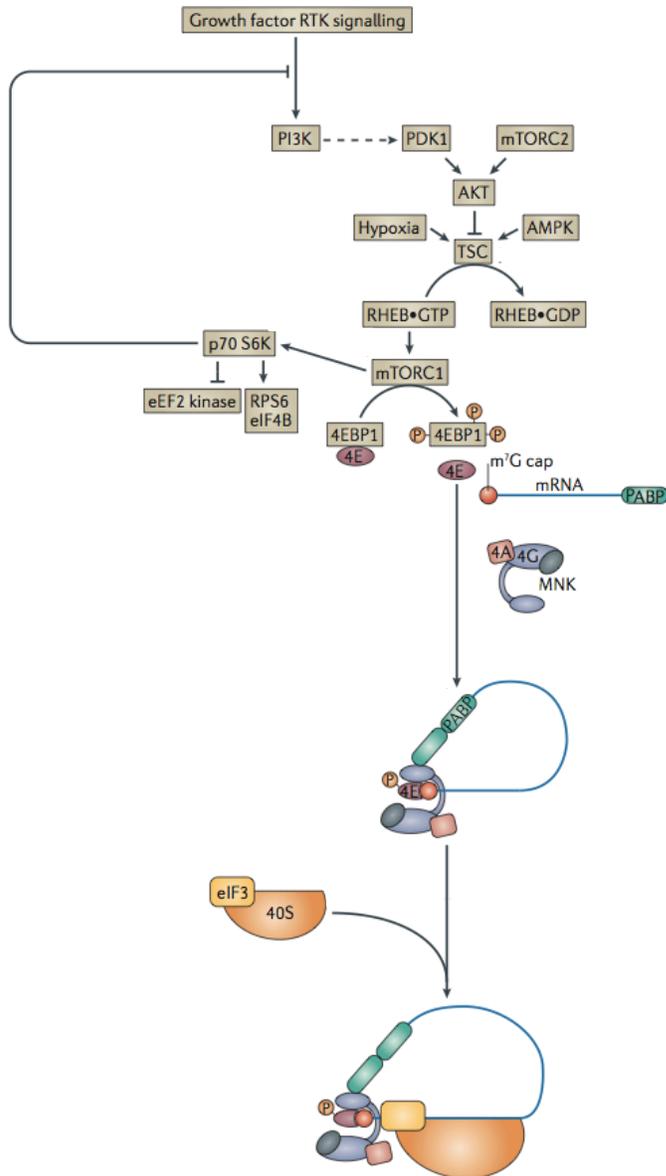


Figura 9. El control traduccional dependiente de “cap” es regulado por la integridad del complejo eIF4F (Adaptado de [55]).

Por otra parte, durante el proceso de elongación de la cadena polipeptídica, la fosforilación del factor 2 de la elongación (eEF2), encargado de la translocación del peptidil-ARNt del sitio aminoacil al sitio peptidil del ribosoma, inhibe su función (Fig. 10) [62,40]. La cinasa involucrada es la cinasa de eEF2 (eEF2K), inicialmente conocida como cinasa dependiente de Ca^{2+} /calmodulina tipo III, por su dependencia de estos dos cofactores. Esta enzima es regulada a su vez por mTORC1, que la fosforila cerca del sitio de unión de calmodulina inhibiendo su función. Adicionalmente también es fosforilada por PKA, p70^{S6K} y p90^{RSK} [57]. La

inhibición de la elongación se asocia a la traducción de ARNm con extremos 5'-UTR complejos [63].

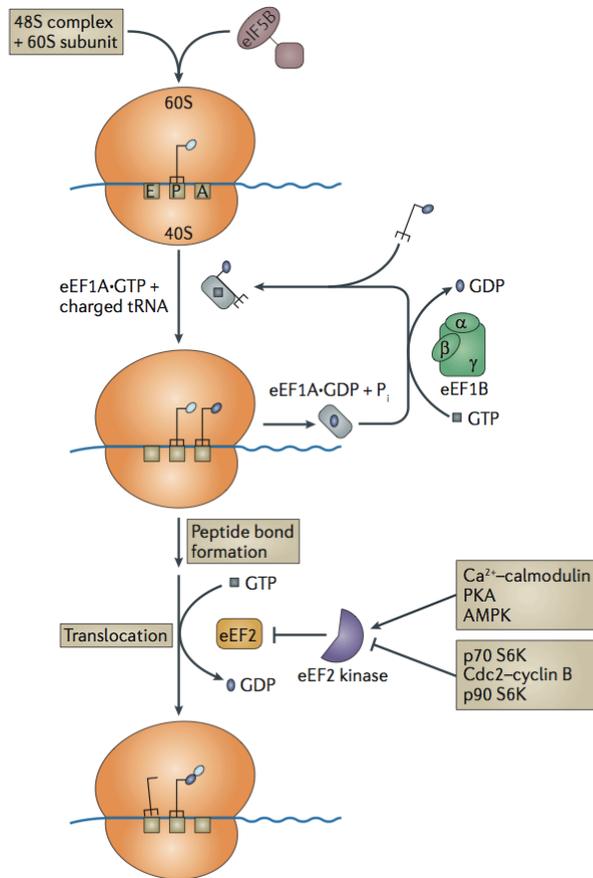


Figura 10. La fosforilación de eEF2 regula la traducción a nivel de la elongación (Adaptado de [55]).

No existe aún consenso en cuanto a la consecuencia de la fosforilación de los factores de terminación. Este proceso requiere la participación de dos factores de liberación, eRF1, el cual reconoce los tres codones de paro y cataliza la reacción de terminación, y eRF3, que estimula la actividad de eRF1 de una manera dependiente de GTP. Además de una posible regulación por fosforilación, la secuencia nucleotídica río abajo del codón de terminación influye en el proceso, así como las proteínas que se unen a estas secuencias [59].

Otro blanco para regular la traducción es el propio ARNm; a través de elementos reguladores en *cis*- a los que se unen factores que actúan en *trans*-. Los elementos *cis*-reguladores se pueden encontrar en cualquier lugar a lo largo del

ARNm, pero para la mayoría de los ejemplos de regulación traduccional bien caracterizados, éstos elementos están presentes en las regiones 5' o 3' no traducidas de los genes (UTRs, por sus siglas en inglés) (Fig. 11). La regulación específica de ARNm ocurre principalmente a través de proteínas de unión al ARN y ARN reguladores, que reconocen a los elementos *cis*- de un ARNm dado.

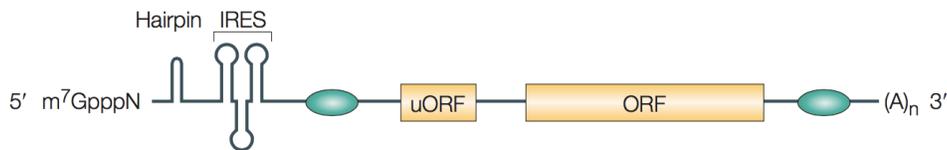


Figura 11. Elementos que influyen en la traducción del ARNm. La estructura del cap m^7GpppN en el extremo 5' del ARNm, y la cola poli (A) en el extremo 3', son motivos canónicos que promueven fuertemente el inicio de la traducción. Estructuras secundarias, tales como horquillas, impiden la traducción. Las secuencias de entrada interna al ribosoma (IRES, por sus siglas en inglés) median la traducción *cap*-independiente. Los marcos de lectura abiertos río arriba (uORFs, por sus siglas en inglés) normalmente funcionan como reguladores negativos mediante la reducción de traducción del marco de lectura principal. Los óvalos verdes simbolizan los sitios de unión para las proteínas y/o ARN reguladores, que generalmente inhiben la traducción [56].

El ribosoma en sí también puede ser un blanco para regular la traducción, ya que varios de sus componentes proteicos pueden sufrir modificaciones postraduccionales. Un ejemplo muy bien estudiado es la fosforilación de la proteína ribosomal S6 (rpS6 por sus siglas en inglés), que fue demostrado por primera vez hace más de 40 años [64].

Proteína ribosomal S6

Los ribosomas eucarióticos están formados por dos subunidades designadas como 40S (pequeña) y 60S (grande). La subunidad 40S se compone de una sola molécula de ARN, el ARN ribosomal (ARNr) 18S, y 33 proteínas; mientras que la subunidad 60S tiene tres moléculas de ARN, los ARNr 5S, 5.8S y 28S, y 46 proteínas [65].

De todas las proteínas ribosomales, la proteína ribosomal S6 (rpS6) ha llamado

mucho la atención, desde que se demostró que podía ser susceptible a fosforilación [64]. Ésta proteína está implicada en la biogénesis ribosomal de la subunidad 40S; entra al núcleo (nucléolo), en donde se ensambla con otras proteínas y ARNr para formar el complejo pre-40S. Posteriormente, las subunidades ribosomales pequeñas conteniendo a la rpS6 son exportadas hacia el citoplasma, donde se fusionan para formar ribosomas maduros [66].

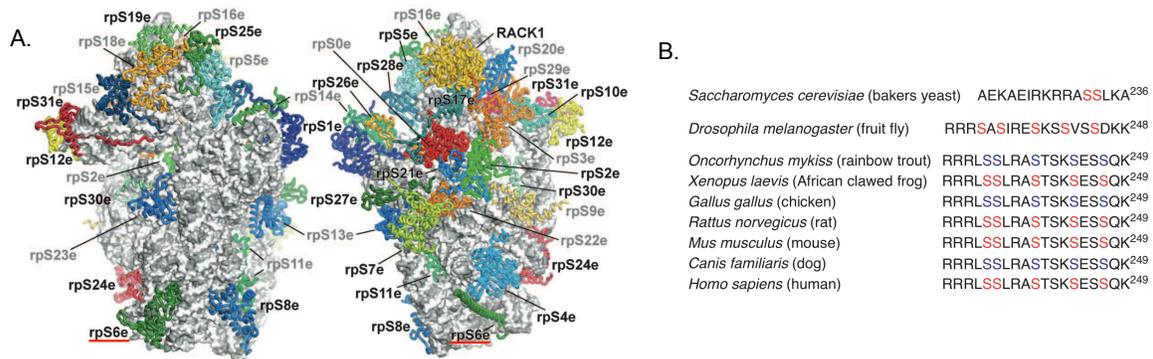


Figura 12. Arquitectura de la subunidad 40S. A. Vista frontal y dorsal de la subunidad 40S; las proteínas ribosomales se muestran en distintos colores (la proteína subrayada en rojo es rpS6), mientras que el ARNr se muestra en gris. B. Sitios de fosforilación identificados de rpS6 en diferentes especies (Adaptado de [67]).

Varios trabajos han demostrado que rpS6 es fosforilada en respuesta a numerosos estímulos fisiológicos, patológicos y farmacológicos. Así mismo, cabe señalar que rpS6 participa en la unión al ARNm, y por lo tanto, su fosforilación podría tener un papel importante en la regulación del inicio de la traducción [68].

Fosforilación de rpS6

rpS6 tiene cinco sitios de fosforilación (Ser235, Ser236, Ser240, Ser244 y Ser247) que se agrupan en su extremo carboxilo terminal (Fig. 12) [69]. Estos sitios, muy conservados en eucariotas superiores, son fosforilados por la acción de las cinasas S6Ks y RSKs.

Además de regular la fosforilación de 4EBP1, mTORC1 regula la traducción

mediante la activación de las cinasas S6K (S6Ks) [70,71]. Los mamíferos expresan dos variantes de S6K (S6K1 y S6K2; o S6K α y S6K β , respectivamente), que son codificadas por dos genes distintos (RPS6KB1 y RPS6KB2) y comparten un alto grado de homología [72]. S6K1 y S6K2 existen en dos isoformas diferentes (p70 y p85, así como p54 y p56, respectivamente), que se generan a través de sitios de inicio alternativos dentro de un ARNm común [73,74]. p70^{S6K} es la isoforma más abundante de S6K1 y su localización celular es predominantemente citoplasmática, mientras que p85^{S6K}, p54^{S6K}, y p56^{S6K} se localizan en el núcleo [72].

Las S6Ks pertenecen a la familia cinasa AGC, y son activadas por PDK1 y mTORC1 a través de la fosforilación de los residuos Thr localizados en su lazo de activación (Thr229 en p70^{S6K} de humano) y en su motivo hidrofóbico (Thr389 en p70^{S6K} de humano), respectivamente [72]. Otros trabajos indican que GSK3 también contribuye a la activación de las S6Ks a través de la fosforilación de su motivo hélice-vuelta-hélice (Ser371 en p70^{S6K} de humano) [75]. Se han identificado varios sustratos de las S6Ks implicados en la regulación de la traducción incluyendo a rpS6 [76,77], el factor eIF4B [78,79], y la proteína de muerte celular programada 4 (PDCD4) (Fig.13) [80].

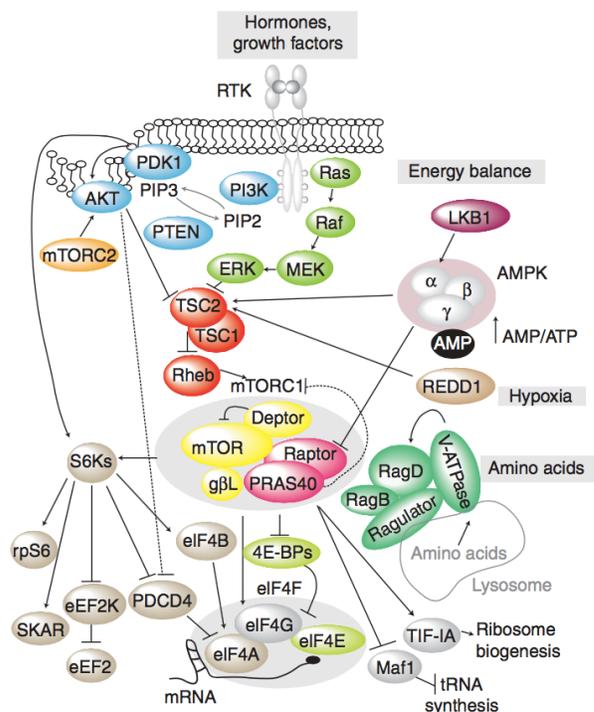


Figura 13. Esquema de la ruta de señalización de mTORC1 hacia la maquinaria de traducción [81].

La rpS6 fue el primer sustrato identificado de las S6Ks; se ha propuesto que estas cinasas fosforilan a rpS6 en una manera secuencial, la fosforilación en Ser236 es seguida por la fosforilación en Ser235, Ser240, Ser244 y Ser247 [82-84]. Aunque S6K1 contribuye a la fosforilación de rpS6, S6K2 parece ser la cinasa predominante que fosforila a rpS6 en estos residuos [85].

Por otro lado, las cinasas de 90 kD que fosforilan a rpS6 (RSKs) pertenecen a una familia de Ser/Thr cinasas que se encuentran río abajo de la cascada de Ras-MAPK (Fig. 14). Esta familia consta de cuatro isoformas (RSK1-4, en humanos) y dos homólogos estructuralmente relacionados, RLPK y RSKB [86,87]. Las RSKs comparten un alto grado de homología (75-80%), y se caracterizan por tener dos dominios cinasa totalmente funcionales [88,89].

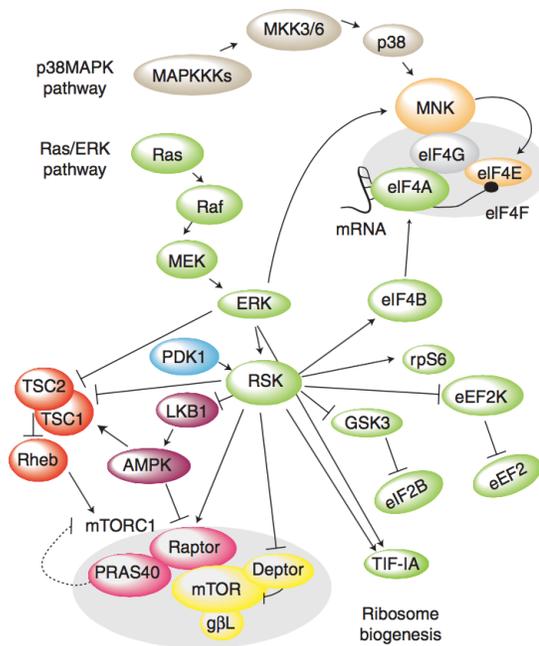


Figura 14. Esquema de la ruta de señalización de las MAPK hacia la maquinaria de traducción [81].

Las isoformas de RSK se activan directamente por la cinasa regulada por señales extracelulares -1 y -2 (ERK 1/2) en respuesta a factores de crecimiento, hormonas, neurotransmisores, quimiocinas y otros estímulos. Dichas cinasas fosforilan a muchas proteínas, tanto citosólicas y nucleares, implicadas en la regulación de diversos procesos, incluyendo la proliferación, la supervivencia, el

crecimiento y la motilidad celular [90].

Cuando se descubrió que la cinasa predominante en la fosforilación de rpS6 era S6K, se llegó a asumir que la actividad de RSK era irrelevante para la fosforilación de dicha proteína [91,92]. Sin embargo, trabajos posteriores demostraron que esa asunción era incorrecta. En células que carecían tanto de S6K1 y S6K2, se detectó, a niveles mucho más bajos, la fosforilación de rpS6 en los residuos Ser 235 y 236 [93,94], pero la relevancia fisiológica de esta especificidad sigue sin conocerse.

Importancia fisiológica de la fosforilación de rpS6

En experimentos utilizando ratones con una rpS6 mutante (rpS6^{P^{-/-}}, donde los residuos de Ser fueron substituidos por Ala) y ratones “*knockout*” para S6K1/2 se obtuvieron resultados similares; en ellos se demostró que la pérdida de la fosforilación de rpS6 afectaba el crecimiento celular [95].

La pérdida de las S6Ks afecta modestamente las tasas de traducción global, mientras que la expresión de la mutante de rpS6 (no fosforilable) resulta en un aumento moderado de la síntesis de proteínas [95]. Del mismo modo, en condiciones donde la fosforilación de rpS6 es mínima, la traducción de ARNm conteniendo motivos constituidos por oligopirimidinas en el extremo 5' (5'-TOP) se ve disminuida, tal como cuando las células son privadas de aminoácidos [96]; entre estos mensajeros se encuentran los que codifican los componentes de la maquinaria traduccional. Por lo tanto, se propuso que las S6Ks promovían la traducción de ARNm 5'-TOP a través de la fosforilación de rpS6 [97-99]. Sin embargo, posteriormente se demostró que ni la pérdida de las S6Ks ni el estado de fosforilación de rpS6 influían en la traducción de los ARNm 5'-TOP [100,93,95].

A pesar de estos resultados, la comprensión de cómo la fosforilación de rpS6 afectan la traducción sigue siendo un misterio.

ANTECEDENTES

En el cerebelo, las CGB responden de manera rápida a la actividad sináptica de las fibras paralelas [101]. Se ha demostrado que la activación de sus receptores glutamatérgicos regula la incorporación de [³⁵S]-Met en las proteínas, de una manera bifásica [39]. En un inicio, el Glu reduce la incorporación de [³⁵S]-Met; a los 15 minutos de exposición la inhibición es de un 75% aproximadamente. Eventualmente, la incorporación regresa de forma paulatina a sus niveles basales después de 60 minutos de tratamiento con éste neurotransmisor (Fig. 15A). Por otro lado, el análisis electroforético de las proteínas sintetizadas durante el tratamiento con el radioligando muestra que a los 15 minutos, aunque la síntesis global de proteínas está disminuida, algunos polipéptidos se sintetizan (Fig. 15B).

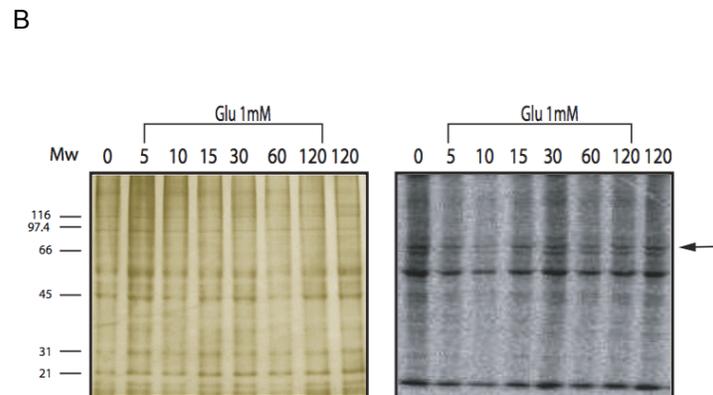
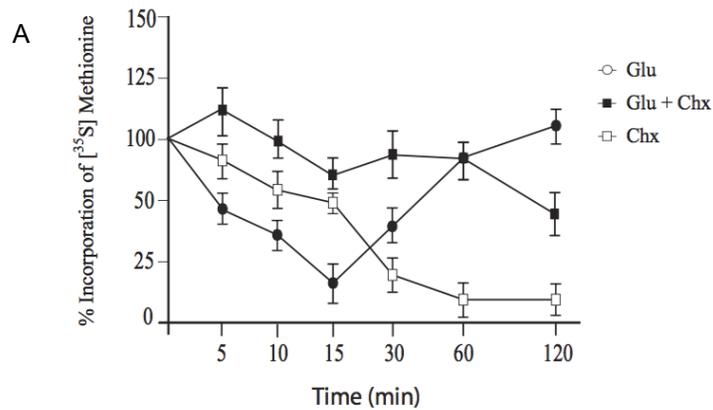


Figura 15. Incorporación de [³⁵S]-Met en proteínas después de exposición a Glu. A. Cultivos primarios de CGB fueron tratados con Glu 1 mM (círculos cerrados), Chx 1 mM (cuadros abiertos) y Glu 1 mM + Chx 1 mM (cuadros cerrados) en intervalos de tiempo diferentes. Posteriormente las proteínas fueron precipitadas usando TCA y se analizó la incorporación del radioligando. B. Cantidades iguales de proteínas fueron analizadas mediante SDS-PAGE, los geles fueron teñidos con plata (izquierda) y expuestos con placas autorradiográficas (derecha) [39].

Dicha cinética de regulación sugiere que el Glu inhibe la etapa de elongación de la traducción, pues una recuperación rápida de la tasa de incorporación de [³⁵S]-Met en las proteínas requiere que los polirribosomas no se desagreguen [63]. Y en efecto, el tratamiento con Glu origina una fosforilación de factor eucariótico de elongación 2 (eEF2) en Thr56, dicha fosforilación es mediada por los receptores glutamatérgicos y resulta ser depende del tiempo y de la dosis (Fig.16). Es importante recalcar que la elongación se detiene una vez fosforilado este factor [40].

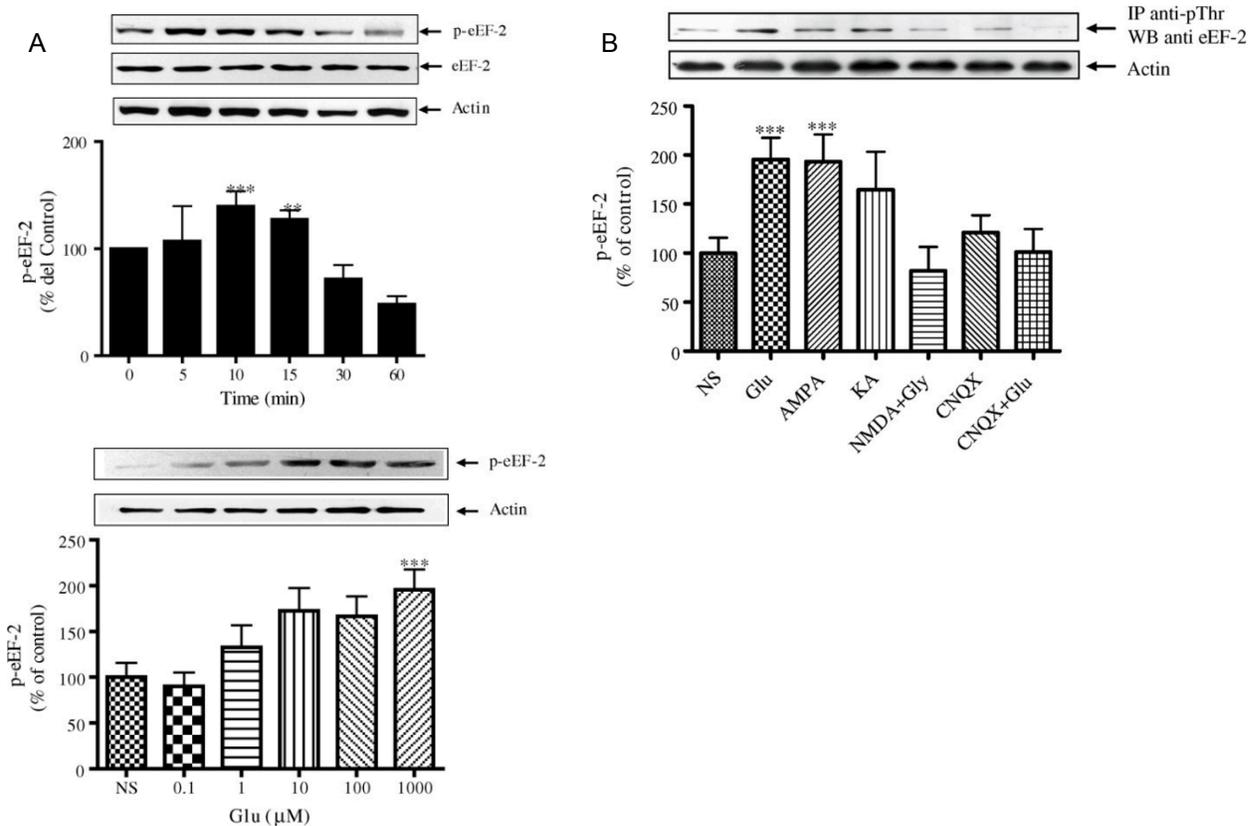


Figura 16. La fosforilación de eEF2 es mediada por los receptores de Glu en forma tiempo- y dosis-dependiente. A. Monocapas de CGB tratadas con Glu 1mM a diferentes tiempos y concentraciones crecientes de Glu. B. CGB tratadas con agonistas de los receptores glutamatergicos, AMPA (500 μ M), KA (500 μ M), NMDA (500 μ M) + Gly (10 μ M) por 10 minutos. El antagonista CNQX fue agregado 30 minutos antes del tratamiento [40].

Por otra parte, tomando en cuenta que la etapa limitante del control traduccional se da en el inicio, se consideró que el Glu también podría participar de alguna forma en la regulación de ésta. Y así resulto ser, la exposición a Glu regula la fosforilación subunidad α del factor eucariótico de inicio 2 (eIF2 α), en Ser51, a través de la activación de los receptores glutamatergicos [43], y dicha fosforilación también es dependiente del tiempo y la dosis (Fig. 17). Esta modificación postraduccional afecta la formación del complejo ternario Met-ARnt-GTP-eIF2 e inhibe el inicio de la traducción.

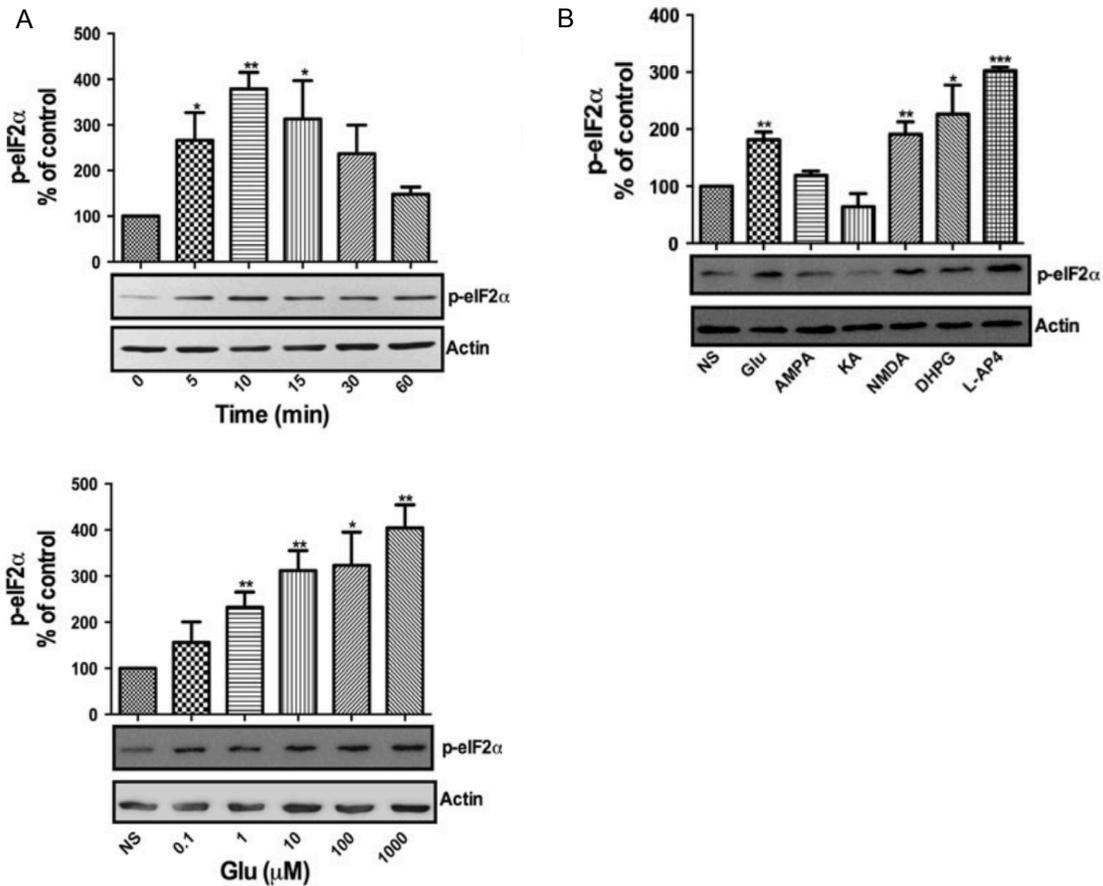


Figura 17. La fosforilación de eIF2 α es mediada por los receptores de Glu en forma tiempo- y dosis-dependiente. A. Monocapas de CGB tratadas con Glu 1mM a diferentes tiempos y concentraciones crecientes de Glu. B. CGB fueron tratadas con agonistas de los receptores glutamatérgicos, AMPA (500 μ M), KA (500 μ M), NMDA (500 μ M) + Gly (10 μ M), DHPG (25 μ M), L-AP4 (500 μ M) y Glu (1mM) por 10 minutos [43].

Es posible especular que la actividad neuronal glutamatérgica, al aumentar los niveles extracelulares de glutamato, desencadena la captura del neurotransmisor en las células gliales y la activación de los receptores glutamatérgicos en estas mismas células. En consecuencia, la síntesis proteica se detiene para permitir la traducción de ARNm involucrados en la lanzadera Glu/glutamina, los cuales son necesarios para el reciclamiento del neurotransmisor.

JUSTIFICACIÓN

El Glu induce cambios en la expresión de genes en las células gliales de Bergmann. Una forma de inducir dichos cambios en la expresión de genes es mediante el control de la traducción, básicamente regulando la fosforilación de algunos de los componentes de la maquinaria traduccional.

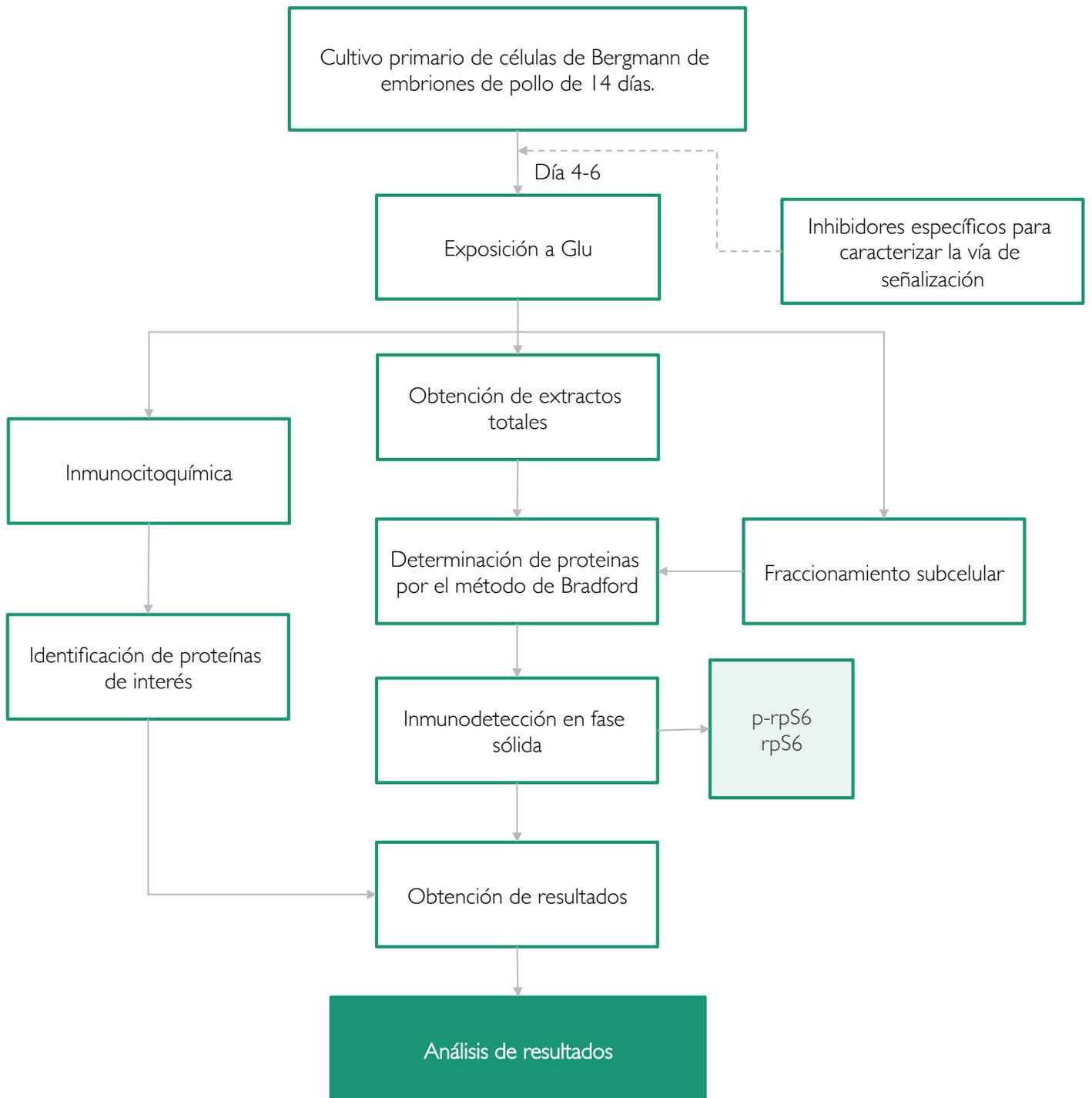
OBJETIVO GENERAL

Demostrar la participación de la proteína ribosomal S6 (rpS6) en la señalización glutamatérgica.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar los cambios en el perfil global de fosforilación de rpS6 bajo estimulación glutamatérgica.
- Identificar la participación de los receptores de glutamato en la fosforilación de rpS6.
- Caracterizar la vía de señalización de la fosforilación de rpS6.
- Examinar la localización subcelular de la rpS6.

ESTRATEGÍA EXPERIMENTAL



MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Los reactivos de cultivo fueron obtenidos de GE Healthcare (Carlsbad, USA). Tanto los bloqueadores: DL-TBOA (ácido DL-treo- β -benciloxi aspártico) y THA (ácido L-treo- β -hidroxi aspártico); el antagonista: CNQX (6-ciano-7-nitroquinoxalina-2,3-diona); y los agonistas: L-Glu (ácido L-glutámico), AMPA (ácido α -amino-3-hidroxi-5-isoxazol propiónico), KA (ácido kaínico), NMDA (N-metil-D-aspartato), DHPG (3,5-dihidroxifenilglicina) y L-AP4 (ácido L-(+)-2-amino-4-fosfonobutírico) fueron obtenidos de Tocris-Cookson (St. Louis, USA). Los anticuerpos monoclonales: anti p-rpS6 (Ser 235/236) y anti rpS6 fueron comprados a Cell Signaling Technology (Denver, USA). Los anticuerpos monoclonales: anti lamina A/C y anti GADPH fueron amablemente proporcionados por el Dr. Bulmaro Cisneros Vega del Cinvestav-IPN (D.F., MEX). Los anticuerpos secundarios acoplados a peroxidasa de rábano (HRP) y el reactivo de quimioluminiscencia fueron obtenidos de Amersham Biosciences (Buckinghamshire, GBR). El anticuerpo secundario conjugado con Alexa 488 fue conseguido de Life Technologies (Grand Island, USA). Todos los demás reactivos fueron adquiridos de Sigma-Aldrich (St. Louis, USA).

Animales

Los embriones de pollo de 10 días fueron donados por Laboratorios Avimex S.A. de C.V. (D.F., MEX) y se mantuvieron a 37°C hasta su uso. Todos los experimentos se llevaron a cabo de acuerdo a las normas internacionales sobre el uso ético de animales.

Cultivo celular y protocolo de estimulación

Los cultivos primarios de CGB se realizaron de acuerdo a lo previamente publicado por Ortega y colaboradores [102]. Embriones de pollo de 14 días

fueron sacrificados y se obtuvo el cerebelo en solución salina de Puck (CaCl₂ 1 mM, MgSO₄ 0.6 mM, KCl 50 mM, KH₂PO₄ 1.1 mM, Na₂HPO₄ 1.1 mM, NaCl 130 mM, glucosa 6 mM) a 4 °C, el tejido se disgregó de manera mecánica y química con tripsina y DNasa, el tejido disgregado se centrifugó y el sobrenadante se diluyó en azul de tripano para realizar una cuenta viable. Las células obtenidas se sembraron a una densidad de 8×10⁵ células/mL en medio DMEM complementado con SFB al 10% y 50 µg/mL de gentamicina y se mantuvieron *in-vitro* entre 4 y 6 días para que alcanzaran una confluencia del 80 al 100%.

Previo a cada tratamiento el medio fue sustituido por medio libre de suero durante dos horas y posteriormente se administraron los tratamientos indicados; los inhibidores se colocaron 30 minutos previo a los agonistas. Las células fueron tratadas con análogos de la Glu añadidos al medio de cultivo por los períodos de tiempo indicados.

Extractos totales

Los extractos totales se obtuvieron cosechando las células por raspado con 1mL de solución salina de fosfatos (PBS) con inhibidores de fosfatasa (10 mM K₂HPO₄, 150 mM NaCl, 2 mM Na₃VO₄, 25 mM NaF, 10 mM Na₃MoO₄) y centrifugando 5 minutos a 13,000 rpm a 4 °C. La pastilla se resuspendió en solución de lisis RIPA (1 mM EGTA, 1 mM EDTA pH 8.0, 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 158 mM NaCl, 2 mM Na₃VO₄, 25 mM NaF, 10 mM Na₃MoO₄, 1µg/mL leupeptina, 1 µg/mL aprotinina, 1 mM PMSF) y se solubilizó por agitación durante una hora a 4 °C en un agitador por vibración.

Fraccionamiento subcelular

Las CGB fueron cosechadas de acuerdo a lo previamente descrito, la pastilla celular fue resuspendida en 500 mL de solución TM (10 mM Tris-HCl pH 7.4, 2 mM MgCl₂, 0.5 mM PMSF, 1 mg/mL aprotinina, 1 mg/mL leupeptina, 10 mM NaF, 1 mM Na₂MoO₄ y 1 mM Na₃VO₄) e incubada por 10 min en hielo.

Posteriormente se adicionaron 500 mL de triton-X100 al 1% y se volvió a incubar por 10 min en hielo. Esta mezcla se colocó en un homogenizador Dounce para romper la membrana celular (25 golpes). Los núcleos fueron sedimentados por una centrifugación a 5000 rpm por 15 min a 4 °C. La fracción citosólica fue recuperada (sobrenadante). La pastilla (núcleos) fue resuspendida en 100 mL de una solución de sacarosa I (0.32 M sacarosa, 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 3 mM CaCl₂, 2 mM Mg(CH₃COO)₂, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.5 mM PMSF y 0.5% NP-40) y 100 µL de una solución de sacarosa II (2 M sacarosa, 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 5 mM Mg(CH₃COO)₂, 0.1mM EDTA, 1 mM DTT y 0.5 mM PMSF). Esta mezcla fue colocada en una base de 200 mL de solución de sacarosa I y se adicionaron 800 mL de solución de sacarosa II quedando en medio la solución que contiene los núcleos. Los tubos fueron centrifugados a 16,000 rpm por 1 h a 4 °C con un rotor TLS-55. Después de la centrifugación, el sobrenadante fue retirado y la pastilla (núcleos) fue resuspendida en una solución de lisis (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1 mM PMSF, 1 mg/mL aprotinina, 1mg/mL leupeptina, 10 mM NaF, 1 mM Na₂MoO₄ y 1 mM Na₃VO₄), sonicada y centrifugada a 13,000 rpm por 2 min a 4°C. Finalmente, el sobrenadante (proteínas nucleares) fue recuperado.

Determinación de proteínas

La estimación de proteínas contenidas en los extractos totales y/o nucleares se llevo a cabo utilizando el método de Bradford, y como estándar se utilizó una solución de 1 µg/µL de γ-globulina [103].

Inmunodetección en fase sólida

Cantidades iguales de proteína (50 µg) fueron separadas por electroforesis en geles de poliacrilamida al 12% en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE), de acuerdo a lo descrito por Laemmli [104], y electrotransferidas a membranas de nitrocelulosa a corriente constante (180 mA) por 2 horas en

cámara húmeda (Bio-Rad). Las membranas se tiñeron con rojo de Ponceau para confirmar la presencia de proteínas y verificar que la carga fuese la misma en cada muestra, posteriormente se lavaron con PBS hasta desteñirlas y se bloquearon por 1 hora con TBS 0.1% Tween-20 (TBST) con leche descremada al 5%. Después de tres lavados con TBST por 5 min, las membranas se incubaron con el anticuerpo correspondiente a una dilución 1:1000 en solución de anticuerpos (TBS, 0.25% BSA, 0.1% Tween-20 y 0.01% Timerosal) durante toda la noche a 4°C. Las membranas fueron lavadas tres veces con TBST a temperatura ambiente en un agitador orbital y se incubaron durante dos horas con el anticuerpo secundario correspondiente acoplado a peroxidasa de rábano en una dilución 1:4000 a temperatura ambiente. Después de lavar las membranas tres veces con TBST, se les adicionó el reactivo de quimioluminiscencia como sustrato de la peroxidasa de rábano, la cual cataliza la oxidación del luminol en presencia de peróxido de hidrógeno emitiendo luz. Las bandas relevantes se detectaron con el fotodocumentador MicroChemi (DNR Bio-Imaging Systems, USA) y se realizaron los análisis densitométricos con el programa ID Image Analysis Software (Kodak Corporation, USA). Los datos recabados se analizaron con el programa Prism 6 (GraphPad Software, USA).

Desnudamiento de las membranas

Las membranas se incubaron con solución de desnudamiento (glicina 0.1 M, SDS 1% pH 2.3) por una hora a temperatura ambiente y se lavaron tres veces durante cinco minutos con TBST para poder proceder a incubar nuevamente con los anticuerpos primarios correspondientes, los cuales se emplearon tanto como control de carga y pureza. Finalmente, las membranas fueron reveladas como se describió previamente.

Inmunocitoquímica

Las CGB se cultivaron en cubreobjetos de vidrio tratados con poli-L-lisina (0.01 mg/mL) siguiendo el procedimiento descrito anteriormente. Las células fueron fijadas por exposición a metanol a -20 °C durante 10 minutos, y lavadas dos veces usando una solución de lavado (Triton X-100 al 0.5% en PBS). Los sitios de unión no específicos fueron bloqueados por incubación con solución de bloqueo (BSA al 1% en PBS) durante una hora. Los anticuerpos primarios correspondientes (anti rpS6 y anti p-rpS6) fueron agregados a una dilución 1:50 en solución de bloqueo y se incubaron durante toda la noche a 4 °C. Luego de tres lavados con solución de lavado, los anticuerpos secundarios conjugados con Alexa 488 fueron agregados a una dilución de 1:200 en solución de bloqueo. Después de lavar los anticuerpos secundarios, las preparaciones celulares fueron montadas con Fluoroshield (Sigma-Aldrich, USA) y examinadas con el microscopio de fluorescencia invertido Axioscope 40 (Zeiss, DEU).

Análisis estadístico

Los datos se expresan como los valores la media \pm el error estándar (SE). Se realizó un análisis de varianza unidireccional no paramétrico (prueba de Kruskal-Wallis) para determinar diferencias significativas entre las condiciones. Se utilizó una prueba post-hoc de Dunnett para determinar qué condiciones eran significativamente diferentes con respecto al control. Los datos se analizaron utilizando el programa Prism 6 (GraphPad Software, USA).

RESULTADOS

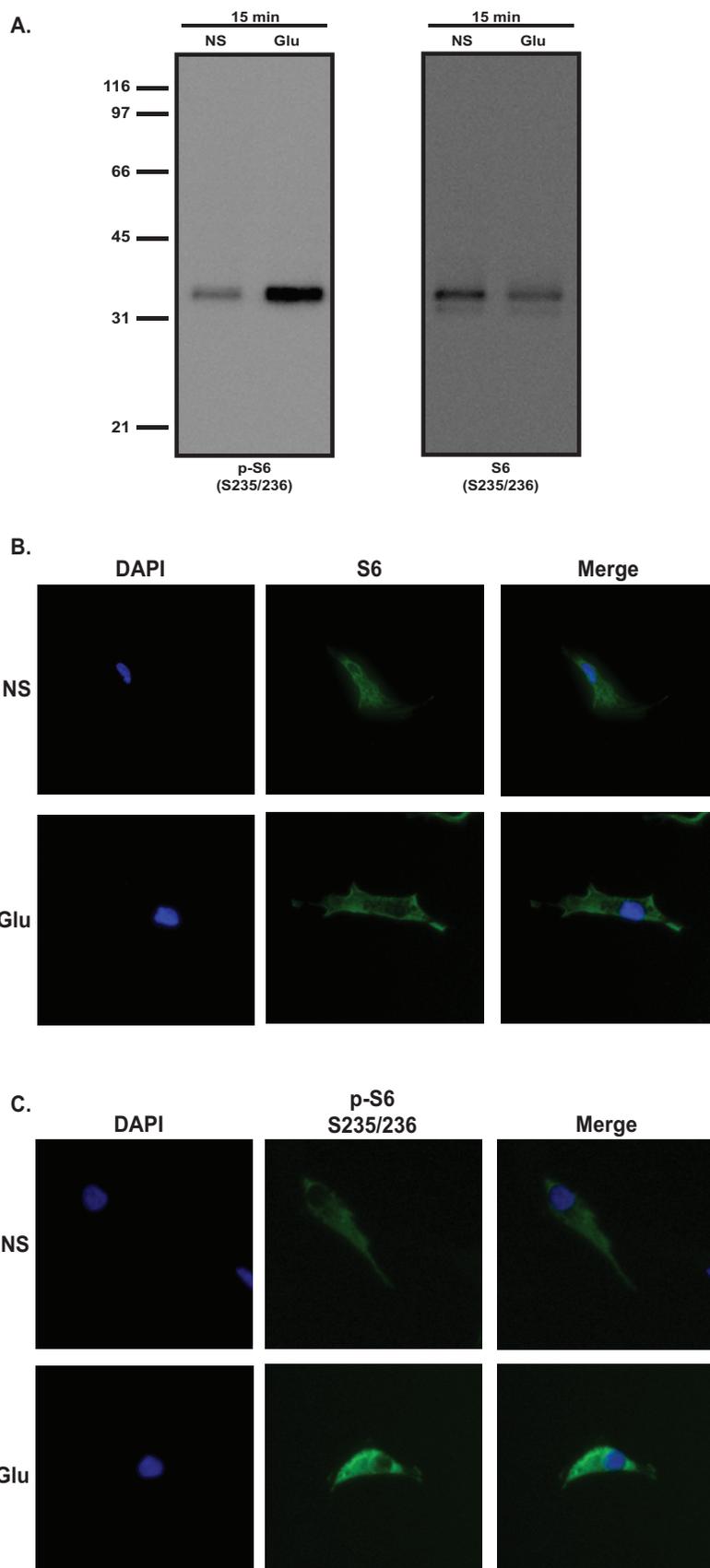
El Glu induce la fosforilación de rpS6 en células gliales Bergmann

En reportes anteriores, hemos observado una disminución de la incorporación de [³⁵S]-Met en CGB tratadas con Glu [39]. Dicho tratamiento conlleva la fosforilación del factor eEF2 en Thr56, mecanismo que inactiva su función e inhibe la elongación. Este tratamiento también induce la fosforilación de eIF2 α en Ser51, esta modificación postraduccional impide su reciclaje al bloquear el intercambio de GDP por GTP, evitando así la formación del complejo ternario Met-ARNt-GTP-eIF2 e inhibiendo el inicio de la síntesis proteínicas.

Después de estos acontecimientos, ocurre una recuperación de la incorporación de [³⁵S]-Met y una disminución de la fosforilación tanto de eEF2 y eIF2 α . En este contexto, se favorece la reanudación de la síntesis de proteínas. Por lo tanto, decidimos explorar si el tratamiento con Glu podría estar ligado a la fosforilación de rpS6 en Ser235/236. Como primera aproximación, expusimos las monocapas confluentes de CGB a una concentración de 1 mM de Glu durante 15 minutos; y como se muestra en el panel A de la Fig. 18, encontramos un claro incremento de la fosforilación de rpS6 en Ser235/236, sin cambio aparente en los niveles de la proteína total. En los paneles B y C se muestran imágenes de inmunofluorescencias evidenciando la fosforilación de rpS6 dependiente de Glu.

Y como era de esperarse, la fosforilación de rpS6 inducida por Glu es dependiente del tiempo (Fig. 19A). Todos los experimentos subsecuentes se realizaron estimulando a las células durante 15 minutos. Con el fin de apoyar una relevancia fisiológica de esta fosforilación, tratamos las CGB con concentraciones crecientes de Glu (Fig. 19B) y se pudo establecer una clara dependencia de dosis con una concentración efectiva media (EC₅₀) de 502.4 μ M (Fig. 19C), sugiriendo un efecto mediado por los receptores.

Figura 18. El Glu induce la fosforilación de rpS6 en CGB. A. CGB fueron tratadas con Glu 1mM por 15 min. Los niveles de fosforilación de S6 fueron detectados por inmunodetección en fase sólida usando un anticuerpo anti-pS6 y normalizados con los niveles totales de S6. Se muestra na autorradiografía de un experimento típico. Micrografía de la inmunofluorescencia de CGB tratadas con Glu 1mM por 15 min. Las células fueron teñidas con el anticuerpo que reconoce B. la proteína total o C. la proteína fosforilada (verde). Los núcleos fueron teñidos con DAPI (azul).



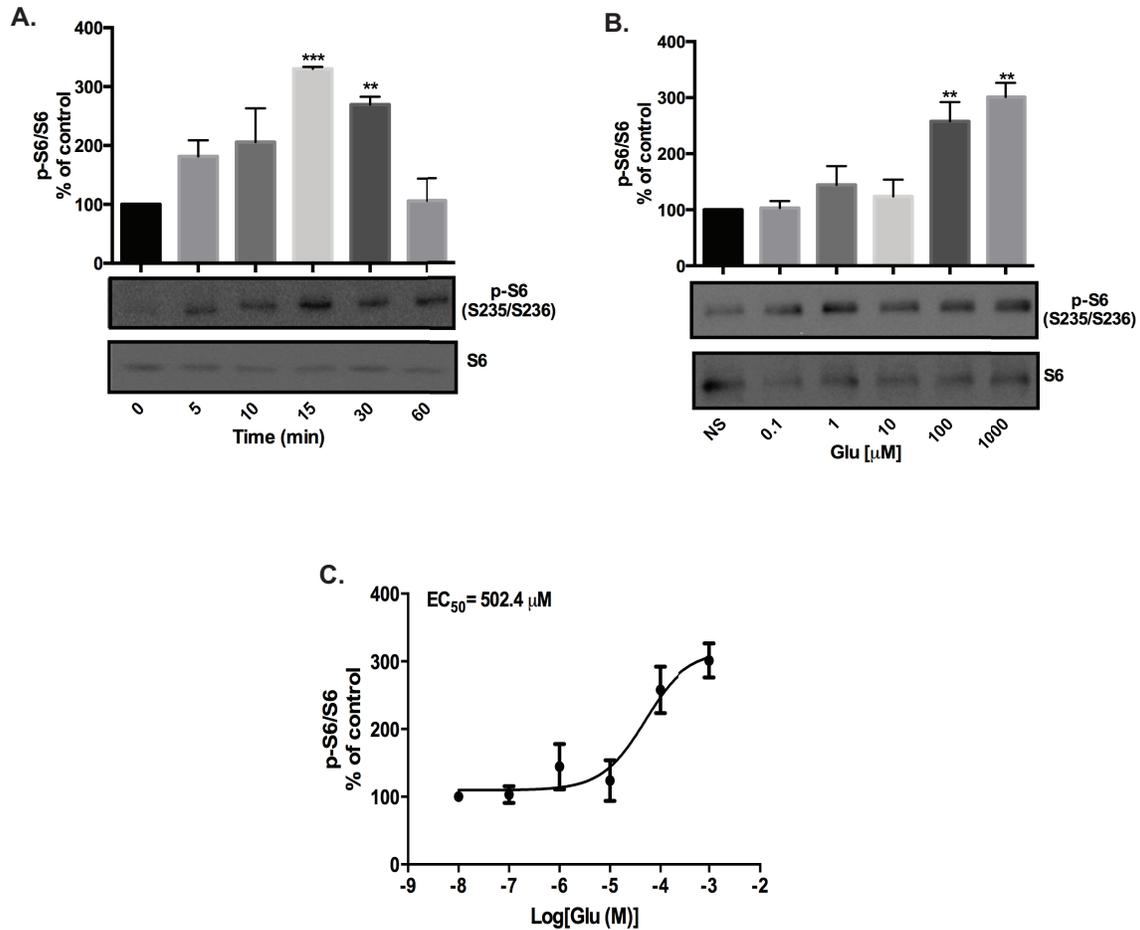


Figura 19. La fosforilación de rpS6 es dependiente del tiempo y la dosis. A. Monocapas de CGB fueron tratadas con Glu 1mM a diferentes tiempos y B. concentraciones crecientes de Glu por 15 min. C Regresión no lineal de los datos en B. Los niveles de fosforilación de S6 fueron detectados por inmunodetección en fase sólida usando un anticuerpo anti-pS6 y normalizados con los niveles totales de S6. Una autorradiografía de un experimento típico es mostrada. Los datos son expresados como el error estándar de la media (SEM) de al menos tres resultados independientes. El análisis estadístico fue realizado comparando los datos obtenidos contra los datos de la célula no estimulada (NS) empleando ANOVA de una vía no paramétrica (Prueba de Kruskal-Wallis y el análisis post hoc de Dunn). (**P< 0.01 y ***P<0.001).

Señalización en la fosforilación de rpS6 mediada por Glu

Mediante el uso de herramientas farmacológicas se determinó el perfil de respuesta a Glu. Las CGB fueron expuestas a diferentes agonistas glutamatérgicos. Como se muestra en la Fig. 20A, sólo el ácido α -amino-3-hidroxi-5-isoxazol propiónico (AMPA) aumenta la fosforilación de rpS6. Congruente con el resultado anterior, el tratamiento previo con 6-ciano-7-

nitroquinoxalina-2,3-diona (CNQX), antagonista de los receptores AMPA, evita el efecto del Glu sobre la fosforilación de rpS6 (Fig. 20B). Por otra parte, el agonista N-metil-D-aspartato (NMDA) no tienen efecto alguno en la fosforilación de rpS6 aun cuando las células son tratadas con un medio sin Mg^{2+} o añadiendo un quelante de Ca^{2+} intracelular (BAPTA-AM) (Fig. 20C), descartando así la participación de los receptores NMDA en la fosforilación de rpS6.

Estudios previos han establecido que la activación de los receptores AMPA en CGB se asocia con la fosforilación de $p90^{RSK}$ y $p70^{S6K}$ a través de las vías de señalización MAPK y PI3K/mTOR, respectivamente [35,39,34,105,41]. Para delinear los eventos de señalización desencadenados por el Glu que resultan en la fosforilación de rpS6, decidimos utilizar inhibidores específicos de ambas vías: PD98059 (inhibidor de MEK) y rapamicina (inhibidor de mTOR). Aunque ambos inhibidores reducen la fosforilación de rpS6, aparentemente $p70^{S6K}$ desempeña el papel principal en este evento (Fig. 20D).

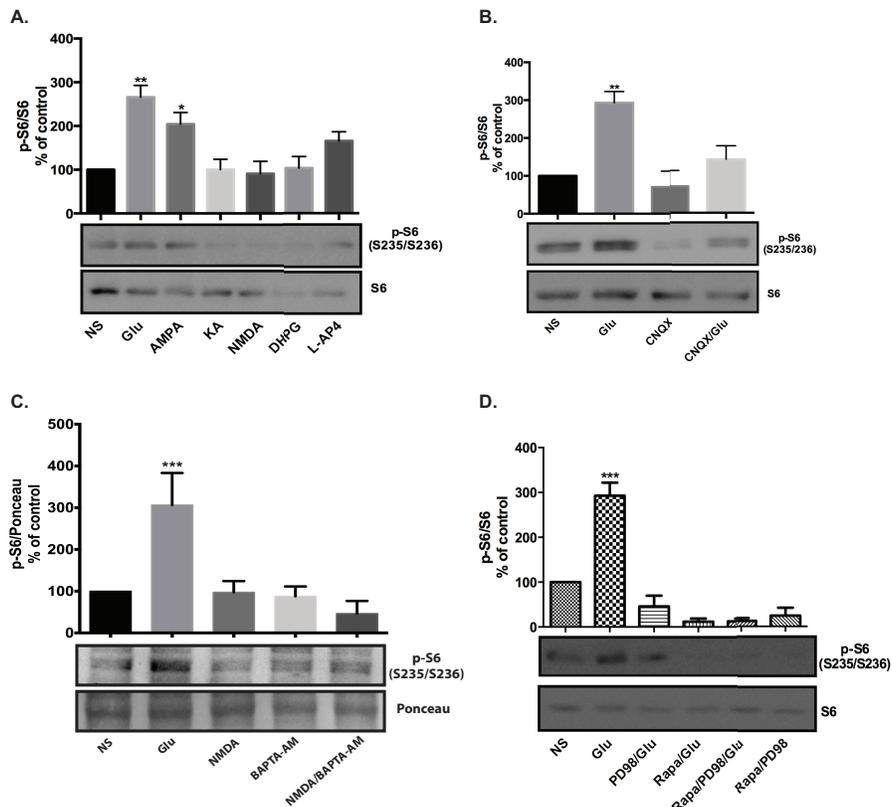


Figura 20. *Caracterización farmacológica de la fosforilación de rpS6.* A. CGB fueron tratadas con agonistas de los receptores glutamatérgicos, AMPA (500 μ M), KA (500 μ M), NMDA (500 μ M) + Gly (10 μ M), DHPG (25 μ M), L-AP4 (500 μ M) y Glu (1mM) por 15 min. B. Las monocapas celulares fueron incubadas con CNQX por 30 minutos antes del tratamiento con Glu 1mM (15 min). C. Las CGB fueron incubadas por 15 minutos con el agonista NMDA (500 μ M) + Gly (10 μ M) en presencia o ausencia de un quelante de Ca^{2+} intracelular (BAPTA-AM 25 μ M) usando un medio libre de Mg^{2+} . D. Las CGB fueron incubadas con PD98059 (10 μ M) y/o rapamicina (100 nM) 30 minutos antes del tratamiento por 15 con Glu 1mM. Los niveles de fosforilación de S6 fueron detectados por inmunodetección en fase sólida usando un anticuerpo anti-pS6 y normalizados con los niveles totales de S6. Una autorradiografía de un experimento típico es mostrada. Los datos son expresados como el error estándar de la media (SEM) de al menos tres resultados independientes. El análisis estadístico fue realizado comparando los datos obtenidos de los diferentes tratamientos vs. los datos de las células no tratadas (NS) empleando ANOVA de una vía no paramétrica (Prueba de Kruskal-Wallis y el análisis post hoc de Dunn). (* $P < 0.05$ y ** $P < 0.01$).

La proteína ribosomal S6 fosforilada se localiza principalmente en el citoplasma

rpS6 participa en la biogénesis de ribosomas, por lo tanto tiene una localización tanto nuclear como citoplásmica [106]. Para tratar de elucidar la posible función de la fosforilación de rpS6 en su distribución subcelular, decidimos realizar fraccionamientos subcelulares de las células control y las tratadas con Glu. Los resultados se muestran en la Fig. 21A, rpS6 está presente tanto en núcleo como en citoplasma. Dentro del núcleo de una pequeña fracción de rpS6 se encuentra fosforilada bajo condiciones control. Sin embargo, la exposición a Glu resulta en un incremento de la fosforilación de rpS6 en ambos dominios subcelulares.

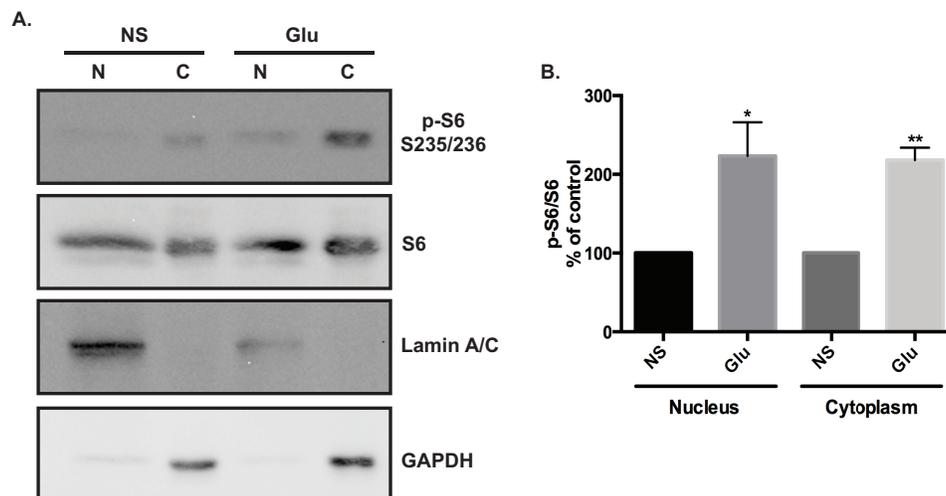


Figura 21. *El glutamato aumenta la fosforilación de rpS6 en el citoplasma.* Fraccionamiento subcelular de CGB tratadas con Glu 1mM por 15 min. Los niveles de fosforilación de S6 fueron detectados por inmunodetección en fase sólida usando un anticuerpo anti-pS6 y normalizados con los niveles totales de S6. Lamina A/C y GAPDH fueron usados como controles de extractos nucleares y citoplasmáticos, respectivamente. Una autorradiografía de un experimento típico es mostrada. Los datos son expresados como el error estándar de la media (SEM) de al menos tres resultados independientes. El análisis estadístico fue realizado comparando los datos obtenidos contra los datos de la célula no estimulada (NS) empleando ANOVA de una vía no paramétrica (Prueba de Kruskal-Wallis y el análisis post hoc de Dunn). (*P < 0.05 y **P < 0.01).

DISCUSIÓN

La síntesis de proteínas es uno de los procesos celulares más demandantes energéticamente, consumiendo casi el 5% de la ingesta calórica. Por lo tanto, el control traduccional, al ser un fenómeno tan sofisticado, requiere una extensa maquinaria bioquímica capaz de garantizar la regulación rápida del repertorio proteico sin involucrar mecanismos asociados al control transcripcional. En este contexto, la dinámica del estado de fosforilación de los factores implicados en la traducción se convierte en un punto clave del control traduccional [107].

La importancia de las células gliales en la fisiología del cerebro recientemente empezó a ser reconocida, y el concepto de sinapsis tripartita es común hoy en día [108]. Sin embargo, la mayoría de los trabajos se han enfocado en entender cómo los astrocitos detectan la actividad neuronal y cómo modulan la actividad sináptica a través de la liberación de gliotransmisores [109]. Debido a esto, es poco el conocimiento que se tiene acerca de los mecanismos moleculares que los neurotransmisores activan en las células gliales, los cuales modifican la función de estas células para proporcionar un entorno bioquímicamente favorable y garantizar una transmisión sináptica continua. Dos ejemplos de este acoplamiento son: la lanzadera Glu/glutamina y la lanzadera de lactato astrocito-neurona. El primer ejemplo mencionado, provee un adecuado suministro del neurotransmisor [110] y el segundo suministra la energía necesaria para la neurotransmisión [111]. Curiosamente, estos dos procesos bioquímicos comienzan cuando el Glu es removido de la hendidura sináptica por los transportadores de aminoácidos excitadores expresados en las células gliales (GLAST/EAAT1 y GLT-1/EAAT2).

Además, las células gliales también albergan receptores de Glu que se activan como resultado de la liberación de este neurotransmisor [112]. Se ha demostrado a lo largo de los años que la activación de los receptores glutamatérgicos de las células gliales está vinculada al control transcripcional [113], no obstante, se carece de un estudio sistemático tanto de la identidad y la función de los genes regulados por el Glu. Hablando específicamente de las

CGB, ya se han publicado perfiles transcripcionales de estas células durante distintas etapas de su desarrollo [28].

La mayoría de los estudios se han enfocado en entender los mecanismos moleculares que subyacen tras el control de la expresión de genes a nivel transcripcional. Sin embargo, la modificación de proteínas preexistentes y la regulación de la traducción son procesos fundamentales para comprender del todo la regulación de la expresión génica. Estudios previos en nuestro laboratorio han sido capaces de demostrar que el Glu puede regular la traducción en CGB, con un efecto bifásico en la síntesis de proteínas después del tratamiento con Glu [39]. También hemos reportado la interacción entre PI3K y los receptores inotrópicos de las CGB, que resulta en la activación de la vía de señalización PKB/GS3K- β [105] con la subsecuente fosforilación de mTORC1 [41], y la fosforilación/desfosforilación de algunos factores y componentes implicados en la traducción bajo exposición glutamatérgica [43].

rpS6 es fosforilada por p70^{S6K} y p90^{RSK} en residuos de serina muy conservados evolutivamente. La cinasa p70^{S6K} es un efector directo de mTORC1, mientras que p90^{RSK} involucra la activación de la vía de las MAPK para poder fosforilar a rpS6 [69]. Se ha demostrado que existe una interrelación entre las vías de las MAPK, PI3K, y mTOR, que resulta en la fosforilación diferencial de residuos específicos de rpS6. Estos resultados posicionan a rpS6 como un punto de convergencia de múltiples vías de señalización en células T CD8⁺ [114].

Para continuar con la caracterización de la transducción de señales que participan en el control traduccional dependiente de Glu, en el presente trabajo se caracterizó la fosforilación de rpS6 usando un cultivo celular emulando a las células gliales que están en contacto íntimo con las neuronas glutamatérgicas. Hemos sido capaces de demostrar que la exposición a Glu altera el estado de fosforilación de rpS6 en CGB de forma tiempo- y dosis-dependiente, principalmente siendo mediada por la activación de los receptores AMPA y la participación de las vías de las MAPK y mTORC1 (Figs. 19 y 20).

Con la idea de entender el papel fisiológico de la fosforilación de rpS6

dependiente de Glu, decidimos evaluar la distribución subcelular de la proteína fosforilada, la cual es diferente dependiendo del tipo celular. Para nuestra sorpresa, pudimos detectar la proteína fosforilada tanto en núcleo como en citoplasma, lo cual favorece la noción de que la actividad neuronal modifica continuamente las funciones de los astrocitos. Por un lado, tiene un efecto bifásico sobre la síntesis global de proteínas [39,43], y por el otro, podría estar implicada con la regulación del ensamblaje ribosomal. Curiosamente, la relación entre la proteína fosforilada vs. la proteína total parece preservarse en ambos compartimientos celulares, lo que sugiere un aumento en los niveles totales de rpS6 tras la exposición a Glu [223.3 ± 24.74 en el núcleo, mientras que en el citoplasma es 218.2 ± 9.082 (Fig. 21B)]. Esto no es de sorprender, ya que datos preliminares de nuestro laboratorio sugieren que el tratamiento con Glu incrementa las cantidades de ARNm en la fracción polisomal en CGB. Especulamos que entre las proteínas traducidas activamente tras la exposición a Glu se encuentran moléculas de señalización, como rpS6, y componentes de la lanzadera Glu/glutamina. Esperamos que el trabajo actualmente en curso arroje pruebas para esclarecer este tema.

En resumen, este trabajo ofrece evidencia de la fosforilación de rpS6 dependiente de Glu, que podría ser importante no sólo para la regulación de la síntesis de proteínas sino también para la biogénesis ribosomal. Un resumen de nuestros hallazgos se representa en la Fig. 22.

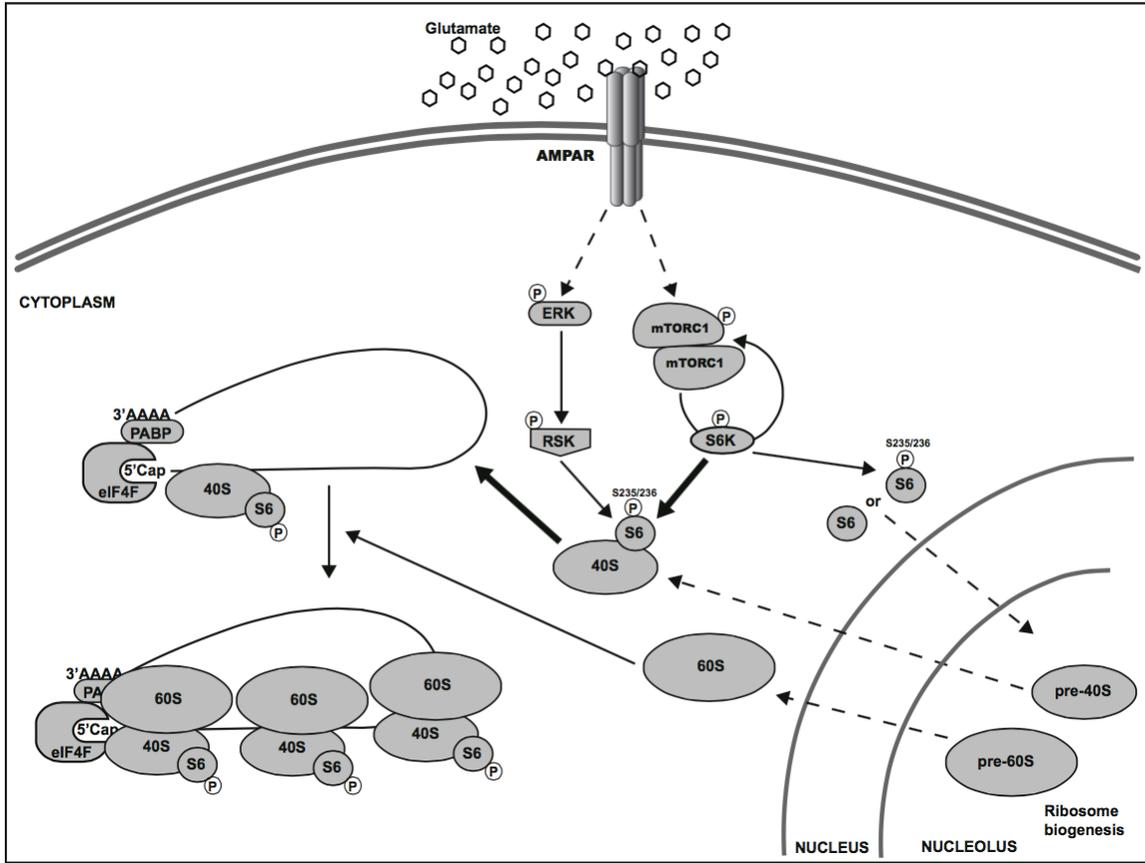


Figura 22. Señalización implicada en la fosforilación de rpS6 en CGB.

CONCLUSIONES

Utilizando como modelo las células gliales de Bergmann, hemos sido capaces de observar cambios en la fosforilación de rpS6 (Ser235/236), mediados por la activación de los receptores glutamatérgicos. Además demostramos que las vías de señalización de MAPK y mTORC1 participan en la fosforilación de esta proteína.

Por otro lado, al evaluar la localización de rpS6 fosforilada, nos dimos cuenta que principalmente esta se ubica en el citoplasma. Sin embargo, la detección de parte de la proteína fosforilada en el núcleo podría implicar que esta modificación postraduccional pueda tener un rol importante en la biogénesis ribosomal, además de su papel en la regulación de la síntesis de proteínas.

Estos resultados nos permiten entender más a fondo los mecanismos moleculares detrás del efecto bifásico en la síntesis de proteínas de las CGB cuando son expuestas a Glu. Así mismo, recalcan la importancia de las células gliales en la neurotransmisión glutamatérgica. Las células gliales no solo mantienen bajas las concentraciones de Glu, también responden a la actividad glutamatérgica con cambios en su repertorio proteico que influye en la modulación de la transmisión y plasticidad sináptica.

PERSPECTIVAS

1. Examinar si la fosforilación de la proteína ribosomal S6 determina su localización subcelular.
2. Evaluar si algunos mensajeros involucrados en el ciclo Glu/glutamina se traducen con mayor eficiencia bajo estimulación glutamatérgica.

BIBLIOGRAFÍA

1. Watkins JC (1981) Pharmacology of excitatory amino acid transmitters. *Advances in biochemical psychopharmacology* 29:205-212
2. Headley PM, Grillner S (1990) Excitatory amino acids and synaptic transmission: the evidence for a physiological function. *Trends in pharmacological sciences* 11 (5):205-211
3. Attwell D, Laughlin SB (2001) An energy budget for signaling in the grey matter of the brain. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 21 (10):1133-1145. doi:10.1097/00004647-200110000-00001
4. Smith CUM (2002) *Elements of Molecular Neurobiology*. 3 edition edn. Wiley,
5. Brady S, Siegel, G., Albers, R. W. and Price, D. (2011) *Basic Neurochemistry: Principles of Molecular, Cellular, and Medical Neurobiology*. 8th edn. Academic Press,
6. Watkins JC, Jane DE (2006) The glutamate story. *British journal of pharmacology* 147 Suppl 1:S100-108. doi:10.1038/sj.bjp.0706444
7. Pittenger C, Kandel E (1998) A genetic switch for long-term memory. *Comptes rendus de l'Academie des sciences Serie III, Sciences de la vie* 321 (2-3):91-96
8. Henley JM (1994) Kainate-binding proteins: phylogeny, structures and possible functions. *Trends in pharmacological sciences* 15 (6):182-190
9. Pin JP, Kniazeff J, Goudet C, Bessis AS, Liu J, Galvez T, Acher F, Rondard P, Prezeau L (2004) The activation mechanism of class-C G-protein coupled receptors. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization* 96 (5):335-342. doi:10.1016/j.biolcel.2004.03.005
10. Kandel ER, Schwartz, J. H., Jessell, T. M., Siegelbaum, S. A. and Hudspeth, A. J. (2012) *Principles of Neural Science*. 5th edn. McGraw-Hill Education/Medical,
11. Olney JW (1969) Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. *Science (New York, NY)* 164 (3880):719-721
12. Werner P, Pitt D, Raine CS (2000) Glutamate excitotoxicity--a mechanism for axonal damage and oligodendrocyte death in Multiple Sclerosis? *Journal of neural transmission Supplementum* (60):375-385
13. Pellerin L, Magistretti PJ (1994) Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91 (22):10625-10629
14. Pellerin L, Magistretti PJ (1997) Glutamate uptake stimulates Na⁺,K⁺-ATPase activity in astrocytes via activation of a distinct subunit highly sensitive to ouabain. *Journal of neurochemistry* 69 (5):2132-2137
15. Novelli A, Reilly JA, Lysko PG, Henneberry RC (1988) Glutamate becomes neurotoxic via the N-methyl-D-aspartate receptor when intracellular energy levels are reduced. *Brain research* 451 (1-2):205-212

16. Bondy SC, Lee DK (1993) Oxidative stress induced by glutamate receptor agonists. *Brain research* 610 (2):229-233
17. Balcar VJ, Johnston GA (1972) The structural specificity of the high affinity uptake of L-glutamate and L-aspartate by rat brain slices. *Journal of neurochemistry* 19 (11):2657-2666
18. Robinson MB (2006) Acute regulation of sodium-dependent glutamate transporters: a focus on constitutive and regulated trafficking. *Handbook of experimental pharmacology* (175):251-275
19. Gether U, Andersen PH, Larsson OM, Schousboe A (2006) Neurotransmitter transporters: molecular function of important drug targets. *Trends in pharmacological sciences* 27 (7):375-383. doi:10.1016/j.tips.2006.05.003
20. Robinson MB (2003) Signaling pathways take aim at neurotransmitter transporters. *Science's STKE : signal transduction knowledge environment* 2003 (207):pe50. doi:10.1126/stke.2003.207.pe50
21. Giaume C, Kirchhoff F, Matute C, Reichenbach A, Verkhratsky A (2007) Glia: the fulcrum of brain diseases. *Cell death and differentiation* 14 (7):1324-1335. doi:10.1038/sj.cdd.4402144
22. Yang HY, Lieska N, Shao D, Kriho V, Pappas GD (1994) Proteins of the intermediate filament cytoskeleton as markers for astrocytes and human astrocytomas. *Molecular and chemical neuropathology / sponsored by the International Society for Neurochemistry and the World Federation of Neurology and research groups on neurochemistry and cerebrospinal fluid* 21 (2-3):155-176. doi:10.1007/bf02815349
23. Cameron RS, Rakic P (1991) Glial cell lineage in the cerebral cortex: a review and synthesis. *Glia* 4 (2):124-137. doi:10.1002/glia.440040204
24. Morest DK, Silver J (2003) Precursors of neurons, neuroglia, and ependymal cells in the CNS: what are they? Where are they from? How do they get where they are going? *Glia* 43 (1):6-18. doi:10.1002/glia.10238
25. Bringmann A, Pannicke T, Grosche J, Francke M, Wiedemann P, Skatchkov SN, Osborne NN, Reichenbach A (2006) Muller cells in the healthy and diseased retina. *Progress in retinal and eye research* 25 (4):397-424. doi:10.1016/j.preteyeres.2006.05.003
26. Somogyi P, Eshhar N, Teichberg VI, Roberts JD (1990) Subcellular localization of a putative kainate receptor in Bergmann glial cells using a monoclonal antibody in the chick and fish cerebellar cortex. *Neuroscience* 35 (1):9-30
27. Hatten ME (1999) Central nervous system neuronal migration. *Annu Rev Neurosci* 22:511-539. doi:10.1146/annurev.neuro.22.1.511
28. Koirala S, Corfas G (2010) Identification of novel glial genes by single-cell transcriptional profiling of Bergmann glial cells from mouse cerebellum. *PloS one* 5 (2):e9198. doi:10.1371/journal.pone.0009198
29. Grosche J, Kettenmann H, Reichenbach A (2002) Bergmann glial cells form distinct morphological structures to interact with cerebellar neurons. *Journal of neuroscience research* 68 (2):138-149

30. Kirischuk S, Kettenmann H, Verkhratsky A (2007) Membrane currents and cytoplasmic sodium transients generated by glutamate transport in Bergmann glial cells. *Pflugers Arch* 454 (2):245-252. doi:10.1007/s00424-007-0207-5
31. Slemmer JE, De Zeeuw CI, Weber JT (2005) Don't get too excited: mechanisms of glutamate-mediated Purkinje cell death. *Prog Brain Res* 148:367-390. doi:S0079612304480297 [pii]
10.1016/S0079-6123(04)48029-7
32. Cid ME, Ortega A (1993) Glutamate stimulates [3H]phorbol 12,13-dibutyrate binding in cultured Bergmann glia cells. *European journal of pharmacology* 245 (1):51-54
33. Lopez-Colome AM, Ortega A (1997) Activation of p42 mitogen-activated protein kinase by glutamate in cultured radial glia. *Neurochemical research* 22 (6):679-685
34. 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. *Journal of neuroscience research* 78 (1):56-63. doi:10.1002/jnr.20237
35. Aguirre A, Lopez-Bayghen E, Ortega A (2002) Glutamate-dependent transcriptional regulation of the chkbp gene: signaling mechanisms. *Journal of neuroscience research* 70 (1):117-127. doi:10.1002/jnr.10394
36. Sanchez G, Ortega A (1994) AMPA/KA receptor induced AP-1 DNA binding activity in cultured Bergmann glia cells. *Neuroreport* 5 (16):2109-2112
37. Lopez T, Lopez-Colome AM, Ortega A (1998) Changes in GluR4 expression induced by metabotropic receptor activation in radial glia cultures. *Brain research Molecular brain research* 58 (1-2):40-46
38. 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. *The Journal of biological chemistry* 275 (50):39246-39253. doi:10.1074/jbc.M002847200
39. 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 (3):1389-1398. doi:10.1016/j.neuroscience.2006.04.076
40. Barrera I, Hernandez-Kelly LC, Castelan F, Ortega A (2008) Glutamate-dependent elongation factor-2 phosphorylation in Bergmann glial cells. *Neurochemistry international* 52 (6):1167-1175. doi:10.1016/j.neuint.2007.12.006
41. Zepeda RC, Barrera I, Castelan F, Suarez-Pozos E, Melgarejo Y, Gonzalez-Mejia E, Hernandez-Kelly LC, Lopez-Bayghen E, Aguilera J, Ortega A (2009) Glutamate-dependent phosphorylation of the mammalian target of rapamycin (mTOR) in Bergmann glial cells. *Neurochemistry international* 55 (5):282-287. doi:10.1016/j.neuint.2009.03.011
42. Barrera I, Flores-Mendez M, Hernandez-Kelly LC, Cid L, Huerta M, Zinker S, Lopez-Bayghen E, Aguilera J, Ortega A (2010) Glutamate regulates eEF1A phosphorylation and ribosomal transit time in Bergmann glial cells. *Neurochemistry international* 57 (7):795-803. doi:10.1016/j.neuint.2010.08.017

43. Flores-Mendez MA, Martinez-Lozada Z, Monroy HC, Hernandez-Kelly LC, Barrera I, Ortega A (2013) Glutamate-dependent translational control in cultured Bergmann glia cells: eIF2alpha phosphorylation. *Neurochemical research* 38 (7):1324-1332. doi:10.1007/s11064-013-1024-1
44. Hieronymus H, Silver PA (2004) A systems view of mRNP biology. *Genes & development* 18 (23):2845-2860. doi:10.1101/gad.1256904
45. Maniatis T, Reed R (2002) An extensive network of coupling among gene expression machines. *Nature* 416 (6880):499-506. doi:10.1038/416499a
46. Mata J, Marguerat S, Bahler J (2005) Post-transcriptional control of gene expression: a genome-wide perspective. *Trends in biochemical sciences* 30 (9):506-514. doi:10.1016/j.tibs.2005.07.005
47. McKee AE, Silver PA (2007) Systems perspectives on mRNA processing. *Cell research* 17 (7):581-590. doi:10.1038/cr.2007.54
48. Moore MJ (2005) From birth to death: the complex lives of eukaryotic mRNAs. *Science (New York, NY)* 309 (5740):1514-1518. doi:10.1126/science.1111443
49. Orphanides G, Reinberg D (2002) A unified theory of gene expression. *Cell* 108 (4):439-451
50. Proudfoot N, O'Sullivan J (2002) Polyadenylation: a tail of two complexes. *Current biology : CB* 12 (24):R855-857
51. Alberts B, Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Walter, P. (2007) *Molecular Biology of the Cell*. 5th edn. Garland Science,
52. Mathews MB, Sonenberg, N., and Hershey, J. W. B. (2007) Origins and principles of translational control. In: *Translational Control in Biology and Medicine*. 1st edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press,
53. Schwanhausser B, Busse D, Li N, Dittmar G, Schuchhardt J, Wolf J, Chen W, Selbach M (2011) Global quantification of mammalian gene expression control. *Nature* 473 (7347):337-342. doi:10.1038/nature10098
54. Buttgereit F, Brand MD (1995) A hierarchy of ATP-consuming processes in mammalian cells. *The Biochemical journal* 312 (Pt 1):163-167
55. Walsh D, Mohr I (2011) Viral subversion of the host protein synthesis machinery. *Nature reviews Microbiology* 9 (12):860-875. doi:10.1038/nrmicro2655
56. Gebauer F, Hentze MW (2004) Molecular mechanisms of translational control. *Nature reviews Molecular cell biology* 5 (10):827-835. doi:10.1038/nrm1488
57. Proud CG (2007) Signalling to translation: how signal transduction pathways control the protein synthetic machinery. *The Biochemical journal* 403 (2):217-234. doi:10.1042/bj20070024
58. Sonenberg N, Hinnebusch AG (2009) Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets. *Cell* 136 (4):731-745. doi:10.1016/j.cell.2009.01.042
59. Jackson RJ, Hellen CU, Pestova TV (2010) The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nature reviews Molecular cell biology* 11 (2):113-127. doi:10.1038/nrm2838

60. Mascher H, Andersson H, Nilsson PA, Ekblom B, Blomstrand E (2007) Changes in signalling pathways regulating protein synthesis in human muscle in the recovery period after endurance exercise. *Acta physiologica (Oxford, England)* 191 (1):67-75. doi:10.1111/j.1748-1716.2007.01712.x
61. Liao XH, Majithia A, Huang X, Kimmel AR (2008) Growth control via TOR kinase signaling, an intracellular sensor of amino acid and energy availability, with crosstalk potential to proline metabolism. *Amino acids* 35 (4):761-770. doi:10.1007/s00726-008-0100-3
62. Horman S, Browne G, Krause U, Patel J, Vertommen D, Bertrand L, Lavoigne A, Hue L, Proud C, Rider M (2002) Activation of AMP-activated protein kinase leads to the phosphorylation of elongation factor 2 and an inhibition of protein synthesis. *Current biology : CB* 12 (16):1419-1423
63. Proud CG (2009) mTORC1 signalling and mRNA translation. *Biochemical Society transactions* 37 (Pt 1):227-231. doi:10.1042/bst0370227
64. Gressner AM, Wool IG (1974) The phosphorylation of liver ribosomal proteins in vivo. Evidence that only a single small subunit protein (S6) is phosphorylated. *The Journal of biological chemistry* 249 (21):6917-6925
65. Wool IG (1996) Extraribosomal functions of ribosomal proteins. *Trends in biochemical sciences* 21 (5):164-165
66. Tschochner H, Hurt E (2003) Pre-ribosomes on the road from the nucleolus to the cytoplasm. *Trends in cell biology* 13 (5):255-263
67. Rabl J, Leibundgut M, Ataide SF, Haag A, Ban N (2011) Crystal structure of the eukaryotic 40S ribosomal subunit in complex with initiation factor 1. *Science (New York, NY)* 331 (6018):730-736. doi:10.1126/science.1198308
68. Ruvinsky I, Meyuhas O (2006) Ribosomal protein S6 phosphorylation: from protein synthesis to cell size. *Trends in biochemical sciences* 31 (6):342-348. doi:10.1016/j.tibs.2006.04.003
69. Meyuhas O (2008) Chapter 1 Physiological Roles of Ribosomal Protein S6: One of Its Kind. 268:1-37. doi:10.1016/s1937-6448(08)00801-0
70. Hay N, Sonenberg N (2004) Upstream and downstream of mTOR. *Genes & development* 18 (16):1926-1945. doi:10.1101/gad.1212704
71. Ma XM, Blenis J (2009) Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control. *Nature reviews Molecular cell biology* 10 (5):307-318. doi:10.1038/nrm2672
72. Fenton TR, Gout IT (2011) Functions and regulation of the 70kDa ribosomal S6 kinases. *The international journal of biochemistry & cell biology* 43 (1):47-59. doi:10.1016/j.biocel.2010.09.018
73. Grove JR, Banerjee P, Balasubramanyam A, Coffey PJ, Price DJ, Avruch J, Woodgett JR (1991) Cloning and expression of two human p70 S6 kinase polypeptides differing only at their amino termini. *Molecular and cellular biology* 11 (11):5541-5550
74. Gout I, Minami T, Hara K, Tsujishita Y, Filonenko V, Waterfield MD, Yonezawa K (1998) Molecular cloning and characterization of a novel p70 S6 kinase, p70 S6 kinase beta containing a proline-rich region. *The Journal of biological chemistry* 273 (46):30061-30064

75. Shin S, Wolgamott L, Yu Y, Blenis J, Yoon SO (2011) Glycogen synthase kinase (GSK)-3 promotes p70 ribosomal protein S6 kinase (p70S6K) activity and cell proliferation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (47):E1204-1213. doi:10.1073/pnas.1110195108
76. Banerjee P, Ahmad MF, Grove JR, Kozlosky C, Price DJ, Avruch J (1990) Molecular structure of a major insulin/mitogen-activated 70-kDa S6 protein kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87 (21):8550-8554
77. Kozma SC, Ferrari S, Bassand P, Siegmann M, Totty N, Thomas G (1990) Cloning of the mitogen-activated S6 kinase from rat liver reveals an enzyme of the second messenger subfamily. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87 (19):7365-7369
78. Raught B, Peiretti F, Gingras AC, Livingstone M, Shahbazian D, Mayeur GL, Polakiewicz RD, Sonenberg N, Hershey JW (2004) Phosphorylation of eucaryotic translation initiation factor 4B Ser422 is modulated by S6 kinases. *The EMBO journal* 23 (8):1761-1769. doi:10.1038/sj.emboj.7600193
79. Shahbazian D, Roux PP, Mieulet V, Cohen MS, Raught B, Taunton J, Hershey JW, Blenis J, Pende M, Sonenberg N (2006) The mTOR/PI3K and MAPK pathways converge on eIF4B to control its phosphorylation and activity. *The EMBO journal* 25 (12):2781-2791. doi:10.1038/sj.emboj.7601166
80. Dorrello NV, Peschiaroli A, Guardavaccaro D, Colburn NH, Sherman NE, Pagano M (2006) S6K1- and betaTRCP-mediated degradation of PDCD4 promotes protein translation and cell growth. *Science (New York, NY)* 314 (5798):467-471. doi:10.1126/science.1130276
81. Roux PP, Topisirovic I (2012) Regulation of mRNA translation by signaling pathways. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 4 (11). doi:10.1101/cshperspect.a012252
82. Krieg J, Hofsteenge J, Thomas G (1988) Identification of the 40 S ribosomal protein S6 phosphorylation sites induced by cycloheximide. *The Journal of biological chemistry* 263 (23):11473-11477
83. Ferrari S, Bandi HR, Hofsteenge J, Bussian BM, Thomas G (1991) Mitogen-activated 70K S6 kinase. Identification of in vitro 40 S ribosomal S6 phosphorylation sites. *The Journal of biological chemistry* 266 (33):22770-22775
84. Bandi HR, Ferrari S, Krieg J, Meyer HE, Thomas G (1993) Identification of 40 S ribosomal protein S6 phosphorylation sites in Swiss mouse 3T3 fibroblasts stimulated with serum. *The Journal of biological chemistry* 268 (6):4530-4533
85. Meyuhas O (2008) Physiological roles of ribosomal protein S6: one of its kind. *International review of cell and molecular biology* 268:1-37. doi:10.1016/s1937-6448(08)00801-0
86. Roux PP, Blenis J (2004) ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiology and molecular biology reviews* : MMBR 68 (2):320-344. doi:10.1128/membr.68.2.320-344.2004
87. Carriere A, Cargnello M, Julien LA, Gao H, Bonneil E, Thibault P, Roux PP (2008) Oncogenic MAPK signaling stimulates mTORC1 activity by promoting

- RSK-mediated raptor phosphorylation. *Current biology* : CB 18 (17):1269-1277. doi:10.1016/j.cub.2008.07.078
88. Jones SW, Erikson E, Blenis J, Maller JL, Erikson RL (1988) A *Xenopus* ribosomal protein S6 kinase has two apparent kinase domains that are each similar to distinct protein kinases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85 (10):3377-3381
89. Fisher TL, Blenis J (1996) Evidence for two catalytically active kinase domains in pp90rsk. *Molecular and cellular biology* 16 (3):1212-1219
90. Carriere A, Ray H, Blenis J, Roux PP (2008) The RSK factors of activating the Ras/MAPK signaling cascade. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 13:4258-4275
91. Ballou LM, Luther H, Thomas G (1991) MAP2 kinase and 70K S6 kinase lie on distinct signalling pathways. *Nature* 349 (6307):348-350. doi:10.1038/349348a0
92. Chung J, Kuo CJ, Crabtree GR, Blenis J (1992) Rapamycin-FKBP specifically blocks growth-dependent activation of and signaling by the 70 kd S6 protein kinases. *Cell* 69 (7):1227-1236
93. Pende M, Um SH, Mieulet V, Sticker M, Goss VL, Mestan J, Mueller M, Fumagalli S, Kozma SC, Thomas G (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. *Molecular and cellular biology* 24 (8):3112-3124
94. Roux PP, Shahbazian D, Vu H, Holz MK, Cohen MS, Taunton J, Sonenberg N, Blenis J (2007) RAS/ERK signaling promotes site-specific ribosomal protein S6 phosphorylation via RSK and stimulates cap-dependent translation. *The Journal of biological chemistry* 282 (19):14056-14064. doi:10.1074/jbc.M700906200
95. Ruvinsky I, Sharon N, Lerer T, Cohen H, Stolovich-Rain M, Nir T, Dor Y, Zisman P, Meyuhas O (2005) Ribosomal protein S6 phosphorylation is a determinant of cell size and glucose homeostasis. *Genes & development* 19 (18):2199-2211. doi:10.1101/gad.351605
96. Levy S, Avni D, Hariharan N, Perry RP, Meyuhas O (1991) Oligopyrimidine tract at the 5' end of mammalian ribosomal protein mRNAs is required for their translational control. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88 (8):3319-3323
97. Kawasome H, Papst P, Webb S, Keller GM, Johnson GL, Gelfand EW, Terada N (1998) Targeted disruption of p70(s6k) defines its role in protein synthesis and rapamycin sensitivity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (9):5033-5038
98. Shima H, Pende M, Chen Y, Fumagalli S, Thomas G, Kozma SC (1998) Disruption of the p70(s6k)/p85(s6k) gene reveals a small mouse phenotype and a new functional S6 kinase. *The EMBO journal* 17 (22):6649-6659. doi:10.1093/emboj/17.22.6649
99. Loreni F, Thomas G, Amaldi F (2000) Transcription inhibitors stimulate translation of 5' TOP mRNAs through activation of S6 kinase and the

mTOR/FRAP signalling pathway. *European journal of biochemistry / FEBS* 267 (22):6594-6601

100. Tang H, Hornstein E, Stolovich M, Levy G, Livingstone M, Templeton D, Avruch J, Meyuhas O (2001) Amino acid-induced translation of TOP mRNAs is fully dependent on phosphatidylinositol 3-kinase-mediated signaling, is partially inhibited by rapamycin, and is independent of S6K1 and rpS6 phosphorylation. *Molecular and cellular biology* 21 (24):8671-8683. doi:10.1128/mcb.21.24.8671-8683.2001

101. Balakrishnan S, Bellamy TC (2009) Depression of parallel and climbing fiber transmission to Bergmann glia is input specific and correlates with increased precision of synaptic transmission. *Glia* 57 (4):393-401. doi:10.1002/glia.20768

102. Ortega A, Eshhar N, Teichberg VI (1991) Properties of kainate receptor/channels on cultured Bergmann glia. *Neuroscience* 41 (2-3):335-349

103. Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254

104. Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* (227):680-685

105. Morales M, Gonzalez-Mejia ME, Bernabe A, Hernandez-Kelly LC, Ortega A (2006) Glutamate activates protein kinase B (PKB/Akt) through AMPA receptors in cultured Bergmann glia cells. *Neurochemical research* 31 (3):423-429. doi:10.1007/s11064-005-9034-2

106. Rosner M, Fuchs C, Dolznig H, Hengstschlager M (2011) Different cytoplasmic/nuclear distribution of S6 protein phosphorylated at S240/244 and S235/236. *Amino acids* 40 (2):595-600. doi:10.1007/s00726-010-0684-2

107. Hershey JW, Sonenberg N, Mathews MB (2012) Principles of translational control: an overview. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 4 (12). doi:10.1101/cshperspect.a011528

108. Perea G, Araque A (2010) GLIA modulates synaptic transmission. *Brain research reviews* 63 (1-2):93-102. doi:10.1016/j.brainresrev.2009.10.005

109. Navarrete M, Araque A (2011) Basal synaptic transmission: astrocytes rule! *Cell* 146 (5):675-677. doi:10.1016/j.cell.2011.08.006

110. Bak LK, Schousboe A, Waagepetersen HS (2006) The glutamate/GABA-glutamine cycle: aspects of transport, neurotransmitter homeostasis and ammonia transfer. *Journal of neurochemistry* 98 (3):641-653. doi:10.1111/j.1471-4159.2006.03913.x

111. Pellerin L, Magistretti PJ (2012) Sweet sixteen for ANLS. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 32 (7):1152-1166. doi:10.1038/jcbfm.2011.149

112. Balakrishnan S, Dobson KL, Jackson C, Bellamy TC (2014) Ectopic release of glutamate contributes to spillover at parallel fibre synapses in the cerebellum. *The Journal of physiology* 592 (Pt 7):1493-1503. doi:10.1113/jphysiol.2013.267039

113. Gallo V, Ghiani CA (2000) Glutamate receptors in glia: new cells, new inputs and new functions. *Trends in pharmacological sciences* 21 (7):252-258

114. Salmond RJ, Emery J, Okkenhaug K, Zamoyska R (2009) MAPK, phosphatidylinositol 3-kinase, and mammalian target of rapamycin pathways converge at the level of ribosomal protein S6 phosphorylation to control metabolic signaling in CD8 T cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 183 (11):7388-7397. doi:10.4049/jimmunol.0902294