

EXPRESIÓN DEL RECEPTOR A SEROTONINA 5A EN LA CORTEZA DEL CEREBRO DE RATAS.

Castillo Ramos N., García-Alcocer G., Rodríguez A., Román Maldonado E.E., Valencia Ojeda C., Berumen L.C.

Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Querétaro

RESUMEN

Mediante el análisis por Western Blot se realizó el estudio de la expresión del receptor 5HT_{5A} de la corteza cerebral de la rata en diferentes etapas del desarrollo, cuya expresión varía durante el desarrollo. En las etapas embrionarias permanece constante (hasta E18), y sufre un aumento en P0. A partir de los 60 días después del parto (P60) se observa un probable aumento en la glicosilación del receptor, que parece estar involucrado en la expresión del receptor.

INTRODUCCION

El neurotransmisor 5 – hidroxitriptamina (5HT, serotonina) está involucrado en varias funciones fisiológicas y del comportamiento incluyendo el sueño, apetito, movimiento, percepción del dolor, actividad sexual y contracción vascular.

La familia de receptores 5HT₅ posee dos miembros: 5HT_{5A} y 5HT_{5B}, los cuales fueron identificados en rata y ratón (Matthes et al., 1993, Erlander et al., 1993). En humanos solo se ha clonado la forma 5HT_{5A}, y se ha sugerido que el receptor 5HT_{5B} no existe en humanos debido a que posee un codón de término que interrumpe el gen (Rees et al., 1994).

Muchas proteínas están sujetas a modificaciones post-traduccionales las cuales consisten en muchos casos, a la adición de oligosacáridos. La mayor parte de estas proteínas están glicosiladas en residuos de asparagina generando N-Glicosilación. La característica y/o funcionalidad de esta glicosilación puede tratarse de la focalización de las proteínas dentro la célula (Wheatley y Hawtin, 1999; Duvernay et al., 2005), garantizar la conformación funcional de la proteína (Parodi, 2000), o marcar las proteínas para su degradación (Lederkremer y Glickman, 2005). Se ha reportado la presencia de receptor 5HT_{5A} glicosilado y la presencia del oligosacárido modifica la expresión de este receptor y su localización en la membrana citoplasmática.

PROCEDIMIENTO

Obtención de la proteína

Para las etapas embrionarias se utilizaron tres camadas completas de ratas (embriones de 14, 16 y 18 días de gestación). Para las muestras post-natales se requirió la corteza cerebral de tres ratas por edad (0, 7, 12, 21, 60, 120 días de edad). Todas las muestras fueron homogenizadas con amortiguador de Tris para lisar las células y extraer la proteína.

Electroforesis SDS-PAGE y Western Blot

Las alícuotas de proteína de cada una de las etapas de desarrollo fueron suspendidas en amortiguador Tris-HCl 0.5M, 10% SDS, pH 6.8, en condiciones reductoras (BME 5%). La

separación por electroforesis fue en acrilamida al 10% a 150V, en Buffer pH 8.3 (Glicina, Tris-base, SDS). Los geles se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa a 200 mA, en Buffer de transferencia (Tris-base, metanol, glicina).

Después de la transferencia, se realizaron a las membranas tres lavados con PBS, para posteriormente bloquearlas con una solución al 3 % de leche durante una hora. Los lavados posteriores se realizaron con PBT al igual que la dilución del anticuerpo anti-5HT_{5A} de conejo (1:4000, 5µl/20ml de PBT) por 18 hrs. Se enjuagaron nuevamente con PBT e incubaron por 2 horas con el anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con peróxidas (1:4000, 5µl/20ml PBT). Las membranas fueron reveladas en placas fotográficas Kodac, utilizando ECL como sustrato para la reacción luminiscente.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

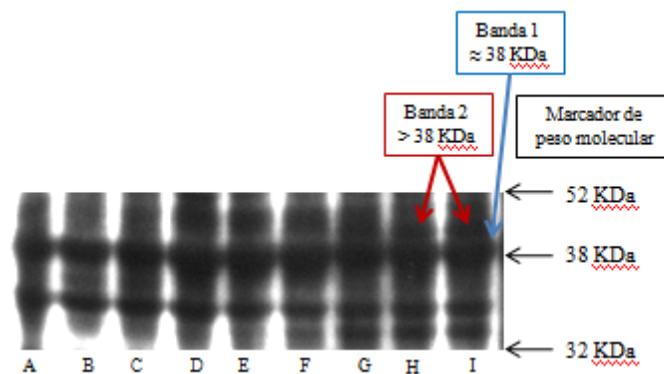


Figura 1. Resultado de SDS – PAGE/Western Blot. Las columnas A, B y C corresponden a las etapas embrionarias de 14, 16 y 18 días respectivamente (E14, E16, E18), en todas se observa una banda de ≈ 38 KDa (Banda 1) que corresponde al receptor 5HT_{5A}. Las columnas D, E, F, G, H e I representan las células de la corteza cerebral de las ratas de las etapas post-embriónicas 0, 7, 12, 21, 60 y 120 (P0, P12, P21, P60, P120). A partir de P0 se observa que la banda se vuelve mas intensa la señal (mayor grosor) hasta P12, y el grosor disminuye en P21. A los 60 y 120 días después del nacimiento se observa una banda de menor intensidad de $\approx 38 - 52$ KDa, que corresponde al receptor glicosilado. Las bandas de menor peso molecular (32 – 38 KDa) representan proteina degradada. El marcador de pesos molecular esta indicado con las flechas, los pesos correspondientes están escritos a la derecha.

En el análisis SDS – PAGE/Western blot se observa una banda gruesa de ≈ 38 KDa (32-52) en todas las muestras (figura 1 banda 1), la cual correspondería al receptor de serotonina 5A, aunque el peso esperado de nuestra proteína es de 41 KDa (Oliver et al., 2000), el anticuerpo utilizado es específico para 5HT_{5A} y otros autores reportan el peso del receptor entre 35 – 45 KDa (Dutton et al., 2007), nuestra banda entra en ese peso, por lo cual podemos aludir que corresponde al receptor. Ahora bien, se observa una banda de menor intensidad con un peso de $\approx 38 - 52$ KDa (de mayor peso que nuestro receptor) en las muestras P60 y P120 (columna H e I, figura 1, banda 2) la cual correspondería al receptor glicosilado cuyo peso reportado es de $\approx 45 - 55$ KDa (Dutton et al., 2007), como ya se mencionó el anticuerpo utilizado es específico para 5HT_{5A} y

nuevamente existe correspondencia entre el peso obtenido y el esperado, por lo cual se puede suponer que corresponde al receptor glicosilado.

Las bandas de menor peso molecular ($\approx 32 - 38$) que se observan corresponden a proteína degradada.

El receptor 5HT_{5A} se presenta en etapas muy tempranas del desarrollo de las ratas (García et al., 2006, Carson et al., 1996) ya que las muestras correspondientes a E14, E16, E18 (Figura 1, banda 1) presentan expresión del receptor, lo cual indica que podría estar involucrado en el desarrollo del cerebro de las ratas (Carson et al., 1996). La expresión de la proteína parece mantenerse constante durante las etapas embrionarias mas al momento del parto (P0, figura 1, columna D, banda 1) se observa un aumento en la expresión del receptor y parece mantenerse aproximadamente constante hasta P12 (figura 1, banda 1, columna F).

El pico de la expresión del receptor se alcanza a los P20 (Carson et al., 1996) de acuerdo al análisis de mRNA del receptor, esto no corresponde con los resultados obtenidos, ya que se observa una disminución en la proteína a los 21 días después del parto (figura 1, columna G, banda 1). Sin embargo se observa un aumento en la cantidad de proteína degradada (figura 1, bandas de menor peso molecular).

En los días post natales de 60 y 120 días (figura 1, banda 1) parece mantenerse la misma cantidad de proteína (comparando solo ambas columnas), aunque lo esperado sería lo contrario (mayor expresión en P120) ya que la glicosilación del receptor estimula la expresión del receptor en la membrana (Dutton et al., 2007), en donde sí se observa un aumento es en la proteína degradada en P120 (en comparación con P60, figura 1 bandas de menor peso molecular). Ahora bien a los 60 y 120 días después del parto nuevamente se observa un aumento (en comparación con el resto de las muestras) tanto en la proteína entera como en la degradada. Esto también contradice los reportes por parte de Carson y col. (1996), el pico no se mantiene durante las etapas posteriores ya que en P60 y 120 nuevamente aumenta, también se observa una banda de mayor peso molecular que correspondería al receptor glicosilado (figura 1, columna H e I, banda 2). La glicosilacion parece aumentar la expresión de la proteína a nivel de la membrana (Dutton et al., 2007), esto apoya los resultados obtenidos, ya se incrementa la expresión del receptor, así como la proteína degradada.

CONCLUSIONES

El receptor 5HT_{5A} puede estar involucrado en el desarrollo cerebral ya que se presenta en las etapas embrionarias desde el día 14. La forma glicosilada del receptor a serotonina 5A, solo se presenta a partir 60 días después del parto y parece estar involucrada en la expresión del receptor, ya que este se incrementa a partir de su aparición.

BIBLIOGRAFÍA

Alice C. Dutton, Andrew N. Massoura, Terri J. Dover, Nick A. Andrews, Nicholas M. Barnes. Identification and functional significance of N-glycosylation of the 5-HT_{5A} receptor. ScienceDirect, Neurochemistry International 52 (2008) 419 – 425

Guadalupe García Alcocer, Gabriela Sarabia Altamirano, Ataúlfo Martínez-Torres, Ricardo Miledi. Developmental expression of 5-HT_{5A} receptor mRNA in the rat brain. *Neuroscience Letters* 379 (2006) 101-105

H. Matthes, U. Boschert, N. Amlaiky, R. Grailhe, J.L. Plassat, F. Muscatelli, M.G. Mattei, R. Hen, Mouse 5-hydroxytryptamine 5A and 5-hydroxytryptamine 5B receptors define a new family of serotonin receptors: cloning, functional expression, and chromosomal localization, *Mol. Pharmacol.* 43 (1993) 313–319.

M.G. Erlander, T.W. Lovenberg, B.M. Baron, L. De-Lecea, P.E. Danielson, M. Racke, A.L. Slone, B.W. Siegel, P.E. Foye, K. Cannon, J.E. Burns, J.G. Sutcliffe, Two members of a distinct subfamily of 5-hydroxytryptamine receptors differentially expressed in rat brain, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 (1993) 3452–3456.

Monica J. Carson, Elizabeth A. Thomas, Patria E. Danielson, J. Gregor Sutcliffe. The 5HT_{5A} serotonin receptor is expressed predominantly by astrocytes in which it inhibits cAMP accumulation: A mechanism for neuronal suppression of reactive astrocytes. *Glia* 17 (1996) 317 – 326.

S. Rees, D. Den, S. Foord, S. Goodson, D. Bull, G. Kilpatrick, M. Lee, Cloning and characterisation of the human 5-HT_(5A) serotonin, *FEBS Lett.* 355 (1994) 242–246.

K.R. Oliver, A.M. Kinsey, A. Wainwright, D.J.S. Sirinathsinghji. Localization of 5-HT_{5A} receptor-like immunoreactivity in the rat brain. *Brain Research* 867 (2000) 131 – 142.