

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE

*Estudo sobre a modulação glutamatérgica
da fosforilação da proteína ácida fibrilar
glial (GFAP) em hipocampo e cerebelo de
ratos jovens.*

Trícia Kommers Albuquerque

Orientadora: Profa. Dra. Susana Tchernin Wofchuk

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas - Bioquímica, como requisito parcial à obtenção do grau
de Doutor em Bioquímica.

Porto Alegre
2001

...não acho que sejamos manipulados por nossos genes - que nosso DNA determine nosso comportamento. Ao contrário, a cultura se apropria de nosso material genético comum e cria inúmeras e diversas tradições; por outro lado, os indivíduos reagem de maneira idiossincrática a seu ambiente e a sua herança, e é esse comportamento que os filósofos denominam de "livre arbítrio"

Helen Fisher

*Dedico este trabalho ao Ricardo,
meu grande companheiro, pelo seu
apoio e colaboração neste período
cheio de bons e maus momentos.*

Agradecimentos

Aos meus pais, pessoas maravilhosas que acreditaram em mim e sempre me apoiaram nas minhas decisões.

À Susana, minha mentora em muitos ensinamentos que vão além da bioquímica. Agradeço seu apoio e sua dedicação a este trabalho e, sobretudo, por sua amizade.

Ao Prof. Rodnigh, por partilhar comigo seus conhecimentos e suas idéias e também pela sua imensa colaboração neste trabalho.

À Daniela Oppelt, uma grande amiga e uma grande companheira de todas as horas.

Aos meninos, Dioguinho e Joel, que sempre me ajudaram no laboratório, principalmente com as intermináveis "eletroforevers".

Aos amigos Márcio e Sílvia pela grande ajuda durante um período de intenso trabalho no laboratório.

À Juliana e a Carmem por toda ajuda e amizade compartilhada e por me ensinarem a metodologia de cultura.

À Carina, por viabilizar todo o trabalho com culturas mistas.

As meninas da Sala-de-Cultura, Francine, Mônica, Daniela Gonçalves, Sirlene, Cristina e Mariana, pelo trabalho em equipe que permitiu o bom andamento dos experimentos *in vitro*.

Ao Prof. C.A., por sempre estar disposto a discutir minhas dúvidas metodológicas e pela grande colaboração na minha formação ao longo destes 8 anos de convívio com a Bioquímica.

A todos colegas do saudoso FPC.

Ao Curso de Pós-Graduação em Bioquímica, por viabilizar este trabalho e, sobretudo, permitir minha formação.

Ao CNPq, pela bolsa cedida.

SUMÁRIO

RESUMO _____	I
ABSTRACT _____	III
APRESENTAÇÃO _____	V
LISTA DE FIGURAS _____	VI
LISTA DE TABELAS _____	VIII
LISTA DE ABREVIATURAS _____	IX
1. INTRODUÇÃO _____	1
1.1 Glutamato _____	2
Receptores Glutamatérgicos Ionotrópicos _____	5
Receptores Glutamatérgicos Metabotrópicos _____	8
1.2 Fosforilação de proteínas no Sistema Nervoso Central _____	13
1.3 Células gliais _____	22
1.4 Filamentos Intermediários _____	25
1.5 Proteína Ácida Fibrilar Glial (GFAP) _____	26
1.6 OBJETIVOS _____	34

2. ARTIGOS CIENTÍFICOS	35
2.1. Artigo 1	
Trícia Kommers, Richard Rodnight, Daniela Oppelt, Diogo Oliveira e Susana Wofchuk, The mGluR stimulating GFAP phosphorylation in immature hippocampal slices has some properties of a group II receptor. <i>NeuroReport</i> , 10, 2119-2123 (1999)	36
2.2. Artigo 2	
Trícia Kommers, Richard Rodnight, Daniela Oppelt, Diogo Oliveira e Susana Wofchuk, Glutamate and NMDA increase the phosphorylation of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in cerebellar cortical microslices from immature rats. Artigo submetido ao <i>Journal of Neurochemistry</i> .	42
2.3. Artigo 3	
Trícia Kommers, Carina Boeck, Joel Horn, Daniela Oppelt, Richard Rodnight e Susana Wofchuk GFAP phosphorylation is stimulated by glutamate via NMDA receptors on cerebellar mixed neuron/glia cells culture. Artigo a ser submetido ao <i>Brain Research</i> .	68
3. DISCUSSÃO	89
4. CONCLUSÕES	102
5. PERSPECTIVAS	105
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	107

RESUMO

A proteína ácida fibrilar glial (GFAP) é uma proteína da classe dos filamentos intermediários, expressa principalmente em astrócitos no Sistema Nervoso Central (SNC). Assim como outras proteínas de citoesqueleto, a GFAP sofre fosforilação/desfosforilação e este mecanismo permite a regulação de seu estado polimerizado/despolimerizado.

Wofchuk e Rodnight (1994) mostraram que, em hipocampo de ratos jovens, a fosforilação da GFAP sofre regulação glutamatérgica através de um mecanismo que envolve proteínas G. Da mesma forma, um estudo preliminar em fatias cerebelares de ratos jovens mostrou que, assim como em hipocampo, a fosforilação da GFAP é estimulada por glutamato.

Com base nestes dados, este trabalho teve como objetivo estudar os mecanismos envolvidos na modulação glutamatérgica da fosforilação da GFAP em fatias de hipocampo e cerebelo de ratos.

Os resultados obtidos mostraram que, embora a estimulação glutamatérgica da fosforilação da GFAP ocorra no mesmo período de desenvolvimento (P10-P16) em ambas as estruturas estudadas, diferentes mecanismos estão envolvidos nestas estruturas. Em hipocampo, a fosforilação da GFAP é estimulada por glutamato via receptores metabotrópicos do grupo II, provavelmente do subtipo mGluR3. Já em

fatias cerebelares, a fosforilação da GFAP sofre estimulação glutamatérgica via receptores glutamatérgicos ionotrópicos do tipo NMDA.

Em cerebelo, avaliou-se o efeito do glutamato sobre a fosforilação de GFAP em culturas primárias de células gliais, tratadas ou não com meio condicionado neuronal, e em culturas mistas de células gliais e neuronais cerebelares. Observou-se que o glutamato não estimulou a fosforilação da proteína em culturas primárias de células gliais. Entretanto, em culturas mistas de neurônios e células gliais cerebelares, o glutamato e seu agonista NMDA estimularam a fosforilação da GFAP, da mesma forma que em fatias. O antagonista de receptores NMDA, DL-AP5, reverteu o efeito de ambos e a TTX não bloqueou o efeito estimulatório, sugerindo um possível envolvimento de receptores NMDA gliais na modulação glutamatérgica de fosforilação da GFAP em cerebelo de ratos.

Nossos resultados evidenciam o envolvimento de diferentes mecanismos de regulação da fosforilação da GFAP, por glutamato, em hipocampo e cerebelo de ratos, os quais podem estar diretamente relacionados com as diferentes funções exercidas por estas estruturas no SNC.

ABSTRACT

Glial fibrillary acidic protein (GFAP) is an intermediate filament protein that is mainly expressed in astrocytes in the Central Nervous System (CNS). Like others cytoskeleton proteins, the phosphorylation of GFAP is the regulation of polymerization/depolymerization of the filament.

Wofchuk and Rodnight (1994), showed that GFAP phosphorylation in immature hippocampus slices is regulated by glutamate through a G protein mechanism. In the same way, a preliminary study in slices from cerebellum of immature rats showed that, like in hippocampus, GFAP phosphorylation is stimulated in the presence of glutamate.

Based in these data, this work intent to determine the mechanisms involved in the glutamatergic modulation of GFAP phosphorylation in slices from immature hippocampus and cerebellum of rats.

The results showed that the glutamatergic modulation of GFAP occurs in the same developmental stage (P10-P16) in both structures; however, the mechanisms involved are different. In hippocampus, the GFAP phosphorylation is regulated by metabotropic receptors from group II, probably from subtype mGluR3. In contrast, in cerebellum slices, the glutamatergic stimulation of GFAP phosphorylation occurs via an ionotropic receptor, from NMDA subtype.

Based on the results with cerebellum slices, the glutamatergic modulation of GFAP phosphorylation in cerebellar primary glial cell cultures and mixed neuron/glial cell cultures was investigated. We observed that glutamate was not able to increase GFAP phosphorylation in primary glial cell cultures. However, in mixed neuron/glial cell cultures, glutamate and its agonist NMDA stimulate GFAP phosphorylation as previously observed in cerebellum slices. DL-AP5 reverted the effect of both and TTX was not able to block the stimulation, suggesting a possible involvement of glial NMDA receptor in the mechanism of glutamatergic modulation of GFAP phosphorylation in cerebellum of rats.

The results of this work in hippocampus and cerebellum suggest that the difference between their mechanisms of glutamatergic regulation of GFAP phosphorylation could be related with the different functions of these structures in the Central Nervous System.

APRESENTAÇÃO

Esta tese é constituída por **Introdução, Artigos Científicos, Discussão, Conclusões, Perspectivas e Referências Bibliográficas.**

O item **1. Introdução** refere-se aos aspectos que embasam os objetivos e a metodologia deste trabalho.

Os **Resultados** que fazem parte desta tese estão apresentados sob forma de artigo publicado, artigo submetido e artigo em fase final de revisão pelos autores para ser submetido à publicação, os quais estão organizados no item **2. Artigos Científicos**. Os resultados, **Material e Métodos, Discussão dos Resultados e Referências Bibliográficas** encontram-se nos próprios artigos.

O item **3. Discussão** contém interpretações e comentários gerais, assim como as considerações finais que englobam os artigos desta tese.

O item **4. Conclusões** aborda as conclusões gerais baseando-se nos objetivos da tese e, por fim, a sua conclusão final.

O item **5. Perspectivas** contem os principais projetos a serem desenvolvidos na seqüência desta tese.

O item **6. Referências Bibliográficas** refere-se somente às citações que aparecem na **Introdução** e na **Discussão** desta tese.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1:	<u>Representação esquemática de um sistema fosforilante</u>	14
Figura 1.2:	<u>Ilustração esquemática da estrutura de um filamento de GFAP</u>	29
<i>Artigo 1:</i>		
<i>The mGluR stimulating GFAP phosphorylation in immature hippocampal slices has some properties of a group II receptor.</i>		
Figura 1:	<u>Representative autoradiograph showing the effect of two concentrations of DCG IV on the phosphorylation of GFAP in hippocampal slices from a rat of 15 days postnatal.</u>	38
Figura 2:	<u>Selective group II agonists strongly stimulated the phosphorylation of GFAP in immature hippocampal slices.</u>	39
Figura 3:	<u>A rough dose response curve of the effect of DCG IV.</u>	39
Figure 4:	<u>Lack of effect of the phospholipase inhibitor U73122 on the stimulation by glutamate of GFAP phosphorylation in immature hippocampal slices.</u>	39

Artigo 2:

Glutamate and NMDA increase the phosphorylation of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in cerebellar cortical microslices from immature rats.

Figura 1: Western blot showing the localization of GFAP and vimentin on 2-D gels prepared from cerebellar microslices and autoradiographs illustrating the effect of metabotropic and ionotropic glutamatergic agonists on GFAP phosphorylation. 65

Figura 2: The effect of ionotropic glutamatergic agonists and antagonists on GFAP phosphorylation in cerebellar microslices. 66

Artigo 3:

GFAP phosphorylation is stimulated by glutamate via NMDA receptors on cerebellar mixed neuron/glia cell culture.

Figura 1: Photograph images of primary glial culture and mixed neuron/glia cell culture from cerebellum. 86

Figura 2: The effect of the ionotropic glutamatergic agonist NMDA and its antagonist on GFAP phosphorylation in cerebellar mixed neuron/glia cell culture. 87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1: Receptores glutamatérgicos e seus principais agonistas e antagonistas. 12

Tabela 1.2: Sítios fosforiláveis e suas respectivas quinases em GFAP de porco. 28

Artigo 2:

Glutamate and NMDA increase the phosphorylation of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in cerebellar cortical microslices from immature rats.

Tabela 1: Effect of glutamate and metabotropic agonists on GFAP phosphorylation in slices from cerebellum and hippocampus in different days post-natal. 67

Artigo 3:

GFAP phosphorylation is stimulated by glutamate via NMDA receptors on cerebellar mixed neuron/glia cells culture.

Tabela 1: Effect of glutamate on GFAP phosphorylation in different cerebellum culture models. 88

LISTA DE ABREVIATURAS

1S,3R-ACPD	ácido (1S,3R)-1- aminociclopentano-1,3-dicarboxílico
1S,3S-ACPD	ácido (1S,3S)-1- aminociclopentano-1,3-dicarboxílico
cAMP	adenosina monofosfato cíclico
AMPA	ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilisoaxasole-4-propiónico
L-AP4	ácido 2-amino-4-fosfonobutírico
DL-AP5	DL-2-amino-5-ácido fosfonovalerico
ATP	adenosina trifosfato
Ca ²⁺	íon cálcio
CaM	calmodulina
CaM KII	proteína quinase cálcio/calmodulina-dependente do tipo II
L-CCG-I	2-carboxiciclopropil-glicina
cdc-2 K	proteína quinase ciclina-dependente
CK	caseína quinase
CNQX	6-ciano-7-nitroquinoxalano-2,3-diano
DaG	diacilglicerol
(S)-3,5-DHPG	(S)-3,5-dihidroxifenilglicina
DCG IV	2,3-dicarboxiciclopropil-glicina
EAAC1	transportador de aminoácidos excitatórios tipo 1
EAAT4	transportador de aminoácidos excitatórios tipo 4
EAAT5	transportador de aminoácidos excitatórios tipo 5
EGTA	ácido etilenoglicol tetracético
GABA	ácido γ aminobutírico
GFAP	proteína ácida fibrilar glial
GLAST	transportador glial de glutamato e aspartato

GLT	transportador glial de glutamato
Glu	L-glutamato
GluR	receptor glutamatérgico
iGluR	receptor glutamatérgico ionotrópico
mGluR	receptor metabotrópico glutamatérgico
cGMP	guanosina monofosfato cíclico
HEPES	ácido etanosulfônico-2-hidroxietil-piperazina
IP3	inositol 1,4,5-trifosfato
K ⁺	íon potássio
KA	cainato
LTD	depressão de longa duração
LTP	potenciação de longa duração
MAP4	α -metil-L-AP4
MAPK	mitogen activated protein kinase
MCCG	(2S,3S,4S)-2-metil-2-(carboxiciclopropil)-glicina
(+)-MCPG	(+)- α -metil-4-carboxifenilglicina
Mg ²⁺	íon magnésio
NEPHGE	eletroforese em gradiente de pH não-equilibrado
NMDA	N-metil-D-aspartato
NMDA NR1	subunidade NR1 do receptor N-metil-D-aspartato
NMDA NR2	subunidade NR2 do receptor N-metil-D-aspartato
NMDA NR3	subunidade NR3 do receptor N-metil-D-aspartato
NS-102	5-nitro-6,7,8,9-tetrahydrobenzo(g)indol-2,3-dione-3-oxime
³² p	rádio-isótopo 32 de fósforo
PIP2	fosfatidil inositol-4,5-difosfato
PLC	fosfolipase C
PKA	proteína quinase dependente de cAMP

PKC	proteína quinase dependente de Ca^{+2} e fosfolípido
PP1	proteína fosfatase do tipo 1
PP2A	proteína fosfatase do tipo 2A
PP2B	proteína fosfatase do tipo 2B
PP2C	proteína fosfatase do tipo 2C
SDS	dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS
SNC	sistema nervoso central
TCA	ácido tricloroacético
TEMED	tetrametil etileno diamina
TTX	tetrodotoxina

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Glutamato

Nos anos 50 ocorreram os primeiros estudos com glutamato no Sistema Nervoso Central (SNC). Hayashi (1952) observou que o glutamato causava convulsão clônica quando aplicado diretamente sobre o córtex cerebral de cachorros. Desde então muitos estudos foram desenvolvidos e atualmente o glutamato é considerado o principal neurotransmissor excitatório do SNC de mamíferos, onde media vários processos vitais, tais como o desenvolvimento das células nervosas, incluindo proliferação, migração e plasticidade sináptica (McDonald & Johnston, 1990), assim como a modulação de mecanismos de aprendizado e memória (Bianchin et al., 1994; Izquierdo, 1994; Izquierdo & Medina, 1997) e até no envelhecimento (Segovia et al., 2001). É bem provável que também o desenvolvimento das células gliais seja regulado, associado com fatores de crescimento, por glutamato (Gallo & Russell, 1995). Ao longo do desenvolvimento do SNC, o glutamato pode ser liberado por cones de crescimento e axônios e influenciar a proliferação e/ou migração de células gliais (Rakic & Komuro, 1995).

Ironicamente, além das inúmeras funções vitais exercidas por este neurotransmissor, o aumento na concentração extracelular de glutamato pode resultar em dano e morte neural através da excessiva ativação de GluRs (Choi et al., 1987; Meldrum, 2000). Deste modo, o glutamato liberado na fenda sináptica deve ser rapidamente removido e para tanto o glutamato pode ser captado por neurônios ou por células gliais. Dos cinco transportadores glutamatérgicos clonados, dois são expressos preferencialmente pelas células gliais (GLAST e GLT) e três em neurônios (EAAC1, EAAT4 e EAAT5). As células gliais exercem papel vital na remoção de glutamato do espaço extracelular, através da recapitação do glutamato, prevenindo a excitotoxicidade neural. Para isto, os transportadores GLAST e GLT conduzem o glutamato aos astrócitos onde, em sua maior parte, é convertido a glutamina, pela glutamina sintetase. A glutamina retorna aos neurônios onde na grande maioria serve como precursora de glutamato, com a participação da glutaminase (Rao & Murthy, 1993, Daikhin & Yudkoff, 2000; Meldrum, 2000).

Os receptores glutamatérgicos (GluRs) são classificados em ionotrópicos e metabotrópicos. Esta divisão é baseada nas diferenças quanto à sua estrutura molecular, aos mecanismos de transdução e às propriedades farmacológicas. Os receptores glutamatérgicos ionotrópicos (iGluRs) são canais iônicos que, quando ativos, são permeáveis a cátions,

incluindo sódio, cálcio e potássio (Nakanishi, 1992; Seeburg, 1993; Schoepp et al., 1995). Em 1985 mostrou-se que o glutamato estimulava a fosfolipase C (PLC) em cultura neuronal de estriato, via receptores que não eram da família dos iGluRs (Sladeczek, et al., 1985). Logo a seguir efeitos similares do glutamato foram descritos em fatias hipocâmpais (Nicoletti et al., 1986a/b), em cultura de células granulares de cerebelo (Nicoletti et al., 1986c) e em cultura de astrócitos (Pearce et al., 1986). A existência destes novos receptores glutamatérgicos, ligados a proteínas G, atualmente chamados de metabotrópicos, foi confirmada por Sugiyama e colaboradores (1987) e por Récasens e colaboradores (1988).

Os GluRs estão amplamente distribuídos no SNC tanto de jovens quanto de adultos; no entanto, a expressão de subtipos de receptores glutamatérgicos apresenta uma intensa variação regional e desenvolvimental específicas, indicando que diferentes subtipos podem exercer funções variadas quanto à ontogenia e ao sinal modulatório produzido no SNC.

Nas células gliais, os receptores glutamatérgicos mediam a expressão gênica, a interação neurônio-glia e participam do desenvolvimento glial (Gallo & Ghiani, 2000).

Receptores Glutamatérgicos Ionotrópicos

Os Receptores Glutamatérgicos Ionotrópicos (iGluRs) são tradicionalmente classificados, de acordo com critérios moleculares, farmacológicos e eletrofisiológicos, em três grande subtipos: receptores NMDA (N-metil-D-aspartato), α - amino- 3-hidroxi- 5-metil- 4-isoxazolepropionico (AMPA) e kainato (KA). Estes dois últimos freqüentemente são chamados de receptores não-NMDA. Em uma única sinapse no SNC geralmente encontram-se os três tipos coexistindo e envolvidos na ampliação do sinal glutamatérgico (Cotman et al., 1995, Ozawa et al., 1998). A tabela 1.1 apresenta os principais agonistas e antagonistas dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos.

Receptores NMDA (NMDARs)

Os receptores NMDA foram inicialmente identificados e separados farmacologicamente dos demais receptores pela sua seletiva ativação pelo agonista N-metil-D-aspartato (NMDA). Estes receptores são altamente permeáveis a Ca^{2+} , são voltagem-dependentes e possuem como co-agonistas glicina e D-serina (Collingridge & Watkins, 1994). Os receptores NMDA desempenham papel central na potenciação de longa duração (LTP), na depressão de longa duração (LTD) e em eventos envolvidos na plasticidade do SNC. Tais receptores, quando superativados, podem causar danos via excitotoxicidade (Cotman et al., 1995; Ozawa et al., 1998;

Rameau et al., 2000). Em potenciais de repouso os canais NMDA neuronais estão normalmente bloqueados por Mg^{2+} e a liberação do canal depende da despolarização da membrana. O nível de corrente que promove a despolarização depende da ativação de receptores AMPA e KA e de outros sinais moduladores pós-sinápticos que controlam a despolarização. A modulação específica da atividade dos canais NMDA é necessária para uma função neural normal. Os subtipos de receptores NMDA apresentam três famílias de subunidades: NMDA NR1, que possui 8 formas variantes, NMDA NR2 (variantes A, B, C, D1 e D2) (Ozawa et al., 1998) e NMDA NR3 (variantes S e L) (Sun et al., 1998) e estão presentes tanto em terminais pós-sinápticos como pré-sinápticos (Smirnova et al., 1993). A subunidade NR1 é essencial para a funcionalidade do receptor NMDA (Forrest et al., 1995), enquanto que as subunidades NMDA R2 e NMDA R3 são co-expressas com NMDA R1 e parecem exercer papel modulador (Petralia et al., 1994a; Sun et al., 1998). A expressão das diferentes subunidades do receptor NMDA varia muito no SNC e o hipocampo e o córtex cerebral são estruturas particularmente ricas neste tipo de receptor glutamatérgico (Watkins et al., 1990). Enquanto a subunidade NMDAR1 apresenta uma ubíqua distribuição ao longo do SNC (Petralia et al., 1994b), as subunidades NMDA NR2 (A-D) e NMDA NR3 (S e L) têm uma distribuição espaço-temporal diferenciada em animais adultos e em desenvolvimento (Nakanishi, 1992, Petralia et al., 1994a, Sun et al., 1998).

Ao contrário da inegável presença de receptores NMDA nas células neurais, a expressão e a funcionalidade de NMDARs em células gliais sempre foi alvo de controversas discussões. Entretanto, sabe-se que o

NMDA promove um aumento na condutividade de membrana da glia de Bergmann (Müller et al., 1993) e a expressão de receptores NMDA nestas células já foi demonstrada (Luque & Richards, 1995, López et al., 1997). Atualmente inúmeros trabalhos têm demonstrado a expressão de receptores NMDA em astrócitos corticais (Conti et al., 1996, 1997, 1999), principalmente em seus processos. Gottlieb e Matute (1997) mostraram que astrócitos hipocâmpais expressam as subunidades NMDA NR2A/B após insulto isquêmico. A presença de receptores NMDA nas células gliais aponta para uma nova discussão dos mecanismos envolvidos na sinalização entre neurônios e células gliais, mas para tanto é necessária a compreensão do papel fisiológico exercido por estes receptores nas células gliais.

Receptores não-NMDA (AMPA e Cainato)

Os receptores AMPA, assim como os Cainato (KA), mediam a transmissão sináptica excitatória rápida e estão associados primariamente a canais independentes de voltagem. Os receptores AMPA e Cainato apresentam múltiplas subunidades, sendo elas GluR1-GluR4 e GluR5-GluR7/KA1-KA2, respectivamente. São canais permeáveis a sódio e potássio (Cotman et al., 1995,) enquanto algumas subunidades apresentam permeabilidade a Ca^{2+} (Swanson et al., 1996, 1997). A ativação dos receptores não-NMDA produz despolarização, a qual promove a abertura de

canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem. Este é o caso da despolarização mediada por AMPA estimulando receptores NMDA pelo deslocamento do Mg^{2+} . Tanto os receptores AMPA quanto Cainato estão distribuídos em todo o SNC; no entanto, a expressão de suas subunidades é bastante heterogênea entre diferentes estruturas e tipos celulares. A distribuição de receptores AMPA é paralela àquela apresentada pelos receptores NMDA. Os receptores Cainato, por outro lado, estão mais concentrados em poucas áreas específicas do SNC (Watkins et al., 1990). Estudos com radioligantes mostraram uma alta afinidade de ^3H -AMPA a sítios na região CA1 de hipocampo, septo lateral e na lâmina molecular de cerebelo; ^3H -KA mostrou alta afinidade na região CA3 de hipocampo, estriato e tálamo (Cotman et al., 1995). As células gliais no SNC também expressam iGluRs (Verkhatsky & Steinhäuser, 2000); no entanto, a variação regional não está obrigatoriamente correlacionada com observações em cultura. A expressão de receptores ionotrópicos glutamatérgicos em células gliais apresenta um aumento após eventos isquêmicos, principalmente nas diferentes regiões do hipocampo (Gottlieb & Matute, 1997).

Receptores Glutamatérgicos Metabotrópicos

Os Receptores Glutamatérgicos Metabotrópicos (mGluRs) constituem uma grande classe de receptores ligados a proteínas G, os quais diferem

estruturalmente, funcionalmente e farmacologicamente dos iGluRs (Schoepp & Conn, 1993; Pin & Duvoisin, 1995; Ozawa et al., 1998). Até o momento oito subtipos de mGluRs foram clonados e caracterizados. Estes receptores podem ser classificados em três grupos onde os membros de cada grupo possuem grande homologia entre si (~70%) e similaridades farmacológicas (Pin & Duvoisin, 1995; Conn & Pin, 1997; Ozawa et al., 1998). O Grupo I compreende os subtipos mGluR1 (Masu et al., 1991; Houamed et al., 1991) e mGluR5 (Abe et al., 1992), os quais estão acoplados à hidrólise de fosfoinositídeos de membrana e são potentemente ativados por quisqualato, mas também são sensíveis ao ácido (1S,3R)-1-aminociclopentano-1,3-dicarboxílico (1S,3R-ACPD). O agonista 3,5-dihidroxifenilglicina (DHPG) tem sido descrito como altamente seletivo e potente para receptores do Grupo I (Ozawa et al., 1998). O Grupo II inclui os subtipos mGluR2 e mGluR3 (Tanabe et al., 1992), que são ligados à formação de AMP_c e potencialmente ativados por 1S,3R-ACPD, por (2S,3S,4S)- α -(carboxiciclopropil)-glicina (L-CCG I) e DCG IV (Schoepp, 1994; Bruno et al., 1996; Ozawa et al., 1998). O Grupo III compreende os subtipos mGluR4 (Tanabe et al., 1993), mGluR6 (Nakajima et al., 1993), mGluR7 (Okamoto et al., 1994; Saugstad et al., 1994) e o subtipo mGluR8 (Duvoisin et al., 1995). Os membros do Grupo III, assim como os do Grupo II, estão ligados à modulação da adenilato ciclase e síntese de AMP_c e são seletivamente ativados pelo ácido L-2-amino-4-

fosfanobutírico (L-AP4) (Schoepp, 1994, Ozawa et al., 1998). São muitos os agonistas que agem nos receptores glutamatérgicos. O 1S,3R-ACPD foi o primeiro a ser identificado como atuando seletivamente sobre receptores metabotrópicos, sendo então de grande importância para o estudo deste tipo de receptores glutamatérgicos.

Assim como descrito anteriormente para os iGluRs, a distribuição dos diferentes subtipos de mGluRs no SNC é bastante irregular, apresentando grandes variações em relação a diferentes estruturas, tipos celulares e estágios de desenvolvimento (Vecil et al., 1992; Schoepp, 1994).

O mGLUR1, em cérebro de rato, tem significativa expressão em células granulares do giro denteado e células piramidais em CA3 de hipocampo, células de Purkinje de cerebelo, células de bulbo olfatório e neurônios do tálamo e septo lateral. O receptor parece estar localizado pós-sinápticamente e não foi demonstrado em glia (Cotman et al., 1995). O mGLUR5, outro receptor ligado à hidrólise de fosfatidilinositol, é expresso no córtex cerebelar, em hipocampo, subiculum, septo lateral, bulbo olfatório, núcleo olfatório anterior, estriato, caudato e córtex. Em culturas de células gliais, na presença de fatores tróficos, a expressão de mGluR5 é muito intensa (Cotman et al., 1995; Winder & Conn, 1996). Sua presença pré-sináptica em axônios terminais indica que o mGluR5 pode exercer funções como receptor pré-sináptico (Romano et al., 1995). Curiosamente,

os receptores metabotrópicos do grupo I apresentam envolvimento tanto em eventos de neurotoxicidade como de neuroproteção (Nicoletti et al., 1999). O subtipo mGLUR2 tem proeminente expressão em córtex cerebelar, acessório de bulbo olfatório, neurônios piramidais do córtex entorrinal e em giro denteado (Ohishi et al., 1994). Acredita-se que o subtipo mGLUR2 pode servir como receptor pré-sináptico em projeções glutamatérgicas córtico-estriatais. O mGluR2 é encontrado tanto pré como pós-sinapticamente em cérebro de ratos (Neki et al., 1996) e sua expressão em células gliais do SNC não foi demonstrada (Cotman et al., 1995). O subtipo mGLUR3, de grande homologia com o mGLUR2 (~70%), é expresso em neurônios do córtex cerebelar, núcleo reticular talâmico, caudato, núcleo supraóptico e em células granulares do giro denteado. O mGluR3 também é expresso em células gliais (Tanabe et al., 1992, 1993; Ohishi et al., 1993; Cotman et al., 1995). O mGLUR4 é expresso em células granulares de cerebelo, em neurônios da lâmina granular interna de bulbo olfatório, no tálamo, no septo lateral, no córtex entorrinal, no giro denteado e na região CA3 de hipocampo (Cotman et al., 1995). O mGluR6 é expresso principalmente em retina (Nakajima et al., 1993), enquanto o subtipo mGLUR8 é expresso em retina e bulbo olfatório (Duvoisin et al., 1995). A tabela 1.1 apresenta os principais agonistas e antagonistas dos receptores glutamatérgicos metabotrópicos.

Tabela 1.1: Receptores glutamatérgicos e seus principais agonistas e antagonistas.

Receptores Glutamatérgicos						
	Ionotrópicos			Metabotrópicos		
	NMDA	AMPA	KA	Grupo I	Grupo II	Grupo III
Subtipos	NR1, NR2, NR3 (subunidades)	GluR 1- GluR4	GluR5-GluR7, KA1, KA2	mGluR1, mGluR5	mGluR2, mGluR3	mgluR4, mgluR6, mgluR7, mGluR8
Principais Agonistas	NMDA	AMPA	Cainato Concavalina A	DHPG	1S, 3s-ACPD, LCCG-I, DCG IV	L-AP4
Principais Antagonistas	AP5 MK-801	CNQX, DNQX,	CNQX, DNQX, NS-102	(+)-MCPG	MCCG	MAP4

Adaptado de Ozawa et al., 1998.

1.2. Fosforilação de proteínas no Sistema Nervoso Central

A fosforilação de proteínas consiste em um mecanismo molecular reversível de modulação intracelular através do qual a função das proteínas é regulada em resposta a estímulos extracelulares. Comuns a todos os organismos eucariotos, os sistemas de fosforilação de proteínas envolvem, pelo menos, três componentes: uma proteína quinase, uma proteína fosfatase e um substrato protéico que tem suas propriedades biológicas alteradas conforme seu estado fosforilado/desfosforilado (Walaas & Greengard, 1991; Rodnight et al., 1997). As quinases são fosforiltransferases que catalisam a transferência do fosfato γ do ATP ou GTP para o grupo hidroxila de resíduos serina, treonina ou tirosina do substrato protéico. As fosfatases são fosforiltransferases que catalisam a hidrólise do grupo fosfato ligado ao substrato protéico, permitindo a reversibilidade do processo de fosforilação (Nestler & Greengard, 1994). A fosforilação de um substrato protéico altera sua carga, uma vez que os grupos fosfato são negativamente carregados, levando a uma possível alteração conformacional e funcional do substrato (Walaas & Greengard, 1991).

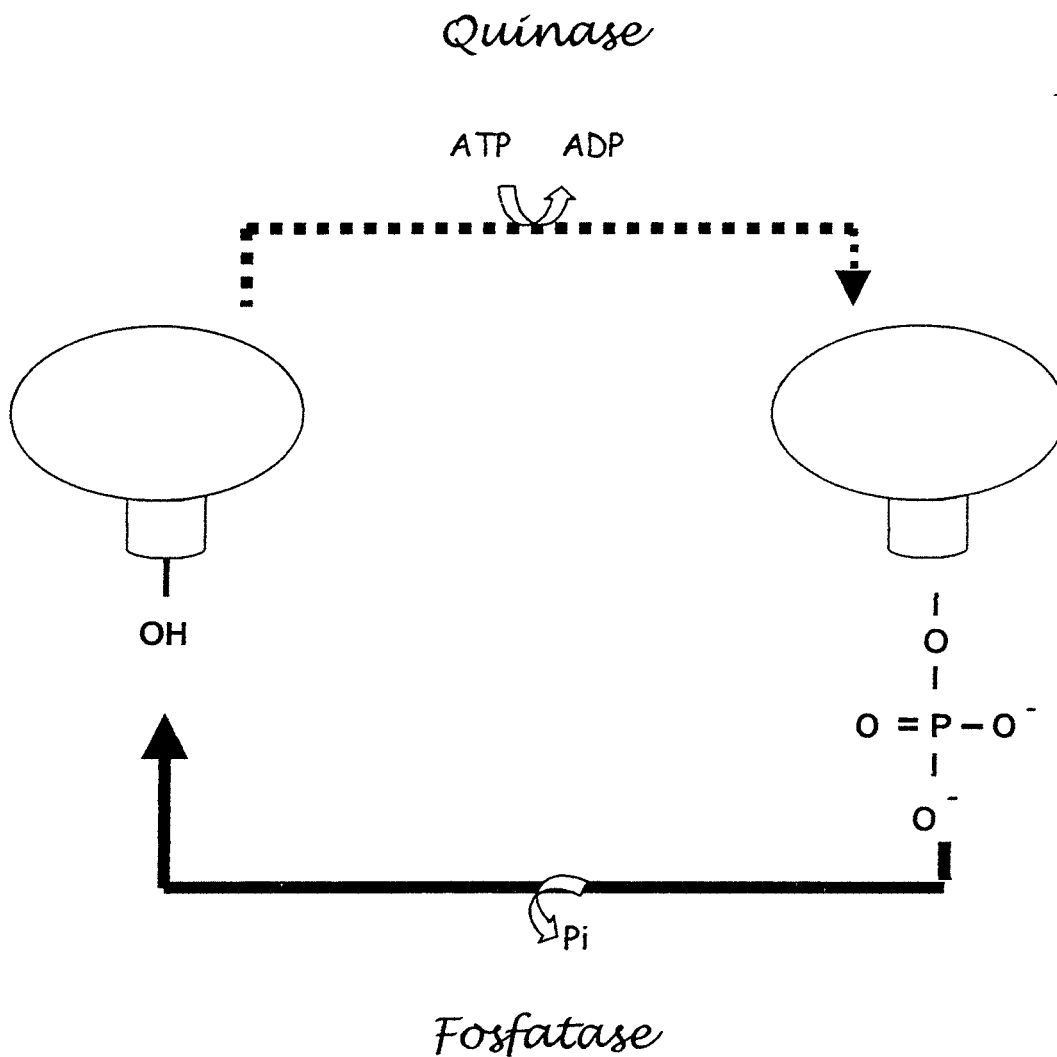


Figura 1.1: Representação esquemática de um sistema fosforilante. A reação de fosforilação é catalisada por uma quinase que transfere o grupo fosfato de uma molécula de ATP para o grupo hidroxila da cadeia lateral de um resíduo de serina, treonina ou tirosina do substrato protéico. A remoção do grupo fosfato é catalisada por uma fosfatase.

O processo de fosforilação e desfosforilação protéica é responsável por inúmeras sinalizações celulares, tais como controle de expressão gênica, síntese protéica e controle do ciclo celular (Whitmarsh & Davis, 2000) e regulação de várias etapas do metabolismo intermediário, inclusive no Sistema Nervoso Central (SNC), o qual é bastante rico em sistemas fosforilantes responsáveis pela modulação de diversas funções celulares. As fosfoproteínas desempenham um importante papel nas funções neurais, entre elas a biossíntese de neurotransmissores, modulação da transmissão sináptica, ancoramento e transporte das vesículas sinápticas e a modulação da atividade de receptores e canais iônicos. A fosforilação protéica também está intimamente relacionada com a dinâmica remodelagem da arquitetura citoesquelética das células nervosas (Nixon & Sihag, 1991; Walaas & Greengard, 1991; Rodnight & Wofchuk, 1992; Nairn & Shenolikar, 1992; Inagaki et al., 1994; Pasqualotto & Shaw, 1996) e envolvida nas várias formas de plasticidade sináptica, exercendo um papel crítico no início da potenciação de longa duração (LTP) e depressão de longa duração (LTD) (Schulman, 1995; Adams et al., 2000), e em eventos de aprendizado e memória (Izquierdo & Medina, 1997; Viola et al., 2000).

De uma forma geral, três mecanismos fisiológicos clássicos podem ativar as proteínas quinases: produção de segundos mensageiros,

autofosforilação enzimática e acoplamento de primeiros mensageiros a complexos receptor-quinase (Walaas & Greengard, 1991).

As quinases podem ser classificadas de acordo com os resíduos de aminoácidos que fosforilam e deste modo podem ser divididas em dois principais grupos: Serina/treonina quinases e tirosina quinases. Cerca de 95% dos resíduos fosforilados são em serina e de 3 a 4% em treonina, enquanto que apenas 1% das fosfoproteínas no SNC são fosforiladas em resíduos de tirosina (Greengard, 1987; Nestler & Greengard, 1994). As proteínas serina/treonina quinases são comumente ativadas através de sistemas de segundos mensageiros tais como: AMP_c , GMP_c , Ca^{2+} , DAG e IP_3 , entre outros. As proteínas tirosina quinases estão geralmente associadas a receptores e são ativadas diretamente pela ligação de primeiros mensageiros. Além destes mecanismos, sabe-se que a grande maioria das quinases apresentam sítios autofosforiláveis que atuam na regulação de sua atividade (Nestler & Greengard, 1994).

Tendo em vista o grande número de processos celulares regulados por fosforilação/desfosforilação protéica, muitos pesquisadores têm investido seus esforços na descoberta e compreensão de seus mecanismos regulatórios (Graves & Krebs, 1999).

As principais serina/treonina quinases dependentes de segundos mensageiros estão descritas a seguir:

Proteínas quinases dependentes de AMP_c (PKA): Estas quinases são encontradas em todas as células eucarióticas e atuam sobre um grande número de substratos protéicos. No estado inativo a PKA é formada por um complexo protéico de duas subunidades catalíticas e duas subunidades regulatórias. A ligação de AMP_c às subunidades regulatórias altera a conformação destas e promove a liberação das subunidades catalíticas que tornam-se ativas para fosforilar o substrato protéico (Alberts et al., 1994; Nestler & Greengard, 1994).

Proteínas quinases dependentes de GMP_c (PKG): Nos mamíferos a PKG é encontrada basicamente no músculo liso (Cohen, 1992) e em cerebelo, principalmente nas células de Purkinje (Schlinchter et al., 1980). É formada por duas subunidades idênticas. O GMP_c liga-se à subunidade regulatória e os dois domínios inibitórios localizados nesta subunidade são deslocados de modo que a subunidade catalítica possa atuar sobre o substrato.

Proteínas quinases dependentes de Cálcio e Calmodulina (PKCaM): No SNC existem pelo menos 5 tipos de proteínas quinases dependentes de Ca^{2+} /calmodulina. A PKCaM tipo II é particularmente abundante e ativa no cérebro e em certas regiões chega a representar 2% da proteína total existente (Bronstein et al., 1993). No SNC esta enzima pode estar presente na forma heteromérica ou homomérica, contendo de 10 a 12 subunidades autofosforiláveis. Cada subunidade possui um domínio catalítico, um domínio

regulatório que liga a calmodulina e um domínio de associação (Walaas & Greengard, 1991; Bronstein et al., 1993; Schulman, 1995).

Proteínas quinases dependentes de Cálcio e fosfolipídio (PKC): São proteínas monoméricas e as subespécies exibem um único polipeptídeo com variações seqüenciais. Presentes no SNC, assim como em outros tecidos, compreendem uma família de isoformas, as quais apresentam distintas localizações subcelulares e diferentes maneiras de ativação no que se refere à translocação para a membrana e quanto ao requerimento por Ca^{2+} e diacilglicerol (DAG). No entanto, o mecanismo clássico de ativação consiste no fato de que, na presença de Ca^{2+} , a PKC transloca-se do citosol para a membrana onde liga-se à fosfatidilserina e ao DAG, provenientes da hidrólise do fosfatidilinositol de membrana. Tais fosfolipídios promovem o deslocamento do domínio inibitório da enzima formando um complexo ativo associado à membrana plasmática (Nishizuka, 1989; Walaas & Greengard, 1991; Inagaki et al., 1994a).

Até o momento, um grande número de serina/treonina quinases independentes de segundos mensageiros já foi descrito. Os mecanismos de ação e as funções destas quinases ainda não são bem conhecidas e como exemplos destas enzimas temos: caseína quinases (CK), que promovem a fosforilação da DARP-32, MAP1 e tubulinas (Giralt et al., 1989; Serrano et al., 1989); MAPKs (Mitogen activated protein kinases), que são ativadas por

fatores mitogênicos e estão relacionadas a inúmeros processos de sinalização intracelular; proteínas quinases dependentes de ciclinas (CDKs), que desempenham funções ligadas à regulação do ciclo celular. Quando associadas a ciclinas específicas, as CDKs sofrem fosforilação por uma quinase ativadora, promovendo a ativação enzimática. Em astrócitos a cdc2 quinase tem sido referida como proteína quinase dependente de ciclinas (Inagaki et al., 1994a).

As proteínas tirosina-quinases, ainda que sejam responsáveis por uma pequena parcela dos eventos de fosforilação no SNC, estão envolvidas em processos de proliferação e crescimento celular e também em mecanismos de transdução de sinal (Greengard, 1987; Nestler & Greengard, 1994). A atividade das tirosina quinases é regulada pela ligação do efetor ao receptor de membrana que promove a autofosforilação dos próprios resíduos de tirosina (Walaas & Greengard, 1991).

As proteínas fosfatases, assim como as quinases, desempenham um importante papel no processo de fosforilação pois promovem a reversibilidade da ação quinásica através da hidrólise do grupo fosfato ligado ao substrato protéico. Seu papel na regulação do estado fosforilado/desfosforilado de proteínas tem sido cada vez mais evidenciado (Cohen, 1992; Hunter, 1995).

As proteínas fosfatases podem ser classificadas em ácidas, básicas e neutras; no entanto, os dois primeiros tipos estão presentes em pequenas quantidades no SNC, onde aparentemente não desempenham papel significativo. No entanto, as fosfatases neutras apresentam-se em grandes quantidades no SNC e são separadas em serina/treonina e tirosina fosfatases, de acordo com os resíduos de aminoácidos que desfosforilam (Nestler & Greengard, 1994). Apesar desta classificação, algumas fosfatases são capazes de atuar sobre outros sítios de modo que ocorre uma certa sobreposição de sítios desfosforiláveis em um mesmo substrato protéico (Vinadé, 1997).

Algumas fosfatases têm sua atividade regulada no SNC, direta ou indiretamente, por segundos mensageiros tais como AMP_c , GMP_c e Ca^{2+} e estes diferentes sistemas regulatórios possuem distintas distribuições celulares e regionais. Certos neurotransmissores podem produzir alguns de seus efeitos fisiológicos no cérebro regulando os inibidores de fosfatases em células específicas. As principais fosfatases com atividade no SNC são:

Proteína fosfatase tipo 1 (PP1): é composta por uma subunidade catalítica combinada com diferentes subunidades regulatórias. A PP1 possui — atua sobre diversos substratos e muitas vezes sobrepõe a atividade de outras fosfatases. No SNC, as fosfatases tipo PP1 são relativamente abundantes e apresentam ubíqua distribuição e atividade (Sim et al., 1994).

Uma importante característica da PP1 é que a sua subunidade catalítica pode associar-se a proteínas endógenas que inibem sua atividade, tais como o inibidor 1, inibidor 2 e a DARPP-32. Estas atividades inibitórias específicas para PP1 são definidas por reações de fosforilação e desfosforilação (Cohen, 1989).

Proteína fosfatase tipo 2A (PP2A): é formada por três subunidades: uma catalítica, uma estrutural e uma regulatória. Esta classe de proteínas fosfatases é inibida por fosforilação via proteína tirosina kinase (Chen et al., 1992).

Proteína fosfatase tipo 2B (PP2B): também conhecida como calcineurina, é composta por uma subunidade catalítica e outra regulatória. A ativação desta fosfatase é dependente de Ca^{2+} e calmodulina (Klee et al., 1988). É expressa em grande quantidade no SNC e seus substratos mais conhecidos são as proteínas reguladoras de atividade de outras fosfatases tais como o inibidor 1 e a DARPP-32 (Wera & Hemmings, 1995).

Proteína fosfatase tipo 2C (PP2C): é descrita como sendo uma fosfatase dependente de Mg^{2+} , sendo mais significativamente expressa em hipocampo e cerebelo; no entanto, há poucos substratos seletivos descritos desta fosfatase (Abe et al., 1992).

Proteína fosfatase tipo 3 (PP3): consiste em uma proteína integral de membrana, cuja função parece estar envolvida com a proliferação celular

(Honkanen et al., 1991), enquanto a proteína fosfatase tipo 4 (PP4) provavelmente atue na divisão celular (Cohen, 1993).

1.3. Células gliais

No SNC os neurônios e as células gliais comunicam-se entre si promovendo interações específicas com a finalidade de realizar diversas funções. As células precursoras das células nervosas e gliais são derivadas de células neuroepiteliais do tubo neural e a diversificação ocorre em estágios primários de desenvolvimento por ativação de genes célula-específicos, os quais conferem diferentes funções e características morfológicas. As células gliais são divididas em dois grupos principais: macroglia, que compreende os astrócitos e oligodendrócitos (de origem ectodérmica) e microglia (de origem mesodérmica).

As células precursoras dos astrócitos são chamadas de glia radial e desempenham importante papel na migração neuronal, na orientação das fibras nervosas e organização do tecido nervoso durante os períodos de desenvolvimento cerebral. Após a completa migração neuronal, a glia radial diferencia-se em astrócitos (Hunter & Hatten, 1995; Chanas-Sacre et al., 2000).

Os astrócitos correspondem a aproximadamente 50% do número total de células do SNC (Pope, 1978), onde desempenham um grande número de funções. São classificados em dois grupos principais: astrócitos fibrosos, que encontram-se principalmente na porção branca do SNC, e astrócitos protoplasmáticos, que encontram-se principalmente na porção cinzenta, ao redor do corpo neuronal, dendritos e sinapses. Ambos os tipos mantêm contato com capilares e neurônios (Kimelberg & Norenberg, 1989). As células astrocíticas são responsáveis por uma série de funções no SNC, tais como a manutenção da homeostase de íons (especialmente o K^+) e aminoácidos (glutamato e GABA) no meio extracelular (Hansson & Rönnbäck, 1995;). Os astrócitos realizam tais funções devido ao variado arranjo de receptores para neurotransmissores e a estimulação de muitos destes pode ativar sistemas de segundos mensageiros (Kimelberg, 1988; Ozawa et al., 1998). A demonstração da presença de receptores para diferentes neurotransmissores e de canais iônicos dependentes de voltagem aumentou o interesse em entender como a glia responde à atividade neuronal.

Sabe-se que astrócitos e neurônios apresentam um sofisticado sistema de comunicação recíproca que pode regular a liberação de neurotransmissores, a excitabilidade neuronal e a transmissão sináptica (Carmignoto, 2000). Os astrócitos são capazes de sintetizar e liberar fatores tróficos e substâncias neuroativas, as quais possuem localização

específica em subpopulações de astrócitos, evidenciando sua grande habilidade em enviar mensagens (Hansson & Rönnbäck, 1995).

Os astrócitos também exercem importante função no processo de cicatrização nervosa, conhecida como gliose reativa. Este processo ocorre após injúria do SNC e é caracterizado por um severo aumento na expressão da proteína ácida fibrilar glial (GFAP), uma proteína de citoesqueleto que é marcadora de células astrocíticas (Eng & Ghirnikar, 1994).

O SNC apresenta, além dos astrócitos, dois importantes tipos de célula glial: a glia de Bergmann e a glia de Müller. Presentes no cerebelo e na retina, respectivamente, estas células, ao contrário das demais glias radiais, não são convertidas em astrócitos. Além das funções de orientação na migração e maturação neuronal, estas células regulam a expressão gênica (López et al., 1998), interagem com neurônios durante a transmissão sináptica (Muller & Kettenmann, 1995; Kirischuk et al., 1999), expressam receptores glutamatérgicos (Ortega et al., 1991; López-Cólome & Romo-de-Vivar, 1991; López et al., 1997) e respondem rapidamente a sinais neuronais (Shao & McCarthy, 1997).

1.4. Filamentos Intermediários

Os filamentos intermediários, conjuntamente com os microtúbulos e os microfilamentos, formam o citoesqueleto celular. Tais componentes são formados pela polimerização de subunidades protéicas específicas. Os monômeros de α e β tubulina formam os microtúbulos, os monômeros de actina formam os microfilamentos e uma heterogênea classe de proteínas fibrosas formam os filamentos intermediários (Steinert & Roop, 1988).

Estudos da seqüência de aminoácidos mostram que nos filamentos intermediários a região central (em α -hélice) é altamente conservada enquanto que as regiões amino-terminal e carboxi-terminal apresentam diferenças que permitem uma subclassificação em seis diferentes tipos: tipo I - queratinas ácidas; tipo II - queratinas neutras e básicas; tipo III - vimentina, desmina e GFAP; tipo IV - neurofilamentos; tipo V - lamininas nucleares e tipo VI - nestina (Fuchs & Weber, 1994).

A fosforilação dos filamentos intermediários é o principal fator de regulação da polimerização/despolimerização, sugerindo que a organização intracelular é controlada pela atividade de enzimas quinases e fosfatases (Inagaki et al., 1996). Tal processo desempenha um importante papel na reorganização citoesquelética que ocorre durante o desenvolvimento, diferenciação e divisão celular (Vinadé et al., 1997). Estudos *in vitro*

mostraram que a fosforilação das proteínas que compõem um filamento intermediário resulta em sua despolimerização e a fosforilação das subunidades impede a polimerização das mesmas (Eriksson et al., 1992; Inagaki et al., 1996).

1.5. Proteína Ácida Fibrilar Glial (GFAP)

A GFAP é uma proteína de filamento intermediário expressa em astrócitos no SNC, consistindo em um importante marcador destas células. Muitos estudos envolvendo os diferentes subtipos, o desenvolvimento e os processos plásticos dos astrócitos tem como alvo principal a proteína ácida fibrilar glial.

Estudos ontogenéticos em ratos mostraram que as células da glia radial expressam principalmente vimentina e que a diferenciação destas células em astrócitos é acompanhada por um aumento nos níveis de expressão de GFAP e por um declínio nos níveis de vimentina. No entanto, as células astrocíticas em cultivo não apresentam redução nos níveis de expressão de vimentina (Sancho-Tello et al., 1995). No cerebelo, a glia de Bergmann expressa GFAP e vimentina concomitantemente, até a vida adulta e estudos recentes mostraram que a co-expressão de GFAP e vimentina é

fundamental para a manutenção das funções exercidas pela glia de Bergmann (Gimenez et al., 2000).

O peso molecular do monômero de GFAP é de aproximadamente 50 kDa em SDS-PAGE e seu ponto isoelétrico é aproximadamente 6,3 (Gonçalves et al., 1990; Gonçalves & Rodnight, 1992). O monômero de GFAP consiste em um domínio central em α -hélice, uma cabeça N-terminal e uma cauda C-terminal, ambas não helicoidais. A região central apresenta pelo menos 70% de homologia com a região central das demais proteínas de filamento intermediário tipo III. A porção N-terminal é altamente carregada e apresenta 5 sítios fosforiláveis. Todos os filamentos intermediários tipo III apresentam um segmento C-terminal não helicoidal altamente conservado (Rodnight et al., 1997). Estudos *in vitro* com GFAP de porco mostraram a presença de seis sítios fosforiláveis, cinco deles na porção N-terminal (Th 7, Ser 8, Ser 13, Ser 17 e Ser 34) e um na porção C-terminal (Ser 389). Estes sítios mostraram-se fosforiláveis pelas quinases PKA, CaMK II, PKC e cdc-2 quinase (Inagaki et al., 1994b; Tsujimura et al., 1994). Os sítios fosforiláveis em GFAP de rato ainda não foram identificados, mas a grande homologia entre os domínios N-terminais de ambas espécies é suficiente para assumir que possivelmente estes sítios também estejam presentes na GFAP de rato e que neles atuem as mesmas quinases indicadas para GFAP de porco (Rodnight et al., 1997).

Tabela 1.2 : Sítios fosforiláveis e suas respectivas quinases em GFAP de porco.

Sítio	Quinase
T7	PKA
S8	cdc-2 quinase, PKA, PKC
S13	PKA, CaMK II, PKC
S17	CaMK II
S34	PKA, CaMK II, PKC
S389	CaMK II

(Adaptado de Tsujimura et al.,1994)

Trabalhos anteriores mostraram uma grande variação regional no nível de fosforilação da GFAP e apontaram que em hipocampo esta proteína encontra-se mais fosforilada do que em qualquer outra das estruturas estudadas (Rodnight & Leal, 1990). Córtex cerebelar apresenta aproximadamente 42% do nível de GFAP fosforilada encontrada em hipocampo (Leal, 1995). Esta diferença regional na fosforilação da GFAP mostrou-se particularmente interessante, uma vez que áreas do sistema límbico apresentaram uma intensa marcação (Gonçalves & Rodnight, 1992). A análise comparativa entre o imunoconteúdo de GFAP e seu nível de fosforilação mostrou que em corda espinhal a quantidade de GFAP imunodetectada é superior àquela encontrada em hipocampo. No entanto, em corda espinhal a quantidade de GFAP fosforilada representa aproximadamente 2,5% da encontrada em hipocampo (Gonçalves & Rodnight,

1992), indicando que não é possível correlacionar diretamente níveis de expressão com níveis de fosforilação. Desta forma, a variação nos níveis basais de GFAP fosforilada encontrada nas diversas estruturas estudadas deve estar relacionada a diferentes níveis de atividade enzimática dos sistemas fosforilantes e não aos níveis de substrato.

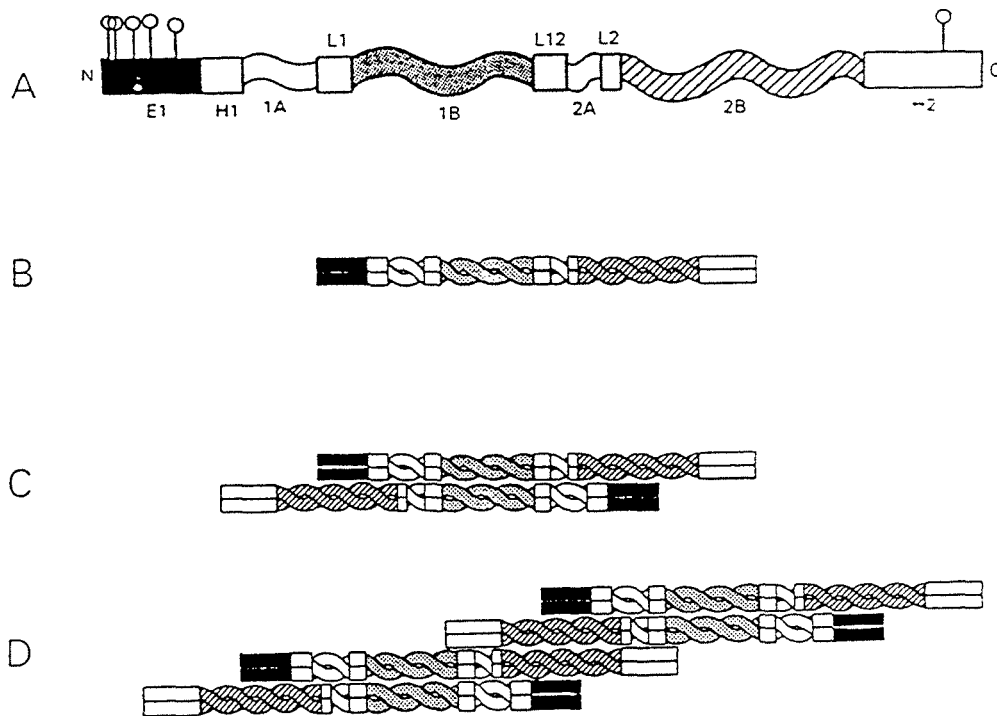


Figura 1.2: Ilustração esquemática da estrutura de um filamento de GFAP. A) Estrutura do monômero de GFAP de porco, com 5 sítios fosforiláveis na porção N-terminal e um sítio na porção C-terminal. B) Arranjo dos monômeros de GFAP em dímeros paralelos. C) Arranjo de dímeros anti-paralelos em tetrâmero ou protofilamento. D) Estrutura de um octâmero. (Adaptado de Rodnight et al., 1997).

Estudos das propriedades do sistema fosforilante desta proteína mostraram que este é regulado pelo desenvolvimento. A GFAP aparece fosforilada em hipocampo de ratos a partir do 9^o dia pós-natal e tem seu nível aumentado com o crescimento do animal, atingindo o máximo de fosforilação na idade adulta. A fosforilação da GFAP é altamente estimulada por glutamato em fatias de hipocampo de animais jovens (P11-16). Em adultos, tal efeito não foi observado (Wofchuk & Rodnight, 1990). Este efeito do glutamato sobre a GFAP em hipocampo de animais jovens parece ocorrer via receptores metabotrópicos, uma vez que o agonista glutamatérgico metabotrópico seletivo 1S,3R-ACPD aumentou o nível de fosforilação da proteína no mesmo nível que o glutamato e agonistas de receptores glutamatérgicos ionotrópicos mostraram-se sem efeito. Na presença da *toxina pertussis* observou-se uma menor estimulação promovida por glutamato, indicando um envolvimento de proteínas G neste mecanismo (Wofchuk & Rodnight, 1994; Rodnight et al., 1997).

Em fatias de hipocampo de animais jovens (P11-P16) o nível de fosforilação da GFAP foi menor na presença de Ca^{2+} externo quando comparado ao nível observado na ausência de Ca^{2+} externo (presença de EGTA). No entanto, aos 20 dias de idade (P20), a presença ou ausência de Ca^{2+} não altera o nível de fosforilação da GFAP, e a partir desta idade o sistema de fosforilação da GFAP torna-se progressivamente dependente do

Ca^{2+} externo (Wofchuk & Rodnight, 1995; Rodnight et al., 1997). Aparentemente, em hipocampo de ratos jovens, este efeito inibitório do Ca^{2+} sobre a incorporação de ^{32}P na GFAP ocorre através de canais tipo-L, uma vez que foi bloqueado por nifedipina, um antagonista específico de canais tipo-L (Wofchuk & Rodnight, 1995; Rodnight et al., 1997).

Wofchuk e Rodnight (1994) mostraram que o nível de fosforilação da GFAP na presença de glutamato é semelhante ao nível de fosforilação apresentado na ausência de Ca^{2+} externo (presença de EGTA). O tratamento simultâneo com glutamato e ausência de Ca^{2+} (EGTA presente), não resultou em efeito sinérgico, indicando que provavelmente o mecanismo envolvido seja o mesmo (Rodnight et al., 1997)

A desfosforilação da GFAP em hipocampo de animais jovens mostrou ser catalisada pela fosfatase PP1 (Vinadé & Rodnight, 1996), não havendo evidências de um envolvimento direto de íons cálcio sobre a desfosforilação desta proteína. No entanto, observou-se um envolvimento da PP2B (ou calcineurina, como comumente é conhecida) no processo de desfosforilação da GFAP. Uma vez que não foi evidenciado um envolvimento direto do cálcio, a ação da calcineurina provavelmente ocorre via uma cascata enzimática dependente de Ca^{2+} , a qual é conhecida por regular a PP1 em muitos tecidos e que parece estar envolvida no fenômeno de depressão de longa duração (LTD) (Mulkey et al., 1994). Este evento em cascata baseia-se no fato de

que a PP1 é inibida pelo inibidor-1 na forma fosforilada e este sofre desfosforilação pela calcineurina. Logo, na ausência de Ca^{2+} externo ou bloqueio da entrada de Ca^{2+} na célula, a calcineurina permanece inativa permitindo a inibição da PP1 pelo inibidor-1 fosforilado o que impede, desta forma, a reversibilidade do processo de fosforilação da GFAP, deslocando o equilíbrio para a forma fosforilada da proteína (Vinadé & Rodnight, 1996 e 1997; Rodnight et al., 1997).

Em um estudo comparativo, o sistema fosforilante de GFAP em corda espinhal de animais imaturos apresenta as mesmas características do sistema fosforilante apresentado por hipocampo de animais adultos, ou seja, dependência de íons Ca^{2+} e ausência de modulação glutamatérgica (Kommers et al., 1998).

Ao contrário do hipocampo, o papel do cerebelo em eventos de cognitivos apenas recentemente tem sido valorizado (Schmahmann, 1997; Silveri & Misciagna, 2000). Provavelmente, a sub-valorização do papel desta estrutura em processos como linguagem e memória, seja devido ao fato de que danos cerebelares promovem intenso déficit motor que podem mascarar o prejuízo sobre outras funções. O interesse sobre o papel desempenhado pelo cerebelo em diferentes funções cerebrais tem levado um grande número de pesquisadores a investirem seus esforços na determinação dos mecanismos envolvidos na atividade cerebelar (Ito, 1999). Com base nestes

dados e no fato que a GFAP apresentam significativos níveis de fosforilação em cerebelo, consideramos importante avaliar se a modulação glutamatérgica sobre a fosforilação da GFAP, presente em hipocampo, também ocorre em cerebelo de ratos.

1.6. Objetivos

Objetivo geral da tese:

- Verificar o(s) mecanismo(s) envolvido(s) na modulação glutamatérgica da fosforilação da proteína ácida fibrilar glial em hipocampo e cerebelo de animais jovens.

Objetivos específicos:

- Verificar qual(is) receptor(es) glutamatérgico(s) metabotrópico(s) está(ão) envolvido(s) na modulação da fosforilação de GFAP em fatias de hipocampo de animais jovens;
- Verificar o efeito do glutamato sobre a fosforilação da GFAP em fatias de cerebelo de animais em diferentes idades;
- Verificar qual(is) receptor(es) glutamatérgico(s) está(ão) envolvido(s) na modulação da fosforilação de GFAP em fatias cerebelares de animais jovens;

- Verificar as respostas do sistema fosforilante da GFAP, mediadas por glutamato, em cultura primária de células gliais e em cultura mista cerebelar.

2. ARTIGOS CIENTÍFICOS

Artigo publicado no NeuroReport, 10, 2119-2123 (1999).

Título: The mGluR stimulating GFAP phosphorylation in immature hippocampal slices has some properties of a group II receptor.

Autores: Trícia Kommers, Richard Rodnight, Daniela Oppelt, Diogo Oliveira e Susana Wofchuk.

NeuroReport 10, 2119-2123 (1999)

IN a previous study we showed that phosphorylation of the astrocytic marker glial fibrillary acidic protein (GFAP) in hippocampal slices from immature rats (P12-P16) is regulated by a metabotropic glutamate receptor (mGluR). The subtypes of these receptors are divided into three groups and exhibit two distinct transduction signals: activation of phospholipase C and liberation of internal calcium (group I) or modulation of cAMP synthesis (groups II and III). Here we investigated the subtype of mGluR involved. Phosphorylation was strongly stimulated by the selective group II agonists DCG IV, L-CCG-I and 1S,3S-ACPD, whereas the group I agonist 3,5-DHPG and the group III agonist L-AP4 had no effect. These results show that the receptor regulating GFAP phosphorylation in the immature hippocampus has some of the properties of a group II mGluR. *NeuroReport* 10:2119-2123 © 1999 Lippincott Williams & Wilkins.

Key words: 1S,3S-ACPD; DCG IV; GFAP; Glial fibrillary acidic protein; Glutamate; Hippocampus; Immature rat; Protein phosphorylation

The mGluR stimulating GFAP phosphorylation in immature hippocampal slices has some properties of a group II receptor

Trícia Kommers, Richard Rodnight, Daniela Oppelt, Diogo Oliveira and Susana Wofchuk^{CA}

Departamento de Bioquímica, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos 2600-anexo, 90.035.003, Porto Alegre, Brazil

^{CA}Corresponding Author

Introduction

Glial fibrillary acidic protein (GFAP) is an intermediate filament protein expressed almost exclusively in astrocytes. Assembled filaments of GFAP exist in dynamic equilibrium with a small pool of soluble GFAP and disassembly is increased by the phosphorylation of sites in the N-terminal region of the protein [1]. Phosphorylation of GFAP and other intermediate filament proteins is believed to play an important role during ontogeny when cellular division and hypertrophy are occurring and reorganization of the cytoskeleton is required [1]. However, extracellular signals that may regulate the phosphorylation state of GFAP are poorly understood. One such developmental signal may be glutamate since we have shown that the phosphorylation of GFAP in slices of hippocampus from immature rats is strongly stimulated by this neurotransmitter via a metabotropic receptor (mGluR) in a reaction dependent on external Ca^{2+} [2]. Notably this effect of glutamate was only observed in a narrow developmental window of 12-16 days postnatal. In order to understand the intracellular mechanism of the response it was important to identify the subtype of mGluR involved since at least eight different mGluRs have been described [3-5]. These are gen-

erally divided into three groups according to their signal transduction mechanisms based primarily on observations made on cloned receptors expressed in heterologous cells. Group I receptors (mGluR1 and 5) are coupled to the hydrolysis of phosphatidylinositol and the generation of inositol trisphosphate (IP₃), while groups II (mGluR2 and 3) and III (mGluR4 and 6-8) inhibit the forskolin-stimulated synthesis of cAMP by adenylyl cyclase. Here we use selective metabotropic receptor agonists to show that the glutamate receptor regulating GFAP phosphorylation in immature hippocampal slices has the pharmacological properties of a group II receptor.

Materials and Methods

Chemicals: [³²P]Na₂HPO₄ was purchased from CNEN, São Paulo. Acrylamide (Product A8887) and materials for electrophoresis were purchased from Sigma. L-Glutamate, (1S,3R)- and (1S,3S)-1-aminocyclopentane-1,3-dicarboxylic acid (1S,3R-ACPD and 1S,3S-ACPD), L-(+)-2-amino-4-phosphonobutyric acid (L-AP4), (2S,1'S,2'S)-2-(carboxycyclopropyl)glycine (L-CCG-I), (2S,2'R,3'R)-2-(2',3'-dicarboxycyclopropyl)glycine (DCG IV), (S)-3,5-dihydroxyphenylglycine ((S)-3,5-DHPG), (2S)- α -ethylglutamic acid (EGLU) and (RS)- α -methyl-4-

carboxyphenylglycine ((RS)-MCPG) were obtained from Tocris Cookson (USA). 1-6-[[17 β -3-methoxyestra-1,3,5(10)-trien-17-yl]amino]hexyl]-1H-pyrrole-2,5-dione (U-73122) came from Calbiochem. U73122 was dissolved in dimethylsulphoxide and diluted to the appropriate concentration with medium. Other compounds were dissolved according to the instructions of the supplier Tocris.

Animals: Wistar rats of either sex in the age range 12–16 days postnatal came from the local breeding colony. They were maintained in a ventilated room at constant temperature with free access to ration and water on 12:12 h light:dark cycle.

Preparation and labelling of slices: Rats were killed by decapitation and their hippocampi dissected on ice. Slices (0.4 mm) were obtained with a McIlwain tissue chopper and labelled as described previously [2]. Adjacent slices were used for test and control situations. The basic medium contained 124 mM NaCl, 4 mM KCl, 1.2 mM MgSO₄, 25 mM Na-HEPES (pH 7.4), 12 mM glucose and 1 mM CaCl₂ and was gassed with O₂. Slices were pre-incubated in 100 ml of this medium at 30°C for 30 min, which was then replaced with 50 ml of medium containing 40 mCi of [³²P]phosphate with or without additions of agonist and/or antagonist. Incubation was stopped after 1 h at 30°C with 1 ml 10% trichloroacetic acid (TCA). Slices were then washed with 4% TCA to remove the excess radioactivity, briefly with water to remove acid and immediately dissolved in 2-D electrophoresis sample buffer [2]. Agonists were diluted to the appropriate concentrations with medium and added to the incubation period. The inhibitors MCPG, EGLU and U73122 were added to the pre-incubation and incubation media. The inhibitory activity of U73122 was checked by showing that it inhibited glutamate-stimulated hydrolysis of phosphatidylinositol in primary cultures of astrocytes (data not shown).

Two-dimensional electrophoresis: Non-equilibrium pH gradient electrophoresis (NEPHGE) was used for the first dimension and 8% polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) in the second dimension. Three sections of first dimension rod gels containing GFAP were mounted on one second dimension slab gel with the control sample in the centre (see Fig. 1 for an example). Dried gels were exposed to X-ray films (Kodak x-Omat) at -70°C with intensifying screens. Autoradiographs were quantified by scanning the films in a scanner (Hewlett-Packard Scanjet 6100C) and determining optical densities with Optiquant (version 02.00, Packard Instrument Company) software. Density values

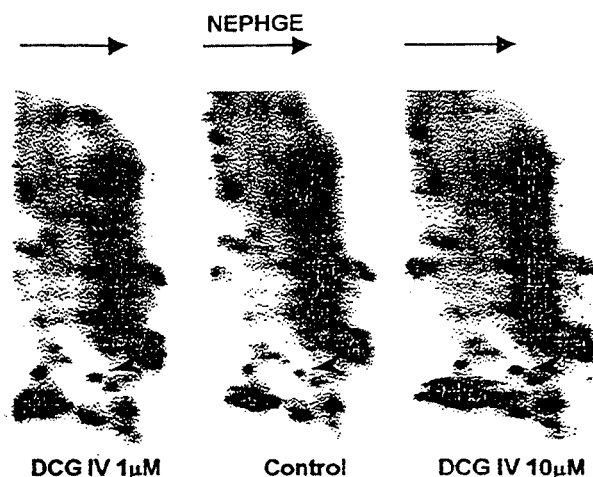


FIG. 1. Representative autoradiograph showing the effect of two concentrations of DCG IV on the phosphorylation of GFAP in hippocampal slices from a rat 15 days postnatal. Slices were labelled with [³²P]phosphate as described in the text and analysed by 2-dimensional electrophoresis. The autoradiograph was derived from sections of three first dimension rod gels mounted on one second dimension slab gel as indicated. Arrow heads point to GFAP. Results were quantified by densitometry of the autoradiographs as described in the text.

were obtained for total phosphorylation and for the spot corresponding to GFAP. Values for GFAP were first expressed as a percentage of the total phosphorylation. The corrected control values were then normalized to 100% and the percentage changes in the test samples calculated. Results were analysed statistically by a paired Student's *t*-test or by ANOVA.

Results

The selective group II agonists DCG IV and L-CCG-I and the relatively selective group II agonist 1S,3S-ACPD strongly stimulated GFAP phosphorylation (Fig. 1; Fig. 2). In contrast the group I selective agonist (S)-3,5-DHPG and the group III agonist L-AP4 were without effect on the phosphorylation. The effect of 1S,3R-ACPD, which is less selective than 1S,3S-ACPD between groups I and II, was partially blocked by 1 mM (RS)-MCPG, a broad spectrum antagonist of mGluRs ($-52 \pm 5.2\%$, 10 observations). However the more specific group II antagonist EGLU (1 mM) did not inhibit the stimulation given by 1 mM DCG IV (three observations, data not shown). There was no significant difference in the magnitude of the stimulation given by the three selective group II agonists, but all the values were significantly higher than that given by 1S,3R-ACPD. A rough dose-response curve for the effect of DCG IV gave a minimum effective concentration of approximately 1 mM (Fig. 3). The non-involvement of a group I receptor activating the hydrolysis of phosphatidylinositol and the genera-

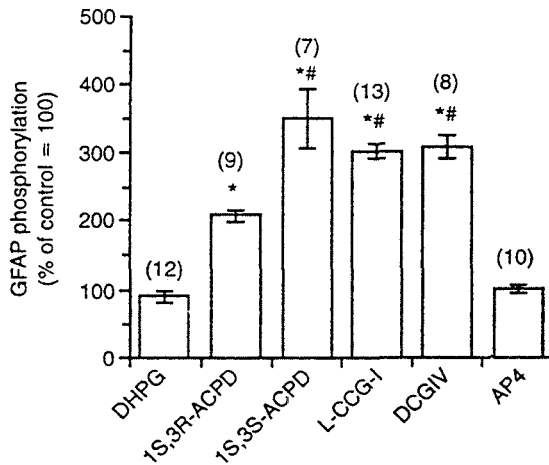


FIG. 2. Selective group II agonists strongly stimulated the phosphorylation of GFAP in immature hippocampal slices. Concentrations used were as follows: DHPG, 100 μ M; 1S,3R-ACPD, 100 μ M; 1S,3S-ACPD, 100 μ M; L-CCG-I, 10 μ M; DCG IV, 20 μ M and L-AP4, 1 mM. The number of observations is given in parentheses above the columns. *Significantly different from the 100% control by paired *t*-test ($p < 0.01$); #significantly different from 1S,3R-ACPD by one-way ANOVA and Duncan's test.

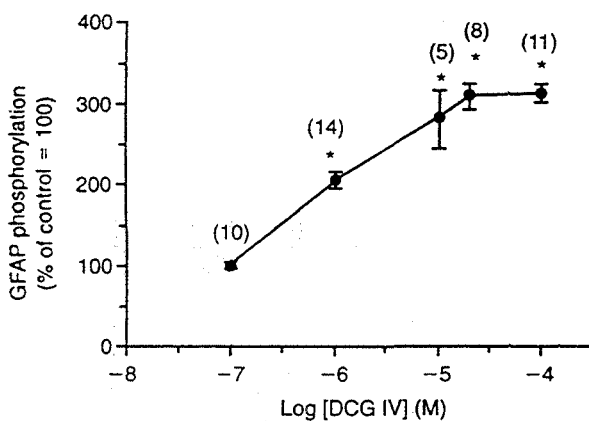


FIG. 3. A rough dose-response curve of the effect of DCG IV. Values marked with an asterisk were significantly different from the 100% control ($p < 0.01$). Number of observations given in parentheses.

tion of IP₃, was confirmed by showing that incubation of slices with the inhibitor of phospholipase C, U73122, did not inhibit the stimulation by 1 mM glutamate (Fig. 4).

Discussion

Of the mGluR agonists used in this study DCG IV is the most potent and selective for group II receptors. Thus tested against mGluR2 and mGluR3 expressed in chinese hamster ovary cells, DCG IV inhibited forskolin-stimulated cAMP synthesis with IC₅₀ values of 0.3 μ M and 0.2 μ M, respectively with no agonist activity for mGluR1 or mGluR4 [6]. Similar potencies were reported for the inhibition of presynaptic excitation in the neonatal rat spinal cord [7], of presynaptic inhibition in the olfactory bulb

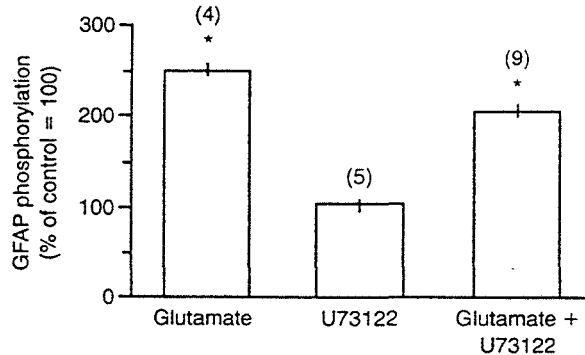


FIG. 4. Lack of effect of the phospholipase inhibitor U73122 on the stimulation by glutamate of GFAP phosphorylation in immature hippocampal slices. Slices were pre-incubated with U73122 before labelling with [³²P]phosphate. Concentrations were: glutamate, 1 mM; U73122, 50 μ M. The number of observations is shown in parentheses. *Significantly different from the 100% control ($p < 0.01$). The stimulations given by glutamate and glutamate + U73122 were not significantly different by one-way ANOVA and Duncan's test.

[6] and of forskolin-stimulated cAMP synthesis in brain slices [8]. Higher concentrations of DCG IV (> 10 μ M) activate NMDA receptors [6,7], but this is not relevant here since functional units of this class of receptor have not been demonstrated in hippocampal astrocytes. Although the lowest effective concentration for the stimulation of GFAP phosphorylation of 1 μ M (Fig. 3) is higher than the potencies quoted above, it is 10 times less than the lowest effective concentration of the non-selective 1S,3R-ACPD for the same phosphorylation reaction reported previously [2]. This fact, together with the high selectivity of DCG IV, strongly suggests the involvement of a group II receptor. This conclusion is supported by the significant stimulations given by L-CCG-I and the less selective group II agonist 1S,3S-ACPD, and the absence of any effect of (S)-3,5-DHPG and L-AP4, which are selective agonists for group I [9] and group III [3] receptors, respectively. L-CCG-I is a potent agonist for group II receptors with EC₅₀ values in the nanomolar range [7,10], but with a 50- to 100-fold weaker potency for group I [10]. 1S,3S-ACPD is less selective than the other two agonists for group II mGluRs, but is substantially more selective than 1S,3R-ACPD and acts preferentially on the presynaptic receptor activated by DCG IV and L-CCG-I [11] (see also [3]). We were surprised to find that all of these agonists were significantly more effective in stimulating GFAP phosphorylation than 1S,3R-ACPD (Fig. 2). However, the percentage stimulation by 1S,3R-ACPD in this series of experiments was some 30% less than previously reported [2], possibly because in that study total phosphorylation was not measured by densitometry.

The failure of the group II selective antagonist EGLU [12] to inhibit the DCG IV-induced stimula-

tion of GFAP phosphorylation was puzzling. However whereas this antagonist selectively reversed the 1S,3S-ACPD-induced inhibition of presynaptic excitation in the neonatal rat spinal cord, it displayed only weak or no antagonistic activity of postsynaptic group II metabotropic receptors [12]. Thus it appears that not all group II receptors are inhibited by EGLU and the astrocytic receptor involved in regulating GFAP phosphorylation is probably different from the presynaptic neuronal mGluR activated by group II-selective agonists. It is unclear from the literature whether this latter receptor is equivalent to mGluR2 or mGluR3 [12], nor could we find evidence for a differential action of EGLU on these two receptors expressed in heterologous cells. Therefore we cannot distinguish from the present data between mGluR2 and mGluR3. Of these two receptors the most likely is mGluR3 because this receptor has been located in glial cells by *in situ* hybridization of RNA [13–15] and by immunocytochemistry [16]. However, despite the evidence for the localization of mGluR3 in glia we cannot exclude the possibility that the phosphorylation response is mediated by another uncharacterized glial mGluR. Indeed, the existence of uncharacterized glial receptors is suggested by a study showing that the release of glutamate from cultured astrocytes is regulated by an unconventional profile of mGluR agonists including 1S,3R-ACPD but not DCG IV and 3,5-DHPG [17]. Moreover, as emphasized by Ozawa *et al.* [4], signal transduction mechanisms established in heterologous expression systems may differ from those of native receptors which may be coupled to different G and effector proteins. What is clear from our results is that the receptor coupled to GFAP phosphorylation has some of the pharmacological properties of a group II receptor and does not appear to act through the hydrolysis of phosphatidylinositol and the liberation of internal Ca^{2+} by IP₃.

The precise transduction mechanism by which metabotropic glutamate agonists increase GFAP phosphorylation remains uncertain, but our results are consistent with the hypothesis [18] that the activated receptor inhibits Ca^{2+} entry through mediation of a G protein and consequently down-regulates a Ca^{2+} -dependent event linked to the dephosphorylation of GFAP, rather than increasing the activity of a Ca^{2+} -dependent GFAP-kinase through the liberation of internal Ca^{2+} . We have obtained evidence for a role for Ca^{2+} in the dephosphorylation of GFAP by showing that inhibition of the Ca^{2+} -dependent phosphatase calcineurin by FK506 increases the phosphorylation of GFAP in hippocampal slices and in astrocyte cultures [19]. However, although inhibition of Ca^{2+} currents by

activation of mGluRs has been demonstrated in neurons [20], to our knowledge it has not been shown in astrocytes. Further studies of the mechanism of the response are in progress.

Finally these results provide further evidence for the compartmentalization of Ca^{2+} pools in astrocytes. Thus since astrocytes also express the group I receptor mGluR5 [21] and since hippocampal astrocytes *in situ* respond to glutamatergic agonists with increases in internal Ca^{2+} [22], it can reasonably be assumed that incubation of slices with the group I agonist 3,5-DHPG (as well as the non-selective agonists glutamate and 1S,3R-ACPD) resulted in an increase in free internal Ca^{2+} liberated from stores. Since the phosphorylation state of GFAP is regulated in part by Ca^{2+} -dependent kinase/phosphatase systems [19,23] the Ca^{2+} associated with GFAP must exist in a spatially distinct compartment from the pool of Ca^{2+} released from internal stores by the group I agonists. Evidence for spatially distinct sites of Ca^{2+} release and uptake in astrocytes [24] and for distinct Ca^{2+} pools associated with phospholipase C and β -adrenergic receptor-coupled adenylyl cyclase in these cells has been described [25].

Conclusion

Our results show that the stimulation by glutamate of the phosphorylation of GFAP in immature hippocampal slices is mediated by a metabotropic receptor with some of the pharmacological properties of a group II mGluR, either an mGluR3-like receptor since this subtype is widely expressed in glia or an uncharacterized glial receptor. The transduction signal of the effect is unknown, but it is unlikely to involve the release of internal Ca^{2+} since this signal is a property of group I mGluRs. As previously reported, the effect of glutamate on GFAP phosphorylation in the rat hippocampus is only observed in a narrow developmental window of 12–16 days postnatal. This is a period when astrocytes are undergoing profound morphological change with consequent reorganization of the cytoskeleton. Considering that phosphorylation of GFAP is an important factor in regulating its polymerization state, it is tempting to speculate that glutamate released from neurons is a trigger for the growth and proliferation of astrocytes.

References

1. Inagaki M, Matsuoka Y, Tsujimura K *et al.* *BioEssays* 18, 481–487 (1996).
2. Wolfchuk ST and Rodnight R. *Neurochem Int* 24, 517–523 (1994).
3. Conn PJ and Pin JP. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 37, 205–237 (1997).
4. Ozawa S, Kamya H and Tsuzuki K. *Prog Neurobiol* 54, 581–618 (1998).
5. Nakanishi S, Nakajima Y, Masu M *et al.* *Brain Res Rev* 26, 230–235 (1998).
6. Hayashi Y, Momiyama A, Takahashi T *et al.* *Nature* 366, 687–690 (1993).
7. Ishida M, Saitoh T, Shimamoto K *et al.* *Br J Pharmacol* 109, 1169–1177 (1993).

8. Genazzani AA, Casabona G, Lepiscopo MR *et al. Brain Res* 622, 132–138 (1993).
9. Ito I, Kohda A, Tanabe S *et al. NeuroReport* 3, 1013–1016 (1992).
10. Cartmeil J, Kemp JA, Alexander SPH *et al. Br J Pharmacol* 111, 364–369 (1994).
11. Jane DE, Jones PLSt J, Pook PC-K *et al. Br J Pharmacol* 112, 809–816 (1994).
12. Jane DE, Thomas NK, Tse HW *et al. Neuropharmacology* 35, 1029–1035 (1996).
13. Ohishi H, Shigemoto R, Nakanishi S *et al. J Comp Neurol* 335, 252–266 (1993).
14. Tanabe Y, Nomura A, Masu M *et al. J Neurosci* 13, 1372–1378 (1993).
15. Petralia RS, Wang YX, Niedzielski AS and Wenthold RJ. *Neuroscience* 71, 949–976 (1996).
16. Ohishi H, Ogawa-Meguro R, Shigemoto R *et al. Neuron* 13, 55–66 (1994).
17. Ye Z and Sontheimer H. *Glia* 25, 270–281 (1999).
18. Rodnight R, Gonçalves CA, Wofchuk ST and Leal R. *Braz J Med Biol Res* 30, 325–338 (1997).
19. Vinadé L, Gonçalves CA, Wofchuk S *et al. Dev Brain Res* 104, 11–17 (1997).
20. Stefani S, Pisani A, Mercuri NB and Calabresi P. *Mol Neurobiol* 13, 81–95 (1996).
21. Romano C, Sesma MA, McDonald CT *et al. J Comp Neurol* 355, 455–469 (1995).
22. Porter JT and McCarthy KD. *Glia* 13, 101–112 (1995).
23. Leal RB, Gonçalves CA and Rodnight R. *Dev Brain Res* 104, 1–10 (1997).
24. Laskey AD, Roth BJ, Simpson PB and Russell JT. *Cell Calcium* 23, 423–432 (1998).
25. Balazs R, Miller S, Chun Y and Cotman CW. *NeuroReport* 9, 1397–1401 (1998).

ACKNOWLEDGEMENTS: This work was supported by the Brazilian funding agencies CNPq, FINEP and PRONEX.

Received 12 April 1999;
accepted 5 May 1999

Artigo submetido ao Journal of Neurochemistry

Título: Glutamate and NMDA increase the phosphorylation of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in cerebellar cortical microslices from immature rats

Autores: Trícia Kommers, Richard Rodnight, Daniela Oppelt,

Diogo Oliveira e Susana Wofchuk

Glutamate and NMDA increase the phosphorylation of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in cerebellar cortical microsllices from immature rats

Trícia Kommers, Richard Rodnight, Daniela Oppelt, Diogo Oliveira and Susana

Wofchuk

(Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul,

Porto Alegre, Brazil

Address for correspondence:

Richard Rodnight

Departamento de Bioquímica

ICBS, UFRGS

Rua Ramiro Barcelos 2600-Anexo

90.035.003 Porto Alegre, RS

BRAZIL

Tel: +55-51-316-5570

Fax: +55-51-316-5535

E-mail: rodn@vortex.ufrgs.br

Running title: GFAP phosphorylation in cerebellar microsllices

Abbreviations used: IF, intermediate filament; GFAP, glial fibrillary acidic protein; TCA, trichloroacetic acid; AP5, DL-2-amino-5-phosphono-valeric acid; 1S,3R-ACPD, (1S,3R)-1-aminocyclopentane-1-3-dicarboxylic acid; L-AP4, L(+)-2-amino-4-phosphonobutyric acid; DCG IV, (2S,2'R,3R')-2-(2',3'-dicarboxycyclopropyl) glycine; AMPA, (RS)--amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid; CNQX, 6-cyano-7-nitroquinoxalene-2,3-dione.

Abstract

In previous work we showed that phosphorylation of glial fibrillary acidic protein (GFAP), an astrocyte marker, is increased by glutamate in hippocampal slices from immature rats via a type II metabotropic receptor. Here we found that glutamate also stimulated GFAP phosphorylation in immature cerebellar tissue, but apparently involving a different receptor mechanism from that observed in hippocampus. Using microslices of cerebellar cortex no effect of metabotropic or non-NMDA ionotropic agonists was found, but NMDA consistently stimulated GFAP phosphorylation to the same degree as glutamate. The effects of glutamate and NMDA were dependent on external Ca^{2+} , were reversed by the NMDA receptor antagonist AP_5 and were not blocked by tetrodotoxin. However, the receptor involved appeared to be different from neuronal NMDA receptors as the activity was observed in the presence of Mg^{2+} . The effect of NMDA was confined to a period starting with the first detectable expression of GFAP at 10 days and finishing at 16 days postnatal as previously observed with metabotropic agonists in hippocampal slices. This period in the rat corresponds to the start of synaptogenesis when astrocyte hypertrophy is occurring. The results are discussed in the light of information in the literature on the occurrence of NMDA receptor subunits in glia.

Keywords: cerebellum astrocytes, glial fibrillary acidic protein, protein phosphorylation, NMDA receptors, glutamate.

Intermediate filaments (IFs) are cytoskeletal components that form a structural network between the cell membrane and nuclear envelope and are considered essential for the maintenance of cell shape and mechanical integrity (Goldman *et al.* 1996; Hermann and Aebi, 2000; Coulombe *et al.* 2000). Several diseases are associated with point mutations of IF genes (Fuchs and Cleveland, 1998) and in experimental animals knock-out of these genes results in cellular abnormality and loss of discrete functions (McCall *et al.* 1996; Shibuki *et al.* 1996; Sjuve *et al.* 1998; Pekny *et al.* 1999).

IFs are dynamic structures which exhibit a high rate of turnover between polymerized and depolymerized states, a process regulated mainly by the phosphorylation by several kinases of sites in the N-terminus (Vikstrom *et al.* 1992; Inagaki *et al.* 1996; Goldman *et al.* 1999). In intact cells changes in the phosphorylation state of IFs, for example by hyperphosphorylation of vimentin induced by drugs or ectopic expression of constitutively active kinases (Ho *et al.* 1996; Ogawara *et al.* 1995), leads to a reorganization of the cytoskeleton.

Glial fibrillary acidic protein (GFAP) is the major subunit of IFs of astrocytes in mammals (Eng *et al.* 1985). Like other IFs, GFAP exhibits dynamic properties which have been elegantly demonstrated by *in vitro* fluorescent labelling studies: a small pool of soluble subunits exists in equilibrium with intact filaments and phosphorylation of these disassembled subunits inhibits assembly, the exchange being suppressed in proportion to the extent of phosphorylation (Eriksson *et al.* 1992; Nakamura *et al.* 1991, 1996; Inagaki *et al.* 1994). However, despite considerable knowledge of this nature of the mechanics of GFAP assembly little is known about the signals that regulate the polymerization/depolymerization cycle and consequently the structural integrity of astrocytic IFs. A candidate extracellular signal during development may be glutamate, since in previous work we showed that in immature hippocampal slices from the rat the phosphorylation state of GFAP is increased by glutamate acting through a type II metabotropic receptor (Wofchuk and Rodnight, 1994;

Kommers *et al.* 1999). The effect of glutamate was confined to a period starting with the first detectable expression of GFAP at 10 days and finishing at 16 days postnatal. This developmental period corresponds to the start of massive synaptogenesis in the rat brain (Aghajanian and Bloom, 1967). Since in the mature brain many synaptic terminals are ensheathed by processes of these cells (Ventura and Harris, 1999) synaptogenesis is accompanied by hypertrophy of astrocytes. Consequently we have suggested that glutamate released from developing synapses may signal an increase in the phosphorylation state of GFAP and IF reorganization (Rodnight *et al.*, 1997). Here we report that glutamate also increased the phosphorylation of GFAP in microslices of immature cerebellar cortex. Surprisingly, the mechanism of the glutamate effect in this brain region was different from the hippocampus and appeared to involve an unconventional NMDA receptor instead of a metabotropic receptor.

Materials and methods

Materials

[³²P]Na₂HPO₄ was purchased from CNEN, São Paulo, Brasil. Acrylamide (product 8887), materials for electrophoresis, DL-2-amino-5-phosphono-valeric acid (AP5) and kainic acid were purchased from Sigma. L-Glutamate, (1S,3R)-1-aminocyclopentane-1,3-dicarboxylic acid (1S,3R-ACPD), L-(+)-2-amino-4-phosphonobutyric acid (L-AP4), (2S,2'R,3R')-2-(2',3'-dicarboxycyclopropyl)glycine (DCG IV), (RS)-α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) came from Tocris Cookson, USA. NMDA and 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX) were purchased from RBI, USA. Tetrodotoxin (Calbiochem) was a gift from Dr. A. Cornell-Bell (USA). CNQX was dissolved in dimethylsulphoxide and diluted to the appropriate concentration with medium. In this case, an equivalent concentration was included in the control tubes. For immunodetection, polyclonal anti-GFAP and monoclonal anti-

vimentin (v-5255) were obtained from Sigma; secondary antibody (peroxidase-linked antimouse IG) and ECL reagents for luminol reaction were purchased from Amersham International.

Animals

Wistar rats of either sex in the postnatal 13-16 day age range were obtained from the local breeding colony. They were maintained in a ventilated room at constant temperature (22°C) with free access to food and water on a 12 h light/dark cycle. All procedures conformed to the regulations of the local Animal House authorities.

Preparation and [³²P]-labelling of slices

Rats were killed by decapitation and the brain was removed and dissected on a Petri dish placed on ice. Transverse macroslices (0.4 mm) of the cerebellum were cut with a McIlwain tissue chopper and transferred to ice-cold medium in a black porcelain dish. Microslices (1.0 mm diameter) were then prepared from the cortex with a needle punch and labelled with ³²P as previously described (Wofchuk and Rodnight, 1994). Briefly, 2 microslices were first preincubated at 30°C for 30 min in 100 µl of a basic medium gassed with O₂ and containing (mM) NaCl, 124; KCl, 4; MgSO₄, 1.2; Na-HEPES, 25 (pH,7.4); glucose, 12; CaCl₂, 1. After preincubation the medium was removed and replaced with 50 µl of incubation medium containing 40 µCi of [³²P]phosphate with or without additions of agonists or antagonists. Agonists were diluted to the appropriate concentrations with medium and added to the incubation medium. Antagonists of glutamate receptors or tetrodotoxin were added to the medium during preincubation and incubation. Media lacking Ca⁺² contained 1 mM EGTA. Incubation was stopped after 1 h at 30°C with 1 ml of 10% trichloroacetic acid (TCA). The tissue was washed with 4% TCA to remove the excess radioactivity, briefly with water to remove acid and immediately dissolved in 2-D electrophoresis sample buffer (Wofchuk and Rodnight, 1994). The activity of

tetrodotoxin was confirmed by showing that it inhibited the release of glutamate from mouse synaptosomes induced by veratridine (data not shown).

Two-dimensional electrophoresis

Non-equilibrium pH gradient electrophoresis (NEPHGE) was used in the first dimension and 8% polyacrylamide slab gel electrophoresis (SDS-PAGE) in the second dimension. Slab gels were prepared in batches of 8 in a casting box. Sections of three first dimension rod gels containing GFAP were mounted on one second dimension slab gel with the control sample in the centre.

Quantification of GFAP phosphorylation

Dried gels were exposed to X-ray films (Kodak X-Omat) at -70°C with intensifying screens. Quantification of GFAP phosphorylation was made by scanning of the autoradiographs in a scanner (Hewlett-Packard Scanjet 6100C) and determining optical densities with Optiquant software (version 02.00, Packard Instrument Company). Density values were obtained for total phosphorylation and for the spot corresponding to GFAP. Values for GFAP were first expressed as a percentage of the total phosphorylation. The corrected control values were then normalized to 100% and the percentage changes in the test samples calculated. Data were analysed statistically by a paired Student's t-test or by ANOVA.

Immunodetection of GFAP and vimentin

In previous work phosphoGFAP was identified on 2-D gels prepared from labelled hippocampal slices by immunoblotting with a polyclonal antibody (Gonçalves and Rodnigt, 1992). Here we used the same procedure to localize phosphoGFAP in 2-D gels from cerebellar microslices and also to identify vimentin. Proteins were transferred to nitrocellulose membranes in a semi-dry transfer unit (Bio-Rad). After blocking overnight in 5% defatted milk, membranes were washed with a solution containing 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 500 mM NaCl and 0.05% Tween 20 (T-TBS). Subsequently all antibodies were diluted in TBS

(T-TBS without Tween) with 5% (w/v) of defatted milk (M-TBS). Membranes were incubated for 1 h on a rotary shaker with anti-GFAP (1:400) or anti-vimentin (1:400), followed by secondary antibody (peroxidase-linked anti-mouse Ig, 1:1000) for 1 h. Conjugates were developed by the luminol method using an ECL kit from Amersham International and X-Omat x-ray film.

Results

Western blotting with a polyclonal antibody showed the presence of GFAP in the microslices which migrated to exactly the same position as a phosphorylated spot on an autoradiograph of the nitrocellulose membrane (Fig. 1A). A weak response to polyclonal anti-vimentin was also observed, but at an intensity too low to be able draw conclusions about its phosphorylation state either under basal or stimulated conditions (Fig. 1A).

Incubation of microslices prepared from immature cerebellar cortex with glutamate resulted in a 2-fold increase in ^{32}P -incorporation into GFAP in a reaction dependent on external Ca^{2+} (Fig. 1B and Table 1). This effect of glutamate was not due to a metabotropic glutamate receptor (mGluR), since relatively high concentrations of metabotropic agonists selective for groups I and II mGluRs (1S,3R-ACPD), group II mGluRs (DCGIV) and group III mGluRs (L-AP4) had no effect. The stimulation given by glutamate was confined to a period starting with the first detectable expression of GFAP at 10 days and finishing at 16 days postnatal since no effect was observed in slices from 20 day old rats (Table 1). This result contrasts with our previous work with immature hippocampal slices in which we found that glutamate increased GFAP phosphorylation exclusively via a group II metabotropic receptor with the properties of mGluR3 (Kommers *et al.* 1999; data included in Table 1). No effect of ionotropic glutamate agonists, including NMDA, was observed in hippocampal slices (Wofchuk and Rodnight, 1994). Furthermore, in hippocampal slices incubated in Ca^{2+} -free medium, basal phosphorylation of

GFAP was increased to the same extent as occurred with glutamate + Ca^{2+} and the two effects were not additive (Wofchuk and Rodnight, 1995). By contrast, in cerebellar slices Ca^{2+} -lack did not increase basal phosphorylation (Table 1).

The absence of any effect of metabotropic agonists in the cerebellar slices suggested a different signal transduction mechanism for the glutamate effect in the cerebellar tissue compared with hippocampus, possibly involving ionotropic glutamatergic agonists. However, the ionotropic non-NMDA agonists, AMPA and kainate at 100 μM also had no effect on GFAP phosphorylation and stimulation by glutamate was not inhibited by the ionotropic receptor antagonist CNQX (Fig. 2). By contrast 100 μM NMDA in the presence of Ca^{2+} stimulated GFAP phosphorylation to the same extent as glutamate and the effect of both NMDA and glutamate was completely inhibited by the NMDA antagonist AP5 (Fig. 2). In the absence of Ca^{2+} no stimulation by NMDA was observed (Fig. 2). Moreover the stimulation given by NMDA was not blocked by preincubation with 2 μM tetrodotoxin, pointing to a direct, rather than an indirect effect secondary to the release of another transmitter from neurons (Fig. 2). Tetrodotoxin blocks Na^+ -channels and is thus a very efficient inhibitor of neurotransmitter release. The NMDA concentration used (100 μM) was similar to the EC_{50} for the induction of Ca^{2+} currents in cultured neurons (Furukawa and Mattson, 1998).

Discussion

Molecular cloning and electrophysiological studies have demonstrated at least 5 N-methyl-D-aspartic acid receptor subunits (NMDARs), designated NR1 and NR2A-D (Ozawa *et al.* 1998). Functional NMDARs consist of heteromeric complexes containing NR1 and one or more NR2 subunits resulting in variation in physiological and pharmacological properties (Monyer *et al.* 1992; Petralia *et al.* 1994). Neuronal NMDARs incorporate a cation-specific ion channel and are therefore classified as ionotropic together with AMPA and kainate receptors

(Nakanishi *et al.* 1998). However, in contrast to the latter receptors, the physiological responses to NMDA have a slow time course and in this respect resemble metabotropic glutamate receptors. These receptors were formerly considered to be expressed only in neurons, but recently several reports have appeared describing responses to NMDA or the occurrence of NMDAR subunits in glial cells, especially, but not exclusively, in the Bergmann glia of the cerebellum. Thus Muller *et al.* (1993) reported NMDA-activated currents which were blocked by ketamine, in Bergmann glia identified in slices of mouse cerebellum. *In situ* hybridization detected mRNA encoding NR2B, but not A,C or D, in Bergmann glia from rat brain (Luque and Richards, 1995) and Lopez *et al.* (1997), using immunocytochemistry and RT-PCR, reported the presence of NMDAR subunits in cultured Bergmann glia from the chick. Interestingly the receptor described by Muller *et al.* in Bergmann glia exhibited different characteristics from NMDARs in neurons in that the activity was not blocked by Mg^{2+} or enhanced by glycine, nor did NMDA increase cytosolic Ca^{2+} in these cells. Similar NMDA-activated currents were also observed in a small group of "passive" glia in hippocampal slices (Steinhauser *et al.* 1994) and the presence of immunoreactive NR1 and NR2A,B subunits in the distal process of some cerebral cortical astrocytes has been reported (Conti *et al.* 1996; 1999). Some reactive glia in the hippocampus have been reported to express NR2A/B subunits (Gottlieb and Matute, 1997) and in retinal glial cells (Muller cells) NMDA-induced currents were detected and antibody studies suggested the presence of NR1 (Puro *et al.* 1996). Although these studies are strongly suggestive that some glial cells express NMDARs, their functional characteristics are unclear.

In another study NMDA increased cytosolic Ca^{2+} in Bergmann glia in slices of immature rat cerebellum (Shao and McCarthy, 1997). This response had the characteristics of a neuronal NMDA receptor and was considered to be secondary to the release of another transmitter from neurons since it was

frequently blocked by tetrodotoxin. It is unlikely that the NMDA-mediated stimulation of GFAP phosphorylation observed here was due to this receptor for several reasons. First, the response was consistently not blocked or decreased by 2 μM tetrodotoxin which was present throughout the pre-incubation and incubation periods (Fig. 2). Secondly, the response occurred in the presence of 1.2 mM Mg^{2+} in the phosphorylation medium, whereas neuronal NMDA responses are blocked by this concentration of Mg^{2+} . Interestingly Mg^{2+} block was not observed in the receptor described by Muller *et al.* (1993) in mouse cerebellum. Thirdly, in an ongoing parallel study we have found that glutamate and NMDA also significantly ($P < 0.001$, $n = 14$ and 11 respectively) stimulate GFAP phosphorylation in a tetrodotoxin-insensitive reaction in mixed cultures of cerebellar glia and granule neurons (T.Kommers *et al.*, unpublished). Interestingly, this GFAP response to glutamate or NMDA was absent in pure primary cultures of cerebellar glia, a finding which parallels the absence of an effect of glutamate on GFAP phosphorylation in primary cultures of hippocampal astrocytes (R.Rodnight, unpublished). The nature of the neuronal influence in the mixed cerebellar cultures is under investigation.

While we believe that our evidence favours a direct effect on glia other possibilities have to be considered. For example an unconventional presynaptic NMDAR might release a transmitter (other than glutamate) or a growth factor capable of stimulating GFAP phosphorylation. Such a release mechanism would have to be insensitive to tetrodotoxin. We considered the possibility that a biogenic amine might be an indirect agent since in slices from several species and in synaptosomes NMDA has been reported to increase the release of noradrenaline and serotonin through presynaptic NMDARs apparently situated in part on noradrenergic and serotonergic varicosities (Gothert and Fink, 1991; Fink *et al.* 1992; Fink *et al.* 1995). Although these receptors were only inconsistently inhibited by tetrodotoxin they appear to correspond to conventional neuronal NMDARs since they were inhibited by 1.2 mM Mg^{2+} .

Moreover noradrenergic and serotonergic terminals were absent in the mixed cultures of cerebellar glia and granule neurons already referred to, since the perikarya of biogenic amine neurons are situated outside the cerebellum.

Although the Bergmann glia of the cerebellum have figured prominently in reports of the presence of NMDAR subunits and responses in glia, the cellular location of the GFAP response to NMDA in the cerebellar microslices is not known since, as mentioned above, NMDAR subunits and responses have been detected in cortical and hippocampal astrocytes (Conti *et al.* 1996,1999; Steinhauser *et al.* 1994) and both types of glia express GFAP. It is worth noting however that extensive proliferation of Bergmann glial cells, involving reorganization of the cytoskeleton and IF phosphorylation, occurs during the first two postnatal weeks (Hanke and Reichenbach, 1987). Presumably the small amount of vimentin detected in the slices reflected the presence of these radial glia, since in contrast to astrocytes, Bergmann glia continue to express this IF after 2 weeks postnatal (Lazarides, 1982; Sancho-Tello *et al.* 1995).

Our results now show that in the cerebellum as well as in the hippocampus the stimulation of GFAP phosphorylation by glutamate is confined to a period starting with the first detectable expression of GFAP at 10 days and finishing at 16 days postnatal when synaptogenesis is commencing. This reinforces the idea that the regulation of GFAP phosphorylation by glutamate plays a role in CNS ontogeny. However, it is not known whether the glutamate-induced increase in GFAP phosphorylation state in these short *in vitro* experiments results in significant depolymerization and reorganization of the cytoskeleton as discussed in the Introduction; possibly a more prolonged stimulation as occurs during development would be necessary to achieve this end. Interestingly, the results with hippocampal and cerebellar slices are in contrast with the situation in slices of spinal cord prepared from rats of the same age, where glutamate did not stimulate GFAP phosphorylation (Kommers *et al.* 1998). Considering that glutamate also has no effect on GFAP phosphorylation in the adult

hippocampus (Wofchuk and Rodnight, 1994) or 20 day old cerebellum, the spinal cord result may reflect a faster rate of maturation of that structure.

A full understanding of the mechanism involved in the stimulation of GFAP phosphorylation by glutamate agonists in both immature hippocampus and cerebellum will require knowledge of the phosphorylation sites in GFAP and their specificity for different kinases and phosphatases. These have yet to be positively identified in the rat, but are known in the head domain of porcine GFAP and include sites phosphorylated by Ca^{2+} -dependent protein kinases (Tsujiura *et al.* 1994). Since the amino acid sequence in the head domain of the rat protein is very similar to porcine GFAP, it is possible that the same Ca^{2+} -dependent kinases phosphorylate analogous sites in rat GFAP (see Leal *et al.* 1997). Identification of these sites by tryptic phosphopeptide mapping, ectopic expression of constitutively active kinases and the use of phosphorylation-specific antibodies will be of fundamental importance in solving this problem in the future. These approaches have been elegantly pioneered by Japanese workers; for example in a study of vimentin phosphorylation in primary cultures of rat astrocytes, Ogawara *et al.* (1995) demonstrated differential targeting of protein kinase C and CaM kinase II signals to specific sites in the protein. It would be impractical to pursue such studies in slices, but they could be undertaken in mixed cultures of cerebellar glia and granule neurons where, as mentioned above, glutamate and NMDA stimulate GFAP phosphorylation. For the present we note that the Ca^{2+} -dependence of the phosphorylation at first sight suggests that NMDA allowed Ca^{2+} -entry with subsequent activation of the Ca^{2+} -dependent protein kinases. Indeed, activation of NMDARs in cultured hippocampal neurons results in the phosphorylation by CaM kinase II of a specific site in the head domain of vimentin ectopically expressed in these cells (Inagaki *et al.* 2000). However, there is no evidence at present as to whether the Ca^{2+} -dependence of the NMDA response involved entry of the cation. NMDA was shown not to increase

cytosolic Ca^{2+} in identified Bergmann glia in mouse cerebellar slices (Kirschuk *et al.* 1999) and as mentioned above the NMDA currents observed in a similar cerebellar preparation were not associated with Ca^{2+} -entry (Muller *et al.* 1993). Therefore, the possibility that NMDARs down regulate a dephosphorylation event linked to GFAP that is independent of Ca^{2+} -entry must also be considered.

Finally it is important to stress that whatever the nature of the effect of glutamate on GFAP phosphorylation in the cerebellum it is clearly distinct from that occurring in the hippocampus, where a type 2 metabotropic receptor is involved and the role of Ca^{2+} is different. In the latter structure present evidence suggests that incubation of slices with glutamate leads to the down regulation of a Ca^{2+} -dependent dephosphorylation event involving calcineurin apparently through inhibition of Ca^{2+} -entry (Rodnight *et al.* 1997). Thus blocking Ca^{2+} -entry with inorganic channel blockers or inhibition of calcineurin with FK506 both increased GFAP phosphorylation (Wofchuk and Rodnight, 1995; Vinade *et al.* 1997). The mechanism of the inhibition of Ca^{2+} -entry by glutamate in hippocampal slices is unknown, but may involve L-type Ca^{2+} -channels (Wofchuk and Rodnight, 1995).

Acknowledgements

We are grateful to Mirna B. Leal for measuring the inhibitory activity of tetrodotoxin on glutamate release from synaptosomes. The work was supported by the Brazilian funding agencies CNPq (PRONEX) and Propesq.

References

Aghajanian, G.K. and Bloom, F.E. (1967) The formation of synaptic junctions in developing rat brain: a quantitative electron microscopic study. *Brain Res.* **6**, 716-727.

Conti, F., DeBiasi, S., Minelli, A., and Melone, M. (1996) Expression of NR1 and NR2A/B subunits of the NMDA receptor in cortical astrocytes. *Glia*, **17**, 254-258.

Conti, F., Barbaresi, P., Melone, M. and Ducati, A. (1999) Neuronal and glial localization of NR1 and NR2A/B subunits of the NMDA receptor in human cerebral cortex. *Cereb.Cortex*, **9**,110-120.

Coulombe, P.A., Bousquet, O., Ma, L., Yamada, S. and Wirtz, D. (2000) The 'ins' and 'outs' of intermediate filament organization. *Trends in Cell Biol.* **10**, 420-428.

Eng, L.F. (1985). Glial fibrillary acidic protein (GFAP): the major protein of glial intermediate filaments in differentiated astrocytes. *J. Neuroimmun.* **8**, 203-214.

Eriksson, J.E., Opal, P. and Goldman, R.D. (1992) Intermediate filament dynamics. *Current Opinion Cell Biol.* **4**, 99-104.

Fink, K., Schultheiss, R. and Gothert, M. (1992) Stimulation of noradrenaline release in human cerebral cortex mediated by N-methyl-D-aspartate (NMDA) and non-NMDA receptors. *Brit. J. Pharmacol.* **106**, 67-72.

Fink, K., Schmitz, V., Boing, C. and Gothert, M. (1995) Stimulation of serotonin release in the rat brain cortex by activation of ionotropic glutamate receptors and its modulation via alpha 2-heteroreceptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **352**, 394-401.

Fuchs, E. and Cleveland, D.W. (1998) A structural scaffolding of intermediate filaments in health and disease. *Science* **279**, 514-519.

Furukawa, K. and Mattson, M.P. (1998) The transcription factor NF- κ B mediates increases in calcium current and decreases in NMDA- and AMPA/kainate-induced current induced by necrosis factor- α in hippocampal neurons. *J. Neurochem.* **70**, 1876-1886.

Goldman, R.D., Khuon, S., Chou, Y.H., Opal, P. and Steinert, P.M. (1996) The function of intermediate filaments in cell shape and cytoskeletal integrity. *J. Cell Biol.* **134**, 971-983.

Goldman, R.D., Chou, Y.H., Prahlad, V. and Yoon, M. (1999) Intermediate filaments: dynamic processes regulating their assembly, motility, and interactions with other cytoskeletal systems. *FASEB J.* **13**, (Suppl. 2) S261-S265.

Gonçalves, C.A. and Rodnight, R. (1992) Apparent identity of ppH-47, a protein highly phosphorylated in the hippocampus with a form of glial fibrillary acidic protein. *Neuroscience Res. Commun.* **11**, 109-117.

Gothert, M. and Fink, K. (1991) Stimulation of noradrenaline release in the cerebral cortex via presynaptic N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors and their pharmacological characterization. *J. Neural Transm. Suppl.* **34**, 121-127.

Gottlieb, M. and Matute, C. (1997) Expression of ionotropic glutamate receptor subunits of the hippocampal CA1 area following transient forebrain ischemia. *J. Cerebral Blood Flow and Metabolism* **17**, 290-300.

Hanke, S and Reichenbach, A. (1987) Quantitative-morphometric aspects of Bergmann glial (Golgi epithelial) cell development in rats. *Anat. Embryol.* **177**, 183-188.

Herrmann, H. and Aebi, U. (2000) Intermediate filaments and their associates: multi-talented structural elements specifying cytoarchitecture and cytodynamics. *Current Opinion Cell Biol.* **12**, 79-80.

Ho, D.T. and Roberge, M. (1996) The antitumor drug fostriecin induces vimentin hyperphosphorylation and intermediate filament reorganization. *Carcinogenesis* **17**, 967-972.

Inagaki, M., Matsuoka, Y., Tsujimura, K., Ando, S., Tokui, T., Takahashi, T. and Inagaki, N. (1996) Dynamic property of intermediate filaments: Regulation by phosphorylation. *BioEssays*, **18**, 481-487.

Inagaki, M., Nakamura, Y., Takeda, M., Nishimura, T. and Inagaki, N. (1994) Glial fibrillary acidic protein: Dynamic property and regulation by phosphorylation. *Brain Pathol.* **4**, 239-243.

Inagaki, N., Nishizawa, M., Arimura, N., Yamamoto, H., Takeuchi, Y., Miyamoto, E., Kaibuchi, K. and Inagaki, M. (2000) Activation of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II within post-synaptic dendritic spines of cultured hippocampal neurons. *J. Biol. Chem.* **275**, 27165-27171.

Kirschuk, S., Kirchoff, F., Matyash, V., Kettenmann, H. and Verkhratsky, A. (1999) Glutamate-triggered calcium signalling in mouse Bergmann glial cells in situ: Role of inositol-1,4,5-trisphosphate-mediated intracellular calcium release. *Neuroscience* **92**, 1051-1059.

Kommers, T. Rodnight, R., Oppelt, D., Oliveira, D. and Wofchuk, S. (1999) The mGluR stimulating GFAP phosphorylation in immature hippocampal slices has some properties of a group II receptor. *NeuroReport* **10**, 2119-2123.

Kommers, T., Vinadé, L., Pereira, C., Gonçalves, C.A., Wofchuk, S. and Rodnight, R. (1998) Regulation of the phosphorylation of glial fibrillary acidic protein (GFAP) by glutamate and calcium ions in slices of immature rat spinal cord: comparison with immature hippocampus. *Neurosci. Letters* **248**, 141-143.

Lazarides, E. (1982) Intermediate filaments: a chemically heterogeneous, developmentally regulated class of proteins. *Annu Rev Biochem.* **51**, 219-50

López, T., López-Colomé, A.M. and Ortega, A. (1997) NMDA receptors in cultured radial glia. *FEBS Letters* **405**, 245-248.

Luque, J.M. and Richards, J.G. (1995) Expression of NMDA 2B receptor subunit mRNA in Bergmann glia. *Glia* **13**, 228-232.

McCall, M.A., Gregg, R.G., Behringer, R.R., Brenner, M., Delaney, C.L., Galbreath, E.J., Zhang, C.L., Pearce, R.A., Chiu, S.Y. and Messing, A. (1996) Targeted deletion in astrocyte intermediate filament (Gfap) alters neuronal physiology. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 6361-6366.

Monyer, H., Sprengel, R., Schoepfer, R., Herb, A., Higuchi, M., Lomeli, H., Burnashev, N., Sakmann, B. and Seeburg, P.H. (1992) Heteromeric NMDA receptors: molecular and functional distinction of subtypes. *Science* **256**, 1217-1221.

Müller, T., Grosche, J., Ohlemeyer, C. and Kettenmann, H. (1993) NMDA activated currents in Bergmann glial cells. *NeuroReport* **4**, 671-674.

Nakamura, Y., Takeda, M., Angelides, K.J., Tada, K., Hariguchi, S. and Nishimura, T. (1991) Assembly, disassembly, and exchange of glial fibrillary acidic protein. *Glia* **4**, 101-110.

Nakamura, Y., Takeda, M. and Nishimura, T. (1996) Dynamics of bovine glial fibrillary acidic protein phosphorylation. *Neurosci.Lett.* **205**, 91-94.

Nakanishi, S., Nakajima, Y., Masu, M., Ueda, Y., Nakahara, K., Watanabe, D., Yamaguchi, S., Kawabata, S. and Okada, M. (1998) Glutamate receptors: brain function and signal transduction. *Brain Res. Rev.* **26**, 230-235.

Ogawara, M., Inagaki, N., Tsujimura, K., Takai, Y., Sekimata, M., Ha, H.A., Imajoh-Ohmi, S., Hirai, S., Ohno, S., Sugiura, M., Yamauchi, T. and Inagaki, M. (1995) Differential targeting of protein kinase C and CaM kinase II signalings to vimentin. *J. Cell Biol.* **131**, 1055-1066.

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

Pekny, M., Johansson, C.B., Eliasson, C., Stakeberg, J., Wallen, A., Perlmann, T., Lendahl, U., Betsholtz, C., Berthold, C.H. and Frisen, J. (1999) Abnormal reaction to central nervous system injury in mice lacking glial fibrillary acidic protein and vimentin. *J. Cell Biol.* **145**, 503-514.

Petralia, R.S., Wang, Y.-X. and Wenthold, R. J. (1994) The NMDA receptor subunits NR2A and NR2B show histological and ultrastructural localization patterns similar to those of NR1. *J. Neurosci.* **14**, 6102-6120.

Puro, D.G., Yuan, J.P. and Sucher, N.J. (1996) Activation of NMDA receptor-channels in human retinal Muller glial cells inhibits inward-rectifying potassium currents. *Vis. Neurosci.* **13**, 319-326.

Rodnight, R., Gonçalves, C.A., Wofchuk, S.T. and Leal, R. (1997) Control of the phosphorylation of the astrocyte marker glial fibrillary acidic protein (GFAP) in the immature rat hippocampus by glutamate and calcium ions: possible key factor in astrocytic plasticity. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **30**, 325-338.

Sancho-Tello, M., Vallés, S., Montoliu, C., Renau-Piqueras, J. and Guerri, C. (1995) Developmental pattern of GFAP and vimentin gene expression in rat brain and in radial glia cultures. *Glia*, **15**, 157-166.

Shibuki, K., Gomi, H., Chen, L., Bao, S., Kim, J.J., Wakatsuki, H., Fujisaki, T., Fujimoto, K., Katoh, A., Ikeda, T., Chen, C., Thompson, R.F. and Itoharu, S. (1996) Deficient cerebellar long-term depression, impaired eye-blink conditioning, and normal motor coordination in GFAP mutant mice. *Neuron*, **16**, 587-599.

Shao, Y. and McCarthy, K. D. (1997) Responses of Bergmann glia and granule neurons in situ to N-Methyl-D-Aspartate, norepinephrine, and high potassium. *J. Neurochem.* **68**, 2405-2411.

Sjuve, R., Arner, A., Li, Z., Mies, B., Paulin, D., Schmittner, M and Small, J.V. (1998) Mechanical alternations in smooth muscle from mice lacking desmin. *J. Muscle Res. Cell Motil.* **19**, 415-429.

Steinhauser, C., Jabs, R. and Kettenmann, H. (1994) Properties of GABA and glutamate responses in identified glial cells of the mouse hippocampal slice. *Hippocampus*, **4**, 19-35.

Tsujimura, K., Tanaka, J., Ando, S., Matsuoka, Y., Kusubata, M., Sugiura, H., Yamauchi, T. and Inagaki, M. (1994) Identification of phosphorylation sites on glial fibrillary acidic protein for cdc2 kinase and Ca²⁺-calmodulin-dependent protein kinase II. *J. Biochem.(Tokyo)*, **116**, 426-434.

Ventura, R. and Harris, K.M. (1999) Three-dimensional relationships between hippocampal synapses and astrocytes. *J. Neurosci.* **19**, 6897-6906.

Vikstrom, K.L. Lim, S-S., Goldman, R.D. and Borisy, G.G. (1992) Steady state dynamics of intermediate filament networks. *J. Cell Biol.* **118**, 121-129.

Vinadé, L., Gonçalves, C.A. Wofchuk, S., Gottfried, C. and Rodnight, R. (1997) Evidence for a role for calcium ions in the dephosphorylation of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in immature hippocampal slices and in astrocyte cultures from the rat. *Develop. Brain Res.* **104**, 11-17

Wofchuk, S. and Rodnight, R. (1994) Glutamate stimulates the phosphorylation of glial fibrillary acidic protein in slices of immature hippocampus via a metabotropic receptor. *Neurochem. Int.* **24**, 517-523.

Wofchuk, S. and Rodnight, R. (1995) Age-dependent changes in the regulation by external calcium ions of the phosphorylation of glial fibrillary acidic protein in slices of rat hippocampus. *Dev. Brain Res.* **85**, 181-186.

Legends to Figures

Fig.1. **(A)** Western blot showing the localization of GFAP and vimentin on 2-D gels prepared from cerebellar microslices and **(B)** autoradiographs illustrating the effect of metabotropic and ionotropic glutamatergic agonists on GFAP phosphorylation. Microslices of cerebellum from P12-16 rats were incubated and analysed as described in Materials and Methods. In **(A)** G = GFAP and V = vimentin. In **B** arrowheads point to GFAP.

Fig. 2. The effect of ionotropic glutamatergic agonists and antagonists on GFAP phosphorylation in cerebellar microslices. Concentrations were as follows (μM): glutamate, 1000; AMPA, 100; kainate, 100; NMDA, 100; CNQX, 500; AP5, 100; tetrodotoxin (TTX), 2. Significance compared to basal control: **, $P < 0.001$; *, $P < 0.008$. There was no significant difference between the values for glutamate, NMDA and NMDA + TTX by ANOVA.

Fig.1

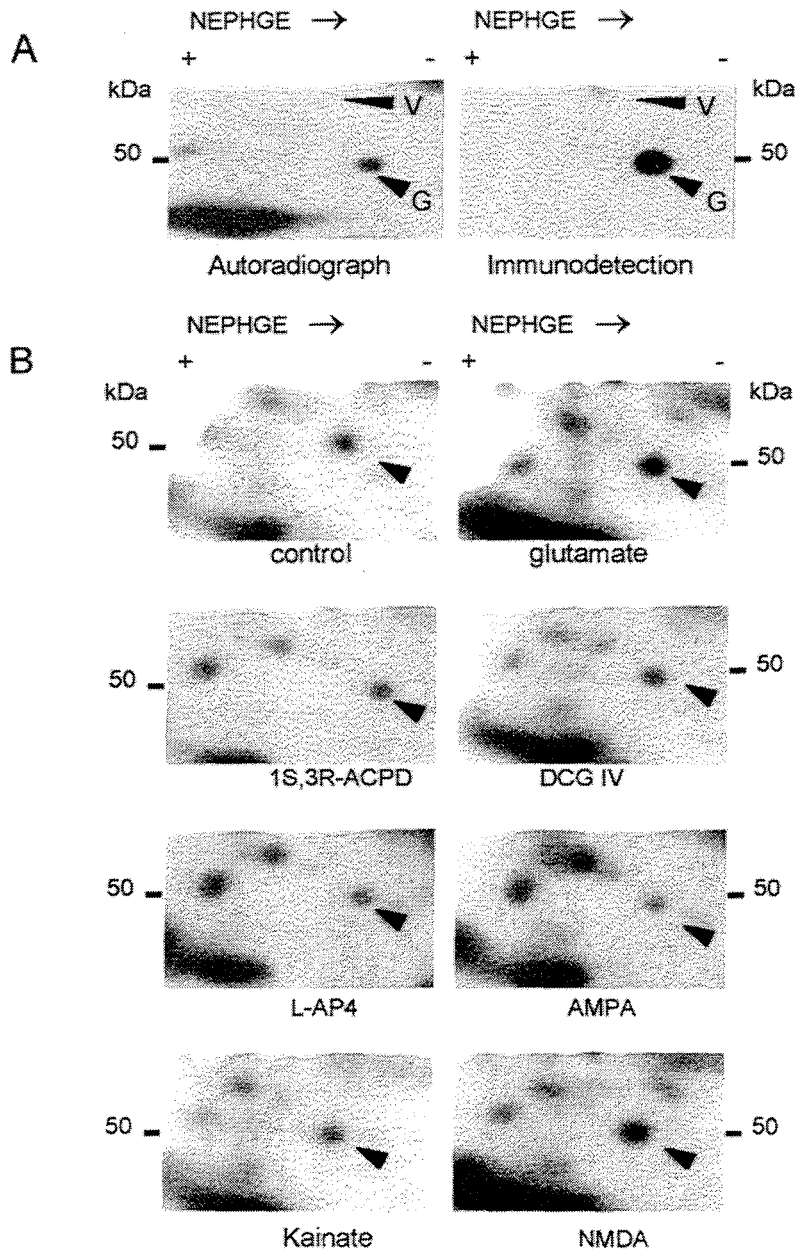


Fig.2

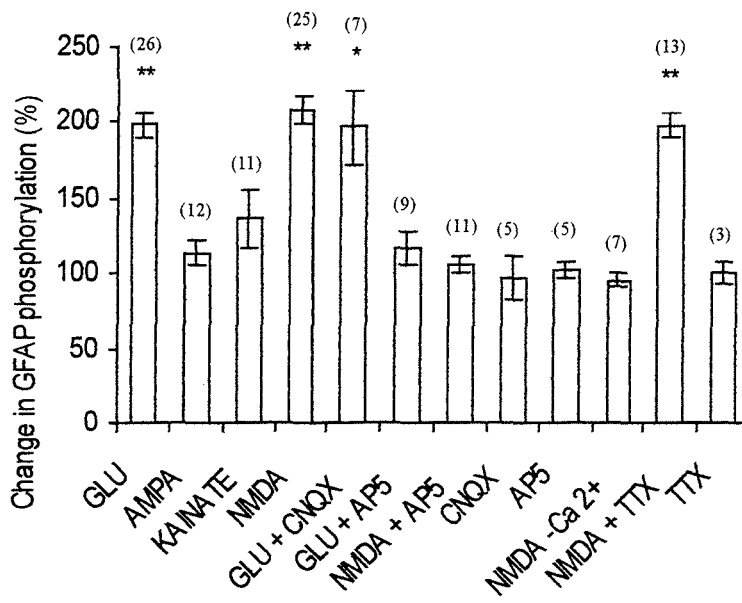


TABLE 1. Effect of glutamate and metabotropic agonists on GFAP phosphorylation in slices from cerebellum and hippocampus in different days post-natal

Structure	Agonists	Ca ²⁺ (1 mM)	days post-natal		
			10	13 - 16	20
Cerebellum	None	-	87.3 ± 11 (4)	102 ± 0.2 (14)	111.5 ± 12.2 (3)
	Glutamate (1 mM)	+	195.5 ± 9.6 * (7)	198 ± 8.4 * (26)	104.6 ± 7.8 (7)
	Glutamate (1 mM)	-	—	108 ± 6 (7)	—
	1S,3R-ACPD (100 μM)	+	—	112 ± 9.4 (10)	—
	DCG IV (20 μM)	+	—	113 ± 5.5 (4)	—
	L-AP ₄ (500 μM)	+	—	103.1 ± 3.5 (6)	—
Hippocampus	None	-	—	212 ± 16.4 * (16) [#]	—
	Glutamate (1 mM)	+	222 ± 17.1* (7)	206 ± 13.5 * (15) [#]	111.6 ± 9 (7)
	DCG IV (20 μM)	+	—	310 ± 16.3 * (8) [#]	—

Density values quoted are means ± standard error of percentages of control densities for basal phosphorylation in the presence of 1 mM Ca²⁺ (= 100%), corrected for total phosphorylation (see Materials and Methods). * p < 0.001 (compared to control = 100%); [#] data obtained from Kommers et al. (1999); — not tested. Number of observations is given in parentheses.

Artigo a ser submetido ao Brain Research

Título: *GFAP phosphorylation is stimulated by glutamate via NMDA receptors on cerebellar mixed neuron/glial cells culture*

Autores: Trícia Kommers, Carina Boeck, Joel Horn, Daniela Oppelt,
Richard Rodnight e Susana Wofchuk

GFAP phosphorylation is stimulated by glutamate via NMDA receptors on cerebellar mixed neuron/glia cells culture

Trícia Kommers, Carina Boeck, Joel Horn, Daniela Oppelt, Richard Rodnigh and Susana Wofchuk

(Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil)

Number of Pages: 19, Number of Figures: 2, Number of tables: 1

Address for correspondence:

Susana Wofchuk

Departamento de Bioquímica

ICBS, UFRGS

Rua Ramiro Barcelos 2600-Anexo

90.035.003 Porto Alegre, RS

BRAZIL

Tel: +55-51-316-5570

Fax: +55-51-316-5535

E-mail: swofchuk@vortex.ufrgs.br

Running title: GFAP phosphorylation in cerebellar mixed cell cultures

Acknowledgements: We are grateful to Mirna B. Leal for measuring the inhibitory activity of TTX on glutamate release from synaptosomes. The work was supported by the Brazilian funding agencies CNPq (PRONEX) and Propesq.

Abstract

Glutamate receptors mediate most of the excitatory neurotransmission in the mammalian Central Nervous System and the actions of glutamate occur through interaction with fast activating ionotropic receptors (iGluRs) and G protein-coupled metabotropic receptors (mGluRs). In a previous work we demonstrated that glutamate and NMDA stimulate GFAP phosphorylation in slices from cerebellum of immature rats. In this work we studied the glutamatergic modulation of GFAP phosphorylation in cerebellar primary glial cell cultures and mixed neuron/glial cell cultures. Our results show that glutamate was not able to increase GFAP phosphorylation in primary glial cell cultures in the presence or absence of granule cells conditioned medium. However, in mixed neuron/glial cell cultures, glutamate and its agonist NMDA stimulate GFAP phosphorylation as previously observed in cerebellum slices. DL-AP5 reverted the effect of both and TTX had no effect. Our results suggest a possible involvement of NMDA receptor, presynaptic or glial, in the mechanism of glutamatergic modulation of GFAP phosphorylation in cerebellum of rats.

1. Introduction

Glutamate receptors have a fundamental role on excitatory neurotransmission in mammalian central nervous system, being implicated in a various process such as information transmission, development, plasticity and neurotoxicity. The actions of glutamate are mediated by ionotropic receptors (coupled to cation-specific ion channels) or metabotropic receptors (coupled to G-protein) [reviewed in [1,19]]. Their expression occurs in both, neurons and glial cells and they are involved in physiological interactions between these cells [5,10]. Selective agonists and antagonists for specific glutamate receptor group have been extensively used to study the role of these receptors in the brain.

We have shown that the phosphorylation of glial fibrillary acid protein (GFAP), an intermediate filament protein, is strongly stimulated by glutamate in immature hippocampal and cerebellum slices from rats in a developmental stage (12-16 days postnatal). In order to understand the mechanism involved in this effect it was important to identify the glutamate receptor involved. Using specific agonists and antagonists to glutamate receptors we determined that, although the effect of glutamate is the same, the mechanism involved in both structures are different. Our results showed that glutamate stimulation of GFAP phosphorylation in hippocampal slices is mediated by a mGluR with pharmacological properties of group II, possibly subtype mGluR3 [14,25]. In cerebellum slices, interestingly, mGluRs agonists did not alter the level of GFAP phosphorylation, but the ionotropic agonist, NMDA, increased GFAP phosphorylation as glutamate and the NMDA receptor competitive antagonist DL-AP₅ reverted this stimulation (data not show). These results involving NMDA receptors and GFAP phosphorylation were surprising

since the expression and functionality of NMDA receptors in glial cells is still controverse [8,10]. NMDA receptors were identified in Bergmann glia [15,17], in cortical astrocytes [7] and in GFAP-positive astrocytes in rat hippocampus [22].

Bergmann cells are a characteristic radial glial cells of cerebellum that, like astrocytes, express GFAP. Their extensive proliferation phase occurs during the two first postnatal weeks and, in contrast to cerebellar astrocytes, the expression of NMDA receptors subunits has been previously described in Bergmann cells [15].

NMDA receptors are perhaps the most widely studied glutamate receptors because their direct involvement in neuronal development, synaptic plasticity, [12,23], modulation of kinases and phosphatases activities [13] and other physiological events. Moreover, excessive NMDA receptor activation causes neuronal excitotoxicity and are related to several brain diseases [20].

The contrast between the receptors responsible by the responses of GFAP phosphorylation by glutamate in hippocampus and cerebellum indicate that different mechanisms are involved in these structures and, probably, are related with their different functions in the Central Nervous System. In order to understand the mechanisms involved in GFAP phosphorylation in cerebellum we studied the effect of glutamate in primary glial cell cultures in absence or presence of conditioned medium and in mixed cultures from rats.

2. Material and Methods

2.1. Chemicals:

[³²P]Na₂HPO₄ (CNEN, São Paulo, Brasil), L-Glutamate (Tocris Cookson, USA), NMDA (RBI, USA), DNase (Roche), trypsin and trypsin inhibitor soybean (Gibco BRL), fetal bovine serum (Cultilab and Gibco). Acrylamide (product 8887),

materials for electrophoresis, DL-2-amino-5-phosphono-valeric acid (AP5), Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) and other material for cell culture were purchased from Sigma. Primary antibody anti-rabbit-GFAP was purchased from DAKO, and secondary antibody anti-rabbit-IgG peroxidase conjugated was from Amersham Tetrodotoxin (TTX; Calbiochem) was a gift from Dr. A. Cornell-Bell (USA).

2.2. Glial cells cultures

Primary glial cultures were prepared as previously described [21]. Briefly, cerebella of new-born (0-3 days old) and 7-8 days-old Wistar rats were removed, placed in a Ca^{2+} - and Mg^{2+} - free balanced salt solution (CMF – BSS) pH 7.4, cleaned of meninges and mechanically dissociated. The cell suspension was allowed to settle for 4-5 min and the supernatant was transferred to another tube. The sedimented cells were resuspended in CMF-BSS and dissociated again. The two supernatants were combined and the resulting cell suspension centrifuged at 1000 rpm for 5 min. The supernatant was discarded, the pellet resuspended in culture medium (pH 7.6), containing 1% Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM); 8,39 mM HEPES; 23.8 mM NaHCO_3 ; 0,1% fungisone; 0.032% garamicine and 10% fetal bovine serum. The cells were plated at a density of 1.5×10^5 cells/cm² onto 24-well plates pre-treated with poly-L-lysine. Cultures were maintained in 5% CO_2 /95% air at 37°C and allowed to grow to confluence (2 weeks). Medium was changed every 3-4 days. The quality of pure cerebellum glial cell culture was confirmed by immunocytochemistry to GFAP. Cells were fixed by 4% paraformaldehyde in PBS and permeabilized by 0,2% Triton X-100/PBS. Cells were coverslipped in PBS / 5% bovine serum albumin for 1 h. Primary antibody anti-

rabbit-GFAP were used 1:200 in PBS. Following primary antibody incubation, cells were washed 3 times with PBS and then incubated with secondary antibody anti-rabbit-IgG peroxidase conjugated diluted 1:200 in PBS. Finally, cells were incubated with 0.05% DAB/0.3% hydrogen peroxide.

2.3. Mixed cerebellar cultures

Mixed cerebellar cell cultures containing both neurons and astrocytes were prepared from 8-day-old Wistar rats with a modified procedure from Boeck et al., [2]. Briefly, freshly dissected cerebella were incubated with 0.025% trypsin solution for 10 min at 37⁰C and disrupted mechanically with fire-polished Pasteur pipette in the presence of 0.08 mg mL⁻¹ DNase and 0.05% trypsin inhibitor. Cells were seeded at density of 2.5 X 10⁵ cells/cm² in a 24-well multiwell dish (Nunc) coated with 10 µg mL⁻¹ poly-D-lysine in Eagle's basal medium (BME) with 10% of fetal bovine serum, 50 µg mL⁻¹ gentamicine, 25mM KCl. Each well's volume were supplemented to 600 µl with DMEM, as described above but with 10% of fetal bovine serum appropriated to neurons culture conditions. Cultures were incubated in a humified atmosphere of 5% CO₂/95% air at 37⁰C, replacing 50% of medium for DMEM – serum free after 3-4 days in vitro after seeding.

2.4. Conditioned medium preparation

Conditioned medium was obtained from cerebellar granule cells prepared from 8-day-old Wistar rats [2]. Medium was collected after 5 days of incubation with neuron cells and used as conditioned medium without freezing. Medium of confluent glial cell cultures were replaced by 50% of fresh medium and 50% of conditioned

cerebellar neurons medium. The conditioned treatment was kept for 4 days and after that the cells were submitted to labelling procedure.

2.5. Labelling of cell cultures with [^{32}P] phosphate

The culture plates were removed from incubator and immediately placed on a metal stage warmed to 30 $^{\circ}\text{C}$ by circulating water. The incubation medium was removed by suction and the cells were washed with medium containing (mM): NaCl 124, MgSo₄ 1.3, glucose 12, Na-HEPES 25 and CaCl₂ 1 (pH 7.4). Cells were pre-incubated with incubation medium for 30 min which was replaced by incubation medium containing 40 μCi / well [^{32}P] phosphate with or without additions of agonists for 60 min at 30 $^{\circ}\text{C}$. Antagonists and TTX were added in pre-incubation and incubation stage. Labelling procedure was stopped by removing of incubation medium and addition of the sample solution for two-dimensional analysis.

2.6. Electrophoresis and quantification of data

For two-dimensional electrophoresis, the samples were analysed by non-equilibrium pH gradient electrophoresis (NEPHGE) in first dimension followed by SDS-PAGE [14]. After drying gels were exposed to Kodak X-Omat films with intensifying screens at - 70 $^{\circ}\text{C}$. Autoradiographs were quantified by scanning the films in a Hewlet-Packard Scanjet 6100C and determining optical densities with Optiquant (version 02.00, Packard Instrument Company) software. Optical density values were obtained for total phosphorylation and for the spot corresponding to GFAP. Values for GFAP were first expressed as a percentage of total phosphorylation. The control values were then normalised to 100% and the percentage changes in the test samples calculated. Results were analysed by a paired Student's t-test.

3. Results

Fig. 1 shows primary glial cells cultures obtained from animals that are 0-3 (A) and 7-8 (B) days post-natal. The glial nature of these cultures was tested by immunocytochemistry to GFAP (C). Cerebellum mixed cell cultures (D) shown the presence of granule neurons and glial cells.

GFAP phosphorylation levels were measured in primary glial cell cultures obtained from animals with 0-3 and 7-8 days post-natal. Table 1 show that GFAP phosphorylation level in primary cultures of glial cells did not response to glutamate at both concentrations tested, 0.1 and 1 mM. The absence of glutamate effect was also observed in primary glial cell cultures treated with conditioned neuronal medium. However, the level of GFAP phosphorylation in mixed cultures was significantly increased by glutamate at the two concentrations, in a manner dependent of concentration (Table 1).

The effect of glutamate 1 mM, shown in mixed cultures, was the same observed in cerebellum slices where NMDA receptor was involved (submitted). In order to investigate if the same mechanism observed in cerebellum slices was present in cerebellum mixed culture, we decided to test the NMDA receptor agonist and antagonist. NMDA 100 μ M enhanced GFAP phosphorylation as the same level as glutamate 1mM, and this effect was blocked by DL-AP₅, a specific NMDA receptor antagonist (Fig. 2). Tetrodotoxin (TTX), an antagonist of voltage-dependent sodium channels, did not inhibit the stimulation of GFAP phosphorylation promoted by glutamate or NMDA agonist (Fig. 2).

4. Discussion

In order to investigate the mechanism involved in the glutamatergic modulation of GFAP phosphorylation in cerebellum of rats, we worked with different cell culture models since the complexity of the brain structure difficults the understanding of the mechanism involved in the regulation of this phosphorylation system.

The morphology of cerebellum primary cultures in this work is similar to Bergmann cells cultures from chick cerebellum shown by López-Cólome et al. [16]. However, the presence of Bergmann glial cells or only astrocytes in our primary cultures is difficult to check since a characteristic and specific marker for Bergmann cells in cultures obtained from rats, is not available, as there is in chick [18]. The morphological profile of cerebellar glial cells in our cultures (Fig. 1 A and B) suggested that if Bergmann glia is growing under these conditions they were developing into a different phenotype from the typical morphology they exhibit normally in situ [11].

In previous works we demonstrated that glutamate stimulates GFAP phosphorylation in slices from cerebellum and hippocampus of immature rats through NMDA receptor and metabotropic receptor respectively [Kommers et al., submitted data, [14]]. However, our present results in cerebellum using primary glial cultures differ from the studies above, since GFAP phosphorylation levels were not increased by glutamate in primary glial cells culture (Table 1). In primary cultures of hippocampal astrocytes it also showed the absence of glutamate effect [R. Rodnight, unpublished]. It is known that the expression of glutamate receptors in

primary glial cultures is very low compared to that found in glial cells in situ [6], which can compromise the effect of glutamate signalling in this condition of culture.

In contrast to primary glial cell cultures, glutamate increased the level of GFAP phosphorylation in glial cells cultured with neurons (mixed neuron/glial cells culture, Table 1), but not in primary glial cell cultures treated with conditioned neuronal medium (Table 1). These results point to the possibility that this effect mediated by glutamate depends on the contact between glial cells and granule neurons, shown in Fig. 1 D. Some studies, investigating the presence of NMDA receptors in astrocytes from cerebral cortex of rats showed that both subunits NR1 and NR2A/B are expressed in distal astrocytic processes but only rarely in astrocytic cell bodies [7,8]. Accordingly this finding it has hypothesised that astrocytic NMDA receptors mediate part of neuron-glia signalling mechanisms involved in some functions of astrocytes and plasticity of central nervous system. This could explain why we reproduce the effect of glutamate increasing GFAP phosphorylation in slices from cerebellum only in a mixed cultures and not in primary isolated glial cells from cerebellum and hippocampus, as described above.

However, we cannot excluded that this neuronal/glial interaction could involve a neuronal short lived factor signalling present in conditioned medium from neurons, like showed by Brown [4], which is not able to produces modifications in the mechanism that regulates GFAP phosphorylation by excitatory amino acids.

The involvement of NMDA receptor in the stimulation of GFAP phosphorylation by glutamate was confirmed using NMDA 100 μ M, that increases the protein phosphorylation to the same level as observed by glutamate 1mM. In agreement with this, DL-AP5, a specific and competitive antagonist of NMDA receptors, reverts totally the effect of glutamate and NMDA (Fig. 2).

An important question refers to the possibility of an indirect mechanism in the response of glial cells in mixed cultures to glutamate and NMDA, instead of a direct action. The absence of blockade effect of TTX in this stimulation (Fig. 2) has been provided an evidence to support that the mechanism of GFAP modulation did not involve a secondary release of neurotransmitters mediated by voltage-dependent sodium channel.

The presynaptic NMDA receptors involvement could not be excluded since it is known that they are able to release glutamate and other neurotransmitters [9]. However, the neuronal cells present in our mixed neuron/glial culture are granule cells which represent a large homogeneous glutamatergic population. So, the involvement of presynaptic NMDA receptors in the glutamatergic stimulation of GFAP phosphorylation could be mediated by glutamate release from presynaptic terminals. In fact, presynaptic NMDA stimulate glutamate and aspartate release in a tetrodotoxin-insensitive way, involving a cytoplasmatic pool [3]. This system, different of our results, is Ca^{2+} -independent. An interesting point lies on the presynaptic NMDA characteristics showed by Fink and collaborators [9] that include blockade by Mg^{2+} . In contrast, our work showed that the NMDA involved with GFAP phosphorylation in cerebellum mixed culture it is not blocked by Mg^{2+} (that is present in the incubation medium). The NMDA insensitivity to Mg^{2+} was observed in Bergmann glial cells [16] but not yet in neurons.

The mechanism by which NMDA receptors increase GFAP phosphorylation is unclear but probably the NMDA allows Ca^{2+} -entry stimulating Ca^{2+} -dependent kinases involved in GFAP phosphorylation [24].

The major contribution of the present work is that cerebellum glial cells could respond to NMDA stimulation through a mechanism that is not totally clear but could play a specific role in neuron-glia interaction in this structure.

References

- [1] M. R. Bennett and V. J. Balcar, Forty years of amino acid transmission in the brain. *Neurochem. International* 35 (1999) 269-280.
- [2] C. R. Boeck, M. J. Bronzatto, D. G. Souza, J. J. F. Sarkis and D. Vendite, The modulation of ecto-nucleotidase by glutamate in cultured cerebellar granule cells. *NeuroReport* 11 (2000) 709-712.
- [3] A. I. M. Breukel, E. Besselsen, F. H. L. Silva and J. M. Ghijesen, A presynaptic N-methyl-D-aspartate autoreceptor in rat hippocampus modulating amino acid release from a cytoplasmatic pool. *Eur. J. Neurosc.*, 10 (1998) 106-114.

-
- [4] D. R. Brown, Neurons depend on astrocytes in a coculture system for protection from glutamate toxicity. *Mol. Cell. Neurosci.* 13 (1999) 379-389.
- [5] G. Carmignoto, Reciprocal communication system between astrocytes and neurones. *Prog. Neurobiol.* 62 (2000) 561-581.
- [6] D. F. Condorelli, P. Dell'Albani, M. Corsaro, R. Giuffrida, A. Caruso, A. Trovato Salinaro, F. Spinella, F. Nicoletti, V. Albanese and A. M. Giuffrida Stella, Metabotropic glutamate receptor expression in cultured rat astrocytes and human gliomas. *Neurochem. Res.* 22 (1997) 1127-1133.
- [7] F. Conti, S. DeBiasi, A. Minelli and M. Melone, Expression of NR1 and NR2A/B subunits of the NMDA receptor in cortical astrocytes. *Glia* 17 (1996) 254-258.
- [8] F. Conti, Localization of NMDA receptors in the cerebral cortex: a schematic overview. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 30 (1997) 555-560.
- [9] K. Fink, V. Schmitz, C. Boing and M. Gothert, Stimulation of serotonin release in the rat brain cortex by activation of ionotropic glutamate receptors and its modulation via alpha 2-heteroreceptors. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 352 (1995) 394-401.
- [10] V. Gallo and J. Russel, Excitatory amino acid receptors in glia: different subtypes for distinct functions? *J. Neurosci. Res.* 42 (1995) 1-8.

-
- [11] S. Hanke, A. Reichenbach, Quantitative-morphometric aspects of Bergmann glial (Golgi epithelial) cell development in rats, *Anat. Embryol.* 177 (1987) 183-188.
- [12] H. Husi, M. A. Ward, J. S. Choudhary, W. P. Blackstock and S. G. N. GRANT, Proteomic analysis of NMDA receptor-adhesion protein signaling complexes. *Nature* 3 (2000) 661-669.
- [13] Q. Jiang, Z. Gu, G. Zhang and G. Jing, N-methyl-D-aspartate receptor activation results in regulation of extracellular signal-regulated kinases by protein kinases and phosphatases in glutamate-induced neuronal apoptotic-like death. *Brain Res.* 887 (2000) 285-292.
- [14] T. Kommers, R. Rodnight, D. Oppelt, D. Oliveira, and S. Wofchuk, The mGluR stimulating GFAP phosphorylation in immature hippocampal slices has some properties of a group II receptor, *NeuroReport*, 10 (1999) 2119-2123.
- [15] T. López, A.M. López-Colomé and A. Ortega, NMDA receptors in cultured radial glia. *FEBS Letters* 405 (1997) 245-248.
- [16] A. M. López-Colomé, A. Ortega, G. Frago and E. Trueba, Excitatory amino acid receptors coupled to the phosphoinositide pathway in Bergmann Glia. *Neurochem. Res.* 22 (1997) 305-312.
- [17] T. Müller, J. Grosche, C. Ohlemeyer and H. Kettenmann, NMDA activated currents in Bergmann glial cells. *NeuroReport* 4 (1993) 671-674.

[18] A. Ortega, N. Eshhar and V.I. Teichberg, Properties of Kainate receptor/channels on cultured Bergmann glia. *Neurosci.* 41 (1991) 335-349.

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

[20] C. G. Parsons, W. Danysz and G. Quack, Memantine is a clinical well tolerated N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor antagonist – a review of preclinical data. *Neuropharmacol.* 38 (1999) 735-767.

[21] S. S. Pinto, C. Gottfried, A. Mendes, D. Gonçalves, J. Karl, C. A. Gonçalves, S. Wofchuk and R. Rodnight, Immunocontent and secretion of S100B in astrocyte cultures from different brain regions in relation to morphology. *FEBS Letters* 486 (2000) 203-207.

[22] J. T. Porter and K. D. McCarthy, GFAP-positive hippocampal astrocytes respond to glutamatergic neuroligands with increase in $[Ca^{2+}]_i$. *Glia* 13 (1995) 101-112.

[23] M. Sheng and S. H. Lee, Growth of NMDA receptor industrial complex. *Nature* 3 (2000) 633-635.

[24] K. Tsujimura, J. Tanaka, S. Ando, Y. Matsuoka, M. Kusubata, H. Sugiura, T. Yamauchi and M. Inagaki, Identification of phosphorylation sites on glial fibrillary

acidic protein for cdc2 kinase and Ca^{2+} -calmodulin-dependent protein kinase II. J. Biochem.(Tokyo), 116 (1994) 426-434.

[25] S. Wofchuk, and R. Rodnight, Glutamate stimulates the phosphorylation of glial fibrillary acidic protein in slices of immature hippocampus via a metabotropic receptor. Neurochem. Int. 24 (1994) 517-523.

Legends to Figures

FIG.1. Photograph images of primary glial culture and mixed neuron/glial cell culture from cerebellum. Primary glial cell cultures were obtained from animals that are 0-3 (A) and 7-8 (B) days post-natal, both at 8 days in vitro. The glial nature of these cultures was tested by immunocytochemistry to GFAP (C). Cerebellum mixed cell cultures (D) showed the presence of granule neuronal cell (arrowhead) and glial cell (arrow). Cells were viewed in a Nikon Eclipse TE 300 inverted microscope.

FIG. 2. The effect of the ionotropic glutamatergic agonist NMDA and its antagonist on GFAP phosphorylation in cerebellar mixed neuron/glial cells culture. Concentrations were as follows (μM): NMDA, 100; glutamate, 1000; AP5, 100; TTX, 2. * significantly different from the 100% control ($p < 0.001$).

Fig. 1

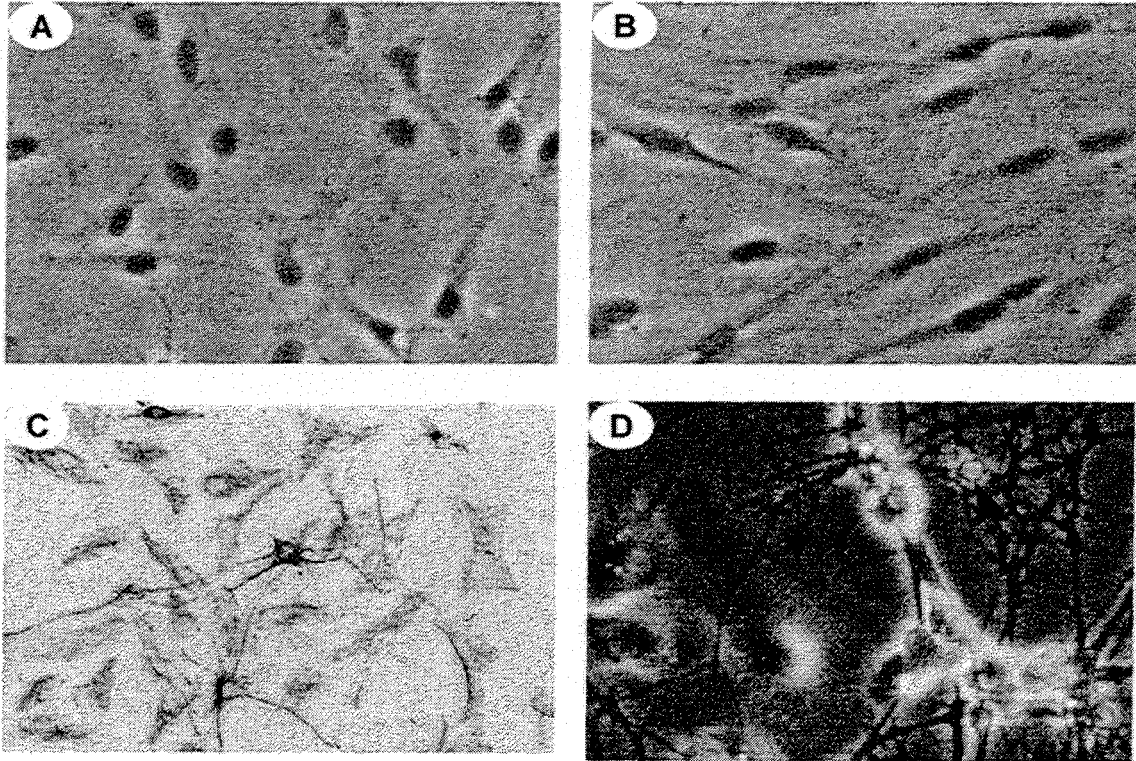


Fig. 2.

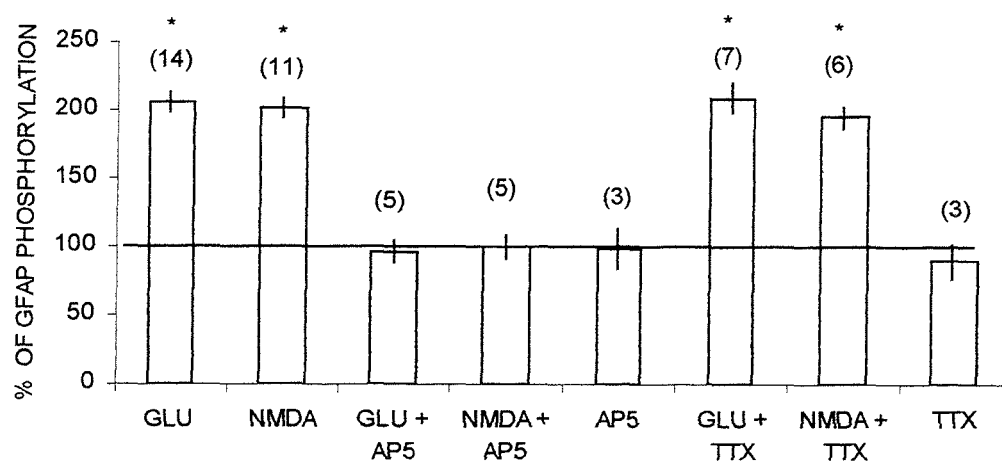


TABLE 1. Effect of glutamate on GFAP phosphorylation in different cerebellum culture models

	% of Control	
	Glutamate 0,1 mM	Glutamate 1mM
Primary glial culture P 0-3	97,3 ± 7,5 (7)	99,3 ± 3,7 (19)
Primary glial culture P 7-8	92,7 ± 11,6 (4)	99,4 ± 4,8 (7)
Primary glial culture with conditioned medium P0-3	94,6 ± 3,2 (8)	92,9 ± 4,7 (10)
Primary glial culture with conditioned medium P7-8	90,5 ± 6,7 (5)	95 ± 5 (6)
Mixed culture P7-8	180,2 ± 5,6 (10)*	206,3 ± 7,1 (14)* #

Density values quoted are means ± standard error of percentages of control densities for basal phosphorylation in the presence of 1 mM Ca^{2+} (= 100%), corrected for total phosphorylation (see Materials and Methods). * significantly different from the control ($p < 0.001$). # significantly different from glutamate 0,1 mM ($p < 0,01$), by ANOVA test.

3. DISCUSSÃO

3. DISCUSSÃO

O primeiro artigo desta tese teve como principal objetivo a determinação do receptor envolvido na modulação glutamatérgica da fosforilação da GFAP em hipocampo de ratos jovens.

Resultados prévios (Wofchuk & Rodnight 1994; 1995) mostraram que em fatias de hipocampo de animais jovens o nível de fosforilação da GFAP aumenta significativamente na presença de glutamato 1mM, o que é mimetizado na presença de 1S,3R-ACPD ou ainda na presença de EGTA 1mM (sem agonista). Por outro lado, em hipocampo de animais adultos a fosforilação da GFAP é dependente de Ca^{2+} e não sofre estimulação por glutamato ou 1S,3R-ACPD. Estes resultados, associados ao fato de que nenhum agonista ionotrópico promoveu o efeito estimulatório do glutamato, indicaram o provável envolvimento de receptores glutamatérgicos metabotrópicos.

Com base neste dados, buscou-se avaliar o efeito de diferente agonistas metabotrópicos sobre a fosforilação da GFAP em hipocampo de animais jovens. O agonista 1S, 3R-ACPD atua sobre receptores metabotrópicos do grupo I e II e deste modo não é capaz de diferenciar estes dois grupos. No entanto, outros agonistas são capazes de diferenciar os subtipos devido a suas especificidades para cada subtipo.

O DHPG, agonista seletivo para receptores do grupo I (subtipos mGluR1 e mGluR5) não apresentou efeito sobre o nível de fosforilação da GFAP. Com a finalidade de verificar se os receptores mGluR do grupo I realmente não estão envolvidos neste mecanismo de modulação, utilizou-se um inibidor de fosfolipase C, U73122, o qual não foi capaz de reverter o efeito estimulatório promovido pelo glutamato sobre a fosforilação da GFAP.

Com o intuito de verificar o possível envolvimento de receptores metabotrópicos glutamatérgicos do grupo III (subtipos mGluR4, mGluR6, mGluR7 e mGluR8), utilizamos o agonista L-AP4, seletivo para este grupo de receptores. Da mesma forma que o DHPG, o agonista L-AP4 não alterou o nível de fosforilação da proteína indicando que receptores metabotrópicos do grupo III não estão envolvidos no mecanismo de modulação glutamatérgica da fosforilação da GFAP.

Por outro lado, os agonistas de receptores mGluR grupo II (subtipos mGluR2 e mGluR3) testados, 1S,3S-ACPD, L-CCG I e DCG IV, mimetizaram o efeito estimulatório promovido pelo glutamato sobre a fosforilação da GFAP. Devido à seletividade destes agonistas podemos indicar o envolvimento de receptores mGluR do grupo II no mecanismo glutamatérgico de estimulação de fosforilação da GFAP. Como há grande homologia entre os subtipos mGluR2 e mGluR3, os agonistas testados não

foram capazes de promover resultados que permitissem a diferenciação entre os subtipos. No entanto, apenas o subtipo mGluR3 tem sido descrito como presente nas células gliais (Ohishi et al., 1993).

Embora o mecanismo de transdução de sinal envolvido no efeito estimulatório promovido pelo glutamato sobre a fosforilação da GFAP, permaneça desconhecido, os resultados do primeiro artigo desta tese estão de acordo com a hipótese (figura 4.1) publicada por Rodnight e colaboradores (1997). Através desta, a estimulação do receptor mGluR3 inibe canais de Ca^{2+} do tipo-L e conseqüentemente impede a entrada de Ca^{2+} externo. A fosfatase tipo 2B (PP2B ou calcineurina), por ser dependente de Ca^{2+} , permanece inativa frente ao seu substrato, o inibidor 1. Na forma fosforilada, o inibidor 1 atua sobre a fosfatase tipo 1 (PP1), inibindo-a. Uma vez que a PP1 é responsável pela desfosforilação da GFAP em hipocampo de ratos jovens (Vinadé & Rodnight, 1996), o equilíbrio entre a forma fosforilada e desfosforilada da proteína estará deslocado para a forma fosforilada.

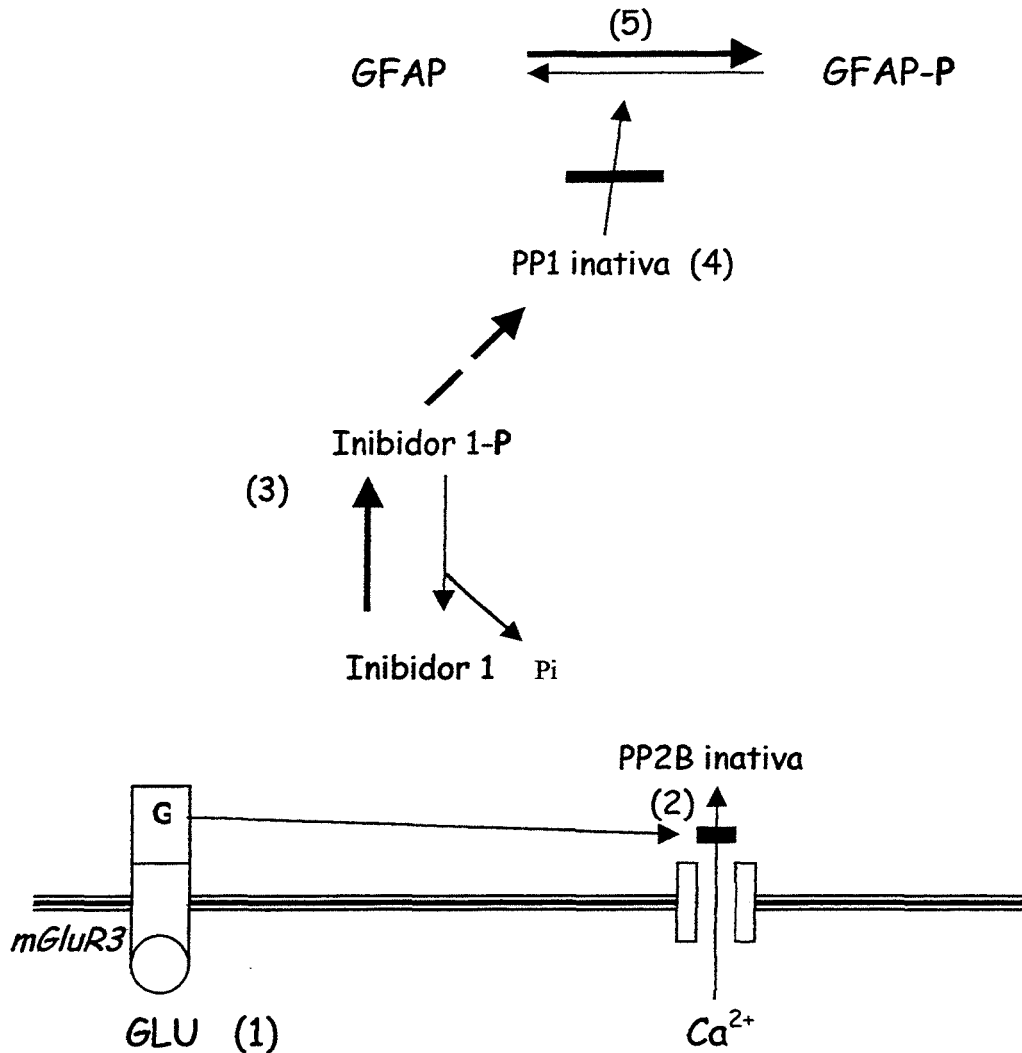


Figura 4.1: Esquema representando o possível mecanismo envolvido na modulação glutamatérgico da fosforilação da GFAP em hipocampo de ratos jovens. (1) a ativação de receptores mGluR3 promove uma inibição dos canais de Ca^{2+} tipo-L impedindo a entrada de Ca^{2+} externo e conseqüentemente inibindo a PP2B (2). O inibidor 1, substrato da PP2B, permanece na forma fosforilada e ativa (3), inibindo a PP1 (4). Sem a ação da PP1, o equilíbrio da fosforilação da GFAP fica deslocado para a forma fosforilada (5). (Adaptado de Rodnigh e colaboradores 1997).

No segundo trabalho desta tese estudou-se o efeito do glutamato na modulação da fosforilação da GFAP em cerebelo de ratos jovens. Comparativamente a hipocampo, o glutamato teve o mesmo efeito sobre a fosforilação da proteína em cerebelo. Pudemos observar que tão logo o nível de GFAP fosforilada é detectado nas autorradiografias, por volta do 10^o dia pós-natal, o glutamato já produz aumento no nível de fosforilação. No entanto, o efeito estimulatório do glutamato desaparece no 20^o pós-natal em ambas as estruturas. Estes resultados reforçam as evidências de que a fosforilação desta proteína é modulada ao longo do desenvolvimento.

Embora a ontogenia do efeito glutamatérgico sobre a GFAP em ambas estruturas seja idêntica, a ausência de Ca²⁺ (presença de EGTA) em fatias de cerebelo não mostrou a estimulação observada em hipocampo. Este resultado indicou pela primeira vez que, possivelmente, os mecanismos que mediam a estimulação da fosforilação da GFAP por glutamato em hipocampo e cerebelo da ratos jovens não sejam iguais.

Desta forma, buscou-se determinar qual mecanismo estava envolvido na modulação glutamatérgica da fosforilação da GFAP em cerebelo de animais jovens.

Da mesma forma que em hipocampo, agonistas glutamatérgicos metabotrópicos foram testados em microfatias de cerebelo, sendo eles 1S, 3R-ACPD (para mGluRs do grupo I e II), DCG IV (específico para mGluRs do

grupo II) e L-AP4 (para mGluRs do grupo III). Ao contrário de hipocampo, nenhum agonista metabotrópico foi capaz de mimetizar o efeito do glutamato sobre a GFAP. A partir deste resultado partiu-se para avaliação do possível envolvimento de receptores glutamatérgicos ionotrópicos. Os agonistas AMPA e cainato foram testados e não promoveram efeito algum sobre a fosforilação da GFAP. Da mesma forma, o antagonista específico para receptores não-NMDA, CNQX, não reverteu o efeito estimulatório da fosforilação da GFAP em cerebelo de animais jovens.

Ao contrário dos agonistas anteriormente testados, o NMDA mimetizou o efeito estimulatório do glutamato sobre a fosforilação da GFAP e o antagonista competitivo DL-AP5, seletivo para receptores NMDA, reverteu o efeito do glutamato e do agonista NMDA sobre a fosforilação da GFAP. Estes resultados indicam o envolvimento do receptor ionotrópico NMDA na modulação glutamatérgica da fosforilação da GFAP em cerebelo de animais jovens.

Por ser o NMDA um receptor ligado a canal de Ca^{2+} , testou-se o efeito da ausência de Ca^{2+} externo, na presença de EGTA, sobre o efeito do glutamato e do NMDA. Observou-se que na ausência de Ca^{2+} externo o efeito estimulatório do glutamato e do NMDA sobre a fosforilação da GFAP desaparece, indicando que o mecanismo é dependente da presença de Ca^{2+} extracelular. Ou seja, é possível que a resposta causada por glutamato, via

receptores NMDA, seja mediada pela entrada de Ca^{2+} . Neste caso, talvez estejamos frente a um mecanismo em cerebelo contrário ao observado em hipocampo, onde a entrada de Ca^{2+} inibe a fosforilação da GFAP.

O envolvimento de receptores NMDA na modulação glutamatérgica da fosforilação da GFAP em cerebelo de animais jovens trouxe uma importante questão: a resposta do glutamato, via receptores NMDA, observada sobre a GFAP envolve ou não a atividade neuronal? De fato, a presença de receptores NMDA em astrócitos cerebelares ainda não foi descrita e sabe-se que as células gliais respondem rapidamente a sinais neuronais (Shao & McCarthy, 1997). Por outro lado, a glia de Bergmann expressa GFAP e receptores NMDA (Luque & Richards, 1995, López et al., 1997). Com o objetivo de verificar se a atividade neuronal está envolvida no mecanismo de estimulação da fosforilação da GFAP por glutamato, testou-se o efeito do glutamato e do NMDA na presença de tetrodotoxina (TTX), um inibidor de canais de Na^{2+} capaz de suprimir a atividade pós-sináptica. O efeito, tanto do glutamato como do NMDA, não foi alterado na presença de TTX, indicando que provavelmente receptores NMDA pós-sinápticos não estejam envolvidos na estimulação glutamatérgica sobre a fosforilação da GFAP em fatias de cerebelo de animais jovens.

Este resultado é extremamente relevante pois sugere a possível existência de receptor NMDA funcional em glia, ainda controverso na

literatura. É possível que este receptor tenha características diferentes daquele em neurônio, já que foi estimulado mesmo na presença de Mg^{2+} no meio de incubação. A literatura cita a presença de receptor NMDA glial diferente do neuronal no que diz respeito à inibição por Mg^{2+} e dependência por glicina (Müller et al., 1993).

Por outro lado, receptores NMDA pré-sinápticos podem estar mediando a liberação de neurotransmissores os quais poderiam estimular a fosforilação da GFAP. Breukel e colaboradores (1998) mostraram que receptores NMDA pré-sináptico modulam a liberação de glutamato citoplasmático através de um mecanismo independente de Ca^{2+} . Neste caso, a ativação de receptores NMDA neuronais poderia levar a liberação de glutamato e este promover uma múltipla sinalização de seus receptores (efeito apenas observado com glutamato e não com agonistas específicos dos subtipos de GluRs), levando ao aumento no nível de fosforilação da GFAP. Embora esta possibilidade exista, é importante ressaltar que o estudo farmacológico realizado indicou o envolvimento de receptores NMDA na modulação glutamatérgica da fosforilação da GFAP, por um mecanismo dependente de Ca^{2+} extracelular. O efeito do glutamato também foi dependente da presença de Ca^{2+} extracelular.

Embora diferentes receptores estejam envolvidos na estimulação glutamatérgica da fosforilação da GFAP em hipocampo e cerebelo de ratos,

este efeito do glutamato ocorre nas duas estruturas estudadas em um breve período de desenvolvimento (P10-P16), o qual coincide com o período de intensa sinaptogênese, durante a qual sabe-se que há proliferação tanto de astrócitos como da glia de Bergmann (Hanke & Reichenback, 1987, Gonçalves et al., 1990; Rodnight & Leal, 1990).

É conhecido que o nível de fosforilação dos filamentos intermediários regula o equilíbrio dinâmico entre o estado polimerizado/despolimerizado do filamento (Steinert & Roop, 1988; Nakamura et al., 1996), o qual tem papel fundamental na mitose (Chou et al., 1990; Tsujimura et al., 1994; Matsuoka et al., 1993). Logo, a liberação de glutamato pelas sinapses em desenvolvimento poderia sinalizar um aumento nos níveis de fosforilação da GFAP o que levaria a um aumento do número de astrócitos e de células de Bergmann em mitose. Por outro lado, em períodos mais tardios de desenvolvimento estas células geralmente encontram-se em interfase, o que explicaria a ausência de efeito do glutamato sobre a fosforilação da GFAP.

No terceiro trabalho desta tese verificou-se a presença da modulação glutamatérgica sobre a GFAP em células cerebelares em cultivo. Sabe-se que a cultura de células consiste em uma importante metodologia que permite a separação de tipos celulares com o objetivo de estudar

respostas específicas. Contudo, é importante considerar que as células em cultura podem apresentar respostas diferentes das apresentadas *in vivo*.

Em um primeiro momento testou-se o efeito do glutamato sobre a fosforilação da GFAP em culturas primárias gliais de cerebelo obtidas de animais em duas idades, 0-3 e 7-8 dias pós-natal. A escolha das idades dos animais teve como objetivo verificar se culturas de células gliais realizadas a partir de animais de uma semana de vida apresentariam células gliais com características de glia radial, a glia de Bergmann. A ausência de marcadores diferenciais que permitam a determinação do tipo de célula glial (astrócito ou célula de Bergmann) presente na cultura impede a completa caracterização da cultura de células gliais de cerebelo de ratos jovens. Ortega e colaboradores (1991) utilizaram 4 critérios para identificação de células de Bergmann em culturas cerebelares obtidas de pinto. Segundo os autores estes critérios só são válidos para pintos e não podem ser aplicados em outros animais.

Nas culturas primárias gliais de cerebelo, obtidas de animais nas duas diferentes idades, o glutamato não foi capaz de estimular a fosforilação da GFAP. O tratamento das células gliais com meio condicionado neuronal também não permitiu que o glutamato produzisse o efeito observado sobre as células gliais *in vivo*. No entanto, quando testado em culturas mistas, constituídas por neurônios granulares e células gliais, o glutamato promoveu

efeito estimulatório similar ao apresentado em fatias cerebelares de animais jovens. As duas concentrações de glutamato (0,1 e 1 mM) testadas foram efetivas; no entanto, o nível de estimulação foi maior com o aumento da concentração de glutamato indicando que o efeito sobre a fosforilação da GFAP é dose-dependente.

O agonista NMDA e o antagonista DL-AP5 foram utilizados a fim de verificar se, assim como em fatias cerebelares, o efeito glutamatérgico sobre a fosforilação da GFAP envolve receptores ionotrópicos do tipo NMDA. Os resultados foram similares aos observados em fatias, indicando que *in vitro*, assim como *in vivo*, a fosforilação da GFAP em células cerebelares sofre modulação glutamatérgica via receptores NMDA.

A presença da toxina TTX nas culturas mistas não alterou o efeito estimulatório do glutamato ou do NMDA sobre a fosforilação da GFAP, indicando que provavelmente terminais pós-sinápticos não estejam envolvidos neste mecanismo e, por outro lado permite a especulação à respeito do envolvimento de receptores NMDA pré-sinápticos ou gliais.

Embora os resultados com TTX possam sugerir um possível efeito direto do glutamato e do NMDA sobre as células gliais, é interessante que estas, quando em culturas puras, não respondem ao glutamato. Provavelmente, a maturação do sistema envolvido na modulação glutamatérgica da fosforilação da GFAP dependa da sinalização neuronal

e/ou da interação entre células gliais e células neuronais. Por outro lado, a ausência de resposta glutamatérgica sobre a fosforilação da GFAP nas culturas primárias tratadas com meio condicionado neuronal pode indicar que as células nervosas liberam fatores de sinalização muito lábeis ou, por outro lado, que a sinalização entre as células dependa da presença de ambos tipos celulares e sua interação.

A ausência do efeito estimulatório de glutamato sobre a fosforilação da GFAP em células gliais primárias de cerebelo *in vitro* não é surpreendente. Rodnight e colaboradores (dados não publicados) observaram que astrócitos hipocámpais em cultivo primário não respondem ao glutamato da mesma forma que em fatias. Este fato provavelmente pode ser devido ao baixo nível de expressão de receptores glutamatérgicos do tipo mGluR3 encontrado nestas células quando em cultura (Condorelli et al., 1997). Da mesma forma, possivelmente a expressão de receptores cerebelares em cultura primária seja diferente da sua expressão *in vivo*.

Embora estudos *in vitro* permitam uma infinidade de opções metodológicas e determinações específicas de mecanismos fisiologicamente complexos, não é possível esquecer que as respostas obtidas nem sempre representam os achados *in vivo*, pois a complexidade do SNC envolve inúmeras sinalizações que não estão presentes *in vitro*.

4. CONCLUSÕES

4. CONCLUSÕES

- período ontogenético de estimulação glutamatérgica da fosforilação da GFAP é igual em ambas estruturas: Hc e Ce
- A fosforilação da GFAP em hipocampo de ratos jovens sofre estimulação glutamatérgica via receptores metabotrópicos do grupo II, subtipo mGluR3.
- A fosforilação da GFAP em cerebelo de ratos jovens também sofre estimulação glutamatérgica e, ao contrário de hipocampo, envolve receptores glutamatérgicos ionotrópicos do tipo NMDA, via mecanismo dependente de Ca^{2+} extracelular.
- Culturas primárias de células gliais cerebelares não respondem ao glutamato; no entanto, células gliais em culturas mistas com neurônios granulares apresentam níveis aumentados de fosforilação da GFAP quando tratadas com glutamato. Assim como em fatias cerebelares, receptores ionotrópicos do tipo NMDA estão envolvidos neste efeito estimulatório.

- A manifestação do efeito do NMDA em cerebelo pode ser primário em glia, ou ser mediado por receptores pré-sinápticos;

5. PERSPECTIVAS

5. PERSPECTIVAS

Os trabalhos apresentados nesta tese abriram inúmeras oportunidades de novos estudos sobre a fosforilação da proteína ácida fibrilar glial (GFAP) em hipocampo e cerebelo de ratos. Sendo assim, os principais estudos a serem seguidos são:

- Determinação das principais atividades quinásicas e fosfatásicas que atuam sobre a fosforilação da GFAP em cerebelo de ratos jovens a fim de elucidar e melhor detalhar o mecanismo envolvido na modulação glutamatérgica;
- Avaliação da expressão das subunidades do receptor NMDA em cultura primária de células gliais e em cultura mista de neurônios granulares e células gliais cerebelares, a fim de identificar os mecanismos envolvidos nas diferentes respostas das células gliais em cultivo, frente ao glutamato.
- Determinação da localidade do receptor NMDA (glial ou neuronal) que media o aumento do nível de fosforilação da GFAP em culturas mistas de neurônio/glia cerebelar,
- Avaliação da modulação glutamatérgica sobre a fosforilação de GFAP em culturas primárias de células gliais em diferentes idades de cultivo.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABE, T.; SUGIHARA, H.; NAWA, H.; SHIGEMOTO, R.; MIZUNO, N. and NAKANISH, S. Molecular characterization of a novel metabotropic glutamate receptor mGluR5 coupled to inositol phosphate/ Ca^{2+} signal transduction. *Journal Biological Chemistry*, 267: 13361-13368, 1992.
- ADAMS J.P.; ROBERSON, E.D.; ENGLISH, J.D.; SELCHER, J.C. and SWEATT, J.D. MAPK regulation of gene expression in the central nervous system. *Acta Experimental Neurobiology* 60(3):377-394, 2000.
- ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J.D. In: *Molecular Biology of the Cell* ed by B. Alberts, D.Bray, J.Lewis, M.Raff, K.Roberts, J.D.Watson, Garland Publishing, Inc. New York, 1994.
- BIANCHIN, M. M.; DA SILVA, R.C.R.; SCHIMITZ, P.K.P.; MEDINA, J.H. and IZQUIERDO, I.I. Memory of inhibitory avoidance in the rat is regulated by glutamate metabotropic receptors in the hippocampus. *Behavioural Pharmacology*, 5: 356-359, 1994.
- BREUKEL, A. I. M.; BESSELSSEN, E.; SILVA, F. H. L. and GHIJESSEN, J. M. A presynaptic N-methyl-D-aspartate autoreceptor in rat hippocampus modulating amino acid release from a cytoplasmatic pool. *European Journal of Neuroscience*, 10: 106-114 1998.
- BRONSTEIN, J.M.; FARBER, D.B.; WASTERLANIN, C.G. Regulation of type II calmodulin kinase: Functional implications. *Brain Research Reviews*, 18: 135-147, 1993.
- BRUNO, V.; BONANNO, L.; KNOEPFEL, T.; KUHN, R. ROBERTS, P. J. and NICOLETTI, F. Activation of group III metabotropic glutamate receptors is neuroprotective in cortical cultures. *European Journal of Pharmacology*, 310: 61-66, 1996.
- CARMIGNOTO, G. Reciprocal communication system between astrocytes and neurones. *Progress in Neurobiology* 62, 561-581, 2000.
- CHANAS-SACRE, G.; REGISTER, B.; MOONEN, G. and LEPRINCE, P. Radial glia phenotype: origin, regulation, and transdifferentiation. *Journal of Neuroscience Research* 15; 61(4): 357-363, 2000.

- CHEN, W.J.; MARTIN, B.L. and BRAUTIGAN, D.L. Regulation of protein serine-threonine phosphatase type-2^A by tyrosine phosphorylation. *Science*, 257: 1261-1264, 1992.
- CHOI, D. W.; MAULUCCI-GEDDE, M. and KRIEGSTEIN, A. R. Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture. *Journal of Neuroscience* 7, 357-368, 1987.
- CHOU, Y.H.; BISCHOFF, J.R.; BEACH, D. and GOLDMAN, R.D. Intermediate filament reorganization during mitosis is mediated by p34cdc2 phosphorylation of vimentin. *Cell* 21:62(6):1063-71, 1990.
- COHEN, P.; HOLMES, C.F.B. and TSUKITANI, Y. An improved procedure for identifying and quantitating protein phosphatases in mammalian tissues. *FEBS Letters*, 250: 590-600, 1989.
- COHEN, P. Signal integration at the level of protein kinases, protein phosphatases and their substrates. *Trends in Biochemical Science*, 17: 408-413, 1992.
- COHEN P. Important roles for novel protein phosphatases dephosphorylating serine and threonine residues. *Biochemistry Society* 21(4):884-888, 1993.
- COLLINGRIDGE, G. L. and WATKINS, J. C. *The NMDA receptor*, 2nd ed. Oxford, Oxford University Press, pp 1-30, 1994.
- CONDORELLI, D. F.; DELL'ALBANI, P.; CORSARO, M.; GIUFFRIDA, R.; CARUSO, A.; TROVATO SALINARO, A.; SPINELLA, F.; NICOLETTI, F. ALBANESE V. and GIUFFRIDA STELLA, A. M. Metabotropic glutamate receptor expression in cultured rat astrocytes and human gliomas. *Neurochemical Research* 22 1127-1133, 1997.
- CONN, P. J. and PIN, J.P. Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. *Annual Reviews Pharmacology and Toxicology*, 37: 205-237, 1997.
- CONTI, F.; DEBIASI, S.; MINELLI, A. and MELONE, M. Expression of NR1 and NR2A/B subunits of the NMDA receptor in cortical astrocytes. *Glia* 17, 254-258, 1996.

- CONTI, F.; MINELLI, A.; DEBIASI, S. and MELONE, M. Neuronal and glial localization of NMDA receptors in the cerebral cortex. *Molecular Neurobiology* 14(1-2):1-18, 1997.
- CONTI, F.; BARBARESI, P.; MELONE, M. and DUCATI, A. Neuronal and glial localization of NR1 and NR2A/B subunits of the NMDA receptor in human cerebral cortex. *Cerebral Cortex* 9,110-120, 1999.
- COTMAN, C. W.; KAHLE, J. S.; MILLER, S. E.; ULAS, J. and BRIDGES, R. J. Excitatory amino acid neurotransmission. *Psychopharmacology*, ch7: 75-85, 1995.
- DAIKHIN, Y. and YUDKOFF, M. Compartmentation of brain glutamate metabolism in neurons and glia. *Journal of Nutrition* 130: 1026S-1031S, 2000.
- DUVOISIN, R. M.; ZHANG, C. and RAMONELL, K. A novel metabotropic glutamate receptor expressed in the retina and olfactory bulb. *Journal Neuroscience*, 15: 3075-3083, 1995.
- ERIKSSON, J. E.; OPAL, P. and GOLDMAN, R. D. Intermediate filament dynamics. *Current Opinion Cell Biology*, 4: 99-104, 1992.
- ENG, L. F. and GHIRNIKAR, R. S. GFAP and astrogliosis. *Brain Pathology*, 4: 229-237, 1994.
- FORREST, D.; YUZAKI, M.; SOARES, H.D.; LUK, D.C.; SHENG, M.; STEWART, C.L.; MORGAN, J.I.; CONNOR, J.A. and CURRAN, T. Targeted disruption of NMDA receptor 1 gene abolishes NMDA response and results in neonatal death. *Neuron* 3(2):325-338, 1994.
- FUCHS, E. & WEBER, K. Intermediate filaments: structure, dynamics, function and disease. *Annual Review of Biochemistry*, 63: 345-382, 1994.
- GALLO, V. and RUSSEL, J. Excitatory amino acid receptors in glia: different subtypes for distinct functions? *Journal of Neuroscience Research*, 42: 1-8, 1995.
- GALLO V. and GHIANI, C. Glutamate receptors in glia: new cells, new inputs and new functions. *Trends in Pharmacology Science*, 21: 252-258, 2000.

- GIMENEZ Y RIBOTTA, M.; LANGA, F.; MENET, V. and PRIVAT, A. Comparative anatomy of the cerebellar cortex in mice lacking vimentin, GFAP, and both vimentin and GFAP. *Glia* 31(1):69-83, 2000.
- GIRAULT, J.A.; HEMMINGS, H.C.; WILLIAMS, K.R.; NAIRN, A.C. and GREENGARD, P. Phosphorylation of DARPP-32, a dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein, by casein kinase II. *Journal of Biological Chemistry* 25; 264(36):21748-21759, 1989.
- GONÇALVES, C.A.; SALBEGO, C.; WOFCHUK, S.; ROCHA, E. and RODNIGHT, R. Properties of a protein phosphorylating system that labels a 47 kDa phosphoprotein (ppH-47) in slices of rat hippocampus. *Neuroscience Research Communications*, vol. 6, 3: 129-133, 1990.
- GONÇALVES, C.A. and RODNIGHT, R. Apparent identity of ppH-47, a protein highly phosphorylated in the hippocampus, with a form of Glial Fibrillary Acidic Protein. *Neuroscience Research Communications*, vol. 11, 2: 109-117, 1992.
- GOTTLIEB, M. and MATUTE, C. Expression of ionotropic glutamate receptor subunits in glial cells of the hippocampal CA1 area following transient forebrain ischemia. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 17: 290-300, 1997.
- GRAVES, J.D. and KREBS, E.G. Protein phosphorylation and signal transduction. *Pharmacological Therapy* 82(2-3):111-121, 1999.
- GREENGARD, P. Neuronal phosphoproteins: Mediators of signal transduction. *Molecular Neurobiology*, 1: 81-118, 1987.
- HANSSON, E. and RÖNNBÄCK, L. Astrocytes in glutamate neurotransmission. *The FASEB Journal*, 9: 343-350, 1995.
- HAYASHI, T. A physiological study of epileptic seizures following cortical stimulation in animals and its application to human clinics. *Japanese Journal of Physiology* 3: 46-64, 1952.
- HANKE, S. and REICHENBACH, A. Quantitative-morphometric aspects of Bergmann glial (Golgi epithelial) cell development in rats. *Anat. Embryol.* 177 183-188, 1987.

- HONKANEN, R.E.; ZWILLER, J.; DAILY, S.L.; KHATRA, B.S.; DUKELOW, M. and BOYNTON, A.L. Identification, purification, and characterization of a novel serine/threonine protein phosphatase from bovine brain. *Journal of Biological Chemistry* 5;266(10):6614-6619, 1991.
- HOUAMED, K. M.; KUIJPER, J. L.; GILBERT, T. L.; HALDEMAN, P. J.; O'HARA, P. J.; MULVIHILL, E. R. ; ALMERS, W. and HAGEN, F. S. Cloning, expression, and gene structure of G protein-coupled glutamate receptor from brain. *Science*, 252: 1318-1321, 1991.
- HUNTER, T. Protein kinases and phosphatases: the Yin and Yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell*, 80: 225-236, 1995.
- HUNTER, K.E. and HATTEN, M.E. Radial glial cell transformation to astrocytes is bidirectional: regulation by a diffusible factor in embryonic forebrain. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 4; 92(6):2061-2065, 1995.
- INAGAKI, N.; ITO, M.; NAKANO, T.; INAGAKI, M. Spatiotemporal distribution of protein kinase and phosphatase activities. *Trends in Biochemical Science*, 19: 448-452, 1994a.
- INAGAKI, M.; NAKAMURA, Y.; TAKEDA, M.; NISHIMURA, T. and INAGAKI, N. Glial fibrillary acidic protein: Dynamic property and regulation by phosphorylation. *Brain Pathology*, 4: 239-243, 1994b.
- INAGAKI, M.; MATSUOKA, Y.; TSUJIMURA, K.; ANDO, S.; TOKUI, T.; TAKAHASHI, T. and NAOYUKI, I. Dynamic property of intermediate filaments: regulation by phosphorylation. *BioEssays*, vol. 18, 6: 481-487, 1996.
- IZQUIERDO, I.I. Pharmacological evidence for a role of long-term potentiation in memory. *FASEB Journal*, 8: 1139-1145, 1994.
- IZQUIERDO I.I. and MEDINA, J.H. Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. *Neurobiology Learn and Memory*, 68: 285-316, 1997.

- ITO, M. The cerebellum, a gateway to modern neuroscience. *Brain Research Bulletin* 50(5/6), 331, 1999.
- KILMELBERG, H. K. *Glial Cell Receptors*, Raven, New York, 1988.
- KILMEBERG, H. K. and NOREMBERG, M. D. Astrocytes. *Scientific American*, 4: 66-76, 1989.
- KIRISCHUK, S.; KIRCHHOFF, F.; MATYASH, V.; KETTENMANN, H. and VERKHRATSKY, A. Glutamate-triggered calcium signalling in mouse bergmann glial cells in situ: role of inositol-1,4,5-trisphosphate-mediated intracellular calcium release. *Neuroscience* 92(3):1051-1059, 1999.
- KLEE, C.B.; DRAETTA, G.F. and HUBBARD, M.J. Calcineurin. *Advances in Enzymology* 61:149-200, 1988.
- KOMMERS, T., VINADÉ, L.; PEREIRA, C.; GONÇALVES, C.A.; WOFCHUK, S.T. and RODNIGHT, R. Regulation of the phosphorylation of glial fibrillary acidic protein by calcium ions and glutamatergic agonists in slices of immature spinal cord: a comparison with slices of immature hippocampus, *Neuroscience Letters* 248: 141-143, 1998.
- LEAL, R. B.; Estudo do sistema fosforilante da ppH47/GFAP em cérebro de ratos: distribuição regional das quinases envolvidas e mapeamento fosfopeptídico. Tese Ph.D., Universidade Federal do Paraná, 1995.
- LÓPEZ, T.; LÓPEZ-COLOMÉ, A.M. and ORTEGA, A. NMDA receptors in cultured radial glia. *FEBS Letters* 405, 245-248, 1997.
- LÓPEZ, T.; LÓPEZ-COLOMÉ, A.M. and ORTEGA, A. Changes in GluR4 expression induced by metabotropic receptor activation in radial glia cultures, *Molecular Brain Research* 58 40-46, 1998.
- LÓPEZ-CÓLOME, A.M. and ROMO-DE-VIVAR, M. Serum affects the characteristics of excitatory amino acid-binding sites on Muller cells. *Neuroscience Research* 25(1):25-32, 1996.
- LUQUE, J.M. and RICHARDS, J.G. Expression of NMDA 2B receptor subunit mRNA in Bergmann glia. *Glia* 13, 228-232, 1995.

- MASU, M.; YASUTO, T.; TSUCHIDA, K.; SHIGEMOTO, R. and NAKANISHI, S. Sequence and expression of a metabotropic glutamate receptor. *Nature*, 349: 760-765, 1991.
- MATSUOKA, Y.; NISHIZAWA, K.; YANO, T.; SHIBATA, M.; ANDO, S.; TAKAHASHI, T. and INAGAKI, M. Two different protein kinases act on a different time schedule as glial filament kinases during mitosis. *EMBO Journal* 11(8):2895-902, 1992.
- McDONALD, J. W. and JOHNSTON, M. V. Physiological and patophysiological roles of excitatory amino acids during central nervous system development. *Progress in Neurobiology*, 28: 197-276, 1990.
- MELDRUM, B. Glutamate as a neurotransmitter in the brain: Review of physiology and pathology. *Journal of Nutrition*, 130: 1007-1015, 2000.
- MULKEY, R. M.; ENDO, S.; SHENOLIKAR, S. and MALENKA, R. C. Involvement of a calcineurin/inhibitor-1 phosphatase cascade in hippocampal long-term depression. *Nature*, 369: 453-508, 1994.
- MÜLLER, T.; GROSCHE, J.; OHLEMEYER, C. and KETTENMANN, H. NMDA activated currents in Bergmann glial cells. *NeuroReport* 4, 671-674, 1993.
- MÜLLER, T. and KETTENMANN, H. Physiology of Bergmann glial cells, *International Review in Neurobiology* 38 341-359, 1995.
- NAIRN, A.C.; SHENOLIKAR, S. The role of protein phosphatases in synaptic transmission, plasticity and neuronal development. *Current Opinion in Neurobiology*, 2: 296-301, 1992.
- NAKAJIMA, Y.; IWAKABE, H.; AKAZAWA, C.; NAWA, H.; SHIGEMOTO, R.; MIZUNO, N. and NAKANISHI, S. Molecular characterization of a novel retinal metabotropic glutamate receptor mGluR6 with a high agonist selectivity for L-2-amino-4-fosfanobutírico acid. *Journal Biological Chemistry*, 268: 11868-11867, 1993.
- NAKAMURA, Y.; TAKEDA, M. and NISHIMURA, T. Dynamics of bovine glial fibrillary acidic protein phosphorylation. *Neuroscience Letters* 23:205(2):91-4, 1996.

- NAKANISHI, S. Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain functions. *Science* 258: 597-603, 1992.
- NEKI, A.; OHISHI, H.; KANEKO, T.; SHIGEMOTO, R.; NAKANISHI, S and MIZUNO, N. Pre- postsynaptic localization of s metabotropic glutamate receptor, mGluR2, in the rat brain: an immunohistochemical study with a monoclonal antibody. *Neuroscience Letters*, 202: 197-200, 1996.
- NESTLER, E.J. and GREENGARD, P. Protein phosphorylation and neuronal function. In: *Basic Neurochemistry*, ed by Siegel, G.; Agranoff, B.W.; Alberts, R.W.; Molinoff, P.B., Raven Press, New York, 1994.
- NICOLETTI, F.; IADAROLA, M. J. WROBLEWSKI, J. T. and COSTA, E. Excitatory amino acid recognition sites coupled with inositol phospholipid metabolism: developmental changes and interaction with α 1-adrenoreceptors. . *Proceedings of the National Academy of Science USA* 83: 1931-1935, 1986a.
- NICOLETTI, F.; MEEK, J. L.; IADAROLA, M. J.; CHUANG, D. M.; ROTH, B. L. and COSTA E. Coupling of inositol phospholipid metabolism with excitatory amino acid recognition sites in rat hippocampus. *Journal of Neurochemistry*, 46: 40-46, 1986b.
- NICOLETTI, F., NOVELLI, A.; ALHO, H.; GUIDOTTI, A. and COSTA, E. The activation of inositol phospholipid metabolism as a signal-transduction system for excitatory amino acids in primary cultures of cerebellar granule cells. *Journal Neuroscience*, 6: 1905-1911, 1986c.
- NICOLETTI, F.; BRUNO, V.; CATANIA, M.V.; BATTAGLIA, G.; COPANI, A.; BARBAGALLO, G.; CENA, V.; SANCHEZ-PRIETO, J.; SPANO, P.F. and PIZZI, M. Group-I metabotropic glutamate receptors: hypotheses to explain their dual role in neurotoxicity and neuroprotection. *Neuropharmacology* 38(10):1477-84, 1999.
- NISHIZUKA, Y. The protein kinase C family: heterogeneity and its implications. *Annual Review Biochemistry*, 58: 31-48, 1989.
- NIXON, R.A. & SIHAG, R.K. Neurofilament phosphorylation: a new look at regulation and function. *Trends in Neurochemical Science*, 14 (11): 501-506, 1991.

- OHISHI, H.; SHIGEMOTO, R.; NAKANISHI, S. and MIZUNO, N. Distribution of the mRNA for a metabotropic glutamate receptor (mGluR3) in the rat brain: an in situ hybridization study. *Journal of Comparative Neurology* 8:335(2):252-66, 1993.
- OHISHI, H.; OGAWA-MEGURO, R.; SHIGEMOTO, R.; KANEKO, T.; NAKANISHI, S. and MIZUNO, N. Immunohistochemical localization of metabotropic glutamate receptors, mGluR2 and mGluR3, in rat cerebellar cortex. *Neuron*, 13: 55-66, 1994.
- OKAMOTO, N.; HORI, S.; AKAZAWA, C.; HAYASHI, Y.; SHIGEMOTO, R.; MIZUNO, N and NAKANISHI, S. Molecular characterization of a new metabotropic receptor mGluR7 coupled to inhibitory cyclic AMP transduction. *Journal Biological Chemistry*, 269: 1231-1236, 1994.
- ORTEGA, A.; ESHHAR, N. and TEICHBERG, V. I. Properties of kainate receptor/channels on cultured Bergmann glia, *Neuroscience* 41, 335-349, 1991.
- OZAWA, S.; KAMIYA, H. and TSUZUKI, K. Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Progress in Neurobiology* 54, 581-618, 1998.
- PASQUALOTTO, B. A. & SHAW, C. A. Regulation of ionotropic receptors by protein phosphorylation. *Biochemical Pharmacology*, 51: 1417-1425, 1996.
- PEARCE, B.; ALBRECHT, J.; MORROW, C. and MURPHY, S. Astrocyte glutamate receptor activation promotes inositol phospholipid turnover and calcium flux. *Neuroscience Letters*, 72: 335-340, 1986.
- PETRALIA, R. S.; YOKOTANI, N. and WENTHOLD, R. J. Light and electron microscope distribution of the NMDAR1 in the rat nervous system using a selective anti-peptide antibody, *Journal of Neuroscience* 14 667-696, 1994a.
- PETRALIA, R. S.; WANG, Y.X. and WENTHOLD R. J., The NMDA receptor subunits NR2A and NR2B show histological and ultrastructural localization patterns similar to those of NR1, *Journal of Neuroscience* 14 6102-6120, 1994b.

- PIN, J. P. and DUVOISIN, R. The metabotropic glutamate receptors: structure and functions. *Neuropharmacology*, 34: 1-26, 1995.
- POPE, A. Neuroglia: quantitative aspects. In *Dynamic Properties of Glia Cells* (Schoffeniels, E.; Franck, G.; Hertz, I. AND Tower, D. B.: eds) Pergamon, London pp.13-20, 1978.
- RAKIC, P. and KOMURO, H. The role of receptor/channel activity in neuronal migration. *Journal Neurobiology*, 26: 299-315, 1995.
- RAO, V. R. and MURTHY, R. Uptake and metabolism of glutamate and aspartate by astroglial and neuronal preparations of rat cerebellum. *Neurochemical Research*, vol.18, 6: 647-654, 1993.
- RÉCASSENS, M.; GUIRAMAND, J.; NOURIGAT, A.; SASSETTI, I. and DEVILLIERS, G. A new quisqualate receptor subtype (sAA2) responsible for the glutamate-induced inositol phosphate formation in rat brain synaptoneurosomes. *Neurochemistry International* 13: 463-467, 1988.
- RODNIGHT, R. and LEAL, R.B. Regional variations in protein phosphorylating activity in rat brain studied in micro-slices labeled with [³²P]phosphate. *Journal of Molecular Neuroscience*, 2: 115-122, 1990.
- RODNIGHT, R. & WOFCHUK, S.T. Roles for protein phosphorylation in synaptic transmission. *Essays in Biochemistry*, 27: 91-100, 1992.
- RODNIGHT, R.; GONÇALVES, C. A.; WOFCHUK, S. and LEAL, R. Control of the phosphorylation of astrocyte marker glial fibrillary acidic protein (GFAP) in the immature rat hippocampus by glutamate and calcium ions: possible key factor in astrocytic plasticity. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 30: 325-338, 1997.
- ROMANO, C.; SESMA, M.; McDONALD, C.; O'MALLEY, A.; VAN DEN POL, A. and OLNEY, J. Distribution of metabotropic glutamate receptor mGluR5 immunoreactivity in rat brain. *The Journal of Comparative Neurology*, 355: 455-469, 1995.
- ROMEAU, G.A.; AKANEYA, Y.; CHIU, L. and ZIFF, E.B. Role of NMDA receptor functional domains in excitatory cell death. *Neuropharmacology*, 39: 2255-2266, 2000.

- SANCHO-TELLO, M.; VALLÉS, S.; MONTOLIU, C.; RENAU-PIQUERAS, J. and GUERRI, C. Developmental pattern of GFAP and vimentin gene expression in rat brain and in radial glia cultures. *Glia* 15, 157-166, 1995.
- SAUGSTAD, J. A.; KINZIE, J. M.; MULVIHILL, E. R.; SEGERSON, T. P. and WESTBROOK, G. L. Cloning and expression of a new member of the L-2-amino-4-fosfanobutírico acidi-sensitive class of metabotropic receptors. *Molecular Pharmacology*, 45: 367-372, 1994.
- SCHLINCHTER D.J., DETRE, J.A., ASWAD, D.W., CHEHRAZI, B., GREENGARD, P. Localization of γ GMP dependent protein kinase and substrate in cerebellum. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 77: 5537-5541, 1980.
- SCHOEPP, D. and CONN, P. J. Metabotropic glutamate receptors in brain: function and pathology. *Trends in Pharmacology Science*, 14: 13-20, 1993.
- SCHOEPP DD and JOHNSON BG. Pharmacology of metabotropic glutamate receptor inhibition of cyclic AMP formation in the adult rat hippocampus. *Neurochemistry International* 22(3):277-283, 1993.
- SCHOEPP, D. Novel functions for subtypes of metabotropic glutamate receptors. *Neurochemistry International* v.24, 5: 439- 449, 1994.
- SCHOEPP, D. D.; JOHNSON, B. G.; SALHOFF, C. R.; WRIGHT, R.A.; GOLDSWORTHY, J. S. and BAKER, S.R. Second-messenger responses in brain slices to elucidate to novel glutamate receptors. *Journal Neuroscience Methods*, 59: 105-110, 1995.
- SCHMAHMANN, J.D. ed. The cerebellum and cognition. *International Review of Neurobiology* 41:433-40, 1997.
- SCHULMAN, H. Protein phosphorylation in neuronal plasticity and gene expression. *Current Opinion in Neurobiology*, 5(3): 375-381, 1995
- SEEBURG, P. H. The molecular biology of mammalian glutamate receptor -channels. *Trends Pharmacology Science*, 16: 359-365, 1993.
- SEGOVIA, G.; PORRAS, A.; DEL ARCO, A. and MORA F. Glutamatergic neurotransmission in aging: a critical perspective. *Mech Ageing Dev* 122(1):1-29, 2001.

- SERRANO, L.; HERNANDEZ, M.A.; DIAZ-NIDO, J. and AVILA, J. Association of casein kinase II with microtubules. *Experimental Cell Research* 181(1):263-272, 1989.
- SHAO, Y. and McCARTHY, K. D. Responses of Bergmann glia and granule neurons in situ to N-Methyl-D-Aspartate, Norepinephrine, and High Potassium, *Journal of Neurochemistry* 68 2405-2411, 1997.
- SILVERI, M. and MISCIAGNA, S. Language, memory, and the cerebellum. *Journal of Neurolinguistics* 13,(2-3), 129-143, 2000.
- SIM, A.T. The regulation and function of protein phosphatases in the brain. *Molecular Neurobiology* 5(2-4):229-246, 1994.
- SLADDECZEK, F.; PIN, J. P., RÉCASSENS, M.; BOCKAERT, J. and WEISS, S. Glutamate stimulates inositol phosphate formation in striatal neurones. *Nature*, 317: 717-719, 1985.
- SMIRNOVA, T.; STINNAKRE, J. and MALLET, J. Characterization of a presynaptic glutamate receptor. *Science* 15;262(5132):430-433, 1993.
- STEINERT, P. M. and ROOP, D. R. Molecular and cellular biology of intermediate filaments. *Annual Review of Biochemistry*, 57: 593-625, 1988.
- SUGIYAMA, H.; ITO, I. and HIRONO, C. A new type of glutamate receptor linked to inositol phospholipid metabolism. *Nature*, 325: 531-533, 1987.
- SUN, L.; MARGOLIS, F. L.; SHIPLEY, M.T. and LIDOW, M. S. Identification of a long variant of mRNA encoding the NR3 subunit of NMDA receptor: its regional distribution and developmental expression in the rat brain. *FEBS Letters* 441: 392-396, 1998.
- SWANSON, G.T.; FELDMEYER, D.; KANEDA, M. and CULL-CANDY, S.G. Effect of RNA editing and subunit co-assembly single-channel properties of recombinant kainate receptors. *Journal of Physiology* 1; 492 (Pt 1):129-142,1996.
- SWANSON, G.T.; KAMBOJ, S.K. and CULL-CANDY, S.G. Single-channel properties of recombinant AMPA receptors depend on RNA editing, splice

- variation, and subunit composition. *Journal of Neuroscience* 1;17(1):58-69, 1997.
- TANABE, Y.; MASU, M.; ISHII, T.; SHIGEMOTO, R. and NAKANISHI, S. A family of metabotropic glutamate receptors. *Neuron*, 8: 169-179, 1992.
- TANABE, Y.; NOMURA, A.; MASU, M.; SHIGEMOTO, R. and MIZUNO, N. Signal transduction, pharmacological properties, and expression patterns of two rat metabotropic glutamate receptors, mGluR3 and mGluR4. *Journal Neuroscience*, 13: 1372-1378, 1993.
- TSUJIMURA, K.; TANAKA, J.; ANDO, S.; MATSUOKA, Y.; KUSUBATA, M.; SUGIURA, H.; YAMAUCHI, T. and INAGAKI, M. Identification of phosphorylation sites on glial fibrillary acidic protein of cdc-2 kinase and Ca²⁺ calmodulin-dependent protein kinase II. *Journal of Biochemistry*, v.116, p.426-434, 1994.
- VECIL, G. G.; LI, P. P. and WARSH, J. J. Evidence for metabotropic excitatory amino acid receptor heterogeneity: Developmental and brain regional studies. *Journal of Neurochemistry*, 59: 252-258, 1992.
- VERKHRATSKY, A. and STEINHÄUSER, C. Ion channels in glial cells. *Brain Research Reviews*, 32: 380-412, 2000.
- VINADÉ, L. and RODNIGHT, R. The dephosphorylation of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in the immature rat hippocampus is catalyzed mainly by a type 1 protein phosphatase. *Brain Research*, 732:195-200, 1996.
- VINADÉ, L. Estudo da defosforilação da proteína ácida fibrilar glial (GFAP) em hipocampo de ratos jovens. Tese Ph.D., Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1997.
- VINADÉ, L.; GONÇALVES, C. A.; WOFCHUK, S.; GOTTFRIED, C. and RODNIGHT, R. Evidence for a role for calcium ions in the dephosphorylation of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in immature hippocampal slices and astrocyte cultures from the rat. *Development Brain Research*, 104: 11-17, 1997.
- VIOLA, H.; FURMAN, M. IZQUIERDO, L.A.; ALONSO, M.; BARROS, D.M.; DE SOUZA, M.M.; IZQUIERDO, I.I. and MEDINA, J.H. Phosphorylated cAMP response element-binding protein as molecular marker of memory

processing in rat hippocampus: effect of novelty. *Journal of Neuroscience*, 1, 20(23)RC 112, 2000.

WALAAS, S.I. and GREENGARD, P. Protein phosphorylation and neuronal function. *Pharmacological Reviews* v.43, p.299-349, 1991.

WATKINS, J.; KROGSGAARD-LARSEN, P and HONORÉ, T. Structure-activity relationships in the development of excitatory amino acid receptor agonists and competitive antagonists. *Trends in Pharmacology Science*, 11: 25-33, 1990.

WERA, S. and HEMMINGS, B.A. Serine/threonine protein phosphatases. *Biochemistry Journal* 1;311: 17-29, 1995.

WHITMARSH, A.J. and DAVIS, R.J. Regulation of transcription factor function by phosphorylation *Cell Molecular Life Science* 57(8-9):1172-1183, 2000.

WINDER, D. and CONN, J. Roles of metabotropic glutamate receptors in glial function and glial-neuronal communication. *Journal of Neuroscience Research*, 46: 131-137, 1996.

WOFCHUK, S. and RODNIGHT, R. Stimulation by glutamate of the phosphorylation of two substrates of protein kinase C, B-50 and MARCKS, and of ppH-47, a protein highly labelled in incubated slices from the hippocampus. *Neuroscience Research Communications*, 6: 135-140, 1990.

WOFCHUK, S.T.; RODNIGHT, R. Glutamate stimulates the phosphorylation of glia fibrillary acidic protein in slices of immature rat hippocampus via a metabotropic receptor. *Neurochemistry International*, 24: 517-523, 1994.

WOFCHUK, S.T.; RODNIGHT, R. Age-dependent changes in the regulation by external calcium ions of the phosphorylation of glia fibrillary acidic protein in slices of rat hippocampus. *Developmental Brain Research*, 85: 181-186, 1995.