



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO**

---

**UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS**

**UNIDAD ACADÉMICA DE MEDICINA**

**“PARTICIPACIÓN DE PAXILINA Y VIMENTINA EN LA  
SEÑALIZACIÓN INDUCIDA POR GLUTAMATO EN  
CÉLULAS GLIALES DE BERGMANN MEDIADO POR  
RECEPTORES AMPA”**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

P R E S E N T A :

**N A P O L E Ó N N A V A R R O T I T O**

DIRECTOR DE TESIS: DR. ALEJANDRO MILLÁN VEGA

CODIRECTOR DE TESIS: DR. ARTURO ORTEGA SOTO

CHILPANCINGO, GRO., SEPTIEMBRE DE 2006.

**“PARTICIPACIÓN DE PAXILINA Y VIMENTINA EN LA  
SEÑALIZACIÓN INDUCIDA POR GLUTAMATO EN CÉLULAS  
GLIALES DE BERGMANN MEDIADO POR RECEPTORES  
AMPA”**

Este trabajo se realizó en el Laboratorio 23 del Departamento de Genética y Biología Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional Campus Zacatenco, México D. F.

**Bajo la dirección de:**

Dr. Alejandro Millán Vega

Dr. Arturo Ortega Soto

**La tutoría de:**

M en C. Natividad Castro Alarcón

**La asesoría de:**

Dra. Mónica Espinoza Rojo

Dr. Alfonso Bernabé Carreño

Dr. Marco Antonio Leyva Vázquez

Esta investigación se desarrolló mediante el donativo 43164-Q: "Receptores y transportadores glutamatérgicos; Señalización y regulación de la expresión genética II" otorgado al Dr. Arturo Ortega Soto.

Durante el período en que cursó la Maestría en Ciencias Biomédicas, el C. Napoleón Navarro Tito recibió beca del CONACYT con número de becario 202740.

Asimismo, el estudiante agradece la Beca de Movilidad Santander Universia otorgada por la banca Santander Serfín, durante el periodo comprendido entre el 15 de Agosto de 2005 al 15 de Enero de 2006.

## **Esto va dedicado . . .**

A **DIOS** porque me ha iluminado en los momentos mas difíciles y por ayudarme a tomar las mejores decisiones y guiarme por el camino adecuado.

A mi papá **Francisco Navarro Espíndola** por ser un ejemplo de superación y dedicación, esto es por usted campeón.

A mi mamá **Flavia Tito Maldonado**, usted me dio la vida . . . pero la vida y Dios me dio algo mucho mas grande, me dió a la mujer mas maravillosa como madre, usted. Gracias por estar conmigo en todo momento, porque sin su complicidad, confianza y apoyo nada de esto hubiera sido posible. Por escuchar mis inquietudes siempre y darme los mejores consejos, para ustedes mi amor y respeto mas profundo.

A mi papá **Silvino Tito Morán** por alentarme a seguir adelante en todo momento, y por su claro ejemplo de superación.

A mi mamá **Socorro Maldonado** q.e.p.d., desde donde esté, este logro es de usted también.

A mis hermanos Rebeca, Francisco, Olivia, Perla, Iván y Diana, porque en todo momento me han mostrado su cariño y apoyo incondicional, esto también es de ustedes.

A mis sobrinos: Mayté, Mayra, Marisol, Brian, Connie, Dany, Isis, Francisco, Amairani, Abimael, Axel y Lupita

A mis tíos.

A mis pequeños Axel y Lupita, por llenar mi vida de felicidad desde antes de nacer, porque sin saberlo me alentaban en los momentos más difíciles, los quiero.

A mis compañeros glicales y amigos del laboratorio 23 del DGBM: Angélica, Iraís, Christian, Lupita, Iliana, Liliana, Francisco, Moisés, Jesús, Judy, Rossana, Elba, Gisela, Alejandro, Reynaldo, Eduardo.

A mis amigos de parrandas y cómplices de nuestras travesuras: Rebeca, Karina, Caro, Yeni, Julio, Juan Pablo, Libertad, Berenice, Eduard, Toñita, Aurora, Hilda, David, Emma, Víctor y francisco.

## AGRADECIMIENTOS

Al Doctor **Alejandro Millán Vega** por brindarme su confianza, paciencia, y consejos, por alentarme a seguir desarrollándome en el ámbito de la investigación en todo momento, gracias Doctor.

Al Doctor **Arturo Ortega Soto** por darme la oportunidad de ingresar y permanecer en su laboratorio durante la realización de este trabajo experimental de tesis, por fomentar el espíritu de investigación en sus alumnos, gracias Doctor.

A mi comité tutorial: MC Natividad Castro Alarcón, Dra. Mónica Espinoza Rojo, Dr. Alfonso Bernabé Carreño, Dr. Marco Antonio Leyva Vázquez, que con sus comentarios y aportes hicieron posible la culminación de este trabajo de tesis.

Por su apoyo y asistencia técnica a la bióloga Luisa Clara Regina Hernández Kelly, al Ing. Bioquímico Luís Cid Cid y a la técnico de laboratorio Blanca Rocío Ibarra López.

Al Dr. Eduardo Pérez por su gentileza en la proporción del anticuerpo  $\alpha$ -Vimentina.

Por su asistencia administrativa a la bióloga Paola Ramírez Macedo.

A Jose Francisco Gallardo Vera por el material didáctico proporcionado.

## CONTENIDO

RESUMEN.....	3
ABSTRACT.....	4
INTRODUCCIÓN.....	5
Receptores a Glutamato .....	5
El cerebelo y glia de Bergmann .....	6
Cinasas activadas en glia de Bergmann .....	8
Citoesqueleto y migración .....	9
Citoesqueleto en enfermedades neurodegenerativas .....	9
Proteínas reguladoras del citoesqueleto .....	10
Paxilina .....	11
Estructura molecular de paxilina .....	11
Vimentina .....	12
MATERIAL Y MÉTODOS .....	14
Reactivos .....	14
Animales .....	14
Cultivo Celular .....	14
Cuantificación de proteínas .....	15
Inmunoprecipitación .....	15
Inmunodetección en fase sólida .....	16
Eliminación de anticuerpos de las membranas .....	17
Análisis Estadístico .....	17
RESULTADOS .....	18
DISCUSIÓN .....	27

CONCLUSIONES .....	30
REFERENCIAS .....	31



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	
Representación esquemática del cerebelo.....	6
<b>Figura 2</b>	
Estructura molecular de paxilina.....	12
<b>Figura 3</b>	
Paxilina interactúa con los receptores AMPA en un modo dependiente del tiempo.....	19
<b>Figura 4</b>	
Expresión diferencial de las diferentes subunidades del receptor AMPA.....	20
<b>Figura 5</b>	
La asociación de paxilina a la subunidad GluR4 es dependiente de la dosis de Glu en el medio.....	21
<b>Figura 6</b>	
Los receptores AMPA están involucrados en la asociación de paxilina-GluR4.....	22
<b>Figura 7</b>	
Glu induce la fosforilación en tirosina de la subunidad GluR4 del receptor AMPA y paxilina.....	24
<b>Figura 8</b>	
La cinasa Src está involucrada en la asociación paxilina-GluR4.....	25

**Figura 9**

La proteína vimentina se asocia a la subunidad GluR4 en un modo dependiente de Glu..... 26

**Figura 10**

Modelo de interacción de proteínas reguladoras del citoesqueleto paxilina y vimentina a los receptores AMPA ..... 31

## ABREVIATURAS

AMPA	$\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxasol propionato
ANOVA	Análisis de varianza
BGC	Células gliales de Bergmann
BSA	Albúmina sérica bovina
CAMKII	Proteína cinasa II dependiente de $Ca^{2+}$ /Calmodulina
CNQX	6-ciano-2,3-dihidroxi-7-nitroquinoxalina-2,3-diona
CPCCOEt	7-(hidroximino)ciclopropa[b] cromen-1a-carboxilato etil ester
DMEM	Medio de Eagle modificado por Dulbecco
EA	Enfermedad de Alzheimer
EDTA	Acido etilendiaminotetraacético
FAK	Cinasa de adhesión focal
Glu	L-Glutamato
GSK3 $\beta$	Glicógeno sintasa cinasa 3 $\beta$
iGluRs	Receptores a glutamato ionotrópicos
IP	Inmunoprecipitación
KA	Kainato
KDa	Kilodaltones
LIM	Dominio de homologia a lin-11, isl-1, mec-3
mGluR	Receptor a glutamato metabotrópico
MAPK	Proteína cinasa activada por mitógeno
NaF	Fluoruro de sodio
Na <sub>3</sub> MoO <sub>4</sub>	Molibdato de sodio
Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>	Ortovanadato de sodio
NMDA	N-Metil-D-Aspartato
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
PDZ	PSD-95/SAP-90, Disc Large, ZO-1
PI3K	Fosfatidil inositol-3-cinasa
PKB	Proteína cinasa B
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo

PP2	4-amino-5-(4-clorofenil)-7-(t-butil)pirazolol(3,4-d)pirimidina
p90RSK	Proteína ribosomal p90 S6 cinasa
PYK2	Tirosina cinasa 2 rica en prolina
RIPA	Amortiguador de ensayo de radioinmunoprecipitación
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio
SH	Dominio de homología a Src
SNC	Sistema Nervioso Central
Src	Sarcoma
STAT	Transactivadora de la señal y activadora de la transcripción

## RESUMEN

El glutamato (Glu), es el principal neurotransmisor excitador del Sistema Nervioso Central que durante el desarrollo embrionario funciona como quimiotáctico para la migración de neuronas granulares a través de las células Gliales de Bergmann (BGC). En el presente estudio realizado en cultivos primarios de Células gliales de Bergmann, utilizando ensayos de inmunoprecipitación acoplados a inmunodetección en fase sólida, se muestra que Glu induce la fosforilación de paxilina en residuos de tirosina y de la misma a la subunidad GluR4 de los receptores AMPA. Adicionalmente, induce la asociación entre Paxilina-GluR4 de los receptores AMPA y es dependiente del tiempo y de la dosis del Glu en el medio. Además, los resultados de la caracterización farmacológica sugieren que esta interacción es mediada por los receptores, y de manera adicional observamos que este evento es dependiente de Src. Vimentina, que es una proteína perteneciente al grupo III de los filamentos intermedios, observamos de manera interesante que interactúa con la subunidad GluR4 y esta interacción es dependiente del tiempo. Estos resultados sugieren que Glu está regulando procesos fisiológicos importantes tales como contactos focales, y posteriormente migración celular, que involucra eventos como la reorganización de los diferentes componentes del citoesqueleto como actina a través del reclutamiento de la proteína adaptadora paxilina y vimentina a la subunidad GluR4 de los receptores AMPA en Células Gliales de Bergmann.

## **ABSTRACT**

Glutamate (Glu) is the major excitatory neurotransmitter of Central Nervous System that during embryonic development is a chemotactic factor for migration of granular neurons through Bergmann Glial Cells (BGC). In this study using in primary cultures of Bergmann Glia, employing immunoprecipitation assays coupled to western blot, we demonstrated that paxillin and GluR4 subunit of AMPA receptors were tyrosine phosphorylated as a result of stimulation with Glu. In addition, Glu caused association between Paxillin-GluR4 subunit of AMPA receptors and was time-dose dependent of Glu in the medium. Moreover, our results of pharmacological characterization suggest that AMPA receptors were involvement in this interaction and we showed that this event is Src dependent. Vimentin, is a protein that belongs to group III of intermediate filaments, we observed interestingly his interaction with GluR4 after Glu stimulation and this event was time dependent. These results suggest strongly that Glu is regulating physiologic processes very important such as focal contacts, and after cell migration, involving events as reorganization of different cytoskeleton components such as actin through recruitment of scaffold protein paxillin and vimentin onto GluR4 of AMPA receptors in Bergmann Glia.

# INTRODUCCIÓN

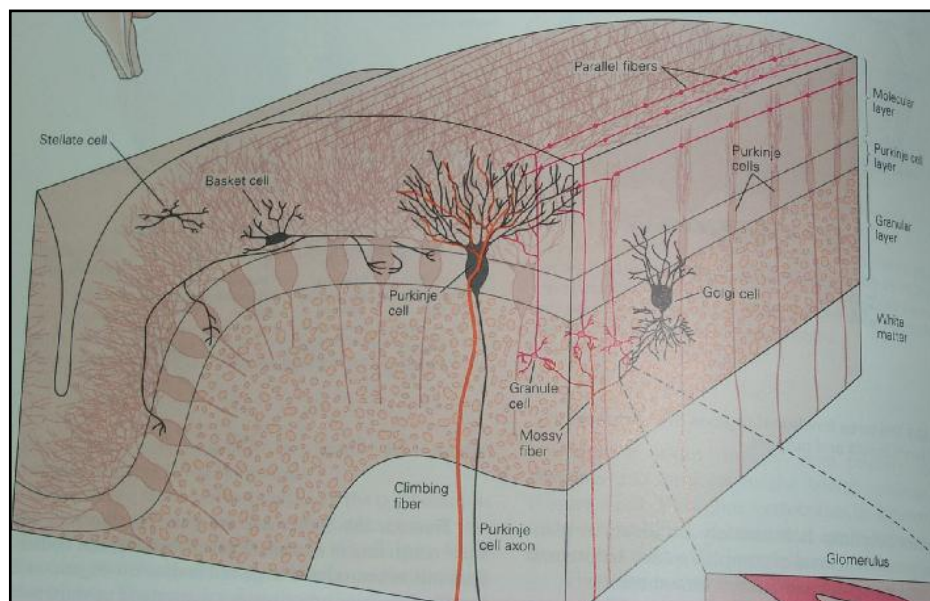
## Receptores a Glutamato

El L-glutamato (Glu), un aminoácido dicarboxílico, es el neurotransmisor excitador más importante del Sistema nervioso central (SNC) de los vertebrados y su acción es mediada por la unión a dos tipos de receptores estructural y funcionalmente diferentes. Los acoplados a proteínas G y cascadas de segundos mensajeros o metabotrópicos (mGluRs) (Rose y Konnerth, 2000); y los receptores que forman un canal iónico abierto por ligando o receptores ionotrópicos (iGluRs). Los receptores ionotrópicos se dividen de acuerdo al agonista que los activa preferencialmente y éstos son: NMDA, AMPA y Kainato. Por otro lado, los receptores metabotrópicos están clasificados de acuerdo a la homología de su secuencia y la activación diferencial de cascadas de segundos mensajeros, dividiéndose en tres grupos, el Grupo I conformado por mGluR1 y mGluR5. El mGluR2, mGluR3 pertenecen al grupo II. El grupo III integrado por mGluR4, mGluR6, mGluR7, mGluR8. Los receptores a glutamato ionotrópicos permiten la transmisión excitadora rápida del SNC, además de estar involucrados en los eventos de plasticidad sináptica, tales como la formación de memoria, así como también en desórdenes neurológicos que incluyen epilepsia, daño isquémico del cerebro y desórdenes neurodegenerativos como enfermedad de Parkinson y Alzheimer, corea de Huntington y esclerosis lateral amiotrófica (Dingledine y cols., 1999, Rose y Konnerth, 2000; Lerma y cols., 2001). El Glu regula la mayor parte de la transmisión sináptica rápida en el SNC, por medio de los iGluRs. Participan de manera importante en los cambios plásticos que se llevan a cabo durante la transmisión sináptica, en el aprendizaje y la formación de memoria, así como en la creación de redes y proyecciones neuronales durante el desarrollo. Irónicamente, el Glu y otros aminoácidos excitadores relacionados resultan ser tóxicos para las neuronas. La activación excesiva de los GluRs durante un daño cerebral, tales como la isquemia, traumatismo cerebral y ataque epiléptico, conduce a la muerte neuronal. La neurotoxicidad del Glu también se ha visto involucrada en la

generación de varias enfermedades. De este modo, los GluRs se encuentran íntimamente involucrados en la fisiología y patología de las funciones cerebrales (Cunningham et al., 1994; Ozawa et al., 1998).

## El Cerebelo y Glia de Bergmann

El cerebelo es un órgano que fue el primero en aparecer en los vertebrados. Un cerebelo rudimentario se reconoce en forma de dos crestas y una comisura interconectada en lampreas. El cerebelo representa el 10% del volumen total del encéfalo, de aquí su nombre derivado del latín, que significa cerebro pequeño, sin embargo, el cerebelo maduro contiene más de la mitad de neuronas del encéfalo en un individuo (Larshell, 1967).



**Fig. 1. Representación esquemática del cerebelo** (tomado de Kandel, 2004. Principles of neural science).



El cerebelo posee dos compartimentos: la corteza y el núcleo profundo. Histológicamente la corteza del cerebelo posee tres capas celulares (la molecular, las de las células de purkinje, de canasta, estrelladas, de Golgi y granulares) (Altman y Bayer, 1997). La corteza cerebelar posee dos principales terminales aferentes: la fibra musgosa y la fibra trepadora, ambas de tipo glutamatérgico. La fibra trepadora proviene del núcleo de oliva inferior y en la corteza cerebelar proyecta alrededor de 10 prolongaciones para establecer un contacto monosináptico en las células de purkinje. La fibra musgosa proviene de diversos tallos del núcleo cerebral, así como de la medula espinal y establecen contactos con las interneuronas de la corteza cerebelar y con la célula granular; ésta última extiende su axon para formar la fibra paralela y establecer múltiples (alrededor de 20,000) contactos excitadores glutamatérgicos con la célula de Purkinje. Los contactos de las interneuronas con la fibra musgosa, de tipo GABAérgico inhibitorio, proveen un mecanismo de regulación de retroalimentación en la corteza del cerebelo (Voogd y Glickstein, 1998).

Existen tres tipos de neuroglia en el cerebelo, con una distribución que es selectiva de acuerdo a las diferentes capas del cerebelo: 1) astroglia en la capa granular, 2) oligodendroglia con sus procesos orientados longitudinalmente en la capa medular, y 3) las células gliales de Bergmann, la neuroglia distintiva, localizada en la corteza cerebelar (Ramón y Cajal, 1911).

Las células gliales de Bergmann figuran entre los tres tipos celulares astrocíticos presentes en la corteza del cerebelo. Sus cuerpos se localizan en la capa de las células de Purkinje y extienden sus axones a través de la capa molecular, mostrando una organización en columna (De Blass, 1984). Estas células desempeñan un papel fundamental en dirección de la organización de los otros componentes celulares del cerebelo. Durante el desarrollo, proveen una guía estructural a las células granulares que migran desde la línea externa del cerebelo hacia la capa interna (Cameron y Rakic, 1991). Esta función que cumple la glia de Bergmann durante el desarrollo del sistema nervioso central, es desempeñada por

la glia radial en diferentes regiones cerebrales, pero de manera excepcional, la glia de Bergmann (y la glia de Müller en la retina) permanece en el estado adulto con sus características de glia radial y no sufre la conversión astrocítica observada por este tipo particular de glia en las otras regiones cerebrales. Esto ha sugerido que las células gliales de Bergmann desempeñan una función adicional a la realizada por la glia radial durante el desarrollo.

Además, se ha demostrado que las funciones de las células gliales abarcan procesos celulares adicionales a los tradicionalmente reconocidos; entre éstas, destacan aquellas involucradas en la modulación de la transmisión sináptica. La función importante de algunas proteínas membranales, que de manera relevante proporcionan los elementos necesarios para una eficiente neurotransmisión, y que a su vez resultan importantes en su modulación. Por ejemplo, el transportador de Glu que elimina el neurotransmisor del espacio sináptico y que se ha demostrado modifica su actividad en forma dependiente del Glu extracelular (Kanai y cols., 1997; González y cols., 1999); y de los receptores a Glu, los cuales al ser estimulados por el neurotransmisor activan o modulan la actividad de una amplia variedad de proteínas y que pueden incluso modificar de manera permanente las propiedades de las células gliales al alterar la expresión genética (López y cols., 1998).

### **Cinasas activadas en Glia de Bergmann**

En células gliales de Bergmann se ha demostrado la activación de la proteína cinasa activada por mitógeno (MAPK) después de la estimulación con Glu (López-Colomé y Ortega, 1997). En este modelo de estudio se ha demostrado también la activación de la proteína transactivadora de la señal y activadora de la transcripción STAT3 a través de receptores metabotrópicos (Aguilera y Ortega, 1999), estas enzimas tienen blancos moleculares importantes como los factores de transcripción que forman el complejo ternario c-myc, c-jun, C/EBP mediante

fosforilación. También se ha descrito la activación de PI3K, CaMKII, MAPK y p90RSK vía de señalización activada por Glu durante la regulación transcripcional (Aguirre y cols. 2002). Además, la activación de diversas moléculas involucradas con contactos focales como FAK, activación dependiente de receptores a glutamato de tipo AMPA (Millán y cols. 2001). Asimismo, se ha demostrado la activación mediante fosforilación en tirosina de los receptores AMPA glutamatérgicos y reclutamiento de FAK, la subunidad reguladora p85 y la subunidad catalítica p110 de PI3K a los receptores AMPA (Millán y cols. 2004), PI3K desempeña un papel importante ya que activa a proteínas que regulan diversos procesos celulares y una de ellas es la vía PI3K-PKB-GSK3 $\beta$ . Se ha descrito la activación de PKB y GSK3 $\beta$  y que es dependiente de PI3K (Morales M y cols. 2006), es importante señalar que esta vía está regulando de manera importante procesos como control de la traducción, apoptosis y migración celular. Esta vía a través de GSK3 $\beta$  está regulando citoesqueleto de microtúbulos ya que fosforila a tau, una proteína asociada a microtúbulos.

### **Citoesqueleto y Migración**

Diferentes moléculas señalizadoras son capaces de interferir con migración celular afectando la adhesión celular y rearrreglos del citoesqueleto. El citoesqueleto esta integrado de tres principales componentes: los microtúbulos, los microfilamentos, y los filamentos intermedios. Los microtúbulos son estructuras muy dinámicas, y en las células en proliferación tales como neuroblastos (precursores de neuronas), su probabilidad de ensamblaje es el mismo que el de la depolarización en todas direcciones. Este equilibrio resulta en el mantenimiento celular en una forma esférica. Sin embargo, durante la diferenciación de un neuroblasto a una neurona, los microtúbulos llegan a ser estabilizados en direcciones específicas, generando las extensiones citoplasmáticas que llegarán a ser el axón y las dendritas.

La MAP tau es una fosfoproteína neuronal regulada durante el desarrollo. La fosforilación de tau reduce su capacidad de unirse y estabilizar los microtubulos axonal durante el crecimiento axonal (Takahashi y cols. 2003).

### **Citoesqueleto en enfermedades neurodegenerativas**

Muchos desórdenes neurodegenerativos crónicos progresivos son caracterizados por la presencia de agregados de proteína anormal en neuronas y glia del SNC. Un grupo heterogéneo de desórdenes del movimiento y demencias está ligado por las presencia de inclusiones intracelulares patológicas de proteínas de filamentos intermedios neuronales o la proteína asociada a microtúbulos (MAP) tau (Caims NJ y cols. 2004).

La fosforilación de tau en residuos específicos no solo ocurre durante el desarrollo normal del cerebro sino también en condiciones patológicas como en enfermedad de Alzheimer. En condiciones normales, el equilibrio entre la fosforilación y defosforilación de tau modula la estabilidad del citoesqueleto axonal y de este modo la morfología axonal. Sin embargo, el rompimiento de este equilibrio bajo condiciones patológicas resulta en la disfunción de tau, que está considerado uno de los eventos críticos que conducen a la degeneración neuronal.

La hiperfosforilación de tau reduce su afinidad por los microtúbulos y puede contribuir a la autoensamblaje de tau y la formación de ovillos neurofibrilares, uno de los principales marcadores histopatológicos de EA. Los ovillos neurofibrilares son lesiones intracelulares que consisten de filamentos apareados fosforilados de manera aberrante de la proteína del citoesqueleto tau. (Brizna M y Elbaum D). Los ovillos neurofibrilares están compuestos de tau hiperfosforilada organizada en estructuras filamentosas llamadas filamentos helicoidales apareados.

En Enfermedad de Parkinson y demencia con cuerpos de Lewy, las proteínas en triplete de neurofilamentos y  $\alpha$ -internexina son encontradas en un subconjunto de cuerpos de Lewy positivos a  $\alpha$ -sinucleína, si bien su papel en la formación de la lesión o neurodegeneración es incierto. Se ha identificado recientemente que la

$\alpha$ -internexina como un componente muy importante de las inclusiones patológicas de la demencia frontotemporal y la enfermedad con inclusiones de filamentos intermedios neuronales (Cairns NJ y cols. 2004).

### **Proteínas reguladoras del citoesqueleto**

Las proteínas cinasas no receptoras son un conjunto de proteínas diversas y sus principales funciones involucran la regulación de los aspectos multicelulares del organismo. Las señales célula-célula concerniente al crecimiento, diferenciación, adhesión, movilidad y muerte, son señales transmitidas frecuentemente a través de estas tirosina cinasas (Robinson y cols., 2000).

### **Paxilina**

Paxilina fue caracterizada inicialmente como una proteína de adhesión focal de 68 kDa y es una proteína de 557 aminoácidos en humanos. Está organizada en una serie de módulos de unión a proteínas. El amino-terminal contiene cinco motivos LD y varios dominios de unión SH2 mientras el carboxilo-terminal consiste de cuatro dominios LIM (Brown MC, 2004). En eucariontes superiores, se han identificado tres isoformas por splicing alternativo de paxilina. La isoforma principal expresada de forma ubicua es paxilina  $\alpha$ , mientras las isoformas  $\beta$  y  $\gamma$  muestran una expresión restringida (Mazaki Y. y cols, 1997).

Una función principal para paxilina radica en la integración y diseminación de señales de integrinas y factores de crecimiento para la migración celular eficiente. La movilidad es un proceso complejo que consta de muchas etapas y requiere la coordinación del tráfico de membrana y la reorganización de la red del citoesqueleto de actina y tubulina para la realización del movimiento celular. La actividad de varias familias p21 GTPasas son críticas para este proceso, y paxilina

es un importante mediador de la interacción de señales entre estas familias a través de su fosforilación y multipotentes asociaciones (Ballestrem C. Y cols. 2000; Hall A, 1998).

### Estructura molecular de paxilina

La estructura de multidominios de paxilina y la ausencia de motivos enzimáticos sugirió en primera instancia que era una proteína adaptadora. Dentro del amino terminal se encuentran cinco regiones ricas en leucina, llamados motivos LD paxilina que funcionan en el reconocimiento de la proteína. El motivo LD1 modula las interacciones con actopaxina, la cinasa unida a integrina (ILK), vinculina y la proteína E6 del papilomavirus. LD2 se une a vinculina y FAK/PYK2. LD4 se une a actopaxina, FAK/PYK2, p95PKL/GIT2/GIT1, y quizá PAK3, clatrina, y PABP1. De este modo no se han encontrado patrones de unión para el motivo LD5 y para el motivo degenerado LD3 (Brown MC, 2004).

Los dominios LIM son motivos dobles de dedos de zinc. El carboxilo terminal está comprendido de cuatro dominios LIM que también modulan interacciones proteína-proteína, además estos dominios se requieren para las adhesiones focales.

Funcionalmente, LIM3 (con cooperación de LIM2) medía la localización de paxilina a las adhesiones focales con fosforilación en serina/treonina de LIM2/3 regulando la localización de paxilina a las adhesiones focales y consecuentemente adhesión celular de fibronectina (Brown MC, 2004). Además de la identificación de los dominios LIM como mediadores de la localización subcelular de paxilina, tubulina fue identificada como el patrón de unión a LIM2 y LIM3. También se encuentran varios motivos potenciales de unión a SH3 ricos en prolina dentro del amino terminal de paxilina, consistente con una asociación descrita Src paxilina SH3

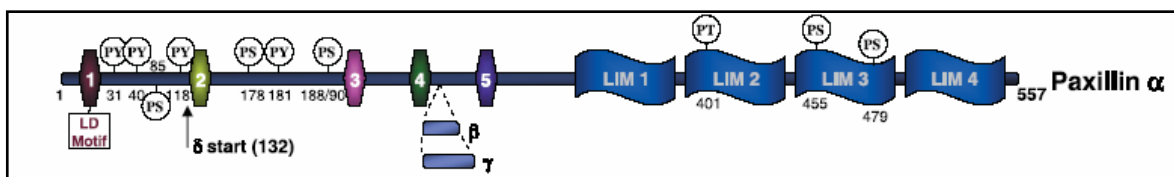


Fig. 2 Estructura molecular de paxilina (Brown MC, 2004).

## Vimentina

Los filamentos intermedios son componentes principales del citoesqueleto de las células que parecen ser estructuras relativamente estables debido a su insolubilidad *in vitro*.

Vimentina es una proteína del citoesqueleto perteneciente al grupo III de los filamentos intermedios y se expresa de manera normal en células de origen mesenquimal tales como células endoteliales, fibroblastos y leucocitos. La sobreexpresión de esta proteína es a menudo relacionada con crecimiento del tumor altamente invasivo.

En células endoteliales vimentina puede interactuar con la integrina  $\alpha6\beta4$  mediada a través de la proteína plectina.

Por lo antes mencionado y tomando en cuenta que la fosforilación de proteínas del citoesqueleto en el SNC juega un papel importante en las funciones de aprendizaje y la memoria, así como en neuropatologías como Alzheimer, Parkinson, Huntington entre otros. Trabajos previos, en células gliales de Bergmann han demostrado que cinasas involucradas en la regulación del citoesqueleto podrían ser activadas por glutamato vía receptores AMPA, provocando fosforilación de proteínas como FAK y que ésta es mediada por la cinasa p60src y reclutamiento de ellas en un sistema de transducisoma. Por esta razón nos propusimos estudiar otras proteínas involucradas en adhesiones focales y reguladoras del citoesqueleto como paxilina y vimentina.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### **Reactivos**

El Glutamato, y sus antagonistas fueron comprados de la casa comercial Tocris, Inc.

El reactivo de Bradford y los reactivos utilizados para SDS-PAGE fueron adquiridos de Bio-Rad (Hércules, CA)

El anticuerpo anti-vimentina, Anti-GluR1, anti-GluR3 y anti-GluR4 fueron comprados de Santa Cruz Biotechnology, Inc. (California, EUA). El anticuerpo anti-paxilina fue adquirido de Transduction Laboratories. El anticuerpo anti-GluR1,2,3 y la proteína G-Agarosa fueron comprados de ZYMED Laboratories.

### **Animales**

Los embriones de pollo de 14 días fueron donados por el laboratorio AVIMEX, S.A. de C.V.

### **Cultivo Celular**

Los cultivos primarios de células gliales de Bergmann fueron preparados de embriones de pollo de 14 días. Los cerebelos obtenidos de estos embriones se disgregaron con jeringas de diferentes calibres haciéndolas pasar a través de ellas.

El homogenado se dejó sedimentar durante 10 minutos para eliminar residuos de tejidos y agregados celulares. Al término de éste, el sobrenadante se aspiró y se centrifugó a 3000 rpm para coleccionar las células, las cuales se resuspendieron en DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino, glutamina 2mM y una mezcla de antibióticos. El número de células viables se determinó por exclusión con azul de tripano, se distribuyeron en placas de cultivo a razón de  $1 \times 10^6$  células



.ml<sup>-1</sup> y se incubaron a 37 °C en una atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub>. Estudios con inmunocitoquímica y de flujo de iones inducido por kainato muestran que las células obtenidas a partir de esta preparación son células gliales de Bergmann. Asimismo, ensayos de inmunodetección en fase sólida, el anticuerpo anti-KBP reconoce el marcador específico de las células gliales de Bergmann, la proteína KBP. Las células cultivadas fueron empleadas al cuarto o quinto día de incubación ya que alcanzaron el 80-90 % de confluencia (Ortega et al., 1991).

### **Cuantificación de Proteínas**

La cuantificación de proteínas se realizó mediante el método de Bradford, utilizando un estuche de la marca Biorad (Bradford, 1976).

### **Inmunoprecipitación**

La monocapa de células gliales fueron incubadas en DMEM con BSA al 0.5% durante 8 horas, transcurrido este tiempo se procedió a estimularlas con Glu. Posteriormente se cosecharon en PBS frío, que contenía inhibidores de fosfatasa (NaF 20 mM, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1 mM y Na<sub>3</sub>MoO<sub>4</sub> 20 mM) y el inhibidor de proteasas PMSF 0.5 mM, con la ayuda de un gendarme de cosecha y enseguida se procedió a centrifugar a 5000 rpm en una centrifuga refrigerada durante 10 minutos a 4 °C. El sobrenadante se eliminó y la pastilla se resuspendió en aproximadamente 100 µl de regulador RIPA (Tris HCl 10 mM pH 7.5, EGTA 1 mM, NaCl 158 mM, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1 mM, Na<sub>3</sub>MoO<sub>4</sub> 10 mM, NaF 25 mM, PMSF 1 mM, Aprotinina 2.5 µg.µl<sup>-1</sup> y Leupeptina 2.5 µg.µl<sup>-1</sup>) para lisar las células y se procedió a determinar la concentración de proteínas mediante el método de Bradford. Enseguida se solubilizó agregando en volumen 1:1 solución reguladora RIPA con detergentes (Tritón 2% y SDS 0.2%) durante 2 horas a 4 °C. El sobrenadante se agregó a un tubo que contenía 5 µl de proteína G-agarosa y 1 µl de anticuerpo anti-GluR4 y se

dejó agitando toda la noche a 4°C para permitir la formación de complejos antígeno-anticuerpo acoplados a la matriz de agarosa. Los inmunoprecipitados fueron colectados por centrifugación a 13000 rpm durante 3 minutos a 4°C y se lavaron 2 veces con 500 µl de regulador RIPA que contenía Tritón al 1% y PMSF 1 mM. Posteriormente fueron eluidos en 15 µl de regulador de muestra 3X (Tris-HCl 0.5 M pH 6.8, SDS 6%, 2-mercaptoetanol 300 mM, Azul de Bromofenol 0.3% y glicerol 30%) e hirviéndolo durante 5 minutos. Las proteínas se separaron por SDS-PAGE al 10%.

### **Inmunodetección en fase sólida**

Las proteínas obtenidas de los inmunoprecipitados fueron separados por SDS-PAGE y transferidos a una membrana de nitrocelulosa en cámara húmeda (Bio-Rad). La eficiencia de la transferencia se determinó por tinción de la membrana con rojo de Ponceau y con tinción con azul de Coomasie a los geles transferidos. Los sitios irrelevantes se cubrieron por incubación de las membranas durante dos horas a temperatura ambiente en solución de bloqueo que contenía 5% de leche descremada y 0.1% de Tween 20 en TBS (Tris-HCl pH 7.4, 0.15 M NaCl) para evitar interacciones inespecíficas. Después de un breve lavado con PBS, la membrana se expuso durante 12 horas a 4°C a un anticuerpo anti-vimentina, anti-paxilina, anti-GluR1, anti-GluR3, anti-GluR4. Posteriormente se realizaron 3 lavados con 0.1% de Tween 20 en TBS (Tris-HCl pH 7.4, 0.15 M NaCl). Se utilizó un anticuerpo secundario policlonal de ratón acoplado a peroxidasa de rábano para la detección de paxilina y vimentina, y un anticuerpo policlonal de cabra acoplado a peroxidasa de rábano para detectar a las diferentes subunidades de los receptores AMPA en BGC .

Después de realizar nuevamente el lavado de la membrana las bandas relevantes se detectaron por autorradiografía (X-OMAT Kodak) empleando un estuche de quimioluminiscencia (GIBCO BRL). La intensidad relativa de las bandas se

determinó por medio de análisis densitométrico empleando el Software EDAS de Kodak.

### **Eliminación de anticuerpos de las membranas**

Las membranas fueron incubadas con solución de desnudamiento (125 mM Tris=HCl pH 6.8, SDS 10%,  $\beta$ -mercaptoetanol) por 15 minutos a 45°C y lavadas 3 veces con PBS pH 7.4. Posteriormente se dieron 3 lavados de 15 minutos cada uno en solución con PBS 0.1% de Tween 20. Después se bloqueó por 2 horas en TBS que contenía 5% de leche semidescremada y 0.1% de Tween 20. La membrana fue incubada toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario anti-GluR4 a una dilución 1:1000 en TBS, 0.25% albúmina de suero bovino, 0.1% Tween 20, 0.01% timerosal, seguido por tres lavados en TBS, 0.01% Tween 20 y 1% de leche semidescremada. El anticuerpo secundario se incubó por 1 hora a temperatura ambiente seguido por seis lavados en TBS, 0.01% Tween 20 y 1% de leche semidescremada frío. Se reveló esta membrana utilizando un equipo de quimioluminiscencia (ECL).

### **Análisis Estadístico**

Los resultados se analizaron mediante análisis de varianza de una vía ANOVA para determinar si había diferencias estadísticamente significativas entre las diferentes condiciones, se utilizó la prueba de Dunette para comparar las diferentes condiciones contra el control.

Asi mismo, se empleó la prueba de *t* de student, para determinar significancia estadística entre dos grupos, para esto se empleó el programa estadístico Prisma (Software GraphPad, San Diego, CA).

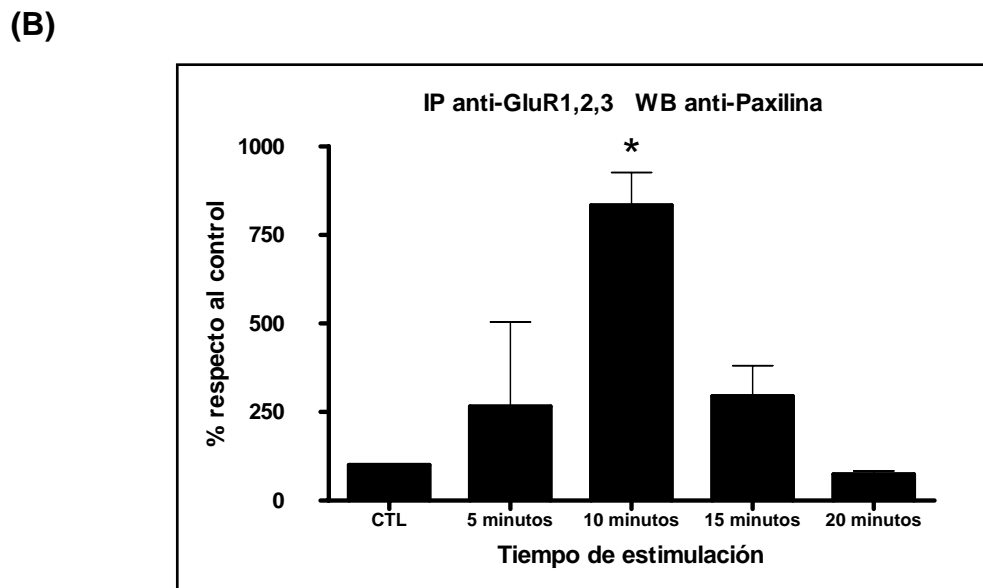
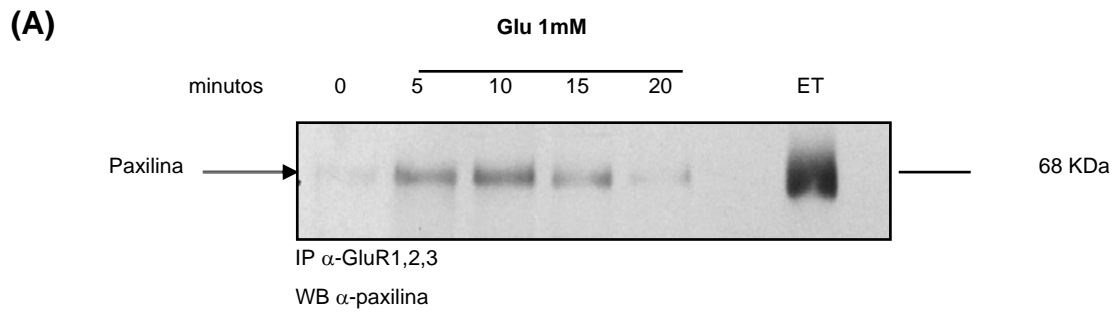
## RESULTADOS

### **Paxilina interactúa con los receptores AMPA en un modo dependiente del tiempo.**

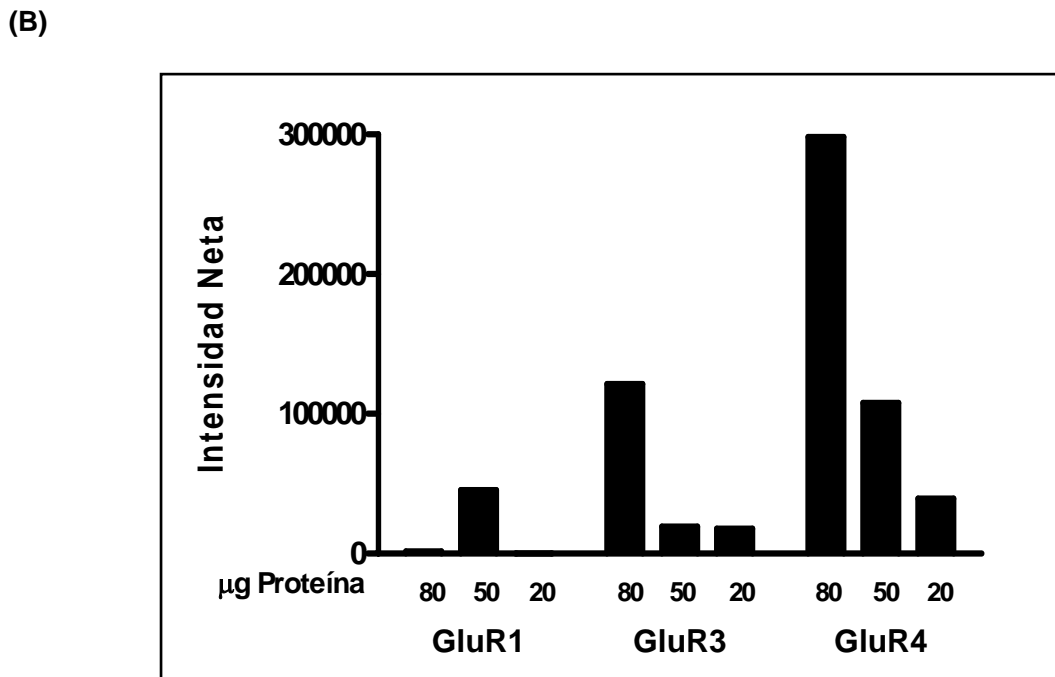
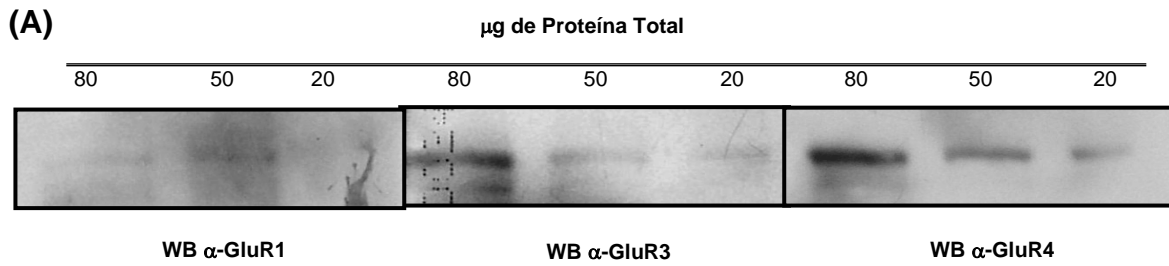
Paxilina es una proteína adaptadora, reguladora del citoesqueleto que se encuentra en adhesiones focales. Para determinar si se asocia esta proteína con los receptores AMPA se realizaron cursos temporales inmunoprecipitando extractos totales de cultivos primarios de BGC con el anticuerpo que reconoce a las subunidades GluR1, 2, 3 de los receptores AMPA glutamatérgicos, y con ensayos de inmunodetección en fase sólida se determinó la presencia de paxilina en el complejo. Los resultados obtenidos de tres experimentos independientes muestran que Glu induce la asociación de paxilina a los receptores AMPA en BGC mostrando un incremento a partir de los 5 minutos y teniendo un pico máximo a los 10 minutos demostrando esto que la interacción entre estas dos proteínas es dependiente del tiempo (Fig. 3).

### **Expresión diferencial de las diferentes subunidades del receptor AMPA.**

Para determinar la expresión de las diferentes subunidades del receptor AMPA se realizó una curva de concentración de estas subunidades mediante inmunodetección en fase sólida empleando los diferentes anticuerpos ( $\alpha$ -GluR1,  $\alpha$ -GluR3,  $\alpha$ -GluR4). Los resultados nos muestran que la subunidad GluR4 es la más expresada cuando se utiliza la misma concentración de proteína y una mayor eficiencia en la detección de esta proteína por parte de su anticuerpo, por lo que se determinó utilizar este anticuerpo en los experimentos posteriores y teniendo en cuenta que esta subunidad está involucrada en el proceso de desensibilización de los receptores AMPA (Fig. 4).



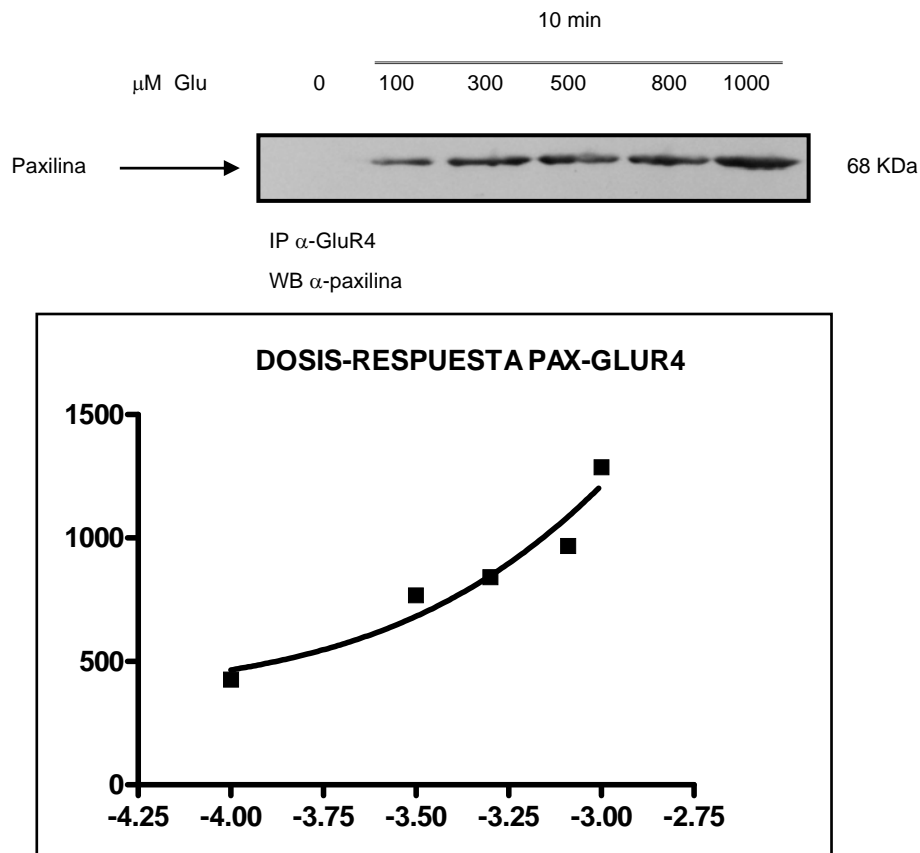
**Fig. 3. Paxilina interactúa con los receptores AMPA en un modo dependiente del tiempo.** Las BGC fueron estimuladas durante los tiempos indicados con Glu 1mM. 500  $\mu$ g de proteína total se inmunoprecipitaron con anti-GluR1,2,3, la inmunodetección en fase sólida se realizó utilizando un anticuerpo anti-Paxilina (A). El resultado de tres experimentos independientes muestra el error estándar de la media. La significancia estadística es de  $*P < .05$  (ANOVA) mostrados en la gráfica (B).



**Fig. 4 Expresión diferencial de las diferentes subunidades del receptor AMPA.** (A) Las diferentes concentraciones de extractos de proteínas totales obtenidas fueron sometidas a inmunodetección en fase sólida utilizando anti-GluR1, anti-GluR3 y anti-GluR4. El análisis densitométrico utilizando la intensidad neta y su respectiva gráfica que se muestra en el panel B.

**La asociación de paxilina a la subunidad GluR4 es dependiente de la dosis de Glu en el medio.**

Para determinar si la interacción entre paxilina y GluR4 era dependiente de receptores, se realizaron ensayos dosis-respuesta inmunoprecipitando con la subunidad GluR4 y realizando inmunodetección con paxilina. Los resultados confirman que este efecto, la asociación de paxilina a la subunidad GluR4 de los receptores AMPA, es mediada por receptor ya que la asociación fue dependiente de la dosis de Glu en el medio (Fig. 5).

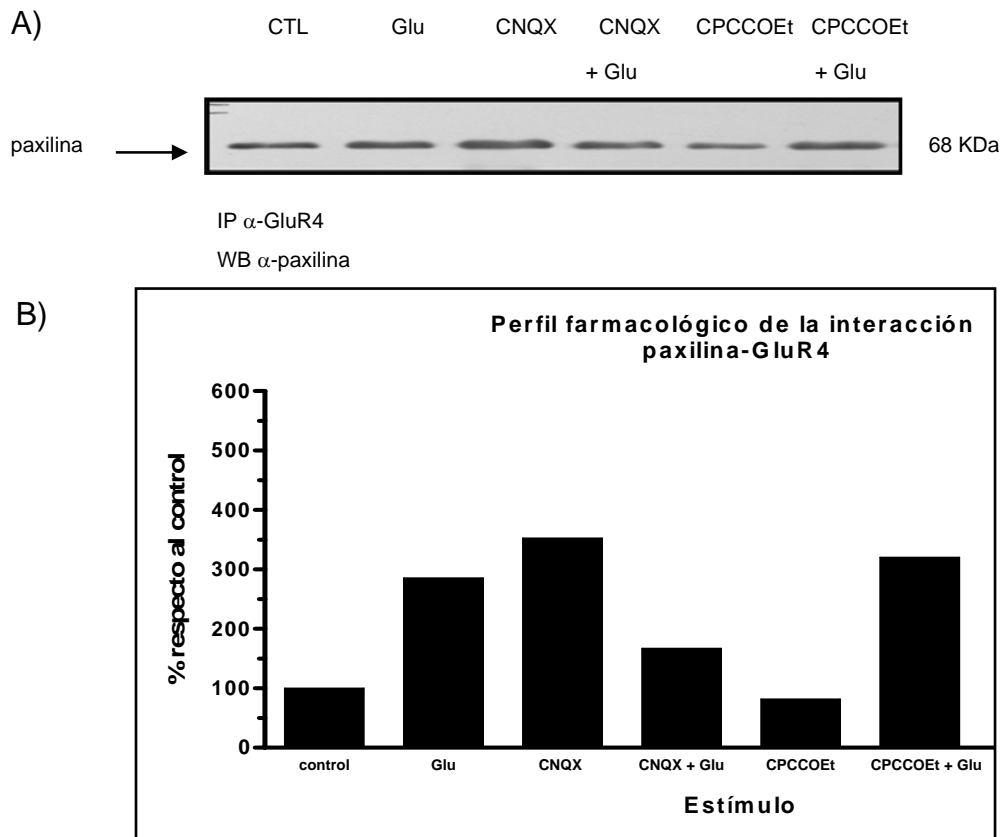


**Fig. 5 La asociación de paxilina a la subunidad GluR4 es dependiente de la dosis de Glu en el medio.**

La monocapa de BGC se estimularon durante 10 minutos con diferentes concentraciones (0, 100,300, 500, 800 y 1000  $\mu$ g) de Glu. Se inmunoprecipitaron 500  $\mu$ g de proteínas totales, la inmunodetección en fase sólida se llevo a cabo utilizando anti-Paxilina. El anticuerpo secundario fue un anti-ratón acoplado a peroxidasa, se reveló con el equipo de Quimioluminiscencia (ECL) (A), la gráfica correspondiente a la densitometría se muestra en el panel B.

### Los receptores AMPA están involucrados en la asociación de paxilina-GluR4.

Para determinar el subtipo de receptores que estaban mediando esta interacción, se realizó la caracterización farmacológica utilizando CNQX (antagonista de los receptores AMPA) y utilizando CPCCOEt (antagonista de los receptores metabotrópicos del grupo I), como se puede observar al utilizar el antagonista de los receptores AMPA se inhibe el efecto mediado por Glu, no así cuando se emplea un antagonista de los receptores metabotrópicos del grupo I. Estos resultados nos sugieren que la asociación paxilina-GluR4 es mediada por receptores ionotrópicos de tipo AMPA (Fig. 6).



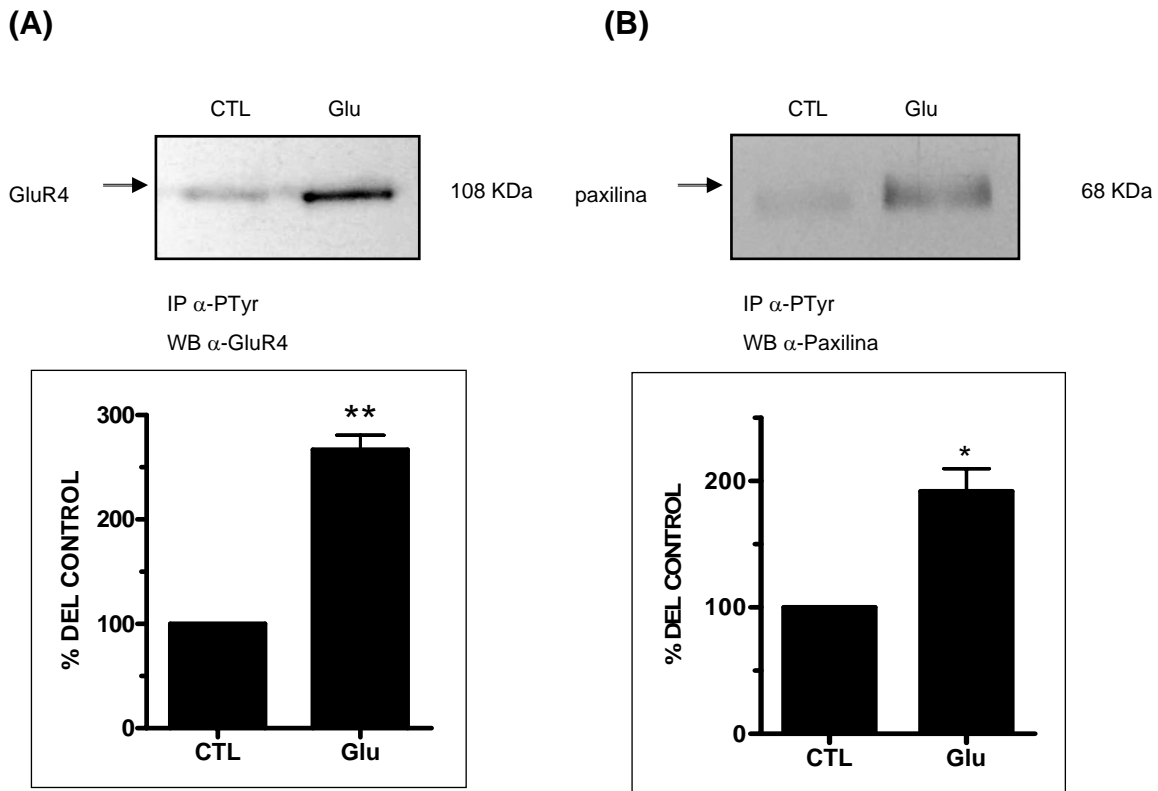
**Fig. 6** Los receptores AMPA están involucrados en la asociación de paxilina-GluR4. Las células fueron incubadas 30 minutos antes con CNQX (5  $\mu$ M) y CPCCOEt (10  $\mu$ M) y posteriormente con 1 mM de Glu durante 10 minutos. Se inmunoprecipitó con la subunidad GluR4 y se inmunodetectó con paxilina a una dilución 1:500. se utilizó un anticuerpo secundario anti-ratón acoplado a peroxidasa de rábano picante a una dilución 1:4000(A), la grafica del experimento se muestra en B.



### **Glu induce la fosforilación en tirosina de la subunidad GluR4 del receptor AMPA y paxilina.**

Millán y cols. en el 2004 determinaron que Glu inducía la fosforilación en tirosina de los receptores AMPA en BGC a partir de los 3 minutos, alcanzando el máximo incremento a los diez minutos, por lo que decidimos caracterizar si al tiempo de 10 minutos de exposición a Glu estaba induciendo la fosforilación en tirosina de la subunidad GluR4 de estos receptores. Los resultados muestran que Glu induce un incremento en la fosforilación en tirosina de esta subunidad en comparación con las células no estimuladas (Fig. 7A).

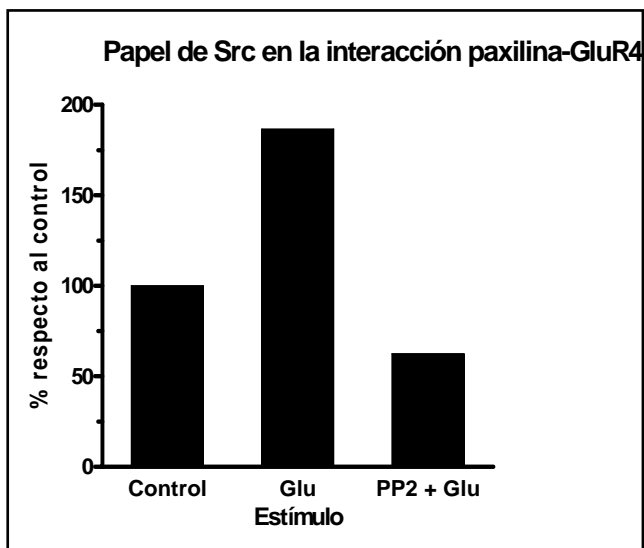
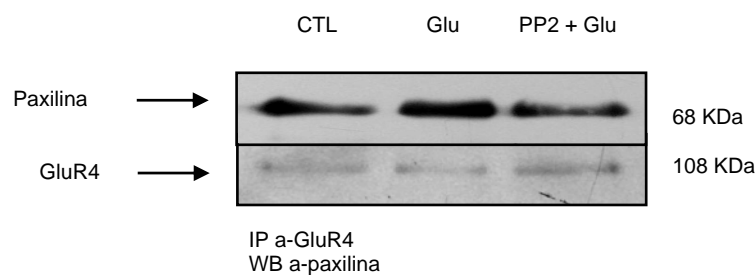
La familia de tirosina cinasas no receptoras Src regulan eventos biológicos importantes como alteraciones del citoesqueleto, adhesión y migración (Thomas SM and Brugge JS, 1997). Un evento importante para que haya reclutamiento de paxilina a las adhesiones focales es su activación a través de su cambio en el estado de fosforilación, por esta razón, se determinó si Glu estaba induciendo la fosforilación en tirosina de paxilina, los resultados muestran que Glu induce un incremento en el estado de fosforilación de esta proteína después de la estimulación con este neurotransmisor (Fig. 7B).



**Fig. 7 Glu induce la fosforilación en tirosina de la subunidad GluR4 del receptor AMPA y paxilina.** Los cultivos celulares fueron estimulados con 1 mM de Glu por 10 minutos y 500  $\mu$ g de extractos totales fueron inmunoprecipitados con anti-fosfotirosina y sometidos a inmunodetección en fase sólida utilizando el anticuerpo anti-GluR4(A) y Paxilina (B). El análisis de significancia estadística fué de \* $P > 0.05$  \*\* $P > 0.01$  según el método t de student.

### **La cinasa Src está involucrada en la asociación paxilina-GluR4.**

Tomando en cuenta que por observaciones anteriores Src estaba involucrada en la fosforilación del receptor AMPA, nos propusimos evaluar la participación de Src en esta interacción para lo cual empleamos el inhibidor PP2. Los resultados nos muestran que preincubando el inhibidor PP2 30 minutos antes de la estimulación con Glu hay una reducción significativa en la asociación paxilina-GluR4 sugiriendo que esta interacción es mediada por la familia Src (Fig. 8).

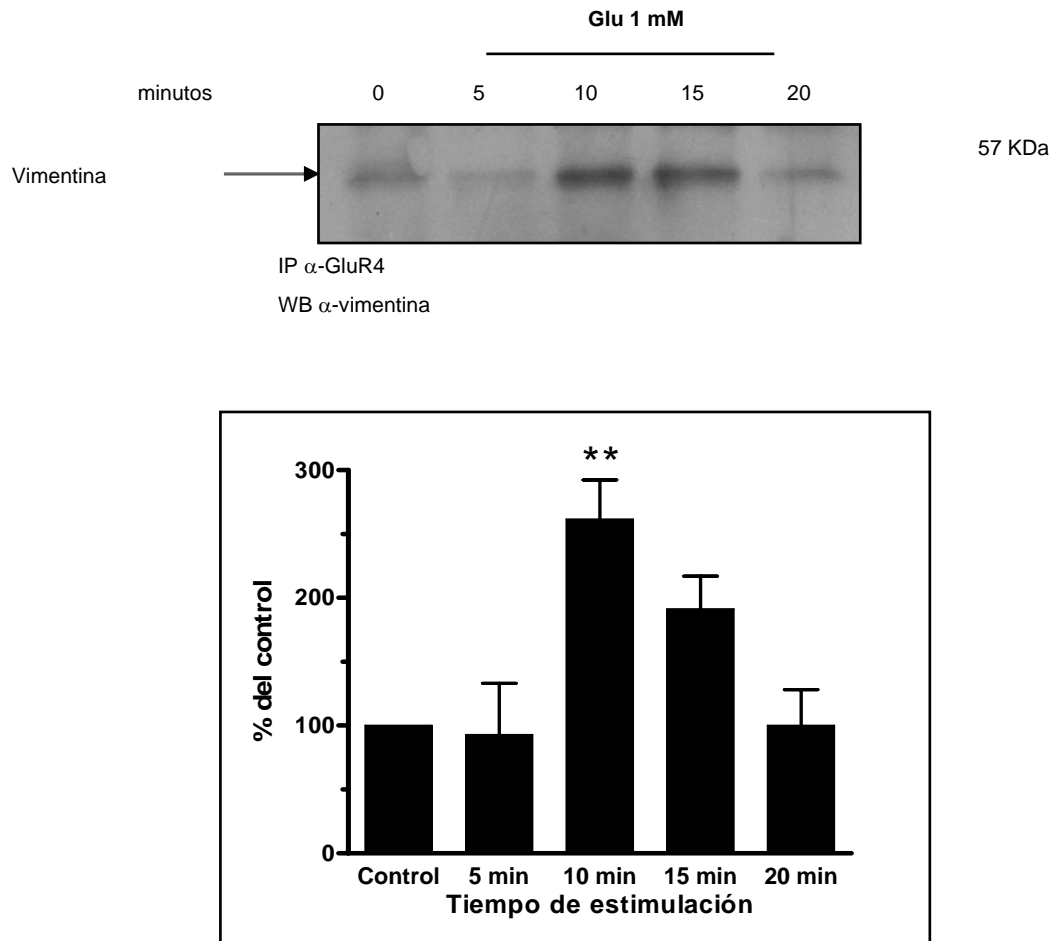


**Fig. 8 La cinasa Src está involucrada en la asociación paxilina-GluR4.** Las células fueron preincubadas con PP2(10 nM) durante 30 minutos, después se estimuló con 1 mM de Glu durante 10 minutos. La IP y la inmunodetección se realizó como en los experimentos anteriores.

### **La proteína vimentina se asocia a la subunidad GluR4 en un modo dependiente de Glu**

Otra proteína a evaluar fue vimentina, proteína perteneciente al grupo III de los filamentos intermedios, involucrada en procesos de migración y que se ha demostrado estar colocalizando con receptores integrina en adhesiones focales y mostró en nuestro modelo estar interaccionando con la subunidad GluR4 de los receptores AMPA incrementando desde los 5 minutos y alcanzando su pico máximo a los 10 minutos después de la estimulación con Glu sugiriendo que esta interacción es dependiente del tiempo (Fig. 9).

Estos resultados refuerzan la idea que los receptores AMPA reclutan proteínas que regulan citoesqueleto como paxilina y de manera interesante vimentina, de acuerdo a los hallazgos obtenidos.



**Fig. 9 La proteína vimentina se asocia a la subunidad GluR4 en un modo dependiente de Glu.** Las BGC se estimularon con Glu1 mM en los tiempos indicados, se inmunoprecipitaron 500 µg de proteína total y la inmunodetección en fase sólida utilizando el anticuerpo anti-vimentina, para el revelado de las placas autorradiográficas se empleó el estuche de quimioluminiscencia ECL. La significancia estadística es de \*\* $P > 0.01$  (ANOVA).

## DISCUSIÓN

Estudios en células del sistema nervioso central han demostrado que los receptores AMPA no solo funcionan como canales iónicos, sino que además pueden funcionar como transductores de señales a nivel de membrana celular. (Hayashi y cols. 1999, Millán y cols. 2004).

En estudios previos, demostraron que la cinasa de adhesión focal (FAK) se encontraba asociada a los receptores AMPA posiblemente mediando contactos focales. En este contexto, evaluamos el papel de paxilina, proteína reguladora del citoesqueleto, como posible proteína adaptadora de la interacción FAK-receptores AMPA. Los resultados obtenidos muestran que existe una interacción paxilina-receptores AMPA y que esta interacción es dependiente del tiempo, su pico máximo de asociación es de 10 minutos (Fig. 3), y sugerimos que esta proteína pueda estar funcionando como adaptadora para el reclutamiento de FAK a los receptores AMPA, ya que el curso temporal se relaciona perfectamente con el realizado para la interacción FAK-receptores AMPA y donde se muestra también que FAK y paxilina están interactuando después de la estimulación con Glu y en la misma cinética de tiempo (Millán y cols. 2004), además, en otros estudios realizados en embriones de ratón demostraron que paxilina está funcionando como molécula adaptadora para el reclutamiento más eficiente de FAK a contactos focales (Hagel y cols. 2002).

Cuando decidimos analizar la expresión de las subunidades de los receptores AMPA expresados en glia de Bergmann: GluR1, GluR3, y GluR4 (Fig. 4). Se observó que las tres subunidades de los receptores AMPA están presentes en estas células, pero la detección de la subunidad GluR4 resultó ser más eficiente, dato que sugiere que se expresa más en éstas células aún cuando la misma concentración de proteínas se empleó para detectar las otras subunidades. Esta observación concuerda con los hallazgos encontrados por López T. y cols. en

1997 donde mediante ensayos de Northern Blot encontraron que la subunidad de mayor expresión es la GluR4 en BGC.

Por otro lado, al realizar ensayos dosis-respuesta se determinó que la interacción paxilina-receptores AMPA es dependiente de receptores ya que responde a la concentración de Glu en el medio (Fig 5), y esta observación sugiere el mismo mecanismo para la interacción FAK-receptores AMPA (Millán y cols. 2004) ya que su interacción está mediada por receptores AMPA con una EC50 de 138.2  $\mu$ M.

Y para corroborar este hallazgo, se realizó caracterización farmacológica utilizando antagonistas de los receptores AMPA (CNQX) y utilizando también el antagonista de los receptores metabotrópicos del grupo I (CPCOOEt) (Fig. 6), los resultados obtenidos en este estudio sugieren que esta asociación paxilina-GluR4 es mediado por receptores de tipo AMPA hallazgos similares encontrados por Millán y cols. en el 2004 donde determinan que este tipo de receptores está actuando como transductores de señal activando e interaccionando con diversas moléculas tales como PI3K, FAK, y sugiere que el mismo mecanismo de activación pudiera ser empleado en esta vía de señalización.

La fosforilación en tirosina de los receptores AMPA permite interacciones proteína-proteína entre las subunidades del receptor y proteínas que contienen y aquellas que no contienen dominios PDZ (Wang JQ y cols, 2005). En un estudio anterior se observó el incremento en la fosforilación de los receptores AMPA inducido por Glu (Millán y cols. 2004). Aquí, se demuestra el incremento de la fosforilación de la subunidad GluR4 después de la estimulación con Glu en el medio, dato que sugiere fuertemente que este incremento le permite interaccionar con otras proteínas (Fig. 7A),

La fosforilación de paxilina en estos residuos precede a su reclutamiento a adhesiones focales (Wosniak MA y cols. 2004). Y aquí observamos que paxilina experimenta un incremento en su fosforilación en tirosina después de la

estimulación con Glu (Fig. 7B). La fosforilación en paxilina y GluR4 permite explicarnos la interacción entre paxilina y la subunidad GluR4 de los receptores AMPA, ya que ambas moléculas están siendo fosforiladas. Cabe hacer mención que la estimulación con Glu fue durante 10 minutos ya que en los cursos temporales realizados es a este tiempo donde existe la máxima interacción entre estas dos proteínas (Millán y cols. 2004) en el sistema.

La fosforilación de una parte importante de las proteínas involucradas en fenómenos de adhesión focal se lleva a cabo a través de la familia de tirosina cinasas no receptoras Src. Por esta razón evaluamos el papel de Src empleando un inhibidor de la familia Src PP2. El pretratamiento con este inhibidor resultó en una disminución en la asociación paxilina-GluR4, sugiriendo que Src se encuentra regulando esta interacción (Fig 8). El papel de Src fue evaluado en experimentos anteriores y se observó que Src estaba involucrado en la fosforilación del receptor AMPA, además, no es raro asumir su papel dado que la cinasa Lyn se asocia a los receptores AMPA en cultivos primarios cerebelares (Hayashi y cols. 1999).

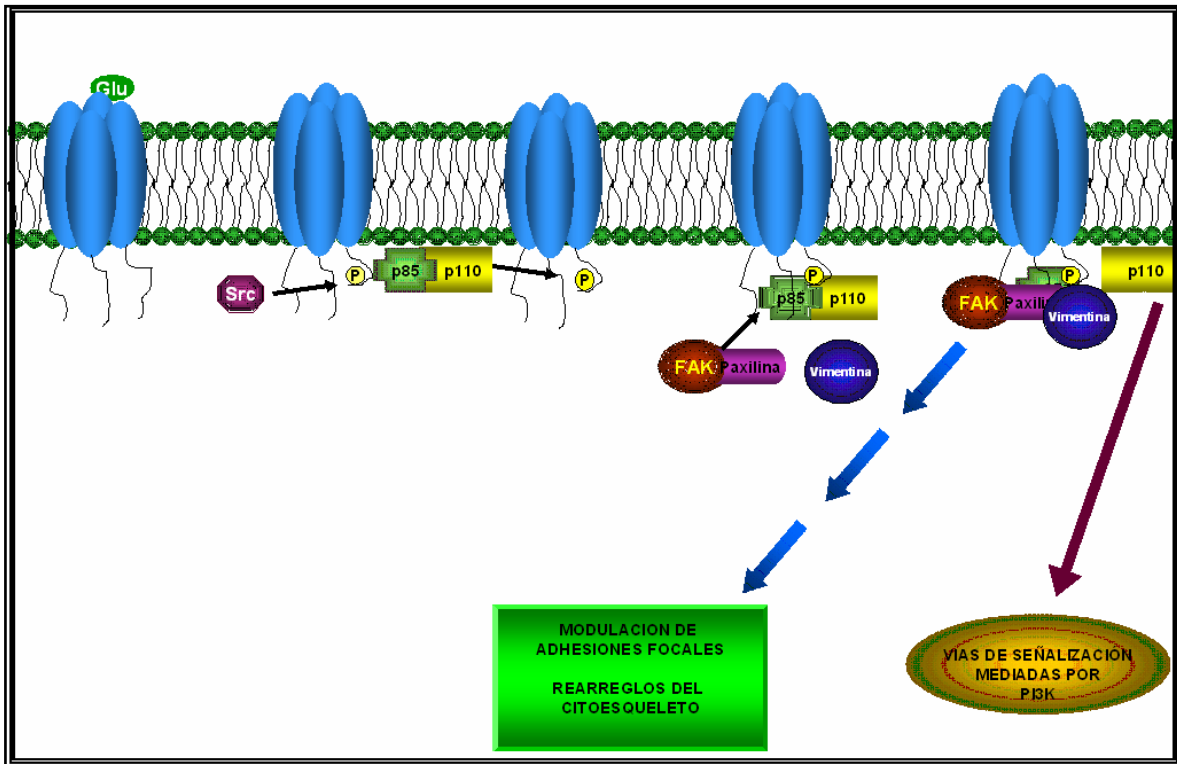
Al evaluar vimentina, proteína altamente dinámica, que es un marcador de glia radial y que en diversos estudios se ha determinado que interactúa con receptores integrina en adhesiones focales. En células endoteliales se ha determinado que vimentina colocaliza con la integrina  $\alpha2/\beta1$  y que está modulando adhesiones focales (Kreis y cols. 2005). Aquí, de manera interesante observamos que esta proteína se asocia con la subunidad GluR4 de los receptores AMPA y que tiene un comportamiento similar a paxilina ya que su pico máximo es a los 10 minutos después que se estimulan a las BGC con Glu (Fig 9), lo cual nos indica que mecanismos asociados con adhesiones focales y migración celular pudiera estar asumiendo al asociarse vimentina al complejo pues el papel de esta proteína así lo sugiere.

Trabajos realizados por lino y cols. en el 2001 muestran que después de utilizar un vector adenoviral transfectando la subunidad GluR2 en BGC haciendo

impermeables a calcio a los receptores AMPA, se induce un cambio en el citoesqueleto de las BGC ocasionando la retracción de estas células de la sinapsis establecida entre la fibra paralela y la célula de Purkinje sugiriendo con esto, que existe una regulación del citoesqueleto a través de este tipo de receptores. Estos datos y los obtenidos en este estudio, nos sugieren fuertemente que existe regulación de proteínas adaptadoras del citoesqueleto de actina tal como paxilina y de otras proteínas del citoesqueleto como vimentina, sugiriendo que la glia de Bergmann a través de los receptores AMPA al ser estimuladas con Glu podrían estar regulando mecanismos involucrados con rearrreglos del citoesqueleto.

Por lo anterior, proponemos el siguiente modelo donde se muestra las proteínas involucradas en el complejo de señalización que podría sugerir un mecanismo de regulación hacia citoesqueleto, ya sea para el de actina mediante paxilina o de filamentos intermedios como vimentina (Fig. 10).





**Fig. 10 Modelo de interacción de proteínas reguladoras del citoesqueleto paxilina y vimentina a los receptores AMPA.** Después de la estimulación con Glu los receptores AMPA experimentan fosforilación en residuos de tirosina dependiente de Src. Posteriormente hay reclutamiento de PI3K, FAK, paxilina y vimentina a los receptores AMPA, conllevando este reclutamiento a regulación de vías de señalización mediadas por PI3K y a probables contactos focales y rearrreglos del citoesqueleto mediadas por FAK, paxilina y vimentina.

## CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este trabajo nos permiten establecer las siguientes conclusiones:

Glu induce un incremento en la interacción paxilina-GluR4 y esta interacción es dependiente del tiempo y de la dosis.

El incremento en la interacción paxilina-GluR4 inducido por Glu en BGC se sugiere que sea mediado por receptores ionotrópicos de tipo AMPA.

Glu induce un incremento en la fosforilación en residuos de tirosina de la subunidad GluR4 de los receptores AMPA, así como también la proteína paxilina.

El incremento en la asociación de paxilina a la subunidad Glur4 parece ser mediada por Src.

Vimentina que es una proteína perteneciente a los filamentos intermedios se observó estar asociada a GluR4 en un modo dependiente de Glu en BGC.

Estos hallazgos nos permiten sugerir un posible papel de estas dos proteínas y su interacción con la subunidad GluR4 en procesos de adhesiones focales y rearrreglos del citoesqueleto mediado por Glu y refuerzan el importante papel que tienen las células gliales de Bergmann en el SNC.

## REFERENCIAS

Aguirre A, López-Bayghen E, Ortega A. 2002. Glutamate-dependent transcriptional regulation of the *chkbp* gene: Signaling Mechanisms. *J Neurosci Res.* 70: 117-127.

Altman J, y Bayer S. 1997. Developmental of the cerebellum system in the relation in its evolution, structure and function. CRC Press.

Aronson MK, Ooi WL, Geva DL, Masur D, Blau A, Frishman W. 1991. Dementia: age dependent incidence, prevalence, and mortality in the old. *Arch Intern Med.* 151:989-92.

Ballestrem C, Wehrle-Haller B, Hinz B, Imhof BA. 2000. Actin-dependent lamellipodia formation and microtubule-dependent tail retraction control-directed cell migration. *Mol Biol Cell,* 11: 2999-3012.

Bettler B. y Mülle, C. 1995. AMPA and kainate receptors. *Neuropharmacol.* 34: 123-139.

Belachew S., Xiaqing, Y. y Gallo, V. 2001. unraveling oligodendrocyte origin and function by cell-specific transgenesis. *Dev Neurosci.* 23:287-298.

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

Brown MC, Turner CE. 2004. Paxillin: Adapting to change. *Physiol Rev.* 84: 1315-1339.

**Brzyska y Elbaum D. 2003. Dysregulation of calcium in Alzheimer's disease. Acta Neurobiol. Exp. 63: 171-183.**

**Caims NJ, Lee MY V, Trojanowsky JQ. 2004. The cytoskeleton in neurodegenerative diseases. J Pathol. 204: 438-449.**

**Cooper, N. y Steindler D. A. 1986. Monoclonal antibody to glial fibrillary acidic protein reveals a parcellation of individual barrels in the early postnatal. Mouse somatosensory cortex. Brain. Res. 380: 342-348.**

**Cunningham MD, Ferkany JW y Enna SJ. 1994. Excitatory aminoacid receptors: A gallery of ma new targets for pharmalogical intervention. Life Sci. 54: 135-158.**

**De Blass A. 1984. Monoclonal antibodies to specific astroglial and neuronal antigens reveal the cytoarchytecture of the Bergmann Glia fibers in the cerebellum. J Neurosci. 4:265-273.**

**Dingledine R, Borges K, Bowie D, Traynelis SF, 1999. The Glutamate receptors ion channels. Pharmacol Rev. 51: 7-60.**

**Goldman, J. y Gesert, J. 2001. Heterogeneity of cycling glial progenitors in the adult mammalian cortex and white matter. J. Neurobiol. 2:75-86.**

**Hagel M, George EL, Kim A, Tamimi R, Opitz SL, Turner CE, Imamoto A, Thomas SM. 2002. The adaptor protein paxillin is essential for normal development in the mouise and is a critical transducer of fibronectin signaling. Moll. Cell Bioll. 22(3): 901-915.**

Hayashi T, Umemori H, Mishina M, Yamamoto T. 1999. The AMPA receptor interacts with and signals through the protein tyrosine kinase Lyn. *Nature*. 397: 72-76.

Hall A. 1998. Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* 279:509-514.

Hama K, Arai T. y Kosaka, T. 1993. Three dimensional organization of neuronal and glial processes: high voltage electron microscopy. *Microsc. Res. Tech.* 29:357-367.

Helmer C, Joly P, Letenneur L, Commenges D, Dartigues JF. 2001. Mortality with dementia: results from a French prospective community-based cohort. *Am J Epidemiol.* 154:642-648.

Ito M. 1984: *The cerebellum and neuronal control*. Raven Press. New York. Pp 580.

Kreis S, Schfnfeld HJ, Melchior C, Steiner B, Kieffer N. 2005. The intermediate filament protein vimentin binds specifically to a recombinant integrin  $\alpha2/\beta1$  cytoplasmic tail complex and co-localizes with native  $\alpha2/\beta1$  in endothelial cell focal adhesions. *Exp Cell Res* 305: 110-121

Larshell ER, Schwartz JH y Jesell TM. 2000. *Principles of neuronal science*. 4e. U:S:A: pp 836.

Lerma, J., Paternain, a. Rodríguez-Moreno, A y López-García, J. m2001. Molecular Physiology of kainate receptors. *Physiol. Rev* 81:971-998.

Levin, J., Reynolds, R. y Fawcett, J. 2001. The oligodendrocyte precursor cell in health and disease. *Trends in neurosci.* 24:39-47.

Levin, S. y Goldman, J. 1988. Spatial and temporal patterns of oligodendrocytes differentiation in rat brain and cerebellum. *J. Comp. Neurol.* 277:441-455.

Mazaki Y, Hashimoto S, Sabe H. 1997. Monocyte cells and cancer cells express novel paxillin isoforms with different binding properties to focal adhesions proteins. *J Biol Chem* 272: 7437-7444.

Michaelis EK. 1998. Molecular biology of glutamate receptors in the central nervous system and their role in excitotoxicity,. Oxidative stress and aging. *Progr. Neurobiol.* 54: 369-415.

Morales M, González-Mejía ME, Bernabé A, Hernández-Kelly LCR, Ortega A. 2006. Glutamate activates Protein Kinase B (Akt) through AMPA receptors in Cultured Bergmann Glia Cells. *Neurochem Res* (en prensa).

Ortega A, Eshar N, Teichberg VI. 1991 Properties of kainate receptors/channels on cultured Bergmann glia. *Neurosci.* 41: 335-349.

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

Parnavelas J, y Nadarajah B. 2001. Radial glial cells: are they really glia? *Neuron* 31:881-884.

Rakic P. 1972. Mode of cell migration to the superficial layers of fetal monkey neocortex. *J. Comp. Neurol.* 145:61-83.

Rakic P. 1995. In neuroglial cells, H. Kettermann and B. R. Ransom, eds. (New York: Oxford university Press), 746-762.

**Rose C y Konnerth A. 2000. Self-regulating synapses. Nature 405:413-415.**

**Takahashi S, Saito T, Hisanaga SI, Pant HC y Kulkarni. 2003. Tau phosphorylation by cyclin-dependent kinase 5/p39 during brain development reduces its affinity for microtubules. J Biol Chem. 278: 10506-10515.**

**Thomas MS y Brugge JS. 1997. Cellular functions regulated by Src family kinases. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 13:513–609.**

**Voogd J. y Glickstein M. 1998. The anatomy of the cerebellum. Trends in neurosci. 21: 370-375.**

**Wang JQ, Arora A, Yang L, Parelkar NK, Zhang G, Liu X, Choe ES, Mao L. 2005. Phosphorylation of AMPA receptors. Mol. Neurobiol. 32(3): 237-249.**

**Waxman S, y Black J. 1995. Axoglial interactions at the cellular and molecular levels in central nervous system myelinated fibers. H. Kettermann and B. R. Ramsom, eds. Neuroglia. Oxford University Press, Oxford 587-610.**

**Williams J, Mason-Parker S, Abraham W y Tate W. 1998. Biphasic changes in the levels of N-methyl-D-Aspartate receptor-2 subunits correlate with the induction and persistence of long term potentiation. Mol. Brain Res 60: 21-27.**

**Wosniak MA, Modzelewska K, Kwong L, Keely PJ. 2004. Focal adhesion regulation of cell behavior. Biochim et Biophys Acta. 113-119**