

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular



**MECANISMOS MODULADORES DE LA LIBERACIÓN
DE GLUTAMATO EN CONTEZA CEREBRAL: IMAGEN
DE CALCIO DE TERMINALES SINÁPTICOS**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

Carmelo Millán Adán

Bajo la dirección del Doctor:

José Sánchez-Prieto Borja

Madrid, 2003

ISBN: 84-669-2125-7

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR



**MECANISMOS MODULADORES DE LA LIBERACIÓN DE
GLUTAMATO EN CORTEZA CEREBRAL: IMAGEN DE CALCIO DE
TERMINALES SINÁPTICOS**

Tesis Doctoral
Carmelo Millán Adán
Madrid, 2003

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

**MECANISMOS MODULADORES DE LA LIBERACIÓN DE
GLUTAMATO EN CORTEZA CEREBRAL: IMAGEN DE CALCIO DE
TERMINALES SINÁPTICOS**

**Memoria presentada por Carmelo Millán Adán para
optar al grado de Doctor
Director de Tesis: Dr. José Sánchez-Prieto Borja
Madrid, 2003**

Vº Bº Director

José Sánchez-Prieto Borja

**A mis padres
y hermanos**

AGRADECIMIENTOS

Ante todo quiero expresar mi agradecimiento al Doctor José Sánchez-Prieto, director de esta Tesis Doctoral, por su dedicación y entusiasmo en el trabajo diario y por compartir conmigo sus conocimientos y su pasión por la investigación.

Quiero igualmente agradecer a la Doctora María Teresa Miras-Portugal, Catedrática del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular IV, la oportunidad que me brindó al acogerme en el Departamento, haciendo posible mi contacto con el mundo de la investigación básica y la Neurociencia.

A las Doctoras Esmerilda García Delicado, María Dolores Fideu, Raquel Pérez Sen y Magdalena Torres, y al Doctor Jesús Pintor, les agradezco el cariño y el apoyo recibido a lo largo de estos años. Al Doctor Enrique Castro quiero expresar mi admiración y mi agradecimiento por sus enseñanzas referentes a aspectos técnicos e informáticos, así como por su talante siempre generoso y estimulante.

A mis compañeros Ana, Cristina, Diana, Elena, Henar, Javier, Jesús, Lisandro, Luz M^a, Maika, Marta, Miguel, Patricia, Ricardo, Rosa, Rut, Rut “bis”, Sandra y Sandra “bis”, les agradezco su actitud de buenos compañeros, su ayuda desinteresada siempre que la pedí y su paciencia conmigo.

Quiero asimismo agradecer el trabajo de los miembros del personal laboral del laboratorio, M^a Carmen, M^a Jesús, M^a Dolores, Julia, Gloria, Juani y Olga.

A todos, gracias.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
RECEPTORES METABOTRÓPICOS DE GLUTAMATO	2
Estructura molecular.....	3
Receptores metabotrópicos de los grupos I y II	5
-Localización	5
-Farmacología.....	7
-Mecanismos de transducción	7
-Papel fisiológico.....	9
Receptores metabotrópicos del grupo III.....	10
-Localización	10
-Farmacología.....	12
-Mecanismos de transducción	12
-Papel fisiológico.....	15
MODULACIÓN DE LA LIBERACIÓN DE GLUTAMATO POR LA ACTIVACIÓN DE LAS PROTEÍNAS QUINASAS A Y C.....	17
Proteína quinasa C	17
Vía de adenilato ciclasa/AMPC/proteína quinasa A	19
EL SINAPTOSOMA COMO MODELO DE SINAPSIS IN VITRO.....	20
II. OBJETIVOS	24
III. MATERIALES Y MÉTODOS	26
MATERIAL	27
Material biológico	27
Productos	27
Aparatos.....	28

MÉTODOS.....	30
Obtención de sinaptosomas	30
Determinación de proteínas	32
Métodos para inducir la despolarización del terminal sináptico “in vitro”	32
-Despolarización inducida por KCl	33
-Despolarización inducida por 4-aminopiridina	34
Determinación de la liberación de glutamato	35
Determinación fluorimétrica de la concentración intracelular de calcio libre en la población de sinaptosomas	36
Determinación de los niveles intrasinaptosomales de AMPc.....	37
Imagen de calcio.....	39
Inmunocitoquímica.....	40
Determinación del potencial de membrana sinaptosomal	41
IV. RESULTADOS.....	43
MODULACIÓN DE LA LIBERACIÓN DE GLUTAMATO POR RECEPTORES METABOTRÓPICOS DEL GRUPO III EN CORTEZA CEREBRAL DE RATAS ADULTAS	44
L-AP4 reduce, a altas concentraciones, la liberación de glutamato en terminales sinápticos de corteza cerebral de ratas adultas (2-3 meses).....	45
La inhibición de la liberación de glutamato producida por L-AP4 no se debe a una disminución de los niveles intracelulares de AMPc.....	48
La inhibición de la liberación producida por L-AP4 se debe a una reducción de la actividad de los canales de calcio dependientes de voltaje del tipo N	49
Los canales de calcio de los tipos N y P/Q presentan un diferente acoplamiento a la exocitosis de glutamato en corteza cerebral de ratas adultas.....	52
La activación de proteína quinasa C y proteína quinasa A suprime la inhibición de la liberación de glutamato producida por L-AP4	54
L-AP4 sí reduce los niveles de AMPc aumentados tras la activación de la adenilato ciclasa	55

Repercusión funcional de la reducción de los niveles de AMPc sobre la liberación de glutamato	56
L-AP4 reduce drásticamente la entrada de Ca^{2+} en una subpoblación de terminales sinápticos	58
Los efectos de L-AP4 en ratas adultas están mediados por receptores metabotrópicos del tipo 7	63
Contenido relativo de terminales glutamatérgicos y GABAérgicos en la preparación de sinaptosomas de corteza cerebral de ratas adultas	63
Los canales de calcio de los tipos N y P/Q no coexisten en terminales sinápticos cerebrocorticales de ratas adultas	66
Los receptores glutamatérgicos de baja afinidad por L-AP4 se localizan casi exclusivamente en terminales que expresan canales de calcio del tipo N.....	66
RECEPTORES METABOTRÓPICOS DE GLUTAMATO DEL GRUPO III EN CORTEZA CEREBRAL DE RATAS JÓVENES	69
Los terminales cerebrocorticales de ratas jóvenes presentan receptores de alta y de baja afinidad por L-AP4	69
Los efectos de L-AP4 en ratas jóvenes están mediados principalmente por receptores del tipo 7 y del tipo 4.....	70
Contenido relativo de terminales glutamatérgicos y GABAérgicos en la preparación de sinaptosomas de corteza cerebral de ratas jóvenes	70
En sinaptosomas de ratas jóvenes L-AP4 sólo inhibe el componente de liberación asociado a canales de Ca^{2+} del tipo N a concentraciones fisiológicas de Ca^{2+}	73
Los canales de calcio de tipo N y P/Q presentan un diferente acoplamiento a la exocitosis de glutamato en corteza cerebral de ratas jóvenes.....	75
L-AP4 inhibe el componente de liberación asociado a canales del tipo P/Q a bajas concentraciones de calcio extracelular	75
La aplicación de L-AP4 a altas y bajas concentraciones reduce las respuestas de Ca^{2+} en dos subpoblaciones diferentes de terminales sinápticos.....	78
Los canales de calcio dependientes de voltaje de tipo N y P/Q coexisten en una fracción de terminales de corteza cerebral de ratas jóvenes.....	80
Los canales de calcio dependientes de voltaje del tipo L se expresan de forma minoritaria en terminales sinápticos de corteza cerebral.....	80

En ratas jóvenes los receptores glutamatérgicos del grupo III se localizan preferentemente en terminales con una determinada distribución de canales de Ca ²⁺	83
EFFECTOS DE LA ACTIVACIÓN SIMULTÁNEA DE LAS PROTEÍNAS QUINASAS A Y C SOBRE LA LIBERACIÓN DE GLUTAMATO EN TERMINALES CEREBROCORTICALES.....	86
La activación de la proteína quinasa C potencia la liberación espontánea de glutamato inducida por proteína quinasa A.....	86
La liberación espontánea inducida por forskolina y PDBu no depende de un incremento en el número de sitios de liberación	88
La liberación inducida por forskolina y PDBu depende de la actividad de canales de Ca ²⁺ dependientes de voltaje, pero sólo parcialmente de la génesis de potenciales de acción.....	90
El efecto de forskolina y PDBu sobre la liberación espontánea de glutamato depende en parte de una modulación directa de canales de Ca ²⁺ dependientes de voltaje	91
Forskolina y PDBu estimulan la liberación de glutamato por una acción directa sobre la maquinaria exocitótica	95
 V. DISCUSIÓN.....	 98
VALIDEZ DE LA PREPARACIÓN DE SINAPTOSOMAS PARA EL ESTUDIO DE MECANISMOS PRESINÁPTICOS.....	99
MODULACIÓN DE LA LIBERACIÓN DE GLUTAMATO POR RECEPTORES METABOTRÓPICOS DEL GRUPO III EN CORTEZA CEREBRAL DE RATAS ADULTAS	100
Identidad del receptor	100
Mecanismo de acción	101
Repercusión funcional del acoplamiento negativo de los receptores metabotrópicos del grupo III a la vía de señalización de adenilato ciclasa/AMPC.....	102
MODULACIÓN DE LA LIBERACIÓN DE GLUTAMATO POR RECEPTORES METABOTRÓPICOS DEL GRUPO III EN CORTEZA CEREBRAL DE RATAS JÓVENES.....	104
Identidad del receptor	104
Mecanismo de acción	105

CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN DE LOS CANALES DE CALCIO DEPENDIENTES DE VOLTAJE CON EL DESARROLLO	108
COLOCALIZACIÓN ESPECÍFICA DE LOS RECEPTORES METABOTRÓPICOS DEL GRUPO III Y DE LOS CANALES DE CALCIO DEPENDIENTES DE VOLTAJE EN TERMINALES SINÁPTICOS.....	110
VI. CONCLUSIONES.....	113
VII. BIBLIOGRAFÍA	116

ABREVIATURAS

ACPD	ácido aminociclopentano-1,3-dicarboxílico
ACPT-I	ácido (1S,3R,4S)-1-aminociclopentano-1,3,4-tricarboxílico
ADA	adenosina desaminasa
t-ADA	trans-azetidina-2,4-dicarboxilato
ω-Aga-IVA	ω -agatoxina-IVA
AIDA	ácido 1-aminoindan-1,5-dicarboxílico
AMPA	ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilisoxazolil-4-propiónico
AMPc	adenosina-3':5'-monofosfato cíclico
4AP	4-aminopiridina
L-AP4	ácido L-2-amino-4-fosfonobutírico
APDC	ácido 2R,4R-4-aminopirrolidina-2,4-dicarboxílico
BSA	albúmina de suero bovino
CBPG	(S)-(+)-2-(3'-carboxibiciclopentil)glicina
L-CCG-I	(2S,1'S,2'S)-2-(carboxiciclopropil)glicina
ω-CgT-GVIA	ω -conotoxina-GVIA
ω-CgT-MVIIC	ω -conotoxina-MVIIC
CPCCOEt	7-hidroximino-ciclopropa[b]cromeno-1a-carboxilato
CPPG	(RS)- α -ciclopropil-4-fosfonofenilglicina
cols.	colaboradores
DAG	diacilglicerol
DCG-IV	(2S,1'R,2'R,3'R)-2-(2,3-dicarboxiciclopropil)glicina
DCPG	(S)-3,4-dicarboxifenilglicina
DHPG	3,5-dihidroxifenilglicina
DiSC₃(5)	ioduro de 3,3'-dipropiltiodicarbocianina
DTT	ditiotreitól
EC₅₀	concentración de agonista que produce el 50% del efecto máximo
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
EGTA	ácido etilenglicol-bis(β -aminoetil éter)- N, N, N', N'-tetraacético
Fura 2-AM	fura-2-penta(acetoximetil)éster

GABA	ácido γ -aminobutírico
GAD	glutamato descarboxilasa
GDH	glutamato deshidrogenasa
GMPc	guanosina-3':5'-monofosfato cíclico
H-89	N-[2-((<i>p</i> -bromocinamil)amino)etil]-5-isoquinolinesulfonamida
HBM	medio tampón HEPES
HEPES	ácido 4-(2-hidroxiethyl)-1-piperazinetil sulfónico
3-HPG	3-hidroxifenilglicina
4C3-HPG	4-carboxi-3-hidroxifenilglicina
IBMX	3-isobutilmetilxantina
IP₃	inositol 1,4,5-trifosfato
KCl	cloruro potásico
LTD	depresión duradera
LTP	potenciación duradera
MCCG-I	α -metil-(2S,1'S,2'S)-2-(carboxiciclopropil)glicina
MCPG	α -metil-4-carboxifenilglicina
mGluR	receptor metabotrópico de glutamato
MPEP	2-metil-6-(feniletinil)piridina
MPPG	α -metil-4-fosfonofenilglicina
NADP	forma oxidada del dinucleótido de nicotinamida adenina fosfato
NADPH	forma reducida del dinucleótido de nicotinamida adenina fosfato
NMDA	ácido N-metil-D-aspartico
PCCG-IV	(2S,1'S,2'S,3'R)-2-(2'-carboxi-3'-fenilciclopropil)glicina
PDBu	4- β -forbol-12,13-dibutirato
α-PDD	4- α -forbol-12,13-dibutirato
PIPES	ácido 1,4-piperazindietil sulfónico
PKA	proteína quinasa A
PKC	proteína quinasa C
PLC	fosfolipasa C
PTx	toxina pertúsica
SDS	dodecilsulfato sódico
L-SOP	O-fosfo-L-serina
Sp-8-Br-cAMPS	8-bromoadenosina-3'-5'-monofosforotioato cíclico

TEA	tetraetilamonio
TES	2-[[2-hidroxi-1,1 bis(hidroximetil)etil]amino}etanosulfónico
TRIS	tris(hidroximetil)aminometano
TTx	tetrodotoxina

I. INTRODUCCIÓN

Las sinapsis glutamatérgicas constituyen el sistema de neurotransmisión excitatoria rápida más abundante en el Sistema Nervioso Central de los mamíferos. En los últimos años se ha producido un avance espectacular en el conocimiento molecular, bioquímico, farmacológico y funcional de estas sinapsis, cuyo interés obedece fundamentalmente a dos razones. Por un lado, porque cambios duraderos en la eficacia de la transmisión glutamatérgica constituyen un aspecto esencial en los fenómenos de plasticidad sináptica y en los procesos de aprendizaje y memoria cerebrales. En segundo lugar, porque una elevación anormal de la concentración de glutamato en la sinapsis es la causa de la degeneración y muerte neuronal asociada a determinadas patologías, tanto de aparición aguda, como las derivadas de situaciones de hipoglucemia, hipoxia e isquemia cerebrales, como de evolución crónica, asociadas a algunos procesos neurodegenerativos (enfermedades de Alzheimer, Parkinson y Huntington).

Para el desarrollo de sus funciones el glutamato interacciona con diferentes tipos de receptores, que han sido clasificados en base a sus características farmacológicas, electrofisiológicas y bioquímicas en dos grupos, ionotrópicos y metabotrópicos.

Los receptores ionotrópicos están constituidos por canales catiónicos y se clasifican, en función de su ligando específico, en receptores sensibles a N-metil-D-aspartato (receptores NMDA), receptores sensibles a α -amino-3-hidroxi-5metilisoxazolil-4-propionato (receptores AMPA) y receptores sensibles a kainato (receptores de kainato). La localización subcelular de los receptores NMDA y AMPA es fundamentalmente postsináptica, mientras que los de kainato se localizan tanto a nivel postsináptico como presináptico. Los receptores AMPA activan canales iónicos permeables a Na^+ y K^+ y en algunos casos a Ca^{2+} , e intervienen principalmente en la transmisión glutamatérgica rápida. Los receptores NMDA, por su parte, activan canales permeables tanto a Na^+ y K^+ como a Ca^{2+} , y parecen tener un papel más especializado en los procesos de plasticidad neuronal. El papel fisiológico de los receptores de kainato es menos conocido, aunque se sospecha que podrían estar implicados, a nivel presináptico, en la modulación de la transmisión GABAérgica.

Los receptores metabotrópicos de glutamato constituyen un conjunto de receptores acoplados a proteínas G que realizan sus funciones, bien a través de la modulación de la producción de segundos mensajeros intracelulares y de la regulación de la fosforilación de proteínas, o bien a través de la modulación directa de canales de Ca^{2+} o K^+ .

En esta Tesis Doctoral hemos empleado la preparación de terminales sinápticos (sinaptosomas) para estudiar algunos aspectos de la modulación de la transmisión glutamatérgica a nivel presináptico, centrándonos principalmente en el estudio del control de la liberación de glutamato por autorreceptores metabotrópicos del grupo III. En este sentido hemos observado que la activación de estos receptores provoca una inhibición de la liberación de glutamato a través de una reducción en la actividad de los canales de calcio dependientes de voltaje, por un mecanismo limitado de membrana que depende de la activación de proteínas G de tipo Gi/Go. Además, estos receptores reducen los niveles intracelulares de AMPc en aquellas situaciones en las que existe una activación previa de la adenilato ciclasa, como ocurre tras la activación de receptores β -adrenérgicos. De esta manera, la reducción de los niveles de AMPc se traduce en la supresión de la liberación espontánea de glutamato inducida por los receptores β -adrenérgicos. Mediante el empleo de técnicas de imagen de Ca^{2+} de sinaptosomas individuales hemos observado que la expresión de los receptores del grupo III se encuentra restringida a una subpoblación de terminales cerebrocorticales donde inhiben de forma drástica la entrada de calcio en respuesta a un estímulo despolarizante y hemos identificado inmunocitoquímicamente los subtipos de receptores responsables de esta respuesta. Además, hemos estudiado el grado de coexistencia de los canales de calcio dependientes de voltaje de tipo N y P/Q en un mismo terminal sináptico, su grado de acoplamiento a la liberación de glutamato y los cambios en su expresión con el desarrollo. Por último, hemos observado la existencia de una colocalización preferencial de determinados tipos de canales de calcio con determinados subtipos de receptores glutamatérgicos.

RECEPTORES METABOTRÓPICOS DE GLUTAMATO

Durante mucho tiempo se pensó que la transmisión glutamatérgica estaba mediada únicamente por receptores ionotrópicos. Sin embargo, en 1985, Sladeczek y colaboradores demostraron la presencia, en cultivos neuronales de estriado, de receptores de glutamato insensibles a AMPA, kainato y NMDA, y que estimulaban la actividad de fosfolipasa C y la formación de inositol trifosfato (IP_3) a través de la activación de proteínas G. Poco después se observaron efectos similares en rodajas de

hipocampo (Nicoletti y cols., 1986a, b), en cultivos de células granulares de cerebelo (Nicoletti y cols., 1986c) y en cultivos de astrocitos (Pearce y cols., 1986). Estos hallazgos llevaron al clonaje en 1991 del primer receptor metabotrópico de glutamato (mGluR1) (Masu y cols., 1991; Houamed y cols., 1991) y en un breve período de tiempo al del resto de los mGluRs (Tanabe y cols., 1992; Abe y cols., 1992; Nakajima y cols., 1993; Saugstad y cols., 1994, 1997; Okamoto y cols., 1994; Flor y cols., 1995; Duvoisin y cols., 1995).

Los receptores metabotrópicos de glutamato (mGluR) se dividen en 3 grupos en función de la homología de su secuencia de aminoácidos, su farmacología y la vía de transducción de señales que activan. Los receptores del grupo I estimulan la actividad de fosfolipasa C y la hidrólisis de fosfoinosítidos, promoviendo la formación de diacilglicerol e IP₃ (Manzoni y cols. 1990; Schoepp y cols., 1990), con la consiguiente activación de proteína quinasa C e incremento en la liberación de Ca²⁺ desde los compartimentos intracelulares, respectivamente. Este grupo está integrado por los receptores mGluR1 y mGluR5, que a su vez presentan variantes de procesamiento alternativo denominadas 1a, 1b, 1c y 1d (Pin y cols., 1992; Mary y cols., 1997), y 5a y 5b (Minakami y cols., 1995). El grupo II está integrado por los receptores mGluR2 y mGluR3, mientras que el grupo III comprende los subtipos mGluR4, mGluR6 mGluR7 y mGluR8. Con excepción de mGluR6, todos los subtipos del grupo III presentan dos variantes de procesamiento alternativo (mGluR4a y 4b, 7a y 7b y 8a y 8b) (Thomsen y cols., 1997; Flor y cols., 1997; Corti y cols., 1998), si bien la existencia de la isoforma 4b es actualmente cuestionada (Corti y cols., 2002). Tanto los receptores del grupo II como los del grupo III están acoplados negativamente a adenilato ciclasa y, por tanto, a la reducción de los niveles de AMPc (Conn y Pin, 1997).

Estructura molecular

Los receptores metabotrópicos de glutamato presentan una secuencia de aminoácidos bastante similar (70% de homología dentro del mismo grupo, 40-45% entre los diferentes grupos), pero carecen de homología con otros receptores acoplados a proteínas G, por lo que desde el punto de vista genético se les considera una familia de receptores independiente, que ha sido clasificada como familia C ó 3 (Bockaert y Pin, 1999). Esta familia incluye también al receptor metabotrópico de GABA (GABA_B)

(Couve y cols., 2000), y a ciertos receptores sensibles a Ca^{2+} extracelular (Brown y cols., 1993; Brown y McLeod, 2001) y a feromonas (Matsunami y Buck, 1997; Herrada y Dulac, 1997).

Desde el punto de vista estructural, estos receptores se caracterizan por presentar un largo dominio aminoterminal extracelular de unos 600 aminoácidos, siete dominios transmembrana, característicos de todos los receptores acoplados a proteínas G, y un dominio carboxiterminal intracelular, de longitud variable y peor conservado entre los diferentes grupos. La zona de unión de glutamato se localiza en la región aminoterminal (Takahashi y cols., 1993; O'Hara y cols., 1993; Tones y cols., 1995; Okamoto y cols., 1998). Según el modelo propuesto por O'Hara esta región forma dos lóbulos globulares con una zona central que actúa como bisagra, por donde se une el neurotransmisor. La unión de glutamato provoca el cierre de los lóbulos en torno al ligando, pasando el receptor de una conformación "abierta" a una conformación "cerrada". Este modelo ha sido confirmado por trabajos realizados con quimeras del receptor (Tones y cols., 1995), y por estudios de cristalografía con rayos X (Kunishima y cols., 2000; Tsuchiya y cols., 2002), habiéndose propuesto un modelo similar para otros receptores de la familia C, como GABA_B (Gálvez y cols., 1999), y para los receptores ionotrópicos de glutamato (Stern-Bach y cols., 1994; Kuusinen y cols., 1995), que exhibirían, por tanto, una estructura similar a la de los receptores metabotrópicos para el sitio de reconocimiento del agonista.

La región aminoterminal presenta, además, 4 sitios de glicosilación, así como 19 residuos de cisteína altamente conservados, que podrían estar implicados en la conformación tridimensional del receptor, al posibilitar la formación de puentes disulfuro intramoleculares, y en la dimerización de los receptores de tipo 1 y de tipo 5 (Romano y cols., 1995, 2001; Robins y cols., 1999; Tsuji y cols., 2000).

Los 7 dominios transmembrana se encuentran conectados por 3 bucles intracelulares y 3 extracelulares. Mediante estudios con receptores quimera se ha observado que el segundo bucle intracelular (i2) es el responsable del reconocimiento selectivo de la subunidad α de la proteína G (Pin y cols., 1994; Gomeza y cols., 1996), aunque el resto de los bucles intracelulares y el dominio C-terminal están también implicados en la eficacia del acoplamiento del receptor a la proteína (Gabellini y cols., 1993; Pin y cols., 1994; Gomeza y cols., 1996).

El dominio C-terminal es la región más variable entre los diferentes receptores metabotrópicos, y su región central parece desempeñar un papel esencial en la localización subcelular de los mGluRs, ya que inserciones o eliminaciones de determinadas secuencias en esta región modifican el destino final del receptor (Stowell y Craig, 1999). El extremo C-terminal presenta además sitios de interacción con múltiples proteínas que regulan la localización sináptica y las propiedades funcionales del receptor, como PICK1 (El Far y cols., 2000; Dev y cols., 2000, 2001; Boudin y cols., 2000), Homer (Brakeman y cols., 1997; Xiao y cols., 1998) y calmodulina (Minakami y cols., 1997; O'Connor y cols., 1999; Nakajima y cols., 1999), así como sitios de fosforilación para proteína quinasa A (Cai y cols., 2001) y para proteína quinasa C (Gereau y Heinemann, 1998; Nakajima y cols., 1999; Dev y cols., 2000; Airas y cols., 2001).

Receptores metabotrópicos de los grupos I y II

-Localización

Los receptores metabotrópicos del grupo I se expresan en diferentes regiones cerebrales, entre las que destacan hipocampo, corteza cerebral, tálamo, hipotálamo y cerebelo (Shigemoto y cols., 1993; Gorcs y cols., 1993; Grandes y cols., 1994; Fotuhi y cols., 1994; Romano y cols., 1995; Luján y cols., 1996; Petralia y cols., 1997; Mateos y cols., 1998a; Liu y cols., 1998). En corteza cerebral mGluR5 se expresa en todas las capas corticales, principalmente a nivel de las células piramidales (Shigemoto y cols., 1993; López-Bendito y cols., 2002), mientras que la presencia de mGluR1 se encuentra restringida a una subpoblación de interneuronas GABAérgicas (Stinehelfer y cols., 2000; López-Bendito y cols., 2002). mGluR1 es muy abundante en cerebelo, detectándose en células granulares, de Golgi, de Purkinje y de Lugaro (Grandes y cols., 1994; Berthele y cols., 1999; Mateos y cols., 2000), mientras que la expresión de mGluR5, más reducida, se detecta en las células de Golgi y de Lugaro (Negyessy y cols., 1997; Berthele y cols., 1999). En hipocampo mGluR1 se expresa en giro dentado y CA3 (Fotuhi y cols., 1994), estando ausente en CA1, donde únicamente se detecta mGluR5 (Fotuhi y cols., 1994; Luján y cols., 1996).

En cuanto a su localización subcelular, los mGluRs del grupo I se expresan tanto a nivel postsináptico como presináptico. Las evidencias inmunocitoquímicas de localización presináptica son relativamente escasas, habiéndose detectado mGluR1 en hipocampo (Fotuhi y cols., 1993) y sustancia nigra (Wittmann y cols., 2001b) y mGluR5 en hipocampo y corteza cerebral (Romano y cols., 1995). Esta escasez de datos inmunocitoquímicos contrasta, sin embargo, con la abundancia de datos bioquímicos y electrofisiológicos que sugieren un papel de estos receptores en la modulación de la transmisión sináptica y de la liberación de glutamato a nivel presináptico (Herrero y cols., 1992, 1994, 1998; Gereau y Conn, 1995; Manzoni y Bockaert, 1995; Rodríguez-Moreno y cols., 1998; Cochilla y Alford, 1998; Sistiaga y Sánchez-Prieto, 2000a,b; Schwartz y Alford, 2000).

La localización postsináptica de los receptores del grupo I sí ha sido confirmada, sin embargo, por numerosos estudios inmunocitoquímicos (Gores y cols., 1993; Baude y cols., 1993; Shigemoto y cols., 1993; Hamori y cols., 1996; Luján y cols., 1996, 1997; Petralia y cols., 1997, 1998; Testa y cols., 1998; Mateos y cols., 2000; López-Bendito y cols., 2002), y explica el papel de estos receptores en el control de la excitabilidad neuronal y en la modulación de la actividad de los receptores NMDA (Fitzjohn y cols., 1996; Rahman y Neuman, 1996; Yu y cols., 1997; Krieger y cols., 2000; Skeberdis y cols., 2001; Pisani y cols., 2001). A nivel postsináptico, los receptores ionotrópicos y metabotrópicos de glutamato presentan una distribución diferenciada, de manera que los receptores ionotrópicos se localizan preferentemente frente a los sitios de liberación, mientras que los mGluRs se concentran principalmente en la región perisináptica y extrasináptica (Baude y cols., 1993; Luján y cols., 1996, 1997; Petralia y cols., 1998; Testa y cols., 1998; Mateos y cols., 2000). Esta distinta localización podría implicar una activación diferenciada de ambos tipos de receptores en función de la concentración de glutamato alcanzada en la hendidura sináptica, y, por tanto, el requerimiento de una mayor liberación de neurotransmisor para que se produzca la activación de los mGluRs.

Los receptores metabotrópicos del grupo II exhiben una amplia distribución en el Sistema Nervioso Central, detectándose altas concentraciones en corteza cerebral, hipocampo, cerebelo, tálamo, ganglios basales y bulbo olfatorio (Fotuhi y cols., 1994; Ohishi y cols., 1998; Testa y cols., 1998; Phillips y cols., 2000; Tamaru y cols., 2001). Su localización subcelular es tanto postsináptica como presináptica (Neki y cols., 1996; Petralia y cols., 1996; Shigemoto y cols., 1997; Ohishi y cols., 1998; Meguro y cols.,

1999; Tamaru y cols., 2001), situándose preferentemente en el preterminal, lejos de la zona activa de liberación (Shigemoto y cols., 1997; Wada y cols., 1998). También se ha descrito su presencia en células gliales (Petralia y cols., 1996; Mineff y Valtschanoff, 1999).

-Farmacología

El perfil farmacológico de los receptores del grupo I corresponde al siguiente orden de potencia de agonistas: Quiscualato > 3,5-DHPG > Glutamato > 1S,3R-ACPD = Ibotenato > L-CCG-I > 3-HPG > t- ADA. El agonista más selectivo es 3,5-DHPG (Conn y Pin, 1997), aunque también actúa sobre receptores NMDA a altas concentraciones (Contractor y cols., 1998). Los compuestos 4C3HPG, CBPG y LY367385 se comportan como antagonistas selectivos de mGluR1 (Clark y cols., 1997), siendo inactivos o actuando como agonistas parciales sobre mGluR5. El único antagonista que ha mostrado una cierta selectividad sobre mGluR5 es MPEP (Gasparini y cols., 1999b). Los antagonistas LY393675 (Baker y cols., 1998) y NPS2390 (Van Wagenen y cols., 1998) exhiben una elevada potencia tanto para mGluR1 como mGluR5. Otros antagonistas altamente selectivos de receptores del grupo I son AIDA (Pellicciari y cols., 1995) y CPCCOEt (Annoura y cols., 1996; Hermans y cols., 1998).

El orden relativo de potencia de los agonistas de los receptores del grupo II es DCG-IV = L-CCG-I > APDC > Glutamato > 1S,3S-ACPD = 1S,3R-ACPD > 4C3HPG > Ibotenato > Quiscualato. De ellos, sólo APDC es estrictamente selectivo, ya que L-CCG-I también es activo sobre mGluR1 y mGluR4, aunque con una potencia diez veces menor, mientras que DCG-IV es activo también sobre receptores NMDA (Conn y Pin, 1997). En cuanto a los antagonistas, los más empleados son MCPG, MCCG-I y PCCG-IV, siendo este último el más potente para mGluR2 (Conn y Pin, 1997). LY307452 (Wermuth y cols., 1996) y LY341495 (Kingston y cols., 1998a) son otros dos potentes antagonistas de estos receptores, aunque el último también antagoniza, a altas concentraciones, las respuestas de los mGluRs del grupo I (Kingston y cols., 1998b).

-Mecanismos de transducción

En todos los sistemas de expresión los receptores glutamatérgicos del grupo I inducen la activación de fosfolipasa C y la hidrólisis de fosfoinosítidos, con la consiguiente producción de diacilglicerol y de IP₃, por un mecanismo que depende de la activación de proteínas G de tipo Gq (Pin y Duvoisin, 1995; Conn y Pin, 1997). Una característica de esta respuesta es su desaparición tras una estimulación repetida con el agonista. Esta desensibilización parece estar relacionada con la fosforilación del receptor por proteína quinasa C (Herrero y cols., 1994; Gereau y Heinemann, 1998; Kammermeier e Ikeda, 2002), lo que provocaría su desacoplamiento de la cascada de transducción de señales. Otras quinasas implicadas en la desensibilización son las denominadas “quinasas de receptores acoplados a proteínas G” o GRKs, que fosforilan específicamente el dominio C-terminal de los receptores ocupados por el agonista. Esta fosforilación favorece la unión de la proteína β-arrestina, que desacopla al receptor de la proteína G (De Blasi y cols., 2001).

Otros efectos atribuidos a los receptores metabotrópicos del grupo I son el incremento de los niveles intracelulares de AMPc, a través de un mecanismo dependiente de proteínas Gs (Joly y cols., 1995; Thomsen, 1996), y la activación de fosfolipasa D (Servitja y cols., 1999; Shinomura y cols., 2000).

A parte de estas acciones, los receptores metabotrópicos del grupo I inhiben la actividad de algunos canales iónicos, en concreto de canales de K⁺ de tipo M (Ikeda y cols., 1995; Kammermeier e Ikeda, 1999; Kammermeier y cols., 2000) y de canales de Ca²⁺ dependientes de voltaje, tanto del tipo N como del tipo P/Q (Choi y Lovinger, 1996; McCool y cols., 1998; Stefani y cols., 1998b; Kammermeier e Ikeda, 1999; Kammermeier y cols., 2000). Estos efectos se producen a través de un mecanismo delimitado de membrana, que depende de la activación de proteínas G tanto sensibles (Choi y Lovinger, 1996; McCool y cols., 1998) como insensibles a PTX (McCool y cols., 1998).

Los receptores metabotrópicos del grupo II están acoplados negativamente a adenilato ciclasa, inhibiendo la formación de AMPc (Manzoni y cols., 1992; Prézeau y cols., 1992, 1994; Tanabe y cols., 1993; Conn y Pin, 1997), por un mecanismo que depende de la activación de proteínas G de tipo Gi/Go. Al igual que los receptores del grupo I, estos receptores también inhiben la actividad de canales de Ca²⁺ dependientes de voltaje (Chavis y cols., 1995; Ikeda y cols., 1995; Choi y Lovinger, 1996; McCool y cols., 1996), siendo esta acción la responsable de los efectos depresores que estos

receptores ejercen sobre muchas sinapsis glutamatérgicas y GABAérgicas del Sistema Nervioso Central.

-Papel fisiológico

La actividad de los receptores metabotrópicos del grupo I se ha relacionado con los fenómenos de plasticidad sináptica conocidos como potenciación y depresión duraderas (LTP y LTD; del inglés “long term potentiation” y “long term depression”). Los agonistas de los receptores del grupo I facilitan la inducción de la LTP en la región CA1 de hipocampo (Lu y cols., 1997; Jia y cols., 1998; Balschun y Wetzell, 2002) y en la amígdala (Rodrigues y cols., 2002; Fendt y Schmid; 2002; Lee y cols., 2002) a través de la activación de mGluR5. mGluR1, por su parte, se ha relacionado con la LTD que tiene lugar en las sinapsis entre las fibras paralelas y las células de Purkinje del cerebelo (Aiba y cols., 1994; Shigemoto y cols., 1994; Levenes y cols., 1998; Ichise y cols., 2001), donde su ausencia se asocia a una ataxia cerebelosa severa (Conquet y cols., 1994; Aiba y cols., 1994; Sillevs y cols., 2000; Ichise y cols., 2001), así como con la LTD observada en las sinapsis corticoestriatales (Gubellini y cols., 2001).

Los mGluRs del grupo I desempeñan un papel fundamental en el desarrollo de la memoria espacial, habiéndose observado alteraciones en este fenómeno tras la inyección intraventricular de sus antagonistas (Riedel y cols., 1994; Balschun y Wetzell, 1998). También se han implicado en los fenómenos de neurotoxicidad cerebral, potenciando el daño neuronal secundario a la activación suprafisiológica de los receptores NMDA (Bruno y cols., 1995; Wang y cols. 1997; Rao y cols., 2000; Allen y cols., 2001), si bien algunos estudios atribuyen a estos receptores efectos neuroprotectores (Montoliu y cols., 1997; Kalda y cols., 2000; Pizzi y cols., 2000).

Los receptores del grupo II ejercen una función fundamentalmente depresora de la transmisión sináptica. Su localización en el preterminal (Shigemoto y cols., 1997) es consistente con su alta afinidad por glutamato (Schoepp y cols., 1999), y sugiere que este receptor podría activarse únicamente en aquellas situaciones en las que el glutamato difunde más allá del sitio de liberación, hecho que ha sido comprobado experimentalmente en ensayos de estimulación de alta frecuencia y de bloqueo de la recaptación (Scanziani y cols., 1997; Kew y cols., 2001). La inhibición de la liberación producida por el receptor evitaría de esta forma la aparición de niveles neurotóxicos de

glutamato en la hendidura sináptica, manteniendo su concentración en todo momento dentro del rango fisiológico.

Receptores metabotrópicos del grupo III

-Localización

Los receptores mGluR7 se expresan de manera abundante en corteza cerebral, tálamo e hipotálamo, apareciendo también niveles elevados en hipocampo, cerebelo, bulbo olfatorio, ganglios basales y médula espinal (Bradley y cols., 1996; Shigemoto y cols., 1997; Phillips y cols., 1998; Kinoshita y cols., 1998; Kosinski y cols., 1999). La distribución de la isoforma 7a es mucho más amplia que la de 7b, que sólo se expresa de manera significativa en determinadas áreas cerebrales (giro dentado, islotes de Calleja, sustancia innominada, globo pálido), donde colocaliza con 7a (Kinoshita y cols., 1998). La localización subcelular de estos receptores es fundamentalmente presináptica, situándose preferentemente en la zona activa de liberación (Shigemoto y cols., 1996, 1997; Kinoshita y cols., 1998), donde actúan como autorreceptores, inhibiendo la liberación de glutamato. En algunas localizaciones, como hipocampo, se ha descrito una asociación entre la presencia de un determinado receptor metabotrópico a nivel postsináptico y la expresión de mGluR7 en la presinapsis. Así, se ha descrito una mayor densidad de mGluR7 en terminales que hacen sinapsis con dendritas de interneuronas GABAérgicas que expresan mGluR1 (Shigemoto y cols., 1996), constituyendo éste un ejemplo de cómo la diana postsináptica puede influir en la localización de los receptores presinápticos.

La distribución de los receptores de los tipos mGluR4 y mGluR8 es más restringida que la de mGluR7. mGluR4a se expresa principalmente en cerebelo, siendo especialmente abundante en los terminales de las fibras paralelas (axones de las células granulares) (Kinoshita y cols., 1996b; Mateos y cols., 1998b, 1999; Corti y cols., 2002). En hipocampo se ha encontrado una expresión elevada en la capa molecular del giro dentado, en el estrato molecular de CA1 y en el estrato oriens (Bradley y cols., 1996; Corti y cols., 2002). También aparece de forma abundante en el ganglios basales (Bradley y cols., 1999; Corti y cols., 2002), tálamo (Corti y cols., 2002) y en el córtex

piriforme (Benítez y cols., 2000), siendo su expresión más reducida en corteza (Ohishi y cols., 1995; Corti y cols., 2002). La existencia de la isoforma 4b es actualmente cuestionada, y su clonaje podría representar un artefacto (Corti y col., 2002). La localización subcelular de estos receptores es fundamentalmente presináptica (Kinoshita y cols., 1996b; Shigemoto y cols., 1997; Benítez y cols., 2000; Corti y cols., 2002), y además de actuar como autorreceptores, inhibiendo la liberación de glutamato, podrían actuar como heterorreceptores, modulando a nivel presináptico la liberación de otros neurotransmisores (modulación heterosináptica), especialmente GABA (Snead y cols., 2000; Semyanov y Kullman, 2000; Wittmann y cols., 2001a; Corti y cols., 2002).

La expresión de mGluR8 se ha descrito en la capa 1a del córtex piriforme (Kinoshita y cols., 1996a; Wada y cols., 1998), localizándose en los terminales del tracto olfatorio lateral, procedentes del bulbo olfatorio, donde el ARNm para mGluR8 muestra una expresión muy elevada (Duvoisin y cols., 1995; Saugstad y cols., 1997). La presencia de este receptor también ha sido descrita en hipocampo (vía perforante lateral) (Shigemoto y cols., 1997), en médula espinal (Thomas y cols., 2001), y, de manera más restringida, en corteza cerebral y cerebelo (Saugstad y cols., 1997). La localización subcelular de este receptor es fundamentalmente presináptica (Kinoshita y cols., 1996a; Shigemoto y cols., 1997).

mGluR6 se expresa exclusivamente en las células bipolares de la retina (Nakajima y cols., 1993; Akazawa y cols., 1994; Vardi y cols., 1997, 2000), donde su localización es somatodendrítica, interviniendo en la modulación de la transmisión sináptica entre fotorreceptores y células bipolares (Masu y cols., 1995).

En los últimos años se han establecido los determinantes moleculares implicados en la distribución subcelular de los receptores metabotrópicos del grupo III. Mediante estudios con quimeras se ha observado, por ejemplo, como la localización de mGluR7 a nivel presináptico depende de una secuencia de 60 aminoácidos presente en la región central del dominio C-terminal del receptor (Stowell y Craig, 1999). La integridad de esta secuencia es fundamental para la localización del receptor en el terminal, pero no parece estar implicada en el agrupamiento de los receptores en la zona activa de liberación. Los mecanismos moleculares que favorecen este agrupamiento son desconocidos, aunque podrían estar relacionados con la interacción del receptor con algunas proteínas con dominios PDZ, y, en especial, con PICK1 (Boudin y cols., 2000; Boudin y Craig, 2001; Perroy y cols., 2002). Esta interacción se establece a través de

una secuencia de reconocimiento de PDZ presente en la región distal del extremo C-terminal del receptor. La delección de esta secuencia no impide la presencia del receptor en la presinapsis, pero sí su concentración en la zona activa (Boudin y cols., 2000). PICK1 podría desempeñar además un papel en la modulación de la funcionalidad del receptor (Dev y cols., 2000; Perroy y cols., 2002), al atenuar su fosforilación por proteína quinasa C.

-Farmacología

El orden relativo de potencia de los agonistas de los receptores del grupo III es L-AP4 > L-SOP > Glutamato > L-CCG-I > 1S,3S-ACPD > 1S,3R-ACPD > Ibotenato > Quiscualato. De ellos, L-AP4 y L-SOP son selectivos del grupo III. ACPT-I, (Acher y cols., 1997; Chapman y cols., 2001), y (S)-3,4-DCPG (Thomas y cols., 2001) son selectivos para mGluR4a y mGluR8a, respectivamente. Entre los antagonistas, los más potentes y selectivos son MPPG y CPPG, aunque MPPG actúa también sobre mGluR2. MCPG y AIDA también se comportan como antagonistas de estos receptores, pero con una potencia mucho menor (Conn y Pin, 1997; Cartmell y Schoepp, 2000).

El rasgo farmacológico más característico de mGluR7 es su baja afinidad por los agonistas farmacológicos y glutamato, mostrando una EC_{50} de entre 100 y 1000 veces mayor para L-AP4 y L-SOP que el resto de los receptores del grupo III (Okamoto y cols., 1994; Saugstad y cols., 1994; Conn y Pin, 1997; Schoepp y cols., 1999; Cartmell y Schoepp, 2000).

-Mecanismos de transducción

Todos los receptores metabotrópicos del grupo III están acoplados negativamente a adenilato ciclasa, inhibiendo la formación de AMPc tanto en sistemas de expresión heteróloga (Tanabe y cols., 1993; Okamoto y cols., 1994; Saugstad y cols., 1994; Duvoisin y cols., 1995; Wu y cols., 1998a) como en preparaciones neuronales (Schoepp y Jonhson, 1993; Herrero y cols., 1996a; Schaffhauser y cols., 1997). Esta respuesta es abolida por toxina pertúsica (PTx), lo que sugiere la participación de una proteína G de tipo Gi/Go.

A parte de este efecto, los receptores metabotrópicos del grupo III reducen la actividad de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje de tipo N y P/Q, por un mecanismo delimitado de membrana mediado por las subunidades $\beta\gamma$ de las proteínas Gi/Go, siendo éste uno de los mecanismos responsables de la inhibición de la liberación de glutamato producida por estos receptores (Sahara y Westbrook, 1993; Hay y Kunze, 1994; Tyler y Lovinger 1995; Glaum y Miller, 1995; Takahashi y cols., 1996; Herrero y cols., 1996a; Vázquez y Sánchez-Prieto 1997; Stefani y cols., 1996, 1998a; Perroy y cols., 2000).

Los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje de alto umbral, es decir, aquellos que requieren fuertes despolarizaciones para activarse se han clasificado en función de sus características biofísicas y farmacológicas en 4 tipos: L, N, P/Q y R (Meir y cols., 1999; Catterall, 2000; Ertel y cols., 2000; Fisher and Bourque, 2001). Estructuralmente, todos ellos son complejos multiméricos formados por subunidades α_1 , α_2 , β y γ . Se han identificado diez tipos de subunidades α_1 , cuatro de α_2 , cuatro de β y dos de γ (Fisher and Bourque, 2001). La subunidad α_1 es la que forma el poro iónico y la que determina las propiedades primarias del canal. Las subunidades α_{1S} (Ca_v 1.1), α_{1C} (Ca_v 1.2) y α_{1D} (Ca_v 1.3) dan lugar a canales del tipo L (sensible a dihidropiridinas), α_{1B} (Ca_v 2.2) a canales del tipo N (sensible a ω -Conotoxina-GVIA), α_{1A} (Ca_v 2.1) a canales P/Q (sensible a ω -Agatoxina-IVA) y α_{1E} (Ca_v 2.3) a canales R (sensible a ω -Agatoxina-III). Las subunidades α_2 , β y γ no son necesarias para la obtención de corrientes en los sistemas de expresión, aunque sí modifican su magnitud y las propiedades biofísicas del canal.

Los canales del tipo L son bloqueados por dihidropiridinas y presentan una amplia distribución en sistema endocrino, músculo y cerebro, aunque no parecen estar implicados en la liberación de neurotransmisores, tal y como se ha puesto de manifiesto tanto en estudios de liberación de glutamato (Turner y Dunlap, 1995; Vázquez y Sánchez-Prieto, 1997), como de transmisión sináptica (Takahashi y Momiyama, 1993; Castillo y cols., 1994; Wheeler y cols., 1994).

Los canales de los tipos N, P/Q y R se expresan casi exclusivamente en el sistema nervioso, y desempeñan un papel fundamental en la exocitosis de neurotransmisores. El componente de liberación asociado a los canales del tipo P/Q parece ser cuantitativamente mayoritario tanto en corteza cerebral como en hipocampo (Takahashi y Momiyama, 1993; Luebke y cols., 1993; Castillo y cols., 1994; Wheeler y

cols., 1994; Vázquez y Sánchez-Prieto, 1997;), aunque la participación de los canales del tipo N también es significativa. En la mayoría de los estudios realizados el empleo de concentraciones saturantes de toxinas de canales N y P/Q deja una pequeña corriente residual de Ca^{2+} , que ha sido atribuida a canales del tipo R (Wu y cols., 1998b).

La participación de los canales de Ca^{2+} de los tipos P/Q y N en la exocitosis es consistente con su localización en la zona activa de los terminales sinápticos, existiendo evidencias de interacciones funcionales entre los canales y las proteínas del complejo de fusión, especialmente con syntaxina, sinaptotagmina y SNAP-25 (Leveque y cols., 1994; Bezprozvanny y cols., 1995, 2000; Sheng y cols., 1997, 1998; Zhong y cols., 1999). Estas interacciones podrían contribuir a la rápida cinética del proceso de exocitosis, al asegurar la colocalización de las corrientes de Ca^{2+} con sus efectores, e intervenir en la modulación de las propiedades biofísicas del canal, tal y como ha sido descrito en el caso de syntaxina (Degtiar y cols., 2000; Bergsman y Tsien, 2000).

El efecto depresor de los receptores metabotrópicos del grupo III sobre la liberación de glutamato es atribuido principalmente a sus acciones inhibitoras sobre los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (Tyler y Lovinger 1995; Glaum y Miller, 1995; Takahashi y cols., 1996; Vázquez y Sánchez-Prieto 1997; Stefani y cols., 1998), habiéndose observado modulaciones tanto sobre canales del tipo N, como sobre canales del tipo P/Q. Recientemente se ha descrito una modulación sobre canales P/Q a través de una vía de señalización no descrita anteriormente para estos receptores, y que implica la activación de fosfolipasa C y de proteína quinasa C (Perroy y cols., 2000). Este efecto, observado a nivel somatodendrítico en células granulares de cerebelo transfectadas con mGluR7, no ha sido reproducido aún en otros sistemas, no existiendo hasta la fecha evidencias sobre su posible repercusión a nivel presináptico.

El acoplamiento negativo de los receptores del grupo III a la vía de adenilato ciclasa/AMPC no parece tener efecto alguno sobre la liberación de glutamato inducida por la despolarización (Herrero y cols., 1996a), desconociéndose hasta la fecha cuales son las repercusiones funcionales de esta vía de señalización sobre el control de la transmisión glutamatérgica. Dado que la activación de adenilato ciclasa mediante forskolina o isoproterenol induce un incremento en la liberación espontánea de glutamato dependiente de la elevación de los niveles intracelulares de AMPC (Herrero y Sánchez-Prieto, 1996b), es posible que los receptores metabotrópicos del grupo III puedan modular, a través de la inhibición de esta vía, los efectos facilitadores sobre la

liberación de algunos receptores acoplados positivamente a adenilato ciclasa, como los β -adrenérgicos o los A_2 de adenosina.

Entre los factores que regulan la actividad de los receptores metabotrópicos de glutamato, adquiere especial relevancia la modulación por parte de proteína quinasas. Los receptores metabotrópicos del grupo III presentan sitios de fosforilación tanto para proteína quinasa C (Macek y cols., 1998; Nakajima y cols., 1999; Dev y cols., 2000; Airas y cols., 2001), como para proteína quinasa A (Cai y cols., 2001), y esta fosforilación conduce a la supresión de la función del receptor y de su capacidad para inhibir canales de Ca^{2+} (Macek y cols., 1998, 1999; Cai y col., 2001).

Otra proteína que parece desempeñar un papel importante en la modulación de la función de los receptores del grupo III es calmodulina. El dominio C-terminal del receptor presenta, en su región proximal, sitios de unión para calmodulina y para las subunidades $\beta\gamma$ de las proteínas Gi/Go (O'Connor y cols., 1999; El Far y cols., 2001; Dev y cols., 2001; Sorensen y cols., 2002). El sitio de unión para calmodulina es fosforilado por proteína quinasa C (Nakajima y cols., 1999; O'Connor y cols., 1999), y esta fosforilación impide la unión de calmodulina al receptor. Por otro lado, la unión de calmodulina previene la fosforilación del receptor por la quinasa.

Algunos experimentos electrofisiológicos han mostrado como la aplicación de antagonistas de calmodulina atenúa la inhibición de la transmisión sináptica producida por L-AP4 (O'Connor y cols., 1999). En este sentido, se ha sugerido que calmodulina actuaría provocando la disociación de las subunidades $\beta\gamma$ de su sitio de unión al receptor, posibilitando de este modo el desarrollo de las acciones inhibitorias de las subunidades $\beta\gamma$ sobre los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (O'Connor y cols., 1999; Dev y cols., 2001).

-Papel fisiológico

Los receptores metabotrópicos del grupo III ejercen una potente acción inhibitoria sobre la transmisión glutamatérgica tanto en rodajas de tejido cerebral (Gereau and Conn, 1995; Vignes y cols., 1995; Dietrich y cols., 1997; Pisani y cols., 1997), como en sinaptosomas (Vázquez y cols., 1995; Herrero y cols., 1996a).

Los receptores de tipo mGluR7 se localizan específicamente en las zonas activas de liberación (Shigemoto y cols., 1996, 1997; Kinoshita y cols., 1998). Dado que este

receptor presenta una baja afinidad por glutamato, es posible que permanezca inactivo en condiciones basales, activándose únicamente en aquellas situaciones en las que la concentración de glutamato alcanza niveles elevados en la hendidura sináptica, como ocurre en situaciones de estimulación de alta frecuencia.

Los estudios realizados con ratones *knockout* para mGluR7 muestran una mayor predisposición de estos animales a desarrollar crisis epilépticas en la edad adulta (a partir de las 12 semanas) (Sansig y cols., 2001), y son varios los trabajos que han puesto de manifiesto los efectos anticonvulsivantes de los agonistas de los receptores metabotrópicos del grupo III (Tang y cols., 1997; Chapman y cols., 1999, 2001; Gasparini y cols., 1999a; Yip y cols., 2001; Folbergrova y cols., 2001; De Sarro y cols., 2002). Curiosamente esta predisposición a la epilepsia no aparece en ratones jóvenes, donde la ausencia de mGluR7 se asocia únicamente a déficits en las respuestas a estímulos nocivos y en las respuestas de aversión condicionada a un determinado sabor (Masugi y cols., 1999).

En cerebelo, mGluR4 inhibe la transmisión glutamatérgica a nivel de la sinapsis entre las fibras paralelas y las células de Purkinje (Mateos y cols., 1999), desempeñando un papel fundamental en el control de la función motora, tal y como lo ponen de manifiesto los estudios realizados con ratones *knockout* para este receptor (Pekhletski y cols., 1996). Estos estudios revelan además un deterioro importante en el procesamiento de la información espacial por parte de estos animales (Gerlai y cols., 1998).

Los receptores metabotrópicos del grupo III parecen estar implicados asimismo en el control extrapiramidal del movimiento (Kosinski y cols., 1999; Wittman y cols., 2001a; Awad-Granko y Conn., 2001; David y Abbraini, 2002; Messenger y cols., 2002) y en la modulación de la sensibilidad no dolorosa a nivel de la médula espinal (Masugi y cols., 1999).

En sinaptosomas cerebrocorticales de ratas jóvenes (21 días) bajas concentraciones de L-AP4 (2-3 μ M) inhiben de manera acusada la liberación de glutamato inducida por la despolarización (Herrero y cols., 1996a). Estas concentraciones de L-AP4 no tienen, sin embargo, ningún efecto sobre la liberación de glutamato en ratas adultas (Vázquez y cols., 1995), sugiriendo una caída en la expresión de los receptores de alta afinidad por L-AP4 con el desarrollo. Es posible, sin embargo, que los terminales sinápticos de ratas adultas expresen receptores de baja afinidad por el

agonista (Shigemoto y cols., 1997; Corti y cols., 2002), y que éstos actúen como autorreceptores presinápticos inhibiendo la liberación de glutamato a estas edades.

El control negativo ejercido por estos receptores sobre la liberación de glutamato podría contribuir a mantener la concentración del neurotransmisor en la hendidura sináptica dentro de los límites fisiológicos, evitando que alcance niveles que podrían resultar neurotóxicos. En este sentido, son varios los trabajos que han puesto de manifiesto los efectos neuroprotectores de la activación de estos receptores (Bruno y cols., 1996; Maiese y cols., 1996; Lafon-Cazal y cols., 1999; Pizzi y cols., 2000), lo que hace de ellos excelentes candidatos para el desarrollo de futuras aplicaciones terapéuticas frente a procesos agudos y crónicos de neurotoxicidad mediados por glutamato (Conn y Pin, 1997; Lafon-Cazal y cols., 1999).

MODULACIÓN DE LA LIBERACIÓN DE GLUTAMATO POR LA ACTIVACIÓN DE LAS PROTEÍNAS QUINASAS A Y C

Proteína quinasa C

El Sistema Nervioso Central de los mamíferos contiene altas concentraciones de la proteína quinasa C (PKC), enzima a la que se le han atribuido importantes funciones en el desarrollo neuronal, la modulación de canales iónicos, la liberación de neurotransmisores y en los fenómenos de plasticidad sináptica (Tanaka y Nishizuka, 1994).

La proteína quinasa C (PKC) constituye una familia de quinasas de serina y treonina dependientes de Ca^{2+} y fosfolípidos, que presentan como activador fisiológico diacilglicerol, generado bien por la hidrólisis de fosfatidilinositoles estimulada por fosfolipasa C o bien por la hidrólisis de fosfatidilcolina inducida por fosfolipasa D. Se han descrito varias isoformas de PKC que se clasifican, desde el punto de vista estructural, en tres grupos (Nishizuka, 1992; Tanaka y Nishizuka, 1994). El primer grupo (isoenzimas clásicas o convencionales) comprende las isoformas α , βI , βII y γ , que requieren para su activación Ca^{2+} , diacilglicerol, fosfatidilserina, lisofosfatidilcolina y ácidos grasos insaturados. El segundo grupo (nuevas isoenzimas) engloba las isoformas δ , ϵ , η y θ , que no requieren Ca^{2+} para su activación, pero si fosfatidilserina y

diacilglicerol. El tercer grupo (isoenzimas atípicas) está integrado por las isoformas ξ y λ , cuya activación requiere únicamente fosfatidilserina, aunque la subespecie ξ es activada también por ácidos grasos insaturados.

La proteína quinasa C ejerce una potente acción facilitadora sobre la transmisión sináptica, efecto que ha sido descrito tanto en rodajas de tejido cerebral (Malenka y cols., 1986; Bramham y cols., 1994; Honda y cols., 2000; Francis y cols., 2002), como en preparaciones de sinaptosomas (Nichols y cols., 1987; Terrian y cols., 1991; Coffey y cols., 1993) y cultivos neuronales (Capogna y cols., 1995; Kudoh y cols., 2001). A nivel presináptico, la quinasa puede actuar sobre múltiples dianas, por lo que resulta muy difícil establecer el mecanismo primario a través del cual produce sus efectos. Así, se ha descrito que PKC fosforila la subunidad $\alpha 1$ de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (Ahlijanian y cols., 1991; Fournier y cols., 1993; Hell y cols., 1994; Stea y cols., 1995; Zamponi y cols., 1997), y que esta fosforilación provoca un aumento de su conductancia (Stea y cols., 1995), así como la supresión de la inhibición tónica ejercida por las subunidades $\beta\gamma$ de las proteínas G sobre estos canales (Zamponi y cols., 1997; Hamid y cols., 1999; Cooper y cols., 2000; Barrett y Rittenhouse, 2000). También se han descrito acciones sobre canales de Na^+ dependientes de voltaje, que se traducen en una disminución de su conductancia (Numann y cols., 1991; Li y cols., 1993; Rossie, 1999) y sobre diferentes canales de K^+ , inhibiendo corrientes de tipo $I_{K(A)}$ (Hoffman y Johnston, 1998), $I_{K(D)}$ (Cousin y cols., 1999), e $I_{K(DR)}$ (Peretz y cols., 1996). La inhibición de la corriente $I_{K(DR)}$ podría ser la responsable del efecto potenciador de PKC sobre la liberación de glutamato inducida por el bloqueante de canales de K^+ 4-aminopiridina (Barrie y cols., 1991). Dado que este efecto no se observa cuando la despolarización es inducida por KCl (Barrie y cols., 1991; Coffey y cols., 1993), se ha sugerido que la diana de la quinasa en este caso sería un canal de K^+ con características similares a las del rectificador retrasado, cuya inhibición prolongaría la duración de los potenciales de acción, produciendo un incremento en la liberación de glutamato.

Además de canales iónicos, PKC fosforila múltiples proteínas de la maquinaria exocitótica como GAP-43, MARCKS, 14-3-3, dinamina I, Munc-18, Munc 13-1, VAMP y SNAP-25 (Liu y cols., 1994; Herget y cols., 1995; Fujita y cols., 1996; Betz y cols., 1998; Genoud y cols., 1999; Turner y cols., 1999; Powell y cols., 2000; Hepp y cols., 2002). La fosforilación de estas proteínas se ha relacionado con un incremento en la movilización de vesículas desde el compartimento de reserva hacia la zona activa

(Stevens and Sullivan, 1998; Waters y Smith, 2000), con un aumento de la sensibilidad de la maquinaria exocitótica al Ca^{2+} (Wu y Wu, 2001) y, en el caso de dinamina I, con una facilitación del reciclaje de las vesículas tras la exocitosis (Cousin y cols., 2001).

La actividad de proteína quinasa C se ha relacionado con los fenómenos de LTP en hipocampo, participando tanto en la fase de inducción como en la fase de mantenimiento (Klann y cols., 1991; Wang y Feng, 1992; Cheng y cols., 1994; Powell y cols., 1994; Son y cols., 1996; Roisin y cols., 1997; Ramakers y cols., 2000). También se ha relacionado con la LTD en algunas sinapsis, como la que tiene lugar entre las fibras paralelas y las células de Purkinje en cerebelo (Daniel y cols., 1998; Levenes y cols., 1998), donde la desensibilización de los receptores AMPA y mGluR1 derivada de su fosforilación por la quinasa provoca una depresión mantenida de la transmisión sináptica.

Vía de adenilato ciclasa/AMPC/proteína quinasa A

La vía de señalización mediada por adenilato ciclasa y AMPC regula diversos procesos fisiológicos en respuesta a señales intra- y extracelulares tales como hormonas, neurotransmisores y Ca^{2+} . En sinaptosomas de corteza cerebral, la activación de esta vía mediante forskolina o el agonista β -adrenérgico isoproterenol induce una liberación espontánea de glutamato dependiente de Ca^{2+} y de la activación de proteína quinasa A (Herrero y Sánchez-Prieto, 1996b). El mecanismo a través del cual se produce este efecto es desconocido, aunque podría estar relacionado con la modulación por parte de la quinasa de corrientes de K^+ de tipo $\text{I}_{\text{K(A)}}$. Estas corrientes, que contribuyen al mantenimiento del potencial de reposo y a la rápida repolarización de la membrana ante despolarizaciones submáximas, son inhibidas por proteína quinasa A (Hoffman y Johnston, 1998; Anderson y cols., 2000; Schrader y cols., 2002), lo que provoca un aumento de la excitabilidad, que favorece la génesis espontánea de potenciales de acción. A diferencia de PKA, PKC no promueve la liberación espontánea de glutamato, pero sí potencia de manera acusada la liberación evocada por 4-aminopiridina (Barrie y cols., 1991), que induce potenciales de acción espontáneos a través de una inhibición de canales de K^+ , posiblemente de tipo $\text{I}_{\text{K(A)}}$ (Tibbs y cols., 1989 a,b; Tibbs y cols., 1996). Basándose en estos datos, es sugerente la idea de que PKA y PKC podrían estar

actuando sobre diferentes dianas a nivel presináptico, y que la activación simultánea de ambas quinasas tenga un efecto sinérgico sobre la liberación de neurotransmisor.

En las regiones CA1 y CA3 de hipocampo y en la amígdala, la activación de proteína quinasa A estimula la transmisión sináptica por un mecanismo presináptico (Gereau y Conn, 1994; Chávez-Noriega y Stevens, 1994; Weisskopf y cols., 1994; Huang y cols., 1996). Los mecanismos de esta facilitación son múltiples, y están relacionados con modulaciones sobre canales iónicos (Huang y cols., 1996; Mellor y cols., 2002) y sobre la maquinaria exocitótica (Trudeau y cols., 1996, 1998; Lonart y cols., 1998b; Chavis y cols., 1998; Chheda y cols., 2001). En este sentido, se ha descrito que PKA es capaz de fosforilar algunas de las proteínas de la maquinaria exocitótica como sinapsina I, SNAP-25 y rabfilina 3a (Numata y cols., 1994; Fykse y cols., 1995; Hirling y Scheller, 1996; Lonart y Sudhof, 1998a; Hosaka y cols., 1999; Risinger y Bennett, 1999; Hepp y cols., 2002), y que la fosforilación de esta última favorece la movilización de vesículas desde el compartimento de reserva a la zona activa (Foletti y cols., 2001).

La activación de proteína quinasa A desempeña un papel esencial en la génesis de la LTP que tiene lugar a nivel de la sinapsis entre las fibras musgosas, procedentes de las células granulares del giro dentado, y las células piramidales de CA3 de hipocampo (Weisskopf y cols., 1994; Huang y cols., 1995; Lonart y cols., 1998b; Villacres y cols., 1998). Esta LTP es típicamente presináptica, y depende de tres mecanismos: un incremento en la entrada de Ca^{2+} en el terminal que es consecuencia de la fosforilación de los canales de Ca^{2+} por PKA, un aumento en el número de vesículas en la zona activa, dependiente de la fosforilación de rabfilina 3a, y un incremento en la sensibilidad de la maquinaria exocitótica al Ca^{2+} (Lonart y cols., 1998b).

EL SINAPTOSOMA COMO MODELO DE SINAPSIS IN VITRO

En el análisis de los mecanismos presinápticos que participan en la transmisión glutamatérgica se han utilizado diferentes preparaciones, como cortes de tejido cerebral, neuronas en cultivo, oocitos de *Xenopus* o líneas celulares transfectadas, sinaptoneurosomas y sinaptosomas. Cada una de estas preparaciones presenta ventajas e

inconvenientes, y la elección de una u otra debe realizarse en función del aspecto que se desee estudiar.

La expresión de receptores recombinantes en líneas celulares constituye un buen modelo para analizar aspectos funcionales e identificar las respuestas asociadas a la activación de un determinado receptor. Asimismo, posibilitan el estudio de la relación estructura-función, permitiendo por ejemplo el análisis de los efectos de la delección de una secuencia del receptor o la identificación de residuos clave en su funcionalidad. Sin embargo, estos sistemas no contienen los elementos de las vías de transducción de los sistemas nativos, por lo que su utilidad en determinados estudios es limitada. Los cortes de tejido cerebral, por su parte, presentan la ventaja de que pueden ser estimulados eléctricamente en sinapsis localizadas y el inconveniente de su elevada heterogenicidad, no permitiendo el análisis de respuestas individuales.

El término *sinaptosoma* hace referencia a los botones presinápticos obtenidos tras el resellado espontáneo de la membrana plasmática durante la homogeneización del tejido cerebral. Frente a los sinaptoneurosomas, que conservan las membranas postsinápticas reselladas, los sinaptosomas son un modelo ideal para la investigación de fenómenos presinápticos, ya que las interferencias postsinápticas quedan minimizadas, permitiendo el análisis de los efectos y vías de transducción de señales que median los distintos receptores presinápticos. Además, los sinaptosomas exhiben una alta capacidad de transporte de glutamato, manteniendo una concentración de glutamato extracelular relativamente baja y cercana a los valores fisiológicos (1 μM) (Lerma y cols., 1986), lo que limita considerablemente la posibilidad de desensibilización de los receptores.

Una de las ventajas de la preparación de sinaptosomas es que posibilita el análisis de respuestas individuales mediante técnicas de imagen de Ca^{2+} , permitiendo, por ejemplo, estudiar la distribución de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje en terminales individuales, o determinar el porcentaje de terminales que presentan un determinado receptor. La reciente aparición de anticuerpos frente los transportadores vesiculares de glutamato VGLUT1 y VGLUT2 permite además identificar inmunohistoquímicamente los terminales glutamatérgicos.

El sinaptosoma *in situ* puede operar de forma autónoma, salvo en lo que se refiere al recambio de proteínas y componentes de la membrana, representando el sistema más sencillo capaz de llevar a cabo la captación, síntesis, almacenamiento y exocitosis de neurotransmisores (Nicholls, 1989). Al microscopio electrónico los

sinaptosomas aparecen como sacos citoplásmicos esféricos, de un diámetro de entre 0,5 y 1,5 μm , conteniendo una o más mitocondrias y gran cantidad de vesículas sinápticas pequeñas, de en torno a 50 nm de diámetro, junto con ocasionales vesículas grandes de núcleo denso (Dunkley y cols., 1986).

Los sinaptosomas son autónomos desde el punto de vista bioenergético, y poseen la dotación enzimática y proteica necesaria para llevar a cabo la síntesis de neurotransmisores y su almacenamiento en vesículas. Cuando se incuban en un medio rico en iones Na^+ (120 mM) y bajo en iones K^+ (3,5 mM), y con un aporte complementario de glucosa (10 mM), los sinaptosomas respiran activamente, manteniendo una producción elevada de ATP y fosfocreatina y una velocidad constante de respiración durante varias horas (Kauppinen y Nicholls, 1986). Los sinaptosomas contienen mitocondrias funcionales, estando la síntesis de ATP restringida a la glucólisis aeróbica. Cuando la síntesis mitocondrial de ATP es inhibida por la anoxia, se pone en marcha la glucólisis anaerobia hacia lactato, incrementándose hasta 10 veces el consumo de glucosa, sin cambios significativos en los niveles de ATP, que sólo disminuyen muy levemente (Kauppinen y Nicholls, 1986).

La membrana plasmática de los sinaptosomas presenta una conductancia elevada para el K^+ y baja para el Na^+ , por lo que el potencial de membrana resultante oscila entre -60 y -80 mV. En los terminales sinápticos se ha descrito la presencia de un canal de K^+ , denominado I_A , que participa en el mantenimiento del potencial de membrana en reposo, activándose rápidamente cuando la membrana se despolariza ligeramente, restableciendo de esta forma el potencial de membrana (Castle y cols., 1989). El bloqueo de este canal por 4-aminopiridina (4-AP) desestabiliza el potencial de membrana, desencadenando potenciales de acción espontáneos (Tibbs y cols., 1989 a,b; Tibbs y cols., 1996). 4-AP también actúa sobre canales de K^+ dependientes de voltaje de tipo I_D , así como sobre canales de K^+ activados por Ca^{2+} , que se activan en la fase final de los potenciales de acción, restableciendo el potencial de membrana en reposo (Blaustein y cols., 1988).

Los sinaptosomas mantienen una baja concentración de Ca^{2+} intracelular (50-200 nM), incluso en medios con alta concentración de Ca^{2+} (2 mM). Esto es debido al transporte de Ca^{2+} a las mitocondrias y a la salida del ión a través de la membrana plasmática mediante el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ y la ATPasa dependiente de Ca^{2+} . El intercambiador utiliza el gradiente de Na^+ a través de la membrana, traslocando tres

iones de Na^+ por uno de Ca^{2+} , y se activa alostéricamente por Ca^{2+} interno. El carácter electrogénico de este transportador ha llevado a sugerir su posible contribución en la entrada de Ca^{2+} durante la despolarización de los terminales, aunque la ausencia de bloqueantes específicos ha impedido establecer de manera inequívoca su participación. La ATPasa dependiente de Ca^{2+} bombea un ión por cada molécula de ATP hidrolizada, y podría representar el principal mecanismo de extracción de Ca^{2+} del citoplasma (Snelling y Nichols, 1985).

El sinaptosoma posee toda la maquinaria bioquímica necesaria para acoplar la despolarización de la membrana plasmática a la entrada de iones de Ca^{2+} y a la liberación de neurotransmisores. Además de la exocitosis vesicular de glutamato, la despolarización también induce una liberación independiente de Ca^{2+} y de ATP, que es debida a la reversión de los transportadores de glutamato acoplados al gradiente electroquímico de Na^+ . La liberación independiente de Ca^{2+} se ve incrementada en condiciones de privación de energía, debido a que el declive del gradiente de Na^+ favorece la reversión del transportador. Se ha sugerido que esta liberación de glutamato citosólico podría contribuir a la toxicidad producida por este neurotransmisor en condiciones de anoxia e isquemia cerebrales, ya que la reducción de los niveles de ATP bloquea la exocitosis e incrementa la salida de glutamato citosólico (Rubio y cols., 1991). Esta acumulación de glutamato en el espacio sináptico provocaría una sobreestimulación de los receptores postsinápticos, especialmente del subtipo NMDA, con el consiguiente daño neuronal.

II. OBJETIVOS

1.- Estudiar la posible existencia de receptores metabotrópicos de glutamato del grupo III de baja afinidad por los agonistas en terminales de corteza cerebral de ratas adultas, conocer los mecanismos implicados en sus acciones moduladoras sobre la liberación de glutamato e identificar inmunocitoquímicamente el subtipo de receptor implicado.

2.- Estudiar la repercusión funcional del acoplamiento negativo de estos receptores a la vía de adenilato ciclasa/AMPC/proteína quinasa A, así como su posible papel modulador sobre las acciones mediadas por receptores acoplados positivamente a esta vía.

3.- Estudiar el grado de coexistencia de los canales de calcio dependientes de voltaje de los tipos N y P/Q en un mismo terminal sináptico, su grado de acoplamiento a la exocitosis de glutamato y la evolución de su expresión con el desarrollo.

4.- Investigar la posible colocalización de determinados tipos de canales de calcio dependientes de voltaje y de determinados subtipos de receptores metabotrópicos del grupo III en terminales cerebrocorticales de ratas jóvenes y adultas.

5.- Estudiar los efectos de la activación simultánea de las proteínas quinasas A y C sobre la liberación de glutamato, e investigar la posible interacción funcional de ambas quinasas en terminales cerebrocorticales.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIAL

Material biológico

Las preparaciones de terminales sinápticos (sinaptosomas) se obtuvieron a partir de ratas Wistar macho adultas (2-3 meses, 200-250 gramos de peso) o de 21 días, suministradas por el animalario de la Universidad Complutense de Madrid.

Productos

El enzima glutamato deshidrogenasa (E. C. 1.4.1.3.), el anticuerpo monoclonal anti-sinaptofisina y los compuestos NADP^+ , ácido L-glutámico, 4-aminopiridina, albúmina de suero bovino (BSA), ácidos etilenglicol-bis (β -amino etil éter)-N, N, N', N'-tetracético (EGTA) y 2-{[2-hidroxi-1,1 bis(hidroximetil)etil]amino}etanosulfónico (TES), ditioneitol (DTT), 4- β -forbol-12,13-dibutirato (PDBu), 4- α -forbol-12,13-dibutirato (α -PDD), 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX), isoproterenol, nifedipina, paraformaldehído, propranolol, tetraetilamonio, tetrodotoxina (TTx), trietanolamina y toxina pertúsica (PTx) fueron suministrados por Sigma Aldrich (St. Louis, E.E.U.U.).

De la casa Merck (Darmstadt, Alemania) se obtuvieron el ácido etilendiaminotetracético (EDTA), dodecilsulfato sódico (SDS), TRIS, KCl, NaCl, CaCl_2 , NaH_2PO_4 , NaHCO_3 , MgCl_2 , HClO_4 , H_3PO_4 , metanol, etanol y D(+)glucosa.

Los ácidos 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetil sulfónico (HEPES) y 1,4-piperazindietil sulfónico (PIPES), adenosina desaminasa y estaurosporina fueron suministrados por Boehringer Corp. (Manheim, Alemania).

La sacarosa se compró a BDH Limited Pool (Reino Unido).

BioRad (Richmon, E.E.U.U.) suministró el β -mercapto-etanol.

Bisindolylmaleimida I, calmidazolium, forskolina, 1,9-dideoxy-forskolina, ionomicina, N-[2-((*p*-bromocinamil)amino)etil]-5-isoquinolinesulfonamida (H-89) y ophiobolina A se compraron a Calbiochem Co. (San Diego, E.E.U.U.).

Las sondas Fura-2AM y Fura-2 ácido fueron suministradas por Molecular Probes (Eugene, E.E.U.U.). Biochrom suministró la polilisina.

De Amersham Biosciences (Reino Unido) se obtuvieron el ensayo comercial para la determinación de AMPc y el Percoll, y de Beckman Instruments (E.E.U.U.) el líquido de centelleo.

Tocris Neuramin (Essex, Reino Unido) suministró el ácido L-2-amino-4-fosfonobutírico (L-AP4), la (RS)- α -ciclopropil-4-fosfonofenilglicina (CPPG) y la (RS)- α -metil-4-fosfonofenilglicina (MPPG). BioLog (Bremen, Alemania) suministró el Sp-8-Br-cAMPS.

Las toxinas ω -conotoxina.GVIA, ω -agatoxina-IVA y ω -conotoxina-MVIIC fueron suministradas por Peptide Institute INC. (Osaka, Japón).

Los anticuerpos policlonales de conejo contra los transportadores vesiculares de glutamato VGLUT1 y VGLUT2 fueron obtenidos de Synaptic Systems (Göttingen, Germany). Chemicon International (Temecula, E.E.U.U.) suministró el anti-suero policlonal de conejo contra la glutamato descarboxilasa (GAD-65). Los anticuerpos policlonales de conejo contra mGluR7a y de cobaya contra mGluR4a y mGluR8a fueron donados por el Dr. Ryuichi Shigemoto (National Institute for Physiological Sciences, Myodaiji, Japón). Los anticuerpos secundarios de cabra anti-conejo o anti-ratón acoplados a Cy2 o Cy3, y los anticuerpos de mono anti-cobaya acoplados a fluoresceína fueron suministrados por Jackson ImmunoResearch (West Grove, E.E.U.U.).

Aparatos

Para la preparación de disoluciones se utilizaron balanzas de precisión AND ER-60 A y granatorios AND modelos FX 2000 y EW 300A. Las disoluciones se agitaron en agitadores de tipo magnético Agimatic-S de Selecta y agitadores orbitales Luckham 802. El agua desionizada para la preparación de las soluciones se obtuvo mediante un sistema Milli-Q Water Purification System de Millipore. Las mediciones de pH se realizaron en pHmetros Metrohm 654 y Crison 2001, y para la filtración de los distintos medios empleados se utilizó una bomba de ultrafiltración de Millipore. Para la limpieza de material se utilizó agua obtenida de un aparato Milli-Ro Plus de Millipore. El hielo picado se obtuvo de una máquina Scotsman AF 10.

Las disoluciones se pipetearon empleando pipetas automáticas Gilson. Para medidas de precisión de pequeños volúmenes se emplearon jeringas Hamilton.

Para la homogeneización del tejido cerebral se utilizó un homogeneizador Braun.

Las medidas espectrofotométricas, para la determinación de proteínas, se realizaron en un espectrofotómetro Pharmacia Ultrospec III.

Para las incubaciones se utilizaron baños termostatzados modelo Unitronic 320 OR con agitación orbital y Tectron 3473100.

En la preparación de sinaptosomas se emplearon la centrífuga refrigerada Sorvall modelo RC-5B y la ultracentrífuga Beckman modelo L8-M. También se utilizaron centrífugas para tubos Eppendorff modelos Beckman 11, Sigma 201M y Sigma 113.

Las determinaciones de la liberación de glutamato y de la concentración intracelular de Ca^{2+} se realizaron mediante fluorímetros Perkin-Elmer de los modelos LS-50 y LS-50B, controlados por ordenador. La cubeta de ensayo estaba acoplada a un baño termostatzado modelo Braun Frigomix U.

Para las determinaciones radiométricas se emplearon contadores de centelleo líquido Beckman modelos LS 3801 y LS 6000IC.

En los experimentos de imagen y de inmunocitoquímica, los sinaptosomas fueron visualizados mediante un microscopio invertido Nikon Diaphot modelo TE200, equipado con un objetivo Nikon 100x, una cámara CCD Hamamatsu modelo C4880, una lámpara de mercurio de alta presión modelo HB-10101AF y un monocromador (Monokromator 1, Kinetic Imaging Ltd, Reino Unido).

MÉTODOS

Obtención de sinaptosomas

Los sinaptosomas se purificaron en un gradiente discontinuo de Percoll según la técnica descrita por Dunkley y colaboradores (1986) y Wang y colaboradores (1989). Las ratas se sacrificaron por dislocación cervical y decapitación. Una vez extraído el cerebro se lavó en sacarosa 0,32 M a pH 7,4 y 4°C, y se diseccionó la corteza cerebral, que se homogeneizó a 700 r.p.m., realizándose 7 pasos completos, en un homogeneizador modelo Potter con vástago de teflón. El homogenado resultante se centrifugó a 2.000 xg durante 2 minutos a 4°C, recogiénose el sobrenadante (S₁). Para aumentar el rendimiento, el sedimento se resuspendió de nuevo en sacarosa 0,32 M y se volvió a centrifugar a 2000 xg durante 2 minutos. Ambos sobrenadantes se centrifugaron a 9.500 xg durante 12 minutos a 4 °C. El sedimento resultante (P₂) se resuspendió en 8 ml de sacarosa 0,32 M. Esta suspensión se colocó sobre un gradiente discontinuo de Percoll, preparado en un medio compuesto por sacarosa 0,32 M, EDTA 1 mM y DTT 0,25 mM, y formado por bandas de 3 ml de Percoll al 3 %, 10 % y 23 %, a pH 7,4. Los gradientes se centrifugaron a 25.000 xg durante 10 minutos a 4°C, recogiénose los sinaptosomas en la interfase formada por las bandas de Percoll al 10 % y al 23 %. La mielina quedó en la banda de Percoll al 3 %, mientras que las mitocondrias sedimentaron en el fondo del tubo. Los sinaptosomas se diluyeron hasta un volumen final de 30 ml con medio HBM (NaCl 140 mM, KCl 5 mM, NaHCO₃ 5 mM, NaH₂PO₄ 1,2 mM, MgCl₂ 1 mM, glucosa 10 mM y HEPES 10 mM; pH 7,4), y fueron centrifugados a 22.000 xg durante 10 minutos a 4°C. El sedimento (P₃) resultante se resuspendió en 8 ml de medio HBM, determinándose a continuación el contenido de proteínas por el método de Biuret. Las alícuotas con 1 mg de sinaptosomas se diluyeron con medio HBM hasta 10 ml y se centrifugaron a 3.000 xg durante 10 minutos. El sobrenadante se decantó y los sinaptosomas, sedimentados en el fondo del tubo, se conservaron en un baño de hielo.

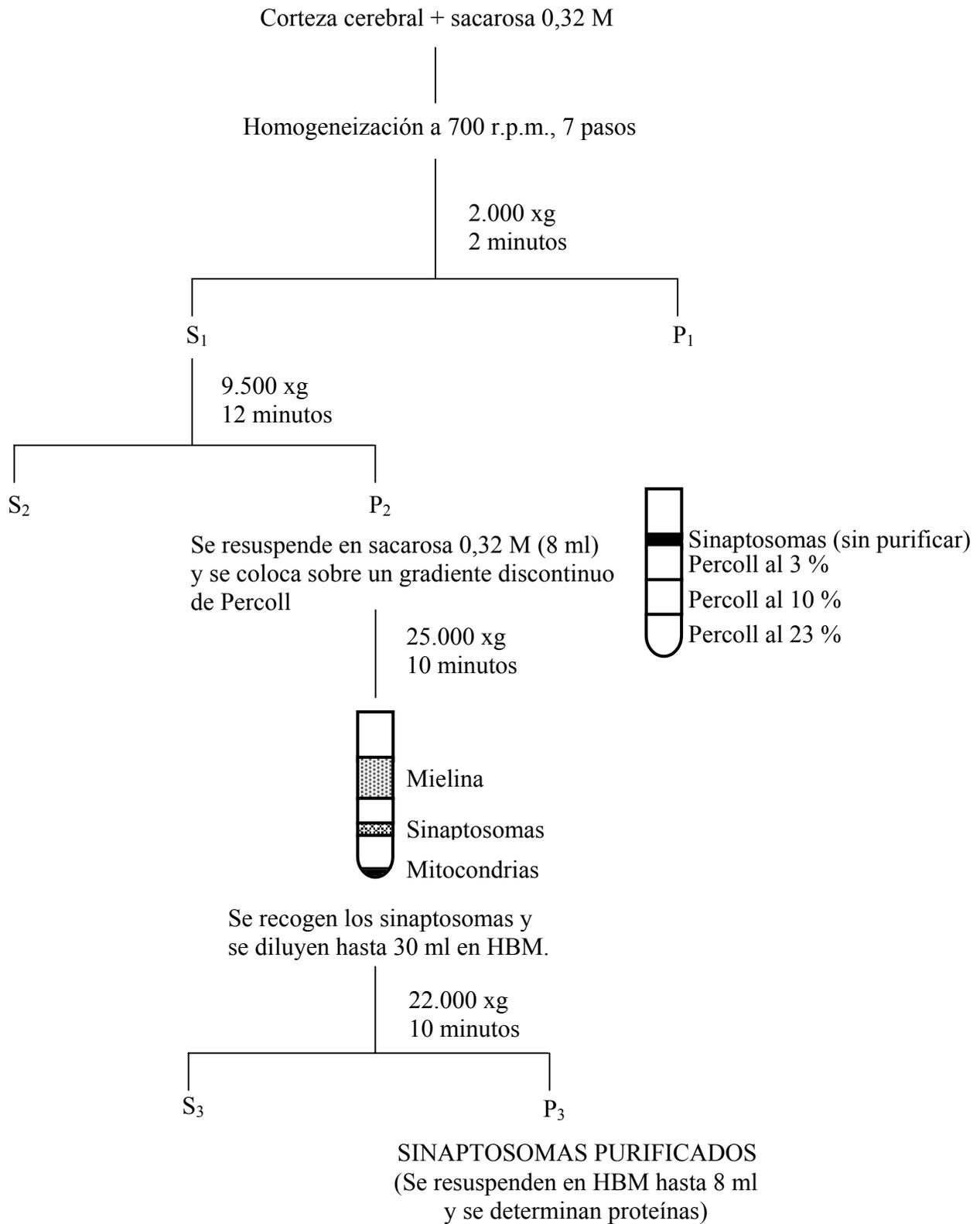


Figura III. 1. Esquema del procedimiento seguido en la preparación de sinaptosomas por gradientes de Percoll. S: Sobrenadante; P: Sedimento.

Determinación de proteínas

La determinación del contenido de proteínas se realizó según el método de Biuret, descrito por Gornall y cols. (1947) basado en la formación de un complejo, de color azul, entre los enlaces peptídicos y el ión Cu^{2+} .

La composición del reactivo de Biuret es la siguiente:

Sulfato de cobre	1,6 % (p/v)
Tartrato de sodio y potasio	6,0 % (p/v)
Hidróxido de sodio	3,0 % (p/v)

Como proteína patrón se utilizó albúmina de suero bovino (BSA) a una concentración de 10 mg/ml, según se indica a continuación:

	Tubo 1 (blanco)	Tubo2 (patrón)	Tubo 3 (sinaptosomas)
Tritón X-100 10%	200	200	200
H₂O	600	520	520
Biuret	1200	1200	1200
BSA	-	80	-
Sinaptosomas	-	-	80

Tabla III. 1. Todos los volúmenes están expresados en μl .

Los tubos se agitaron vigorosamente, determinándose a continuación su absorbancia a 550 nm mediante un espectrofotómetro.

La concentración de proteínas, expresada en mg/ml, se determinó por comparación de las absorbancias de la muestra con la de la solución patrón que contenía una cantidad de proteína conocida.

Métodos para inducir la despolarización del terminal sináptico “in vitro”

La principal diferencia entre un terminal sináptico in situ y un sinaptosoma es que éste último no puede recibir potenciales de acción a través de su axón, ya que

carece de él. Además, el pequeño tamaño de la mayoría de los botones sinápticos impide la aplicación de electrodos, por lo que es necesario recurrir a procedimientos bioquímicos para inducir su despolarización.

Existen diferentes métodos para inducir la despolarización de los sinaptosomas. En este trabajo hemos empleado fundamentalmente dos: altas concentraciones de K^+ y el inhibidor de canales de K^+ 4-aminopiridina (4-AP).

-Despolarización inducida por KCl

En sinaptosomas polarizados la conductancia dominante es la de K^+ (Schmalzing, 1985) y la membrana se despolariza cuando se incrementa la concentración extracelular de este ión (Scott y Nicholls, 1980), con la consiguiente apertura de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje y la inducción de la liberación de neurotransmisores (Tibbs y cols., 1989b).

La despolarización mediante KCl es una técnica ampliamente utilizada en estudios de liberación, aunque presenta algunas limitaciones. La más importante es que la despolarización sostenida inducida por altas concentraciones de K^+ (30 mM) impide observar acciones moduladoras que tienen su diana en canales presinápticos que se inactivan rápidamente, como los canales de Na^+ y K^+ dependientes de voltaje, de tal manera que, aunque estos canales se activan inicialmente, se inactivan a continuación, permaneciendo en este estado durante todo el periodo de estimulación con K^+ , no contribuyendo por ello de manera significativa al proceso de liberación. La despolarización con KCl sí permite por el contrario estudiar de manera eficaz aquellas modulaciones de la liberación que tienen su diana en canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje.

La utilidad del KCl como inductor de la despolarización en sinaptosomas de corteza cerebral ha sido corroborada por numerosos estudios de liberación de glutamato, en los que se han determinado las acciones moduladoras de distintos receptores presinápticos sobre canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje. Sirvan como ejemplo los estudios de inhibición de la liberación de glutamato por receptores de adenosina (Barrie y Nicholls, 1993), o por receptores metabotrópicos de glutamato del grupo III (Herrero y cols., 1996a). En cambio, aquellos mecanismos de modulación presináptica que afectan a canales de Na^+ y K^+ dependientes de voltaje, y por tanto a los potenciales de

acción o a la excitabilidad presináptica no pueden ser estudiados bajo el régimen de despolarización inducido por K^+ . Es el caso de la acción inhibitoria de ácido araquidónico (Herrero y cols., 1991) o de la acción facilitadora de la liberación mediada por receptores glutamatérgicos del grupo I (Herrero y cols., 1992, 1998; Rodríguez-Moreno y cols., 1998; Sistiaga y Sánchez-Prieto, 2000a,b).

Otro inconveniente de la despolarización con K^+ es que la despolarización prolongada que induce produce una reversión de los transportadores de glutamato dependientes de Na^+ de la membrana plasmática, dada su naturaleza electrogénica, con el consiguiente flujo de aminoácidos citosólicos al medio extracelular, liberación que debe ser cuidadosamente distinguida de la exocitosis.

-Despolarización inducida por 4-aminopiridina

4-aminopiridina (4-AP) bloquea algunos de los canales de K^+ que controlan la excitabilidad del terminal nervioso y las posibles fluctuaciones del potencial de membrana (Thesleff, 1980). Estos canales podrían actuar como estabilizadores del potencial de reposo, ya que su apertura en respuesta a despolarizaciones submáximas permite una rápida repolarización de la membrana, amortiguando así las pequeñas despolarizaciones producidas por la apertura aleatoria de canales de Na^+ . El bloqueo de estos canales con dendrotoxina (nM) o con 4-AP (mM) induce por tanto un potencial de membrana inestable, que posibilita la génesis espontánea de potenciales de acción, con la consiguiente apertura de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje y la exocitosis de neurotransmisores (Tibbs y cols., 1989a, b, 1996).

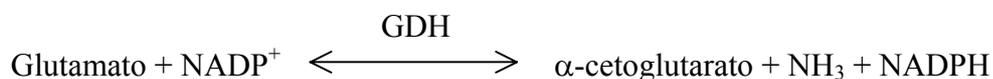
4-AP produce una despolarización más fisiológica que KCl, ya que en ella participan canales de Na^+ y K^+ dependientes de voltaje, además de los canales de Ca^{2+} . Por tanto, 4-AP es un estímulo adecuado para el estudio de aquellas modulaciones que implican un cambio en la excitabilidad presináptica o en las propiedades de los potenciales de acción. Además, el carácter transitorio de las despolarizaciones inducidas por 4-AP se traduce en una menor liberación de neurotransmisor citosólico por reversión del transportador de membrana. (Tibbs y col., 1989b).

El diferente mecanismo de despolarización de KCl y 4-AP permite hacer un primer análisis del mecanismo modulador implicado en el efecto objeto del estudio, ya que aquellas modulaciones que sean observadas únicamente con 4-AP podrán ser

debidas a una acción sobre canales de Na^+ o de K^+ , mientras que las observadas en presencia de ambos agentes despolarizantes implican una modulación de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje o un efecto sobre la maquinaria excitotónica.

Determinación de la liberación de glutamato

El glutamato liberado por estimulación de los sinaptosomas se determinó según la técnica descrita por Nicholls y cols., (1987), midiendo el incremento en la fluorescencia producido al generarse NADPH en la reacción catalizada por el enzima glutamato deshidrogenasa (GDH) en presencia de NADP^+ :



Las variaciones de fluorescencia se registraron a unas longitudes de onda de emisión y de excitación de 340 nm y 460 nm, respectivamente, y las rendijas de excitación y de emisión se fijaron en 15 nm y 20 nm, respectivamente.

Los sinaptosomas se resuspendieron (0,67 mg/ml) en un medio HBM (NaCl 140 mM, KCl 5 mM, NaHCO_3 5 mM, NaH_2PO_4 1,2 mM, MgCl_2 1 mM, glucosa 10 mM y HEPES 10 mM; pH 7,4), siempre en presencia de BSA 16 μM libre de ácidos grasos, y se incubaron a 37°C durante 1 hora en un baño con agitación continua. Transcurrido este tiempo, 1 ml de la suspensión fue transferido a una cubeta de fluorímetro Perkin-Elmer LS-50, que contenía NADP^+ 1mM y CaCl_2 1,33 mM o una mezcla de Ca^{2+} /EGTA (CaCl_2 38 μM y EGTA 50 μM). En este último caso la concentración de calcio libre resultante es de 200 nM.

El ensayo se inició con la adición de 50 unidades de glutamato deshidrogenasa, observándose un incremento en la fluorescencia debido a la presencia de glutamato extrasinaptosomal. La liberación de glutamato inducida por la despolarización se determinó mediante la adición de KCl o 4-AP, registrándose la señal fluorescente cada segundo a lo largo de 5 o 10 minutos, según el experimento.

Los datos de fluorescencia se transformaron en nmoles de glutamato/mg de proteína por comparación con el incremento de fluorescencia producido por la adición de un patrón interno de 2 nmoles de glutamato.

Como se ha mencionado anteriormente, la despolarización de los sinaptosomas provoca también la salida de glutamato citosólico no vesicular, debido a la reversión de los transportadores de la membrana plasmática, por un mecanismo que es independiente de Ca^{2+} . La liberación de glutamato dependiente de Ca^{2+} (liberación vesicular) se calculó, por tanto, como la diferencia entre la liberación obtenida en presencia de 1,33 mM de Ca^{2+} extracelular y la liberación registrada en presencia de una concentración de Ca^{2+} de 200 nM, insuficiente para inducir exocitosis.

Determinación fluorimétrica de la concentración intracelular de calcio libre en la población de sinaptosomas

La concentración citosólica de calcio en la población de sinaptosomas se determinó mediante la sonda fluorescente Fura 2, polianión hidrofílico que une Ca^{2+} de forma específica. En los ensayos se utilizó el éster acetoximetil, Fura 2-AM, que es suficientemente lipofílico para atravesar la membrana plasmática y alcanzar el interior celular, donde las esterasas citosólicas rompen el enlace éster. El Fura 2 liberado queda confinado en el citosol donde se une al Ca^{2+} libre para formar el complejo Ca^{2+} -Fura, que da lugar a una emisión fluorescente cuyo máximo se registra a una longitud de onda de 510 nm, produciéndose además un desplazamiento en el máximo de su espectro de excitación ultravioleta de 380 nm a 340 nm.

Como nuestro equipo de fluorimetría tardaba unos 7 segundos en cambiar la excitación de 340 a 380 nm y por tanto limitaba el número de datos que se podían obtener, los ensayos se realizaron a una única longitud de onda de excitación (340 nm), para poder así registrar los datos con intervalos de 0,5 segundos, realizando, eso sí, la correspondiente calibración al final de cada ensayo.

Los sinaptosomas se resuspendieron (2 mg/ml) en medio HBM con BSA (1 mg/ml) y se preincubaron en un baño termostatzado a 37°C en agitación continua. A los 5 minutos se añadieron CaCl_2 1,33 mM y Fura 2-AM 5 μM , continuando la incubación durante 25 minutos más. Transcurrido este tiempo, la suspensión de sinaptosomas se lavó mediante centrifugación a 12.000 xg durante 1 minuto, y el precipitado se resuspendió en medio HBM (0,67 mg/ml). Para el ensayo se transfirió 1 ml de esta suspensión a una cubeta de fluorímetro, y se registró la señal fluorescente, fijando las longitudes de onda de excitación y de emisión en 340 nm y 510 nm,

respectivamente. El experimento se inició con la adición de CaCl_2 1,33 mM y, una vez estabilizada la señal, se añadieron los diferentes compuestos según el ensayo a realizar, procediendo finalmente a la despolarización de los sinaptosomas con KCl o 4-AP.

La posible contaminación con Fura extrasinaptosomal se estimó por la caída de fluorescencia observada tras la quelación del Ca^{2+} extrasinaptosomal con una mezcla de EGTA 7,5 mM y Tris 45 mM, pH 8. En los casos en que la disminución de la señal fue significativa, ésta se restó a todo el registro.

La señal de fluorescencia mínima (F_{min}) se obtuvo al romper los sinaptosomas mediante la adición del detergente SDS al 0,2 % en ausencia de Ca^{2+} , mientras que la señal de fluorescencia máxima (F_{max}) se obtuvo añadiendo un exceso de CaCl_2 .

Los datos se registraron cada 0,5 segundos, y la concentración citosólica de Ca^{2+} se calculó aplicando la siguiente fórmula:

$$[\text{Ca}^{2+}] = K_d \frac{F_t - F_{\text{min}}}{F_{\text{max}} - F_t}$$

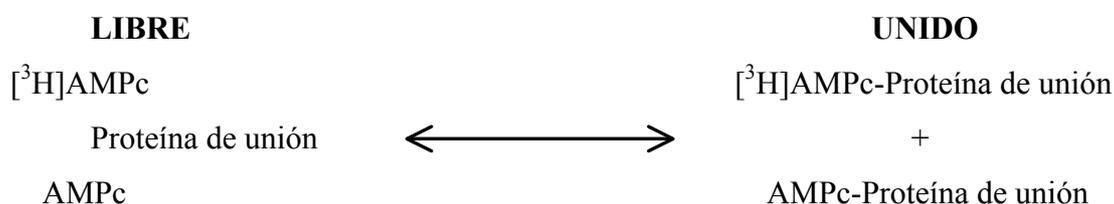
en la que F_t es la fluorescencia registrada para cada tiempo y F_{min} y F_{max} son la fluorescencia mínima y máxima, respectivamente. El valor de la constante de disociación, K_d , para el complejo Ca^{2+} -Fura es de 224 nM (Grynkiewicz y cols., 1985).

Determinación de los niveles intrasinaptosomales de AMPc

Los sinaptosomas se resuspendieron (2 mg/ml) en un medio HBM con BSA (1mg/ml) libre de ácidos grasos y se incubaron en un baño termostático a 37°C en agitación permanente. A los 5 minutos se añadió CaCl_2 (1,33 mM), adenosina desaminasa (1 U/mg de proteína) y el inhibidor de fosfodiesterasas 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX) (1mM). La incubación se mantuvo durante 25 minutos más, a lo largo de los cuales se fueron realizando las aplicaciones de los distintos agentes, dependiendo del experimento a realizar. Una vez transcurridos los 30 minutos se procedió a la recogida de 0,5 ml de cada muestra, a los que se añadió una solución que contenía HClO_4 (1 M) y EDTA (50 mM), para precipitar las proteínas. Las alícuotas se mantuvieron en hielo durante 20 minutos, tras los cuales se centrifugaron a 12.000 xg durante 1 minuto. Se recogieron los sobrenadantes y se neutralizaron con una mezcla de

KOH 3 M y TEA 1,5 M durante 2 minutos a 4°C, agitando vigorosamente. Seguidamente se centrifugó a 12.000 xg durante 1 minuto y se recogieron de nuevo los sobrenadantes, que se almacenaron a 4°C.

Para determinar los niveles intrasinaptosomales de AMPc se utilizó el ensayo comercial de Amersham (TRK 432), que se basa en la competición entre AMPc frío y una cantidad fija de AMPc tritiado por la unión a una proteína con alta afinidad y especificidad por AMPc. La cantidad de complejo [³H]AMPc-proteína que se forma estará, por tanto, inversamente relacionada con la cantidad de AMPc presente en la muestra. Así, la medida del AMPc radiactivo unido a la proteína permite estimar la cantidad de AMPc no marcado en la muestra:



La tabla III. 2. muestra la composición de los diferentes tubos empleados en el ensayo. Los volúmenes se tomaron directamente de las soluciones comerciales, tras realizar las correspondientes reconstituciones. 50 µl de la solución de [³H]AMPc equivalen a 0,9 pmoles. Para obtener una estimación de la concentración de AMPc en pmoles/mg de proteína, en algunos tubos se añadieron cantidades conocidas de AMPc para la realización de una recta patrón.

Una vez añadida la proteína de unión las muestras se mantuvieron durante 2 horas a 4°C. La reacción se detuvo mediante la adición de 200 µl de carbón vegetal seguida de una centrifugación a 12.000 xg durante 1 minuto. Del sobrenadante resultante se tomaron 200 µl, a los que se añadió 2,2 ml de líquido de centelleo, tras lo cual se procedió a la medida de la radiactividad.

Tabla III. 2.

Tubo (x2)	Tampón	AMPc (patrón)	Problema	[³H]AMPc	Proteína de unión
1	150 µl	-	-	50 µl	-
2	50 µl	0 pmol	-	50 µl	100 µl
3	-	1 pmol	-	50 µl	100 µl
4	-	2 pmol	-	50 µl	100 µl
5	-	4 pmol	-	50 µl	100 µl
6	-	8 pmol	-	50 µl	100 µl
7	-	16 pmol	-	50 µl	100 µl
8, etc (x3)	-	-	50 µl	50 µl	100 µl

Imagen de calcio

Los sinaptosomas se resuspendieron (2 mg/ml) en un medio HBM con BSA (1 mg/ml) libre de ácidos grasos y se preincubaron a 37°C con Fura 2-AM (5 µM) y CaCl₂ (1,33 mM) durante 45 minutos. Transcurrido este tiempo, una gota de la suspensión se colocó sobre un cubreobjetos tratado con polilisina, manteniéndose durante 1 hora, tras la cual se retiró por decantación el material no fijado. A continuación, los sinaptosomas fueron transferidos a una cámara de perfusión para su visualización en un microscopio invertido Nikon, con perfusión continua (1-1,5 ml/min) de un medio HBM con CaCl₂ (1,33 mM) a 37°C. Los sinaptosomas individuales cargados con Fura-2 fueron visualizados a 380 nm como partículas brillantes de forma circular de 0,5-1 micras de diámetro. Durante los ensayos los campos fueron iluminados alternativamente a 340 y 380 nm, con un intervalo de 0.8 segundos, y la fluorescencia emitida fue recogida a través de un filtro centrado a 510 nm. Las imágenes fueron recogidas por una cámara CCD (Hamamatsu C4880), y almacenadas en un sistema de procesamiento de imágenes (Kinetic Imaging Ltd., Reino Unido).

El análisis de las imágenes se realizó mediante el programa Lucida Analyse 4.0. En primer lugar, se restó la señal del fondo a las imágenes obtenidas a cada una de las longitudes de onda. A continuación se contruyó una imagen binaria (máscara) a partir de la imagen de 380 nm, con el objetivo de delimitar el contorno de los sinaptosomas y eliminar la señal fluorescente exterior a los mismos. La imagen de ratio (340/380 nm) se obtuvo multiplicando la serie de imágenes de 340 nm por la máscara binaria y dividiendo entre la serie de imágenes de 380 nm. Las concentraciones citosólicas de Ca^{2+} , $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$, se calcularon a partir de las ratios correspondientes, según la ecuación desarrollada por Grynkiewicz y cols., 1985:

$$[\text{Ca}^{2+}] = \frac{R - R_{\text{min}}}{R_{\text{max}} - R} \times K_d \times \beta$$

donde R es la ratio obtenida para cada tiempo, R_{min} la ratio obtenida con la sonda fluorescente en ausencia de Ca^{2+} , R_{max} la ratio obtenida a concentraciones saturantes de Ca^{2+} , β la relación entre la fluorescencia obtenida en ausencia de Ca^{2+} a 380 nm y la obtenida a concentraciones saturantes de Ca^{2+} a esa longitud de onda, y K_d el valor de la constante de disociación para el complejo Ca^{2+} -Fura (224 nM).

R_{min} , R_{max} y β fueron calculadas a partir de una calibración in vitro realizada con Fura-2 ácido (10 μM) disuelto en una solución que simula el medio intracelular (100 mM KCl, 10 mM NaCl, 1 mM MgCl_2 , 10 mM MOPS, sacarosa 0.2 M y BSA 1 mg/ml, pH 7,0), a la que se añadió 2 mM CaCl_2 (condiciones de saturación) o 2 mM EGTA (situación de ausencia de Ca^{2+}).

Inmunocitoquímica

Los sinaptosomas se resuspendieron (2 mg/ml) en un medio HBM con BSA (1 mg/ml) libre de ácidos grasos, a 37°C, y se mantuvieron durante 1 hora sobre un cubreobjetos tratado con polilisina. A continuación fueron fijados durante 5 minutos con paraformaldehído 4 % diluido en tampón fosfato (0.1 M, pH 7.4) y, tras dos lavados de 5 minutos con tampón fosfato y un lavado de 10 minutos con una solución de 50 mM Tris (pH 7.4) y NaCl 0.9 % (TBS), preincubados durante otra hora con una solución

bloqueante de suero normal de cabra al 10 % (NGS) diluida en TBS y Triton X-100 al 0.2 %. Tras este periodo fueron incubados durante 24 horas a 4°C con el anticuerpo primario correspondiente: mGluR7a (1 µg/ml), mGluR4a (1 µg/ml), mGluR8a (1 µg/ml), VGLUT1 (1:1000), VGLUT2 (1:1000), GAD-65 (1:1000), o sinaptofisina (1:1000), diluidos en TBS, con NGS al 1 % y Triton X-100 al 0.2 %. Tras tres lavados de 10 minutos con TBS, los sinaptosomas fueron incubados durante otras 2 horas con los anticuerpos secundarios de cabra anti-conejo o anti-ratón acoplados a Cy2 o Cy3, o de mono anti-cobaya acoplados a fluoresceína, según el caso, diluidos en TBS 1:200. Después de tres lavados de 10 minutos con TBS los sinaptosomas fueron transferidos a un microscopio Nikon y visualizados mediante la luz proveniente de una lámpara de mercurio, empleando un filtro para rodamina en el caso de Cy3 y un filtro para fluoresceína en el caso de Cy2 y fluoresceína. El tratamiento de las imágenes se realizó mediante los programas Lucida Analyse y Paint Shop Pro, asignando el color rojo al marcaje secundario a Cy3 y el color verde a los marcajes secundarios a Cy2 y fluoresceína.

Determinación del potencial de membrana sinaptosomal

La determinación del potencial de membrana sinaptosomal se realizó utilizando la sonda fluorescente yoduro de 3,3'-dipropiltiodicarbocianina, DiSC₃(5), según la técnica descrita por Sims y cols., (1974). El DiSC₃(5) es un catión lipofílico que penetra en el interior de los orgánulos cargados negativamente, formando dímeros cuando alcanza concentraciones elevadas, lo que provoca una disminución de la señal fluorescente. La despolarización de los sinaptosomas induce la salida de la sonda al medio extracelular, observándose un incremento de la señal fluorescente recogida a una longitud de onda de 675 nm tras haber excitado a 651 nm. Dado que se ha descrito que la acumulación excesiva de este indicador en el interior de las mitocondrias sinaptosomales podría inhibir tanto al enzima NADH-deshidrogenasa como el transporte de ADP, con el consiguiente efecto sobre la fosforilación oxidativa y los niveles de ATP, los experimentos se realizaron empleando una baja concentración de la sonda (5 µM), y la duración de las incubaciones nunca fue superior a los 5 minutos.

En los ensayos, los sinaptosomas se resuspendieron (0,67 mg/ml) en un medio HBM con BSA (1 mg/ml) libre de ácidos grasos, a 37°C, y se mantuvieron durante 1

hora en un baño con agitación. Una alícuota de 1 ml se transfirió a una cubeta de fluorímetro que contenía 5 μM de DiSC₃(5) y 1,33 mM de CaCl₂, ajustando las longitudes de onda de excitación y de emisión a 651 nm y 675 nm, respectivamente, y fijando las ventanas a 12 nm y 17 nm. Una vez estabilizada la señal se procedió a la adición de los distintos compuestos en estudio, y se recogieron los datos con intervalos de 1 segundo. La despolarización se indujo con KCl, registrándose un aumento de la señal fluorescente que se expresó en unidades arbitrarias de fluorescencia.

IV. RESULTADOS

MODULACIÓN DE LA LIBERACIÓN DE GLUTAMATO POR RECEPTORES METABOTRÓPICOS DEL GRUPO III EN CORTEZA CEREBRAL DE RATAS ADULTAS

Los receptores metabotrópicos de glutamato (mGluRs) del grupo III (mGluR4, 6, 7 y 8) se expresan a nivel presináptico (Bradley y cols., 1996; Shigemoto y cols., 1996, 1997; Kinoshita y cols., 1998) en diferentes regiones del Sistema Nervioso Central, donde inhiben de forma retroalimentativa la liberación de glutamato (Gerau y Conn, 1995; Herrero y cols., 1996a). Todos ellos son activados por el agonista selectivo L(+)-2-amino-4-fosfonobutirato (L-AP4) (Conn y Pin, 1997; Schoepp y cols., 1999), aunque con distinta afinidad, siendo la EC_{50} del orden de 150-500 μM en el caso de mGluR7, y del orden de 0,4-1,2 μM en el caso de mGluR4, 6 y 8 (Conn y Pin, 1997; Schoepp y cols., 1999; Cartmell y Schoepp, 2000). La inhibición de la liberación de glutamato producida por estos receptores se ha relacionado con la reducción en la actividad de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (Sahara y Westbrook, 1993; Tyler y Lovinger 1995; Glaum y Miller, 1995; Takahashi y cols., 1996; Vázquez y Sánchez-Prieto 1997; Stefani y cols., 1998a; Perroy y cols., 2000). Sin embargo, se ha demostrado que estos receptores disminuyen también los niveles intracelulares de AMPc, tanto en sistemas de expresión heteróloga (Tanabe y cols., 1993; Nakajima y cols., 1993; Okamoto y cols., 1994; Saugstad y cols., 1994; Duvoisin y cols., 1995; Wu y cols., 1998a) como en preparaciones neuronales (Schoepp y Johnson, 1993; Herrero y cols., 1996a; Schaffhauser y cols., 1997), sin que se conozcan las repercusiones de esta vía de señalización sobre la modulación de la liberación del neurotransmisor.

Algunos datos sugieren que la expresión en corteza cerebral de los diferentes subtipos de receptores glutamatérgicos del grupo III podría variar con el desarrollo. En este sentido, se ha observado que bajas concentraciones de L-AP4 (2-3 μM) inhiben de manera acusada la liberación de glutamato en ratas jóvenes (21 días) (Herrero y cols., 1996a), pero no en ratas adultas (Vázquez y cols., 1995), sugiriendo una caída en la expresión de los receptores de alta afinidad por L-AP4 con el desarrollo. Es posible, sin embargo, que los terminales sinápticos de ratas adultas sí expresen receptores de baja afinidad por el agonista (Shigemoto y cols., 1997; Corti y cols., 2002), y que éstos actúen como autorreceptores presinápticos inhibiendo la liberación de glutamato a estas edades.

Nuestro primer objetivo ha sido indagar la presencia de estos receptores de baja afinidad por L-AP4 en corteza cerebral de ratas adultas, realizar su caracterización farmacológica y su identificación inmunohistoquímica, y determinar cuales son los mecanismos moleculares implicados en sus efectos moduladores. Asimismo, se ha estudiado la repercusión funcional que la disminución de los niveles intracelulares de AMPc mediada por estos receptores tiene sobre la liberación de glutamato.

L-AP4 reduce, a altas concentraciones, la liberación de glutamato en terminales sinápticos de corteza cerebral de ratas adultas (2-3 meses)

Con el fin de poner de manifiesto la posible existencia de una vía inhibitoria mediada por mGluRs de baja afinidad por L-AP4 en ratas adultas, estudiamos la liberación de glutamato inducida por los agentes despolarizantes KCl (30 mM) y 4-aminopiridina (4-AP) (1 mM) en sinaptosomas de corteza cerebral, y analizamos el efecto de L-AP4 a altas concentraciones (1 mM) sobre dicha liberación. La liberación de glutamato dependiente de calcio después de 5 minutos de despolarización con KCl (Figura IV.1., A) y 4-AP (Figura IV.1., B) fue de $3,73 \pm 0,14$ y $3,89 \pm 0,31$ nanomoles/mg de proteína, respectivamente. La adición previa de L-AP4 redujo esta liberación a $2,78 \pm 0,12$ y $2,91 \pm 0,17$ respectivamente (Figura IV.1., A y B). El efecto inhibitorio de L-AP4 fue dependiente de la concentración del agonista, obteniéndose una EC_{50} de $309,4 \mu\text{M}$ (Figura IV.1., C), situada en el rango de magnitud esperable para un receptor de baja afinidad por L-AP4 (Conn y Pin, 1997; Cartmell y Schoepp, 2000). La inhibición de la liberación fue revertida por el antagonista de receptores glutamatérgicos del grupo III CPPG ($100 \mu\text{M}$) (Figura IV.1., D), y significativamente reducida por toxina pertúsica (PTx) ($1,5 \mu\text{g/ml}$), lo que sugiere que el efecto mediado por estos receptores es dependiente de la activación de proteínas G del tipo Gi/Go.

Los antagonistas de calmodulina calmidazolium ($1 \mu\text{M}$) y ophiobolina A ($50 \mu\text{M}$) también redujeron de forma significativa el efecto de L-AP4 (Figura IV.1., D). Estos resultados están de acuerdo con el hallazgo reciente de la existencia de un sitio de unión para calmodulina en el extremo C-terminal del receptor, y con la necesidad de la unión de calmodulina al receptor para que se produzca la acción inhibitoria de L-AP4 sobre la transmisión sináptica (O'Connor y cols., 1999; El Far y cols., 2001; Dev y cols., 2001; Sorensen y cols., 2002). Se ha especulado que la inhibición de la unión de

calmodulina podría favorecer el anclaje de las subunidades $\beta\gamma$ al receptor, lo que reduciría las acciones de éstas sobre su diana.

El inhibidor de amplio espectro de proteína quinasas staurosporina (100 nM), y los inhibidores más específicos de proteína quinasa C y proteína quinasa A bisindolylmaleimida (1 μ M) y H-89 (10 μ M), respectivamente, no modificaron de manera significativa el efecto inhibitorio de L-AP4 (Figura IV.1., D), lo que sugiere que estas quinasas no intervienen en la vía de señalización puesta en marcha por el receptor.

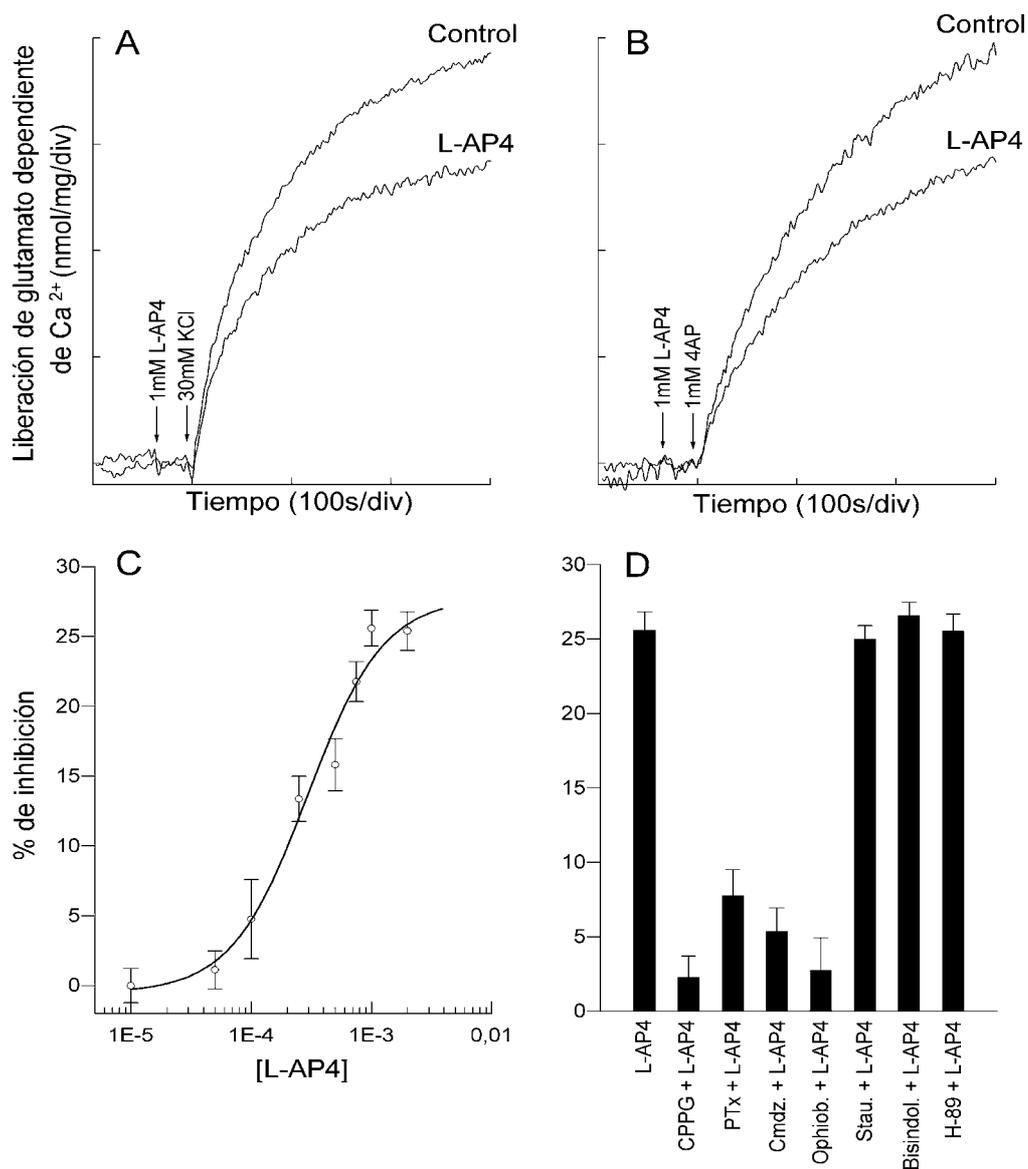


Figura IV. 1. Caracterización farmacológica de la inhibición de la liberación de glutamato por L-AP4. Los sinaptosomas de corteza cerebral de ratas adultas (2-3 meses) se resuspendieron (0.67 mg/ml) en un medio HBM con BSA (1 mg/ml) libre de ácidos grasos y se preincubaron a 37°C durante 1 hora. 1 ml de esta suspensión se utilizó para determinar la liberación de glutamato, tal y como se describe en Materiales y Métodos. La liberación de glutamato dependiente de Ca²⁺ se calculó como la diferencia entre la secreción obtenida en los 5 minutos siguientes a la despolarización en presencia de CaCl₂ 1,33 mM y la obtenida en un medio en el que se mantuvo una concentración de Ca²⁺ libre de 200 nM. L-AP4 (1 mM) se añadió 30 segundos antes de la despolarización con KCl (30 mM) (A) o 4-aminopiridina (4-AP) (1 mM) (B). La curva concentración-respuesta de L-AP4 (C) se determinó mediante la adición de diferentes concentraciones del agonista 30 segundos antes de la aplicación de KCl. El antagonista de mGluR III CPPG (100 μM) (D) fue añadido 1 minuto antes de la despolarización. En los experimentos con PTX (1,5 μg/ml) los sinaptosomas fueron preincubados con la toxina durante las 2 horas previas a la realización del ensayo de liberación. Los antagonistas de calmodulina calmidazolium (Cmdz.) (1 μM) y ophiobolina A (Ophiob.) (50 μM) y los inhibidores de proteína quinasas staurosporina (Stau.) (100 nM), bisindolylmaleimida I (Bisindol.) (1 μM) y H-89 (10 μM) fueron añadidos 30 minutos antes de la realización de los ensayos correspondientes. Los resultados son la media ± SD de 3 a 9 experimentos independientes.

La inhibición de la liberación de glutamato producida por L-AP4 no se debe a una disminución de los niveles intracelulares de AMPc

Los receptores metabotrópicos de glutamato del grupo III reducen los niveles intracelulares de AMPc a través de una disminución de la actividad de adenilato ciclasa (Okamoto y cols., 1994; Saugstad y cols., 1994; Duvoisin y cols., 1995; Herrero y cols., 1996a). Este efecto ha sido ampliamente descrito tanto en sistemas de expresión heteróloga como en preparaciones neuronales, pero se desconoce cual es su repercusión sobre la liberación de glutamato. Con el objeto de determinar si la inhibición observada en los estudios de liberación era consecuencia de una disminución en la concentración de AMPc, estudiamos los efectos de L-AP4 sobre los niveles intracelulares del nucleótido. La concentración de AMPc no se modificó de manera significativa por la adición de L-AP4 (1 mM) ni en ausencia ni en presencia de KCl (30 mM) (Figura IV. 2.), añadido para reproducir las condiciones del ensayo de liberación. Por tanto, podemos concluir que la vía de inhibición de la adenilato ciclasa no es la responsable del efecto inhibitor de estos receptores sobre la liberación de glutamato.

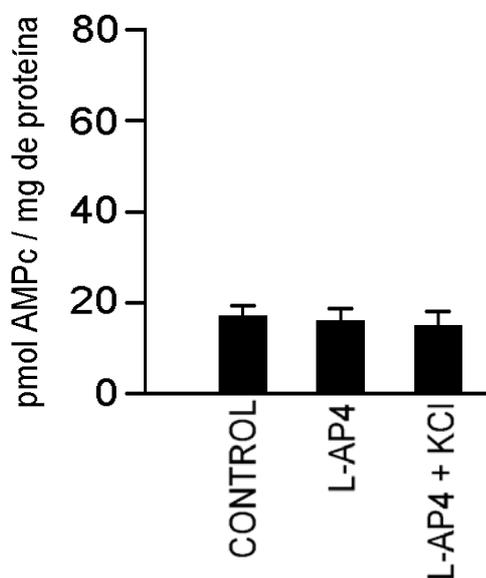


Figura IV. 2. L-AP4 no modifica los niveles intracelulares de AMPc. Los sinaptosomas de corteza cerebral de ratas adultas (2-3 meses) se resuspendieron (2 mg/ml) en un medio HBM con BSA (1 mg/ml) libre de ácidos grasos y se incubaron durante 30 minutos a 37°C. A los 5 minutos de la resuspensión se añadieron CaCl_2 (1,33 mM), 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX) (1 mM) y adenosina desaminasa (1 U/mg de proteína), añadida para prevenir cualquier acción tónica mediada por receptores de adenosina. L-AP4 (1 mM) sólo, o en combinación con KCl (30 mM) fue añadido 2 minutos antes de la recogida de las muestras. La determinación de AMPc se realizó mediante la técnica de inmunoensayo, tal y como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados son la media \pm SD de 4 experimentos diferentes.

La inhibición de la liberación producida por L-AP4 se debe a una reducción de la actividad de los canales de calcio dependientes de voltaje del tipo N

Una vez descartado que una disminución en la concentración de AMPc sea la causa de la inhibición de la liberación producida por L-AP4, nos planteamos la posibilidad de que las acciones del agonista estuvieran relacionadas bien con una modulación de los canales de potasio que controlan la duración del potencial de acción, bien con una disminución de la entrada de Ca^{2+} a través de los canales de Ca^{2+} acoplados a la exocitosis. Dado que L-AP4 reduce tanto la liberación inducida por 4-AP como la inducida por KCl parece poco probable que la inhibición de la liberación sea debida a una modulación de los potenciales de acción, y más bien sugiere la inhibición de canales de Ca^{2+} como mecanismo responsable. Con el fin de confirmar esta hipótesis, estudiamos los efectos de la activación del receptor sobre el incremento en la concentración citosólica de Ca^{2+} inducido por la despolarización en la población de terminales.

La despolarización provocada por KCl (30 mM) produjo una elevación de la concentración citosólica de Ca^{2+} que fue reducida, de manera parcial pero significativa, por el agonista glutamatérgico (Figura IV. 3., A). Esta inhibición fue revertida por el antagonista de los mGluRs de los grupos II y III MPPG (1 mM) y por el antagonista selectivo del grupo III CPPG (100 μM). Finalmente, la activación de proteína quinasa C (PKC) mediante el éster de forbol PDBu también revirtió el efecto de L-AP4.

En corteza cerebral la exocitosis de glutamato está acoplada principalmente a dos tipos de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (Luebke y cols., 1993; Mintz y cols., 1995; Turner y Dunlap, 1995; Vázquez y Sánchez-Prieto, 1997): los canales del tipo N, que son bloqueados selectivamente por ω -conotoxina-GVIA (Olivera y cols., 1985) y los canales del tipo P/Q, que son bloqueados selectivamente por ω -agatoxina-IVA (Mintz y cols., 1995). Para establecer cual de los dos tipos de canales es la diana a través de la cual se produce el efecto inhibitorio de L-AP4, procedimos a la realización de experimentos de liberación en presencia de las dos toxinas y del agonista glutamatérgico (Figura IV. 3., B y C). La liberación control inducida por KCl (30 mM) fue reducida en un $70,8 \pm 8,1$ % por ω -agatoxina-IVA (ω -Aga-IVA) (200 nM) y en un $25,0 \pm 3,2$ % por ω -conotoxina-GVIA (ω -CgT-GVIA) (2 μM) (Figura IV. 3., C). Ahora bien, dado que la

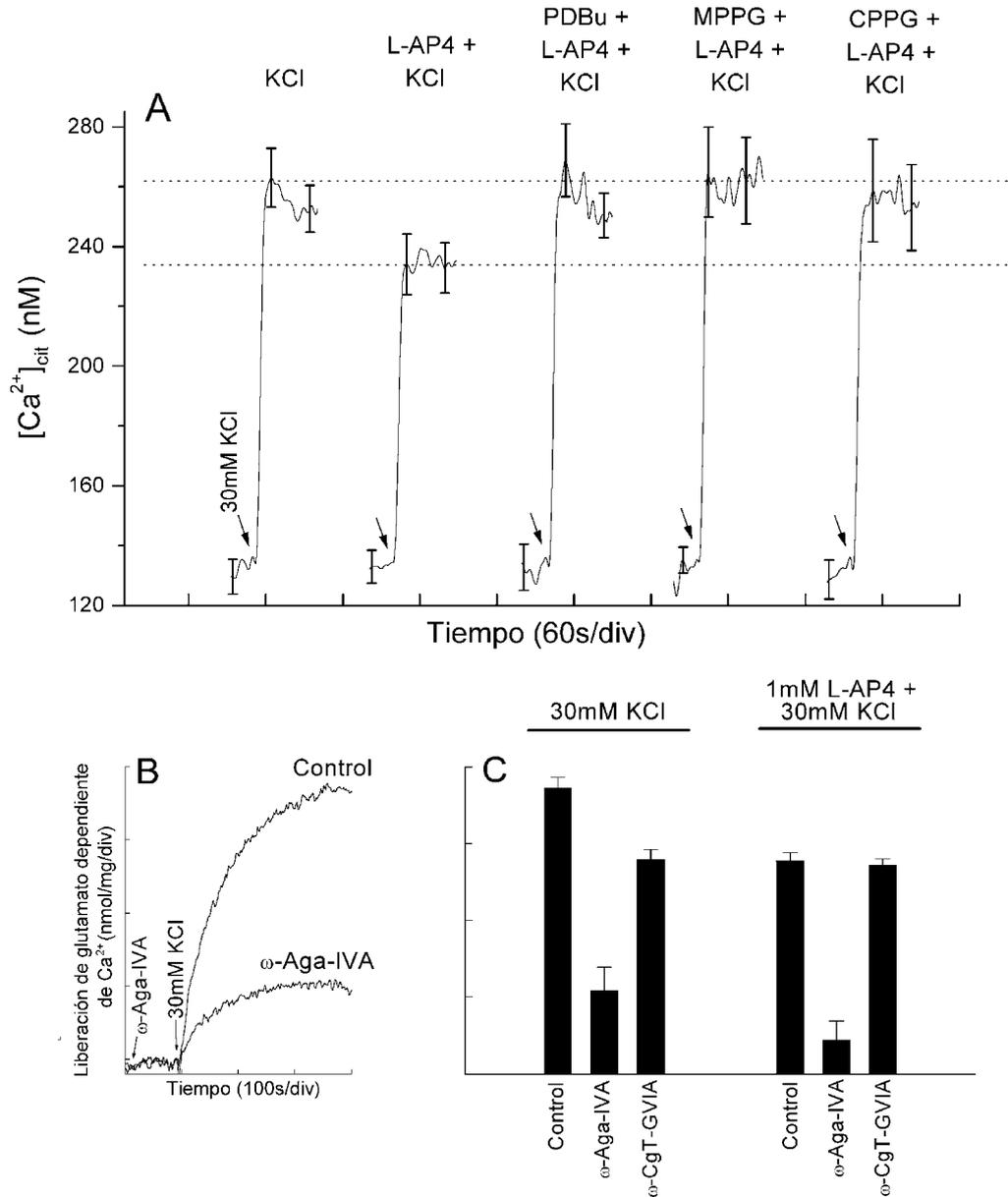


Figura IV. 3. L-AP4 reduce el incremento en la concentración citosólica de Ca²⁺ inducido por la despolarización y el componente de liberación asociado a los canales de Ca²⁺ del tipo N. Para la determinación de la concentración citosólica de Ca²⁺, [Ca²⁺]_{cit} (A), los sinaptosomas de corteza cerebral de ratas adultas (2-3 meses) se resuspendieron (2 mg/ml) en un medio HBM con BSA (1 mg/ml) libre de ácidos grasos y se preincubaron a 37°C durante 30 minutos con Fura 2-AM (5 μM) y CaCl₂ (1,33 mM). A continuación se centrifugaron a 12.000 xg durante 1 minuto y se resuspendieron (0,67 mg/ml) en medio HBM con BSA, al que se añadió CaCl₂ (1,33 mM). L-AP4 (1 mM) y PDBu (1 μM) se añadieron 30 y 40 segundos respectivamente antes de despolarizar con KCl (30 mM). Los antagonistas MPPG (500 μM) y CPPG (100 μM) fueron añadidos 1 minuto antes de la despolarización. En los experimentos de liberación (B y C) los sinaptosomas se incubaron (0.67 mg/ml) en medio HBM con BSA (1 mg/ml) libre de ácidos grasos, a 37°C, durante 1 hora. El bloqueante de canales de Ca²⁺ del tipo P/Q ω-Agatoxina-IVA (ω-Aga-IVA) (200nM) y el bloqueante de canales de Ca²⁺ del tipo N ω-Conotoxina-GVIA (ω-CgT-GVIA) (2 μM) fueron añadidos 100 segundos antes de la despolarización con KCl (30 mM) y 70 segundos antes de la aplicación de L-AP4 (1mM). El diagrama de barras (C) muestra la liberación de glutamato dependiente de Ca²⁺ inducida tras 5 minutos de despolarización con KCl (30 mM) en ausencia (Control) y en presencia de los bloqueantes de canales de Ca²⁺, ambos en ausencia y presencia de L-AP4. Los resultados son la media ± SD de 3 a 5 experimentos independientes.

inhibición producida por L-AP4 se incrementó en presencia de ω -agatoxina-IVA ($88,3 \pm 6,7 \%$), pero no con ω -conotoxina-GVIA ($27,1 \pm 2,1 \%$) (Figura IV. 3., C), cabe pensar que el efecto inhibitor de L-AP4 sobre la liberación de glutamato es debido a una reducción preferente de la entrada de Ca^{2+} a través de canales dependientes de voltaje del tipo N.

Los resultados obtenidos con KCl fueron reproducidos también con 4-AP (1 mM), observándose que ω -agatoxina-IVA y ω -conotoxina-GVIA redujeron la liberación de glutamato en un $72,8 \pm 5,4 \%$ y un $30,1 \pm 3,8 \%$ respectivamente (Figura IV. 4.). En presencia de L-AP4 la inhibición producida por ω -agatoxina-IVA se incrementó hasta un $91,5 \pm 3,8 \%$, mientras que la observada con ω -conotoxina-GVIA se mantuvo en un $32,1 \pm 5,1 \%$ (Figura IV. 4., B).

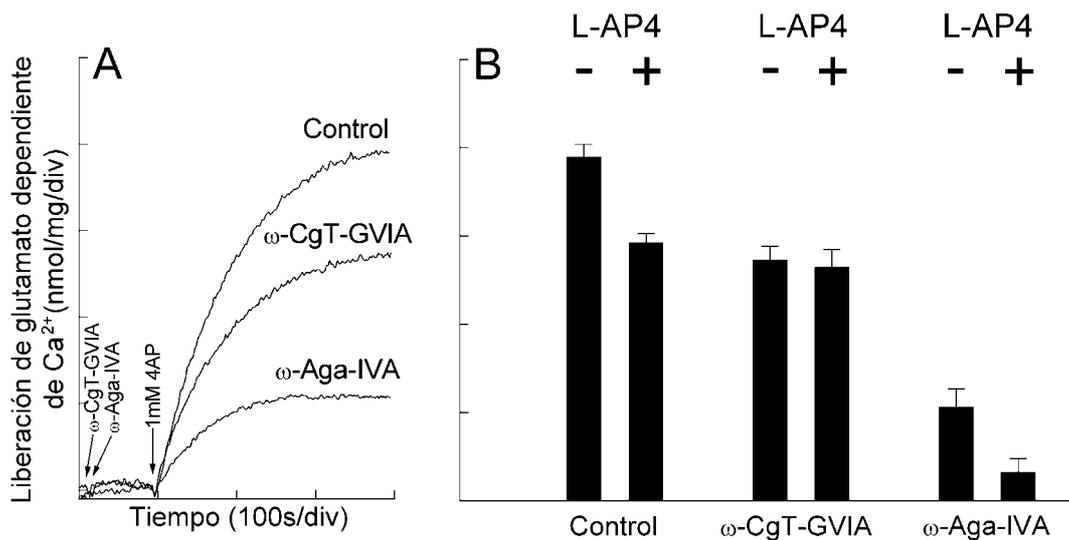


Figura IV. 4. L-AP4 inhibe la liberación de glutamato inducida por 4-aminopiridina a través de una reducción en el componente de liberación asociado a canales de Ca^{2+} del tipo N. Los sinaptosomas de corteza cerebral de ratas adultas (2-3 meses) se incubaron (0.67 mg/ml) en medio HBM con BSA (1 mg/ml) libre de ácidos grasos a 37°C durante 1 hora. 1 ml de esta suspensión se utilizó para determinar la liberación de glutamato. El bloqueante de canales de Ca^{2+} del tipo P/Q ω -Agatoxina-IVA (ω -Aga-IVA) (200nM) y el bloqueante de canales del tipo N ω -Conotoxina-GVIA (ω -CgT-GVIA) (2 μM) fueron añadidos 100 segundos antes de la despolarización con 4-AP (1 mM) y 70 segundos antes de la aplicación de L-AP4 (1mM). El diagrama de barras (B) muestra la liberación de glutamato dependiente de Ca^{2+} inducida tras 5 minutos de despolarización con 4-AP (1 mM) en ausencia (Control) y en presencia de los bloqueantes de canales de Ca^{2+} , ambos en ausencia y presencia de L-AP4. Los resultados son la media \pm SD de entre 4 y 5 experimentos obtenidos del mismo número de preparaciones de sinaptosomas.

Los canales de calcio de los tipos N y P/Q presentan un diferente acoplamiento a la exocitosis de glutamato en corteza cerebral de ratas adultas

Una vez establecido el mecanismo por el cual los receptores sensibles a L-AP4 inhiben la liberación de glutamato, quisimos estudiar la eficacia relativa de los canales de calcio de los tipos N y P/Q sobre el control de la liberación, y determinar si un distinto grado de acoplamiento de estos canales a la exocitosis podría ser responsable de la modulación preferencial ejercida por el receptor glutamatérgico sobre el componente de liberación asociado a los canales del tipo N. Para ello realizamos ensayos de liberación a distintas concentraciones de calcio extracelular, en presencia de las correspondientes toxinas, y cuantificamos el componente de liberación asociado a cada tipo de canal.

La liberación de glutamato asociada a los canales de los tipos N y P/Q mostró una sensibilidad diferente a la reducción de la concentración extracelular de Ca^{2+} , $[\text{Ca}^{2+}]_o$. Así, el componente de liberación de los canales del tipo N disminuyó progresivamente con la reducción de la $[\text{Ca}^{2+}]_o$, hasta desaparecer a una $[\text{Ca}^{2+}]_o$ de 0,5 mM. Dado que a esta baja concentración de $[\text{Ca}^{2+}]_o$ toda la liberación depende de la actividad de los canales de Ca^{2+} del tipo P/Q (Figura IV. 5.) cabe pensar que, en terminales cerebrocorticales de ratas adultas, los canales de Ca^{2+} del tipo N están peor acoplados a la liberación de glutamato que los canales del tipo P/Q.

El hecho de que L-AP4 reduzca la actividad de los canales de Ca^{2+} del tipo P/Q en otras preparaciones (Perroy y cols., 2000), nos llevó a plantearnos si la mayor eficacia mostrada por este tipo de canales sobre el control de la liberación podría enmascarar la inhibición del componente de liberación asociado a los canales P/Q en nuestra preparación. Así, es posible que el receptor inhiba también la actividad de los canales del tipo P/Q, pero que el mejor acoplamiento de éstos a la exocitosis permita que se alcance una $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en la zona activa suficiente para que se produzca la liberación de todo el glutamato vesicular. Si esto fuera así, la reducción de la concentración extracelular de calcio debería favorecer la detección de esta modulación. Sin embargo, L-AP4 no modificó la liberación de glutamato a una $[\text{Ca}^{2+}]_o$ de 0,5 mM (Figura IV. 6.), lo que en principio sugiere que el mayor grado de acoplamiento de los canales del tipo P/Q a la exocitosis no enmascara una posible modulación del componente de liberación asociado a estos canales de Ca^{2+} .

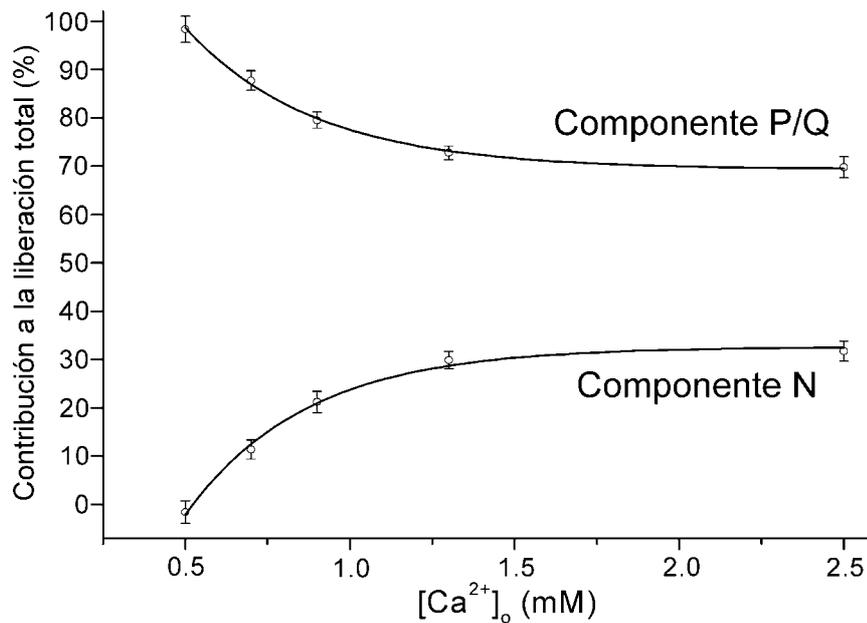


Figura IV. 5. La disminución de la concentración extracelular de Ca^{2+} suprime la contribución de los canales de Ca^{2+} del tipo N a la liberación de glutamato. Los sinaptosomas de corteza cerebral de ratas adultas (2-3 meses) se incubaron (0.67 mg/ml) en medio HBM con BSA (1 mg/ml) libre de ácidos grasos a 37°C durante 1 hora. 1 ml de esta suspensión se utilizó para determinar la liberación de glutamato. El bloqueante de canales de Ca^{2+} del tipo P/Q ω -agatoxina-IVA (200 nM) y el bloqueante de canales del tipo N ω -conotoxina-GVIA (2 μM) fueron añadidos 100 segundos antes de la despolarización con 4-AP (1 mM), determinándose la liberación inducida durante 5 minutos de despolarización. El componente de liberación asociado a cada tipo de canal para cada concentración de Ca^{2+} extracelular, $[\text{Ca}^{2+}]_o$, fue calculado como la fracción de la liberación total sensible a cada toxina a esa concentración. Los resultados son la media \pm SEM de 4 a 6 experimentos diferentes.

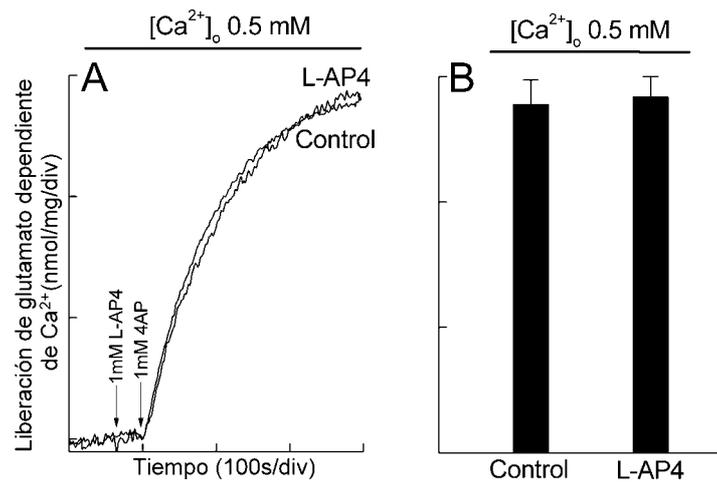


Figura IV. 6. L-AP4 no afecta al componente de liberación asociado a canales de Ca^{2+} del tipo P/Q a bajas concentraciones de Ca^{2+} extracelular. Los sinaptosomas de corteza cerebral de ratas adultas (2-3 meses) se incubaron (0.67 mg/ml) en medio HBM con BSA (1 mg/ml) libre de ácidos grasos a 37°C durante 1 hora. 1 ml de esta suspensión se utilizó para determinar la liberación de glutamato. La figura muestra la liberación de glutamato inducida por 4-AP (1 mM) a una concentración de Ca^{2+} extracelular, $[\text{Ca}^{2+}]_o$, de 0.5 mM en ausencia (Control) y presencia de 1 mM L-AP4. Los resultados son la media \pm SEM de 3 preparaciones diferentes.

La activación de proteína quinasa C y proteína quinasa A suprime la inhibición de la liberación de glutamato producida por L-AP4

La activación previa de la proteína quinasa C (PKC) mediante el éster de forbol PDBu (1 μ M) suprimió el efecto inhibitor de L-AP4 (1 mM) sobre la liberación de glutamato (Figura IV.7., A). Esta reversión no se observó cuando los ensayos se hicieron en presencia del inhibidor de proteína quinasas staurosporina (100 nM), ni cuando en lugar de PDBu se utilizó el forbol inactivo α -PDD (1 μ M) (Figura IV.7., B).

La activación de adenilato ciclasa mediante forskolina también redujo significativamente la inhibición producida por L-AP4, por un mecanismo dependiente de la activación de PKA, como lo ponen de manifiesto los experimentos realizados en presencia del inhibidor de PKA H-89 (10 μ M) (Figura IV.7., B).

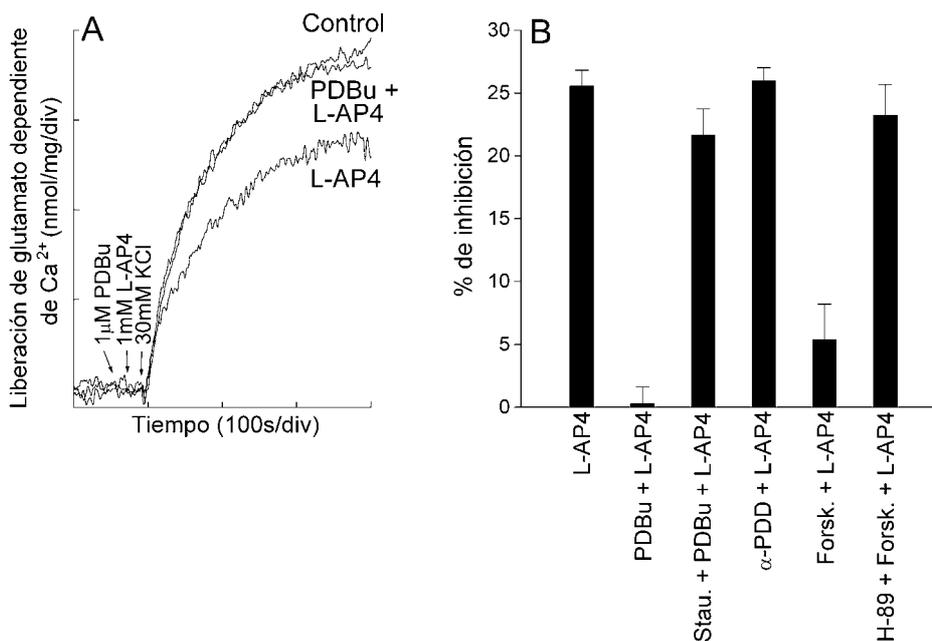


Figura IV. 7. La activación de PKC y PKA suprime la inhibición de la liberación de glutamato producida por L-AP4. Los sinaptosomas de corteza cerebral de ratas adultas (2-3 meses) se incubaron (0.67 mg/ml) en medio HBM con BSA (1 mg/ml) libre de ácidos grasos a 37°C durante 1 hora. 1 ml de esta suspensión se utilizó para determinar la liberación de glutamato. PDBu (1 μ M), α -PDD (1 μ M) o forskolina (Forsk.) (100 μ M) fueron aplicados 10 segundos antes de la adición de L-AP4 y 40 segundos antes de la despolarización con KCl (30 mM). Los inhibidores de proteína quinasas staurosporina (Stau.) (100 nM) y H-89 (10 μ M) se añadieron 30 minutos antes de la realización de los ensayos correspondientes. Los resultados son la media \pm SD de 3 a 7 experimentos diferentes.

L-AP4 sí reduce los niveles de AMPc aumentados tras la activación de la adenilato ciclasa

Previamente hemos descrito que la activación de los receptores glutamatérgicos de baja afinidad por L-AP4 no modifica los niveles de AMPc en condiciones basales. Llegados a este punto nos planteamos qué efecto tendría la aplicación del agonista en aquellas situaciones en las que existe un aumento previo de los niveles del nucleótido, como ocurre tras la activación de la adenilato ciclasa.

La activación de la adenilato ciclasa mediante forskolina (100 μ M) en presencia de IBMX (1 mM) y de adenosina desaminasa (1 U/mg) produjo un fuerte incremento de la concentración intracelular de AMPc (Figura IV. 8.), que fue reducido significativamente por L-AP4 (1 mM). La adición previa del antagonista de proteína quinasa A H-89 (10 μ M) potenció discretamente el aumento de los niveles de AMPc observado con forskolina, pero no modificó cualitativamente el efecto de L-AP4. Por el contrario, la activación de la proteína quinasa C mediante PDBu (1 μ M) suprimió completamente la acción de L-AP4.

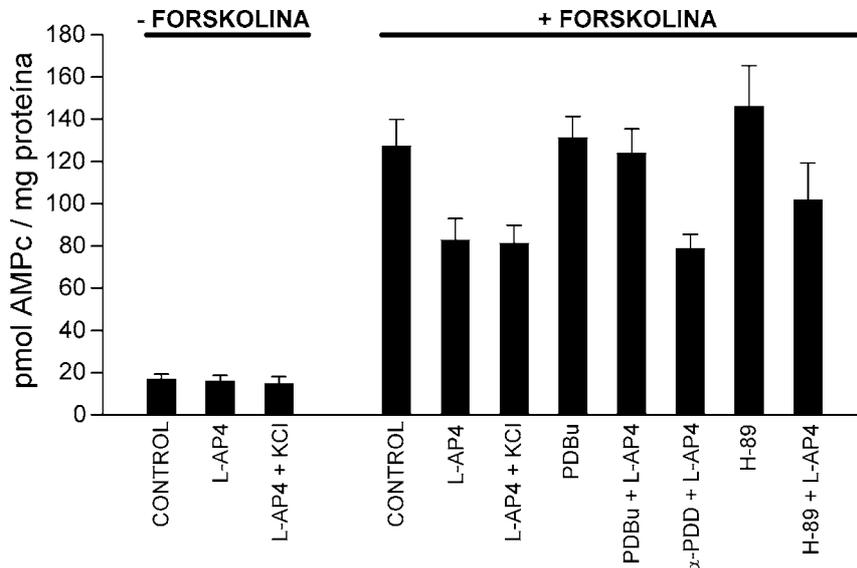


Figura IV. 8. L-AP4 reduce los niveles de AMPc en presencia pero no en ausencia de forskolina. Los sinaptosomas de corteza cerebral de ratas adultas (2-3 meses) se resuspendieron (2 mg/ml) en un medio HBM con BSA (1 mg/ml) libre de ácidos grasos y se incubaron durante 30 minutos a 37°C. A los 5 minutos de la resuspensión se añadieron CaCl₂ (1,33 mM), adenosina desaminasa (1 U/mg de proteína) y 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX) (1 mM). En los experimentos con forskolina (100 μ M), ésta fue añadida 15 minutos después de la resuspensión. L-AP4 (1 mM) sólo, o en combinación con KCl (30 mM), fue añadido 2 minutos antes de la recogida de las muestras. PDBu (1 μ M) y α -PDD (1 μ M) se aplicaron 1 minuto antes que L-AP4, mientras que H-89 (10 μ M) se añadió en el momento de la resuspensión. La determinación de AMPc se realizó mediante la técnica de inmunoensayo, tal y como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados son la media \pm SD de 3 a 5 experimentos diferentes.

Repercusión funcional de la reducción de los niveles de AMPc sobre la liberación de glutamato

Puesto que L-AP4 reduce los niveles de AMPc únicamente en aquellas situaciones en las que existe una activación previa de la vía de señalización de adenilato ciclasa / AMPc, nos planteamos si esta inhibición de la actividad de adenilato ciclasa tenía alguna repercusión funcional sobre la liberación de glutamato. En sinaptosomas cerebrocorticales, la activación de esta vía mediante forskolina incrementó la liberación espontánea dependiente de Ca^{2+} (Figura IV. 9., A). Esta facilitación de la liberación inducida por forskolina requiere de la activación de proteína quinasa A, como lo pone de manifiesto su supresión por el inhibidor H-89 (Figura IV. 9., C). La adición previa de L-AP4 (1 mM) inhibió de manera acusada esta liberación inducida por forskolina (Figura IV. 9., A y C). Sp-8-Br-cAMPS, análogo de AMPc que activa directamente proteína quinasa A, provocó también un incremento en la liberación espontánea de glutamato (Figura IV. 9., B), que fue prevenida por H-89, pero sobre el cual L-AP4 tuvo un efecto significativamente menor. Estos resultados sugieren que la inhibición producida por L-AP4 sobre la liberación inducida por forskolina es en buena parte debida a la inhibición de la actividad de adenilato ciclasa mediada por el receptor glutamatérgico, mientras que la inhibición de la liberación inducida por Sp-8-Br-cAMPS es posiblemente debida a la inhibición de los canales de Ca^{2+} .

Para determinar si L-AP4 era capaz de reducir también la facilitación de la liberación inducida por la activación de receptores acoplados a proteínas Gs estudiamos el efecto del agonista de receptores β -adrenérgicos isoproterenol en los niveles basales de AMPc y en la liberación de glutamato. Isoproterenol (100 μM) produjo un incremento significativo en los niveles intracelulares de AMPc, que fue inhibido por L-AP4 (1 mM) y completamente suprimido por el antagonista β -adrenérgico propranolol (Figura IV. 10., A). Al igual que en los experimentos con forskolina, L-AP4 redujo significativamente la liberación espontánea de glutamato inducida por el agonista β -adrenérgico (Figura IV. 10., B y C).

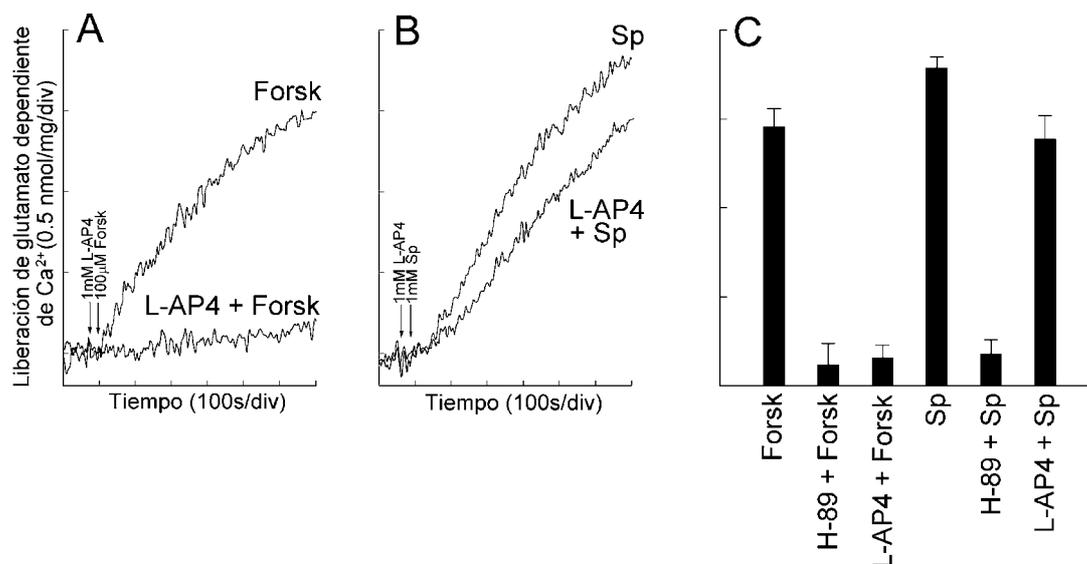


Figura IV. 9. L-AP4 suprime la liberación espontánea inducida por forskolina a través de una reducción en los niveles de AMPc. Los sinaptosomas de corteza cerebral de ratas adultas (2-3 meses) se incubaron (0.67 mg/ml) en medio HBM con BSA (1 mg/ml) libre de ácidos grasos durante 1 hora a 37°C. L-AP4 (1 mM) fue añadido 10 segundos antes de la aplicación de forskolina (Forsk) (100 μ M) (A) o de Sp-8-Br-cAMPS (Sp) (1mM) (B). H-89 (10 μ M) fue añadido 30 minutos antes de la realización de los ensayos correspondientes. Los resultados son la media \pm SD de 3 a 4 experimentos independientes.

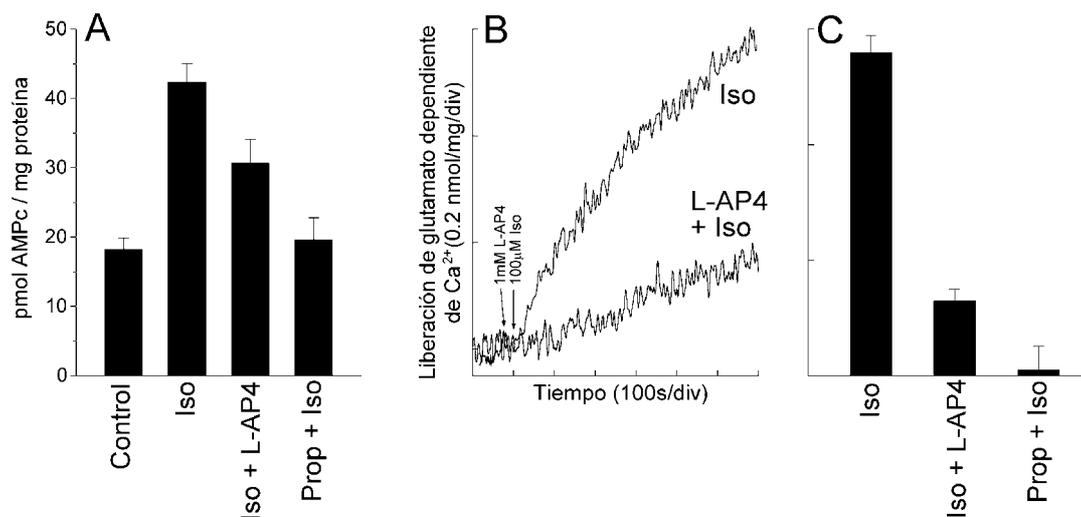


Figura IV. 10. L-AP4 reduce el incremento de los niveles de AMPc y la liberación de glutamato inducidos por la activación de receptores β -adrenérgicos. Para la determinación de los niveles intracelulares de AMPc, los sinaptosomas de corteza cerebral de ratas adultas (2-3 meses) se resuspendieron (2 mg/ml) en un medio HBM con BSA (1 mg/ml) libre de ácidos grasos a 37°C. A los 5 minutos de la resuspensión se añadieron CaCl_2 (1,33 mM), adenosina desaminasa (1 U/mg de proteína) y 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX) (1 mM). El AMPc endógeno registrado en ausencia de cualquier aplicación fue considerado como control. En los experimentos con isoproterenol (Iso) (100 μ M), éste fue añadido 15 minutos después de la resuspensión. L-AP4 (1 mM) se aplicó 2 minutos antes de la recogida de las muestras. El antagonista β -adrenérgico propranolol (Prop) (100 μ M) fue añadido 1 minuto antes que isoproterenol. La determinación de AMPc se realizó mediante la técnica de inmunoensayo, tal y como se describe en Materiales y Métodos. En los experimentos de liberación (B y C) los sinaptosomas se incubaron (0.67 mg/ml) en medio HBM con BSA (1 mg/ml) a 37°C durante 1 hora y 1 ml de esta suspensión fue utilizado para determinar la liberación de glutamato. El diagrama de barras (C) muestra la liberación de glutamato dependiente de Ca^{2+} inducida por isoproterenol (100 μ M) en ausencia (Iso) y en presencia de L-AP4 (1 mM) o propranolol (Prop) (100 μ M), añadidos 10 segundos y 1 minuto respectivamente antes que el agonista β -adrenérgico. Los resultados son la media \pm SD de 3 a 4 experimentos independientes.

Estos resultados ponen de manifiesto que los receptores glutamatérgicos de baja afinidad por L-AP4 inhiben, a través de una reducción en la actividad de adenilato ciclasa, la liberación de glutamato inducida por la activación de la vía de AMPc/PKA.

L-AP4 reduce drásticamente la entrada de Ca^{2+} en una subpoblación de terminales sinápticos

El hecho de que L-AP4 reduzca la liberación de glutamato inducida por la despolarización en una magnitud de sólo un 25 % puede ser explicado de dos maneras. En primer lugar, es posible que el receptor esté ampliamente distribuido en la población de sinaptosomas pero que ejerza un efecto débil sobre la entrada de calcio, y por ende sobre la liberación. La segunda posibilidad es que el receptor esté circunscrito a una minoría de terminales, en los que ejerza un fuerte control sobre la liberación de glutamato. Para distinguir entre ambas posibilidades procedimos a la realización de experimentos mediante la técnica de imagen de calcio, empleando sinaptosomas marcados con la sonda fluorescente Fura 2-AM y fijados sobre una superficie de polilisina, tal y como se describe en Material y Métodos.

Los sinaptosomas fueron visualizados a 380 nm como círculos brillantes de 0,5 a 1,2 micras de diámetro (Figura IV. 11., A). A pesar de su tendencia a la agregación, los sinaptosomas aislados fueron numerosos, posibilitando el análisis de sus respuestas individuales. Entre aquellos sinaptosomas que cargaron Fura-2AM más del 95 % respondieron a la aplicación de KCl (30 mM) y 4-AP (1 mM). La concentración citosólica basal de Ca^{2+} promedio fue $110,4 \pm 1,1$ nM. El incremento en la concentración provocado por los agentes despolarizantes fue variable, oscilando entre 500 y 900 nM (Figura IV. 11., B). Estas respuestas, inducidas por aplicaciones de 10 segundos de duración, fueron transitorias aunque más duraderas y con una cinética de recuperación más lenta en el caso de 4-AP. Prácticamente el 100 % de las partículas que respondieron a KCl lo hicieron también a 4-AP. Las respuestas a 4-AP fueron completamente abolidas por el bloqueante de canales de Na^+ dependientes de voltaje tetrodotoxina (TTx), sugiriendo la participación de potenciales de acción. El incremento en la concentración de Ca^{2+} inducido por KCl fue, por el contrario, resistente a la toxina.

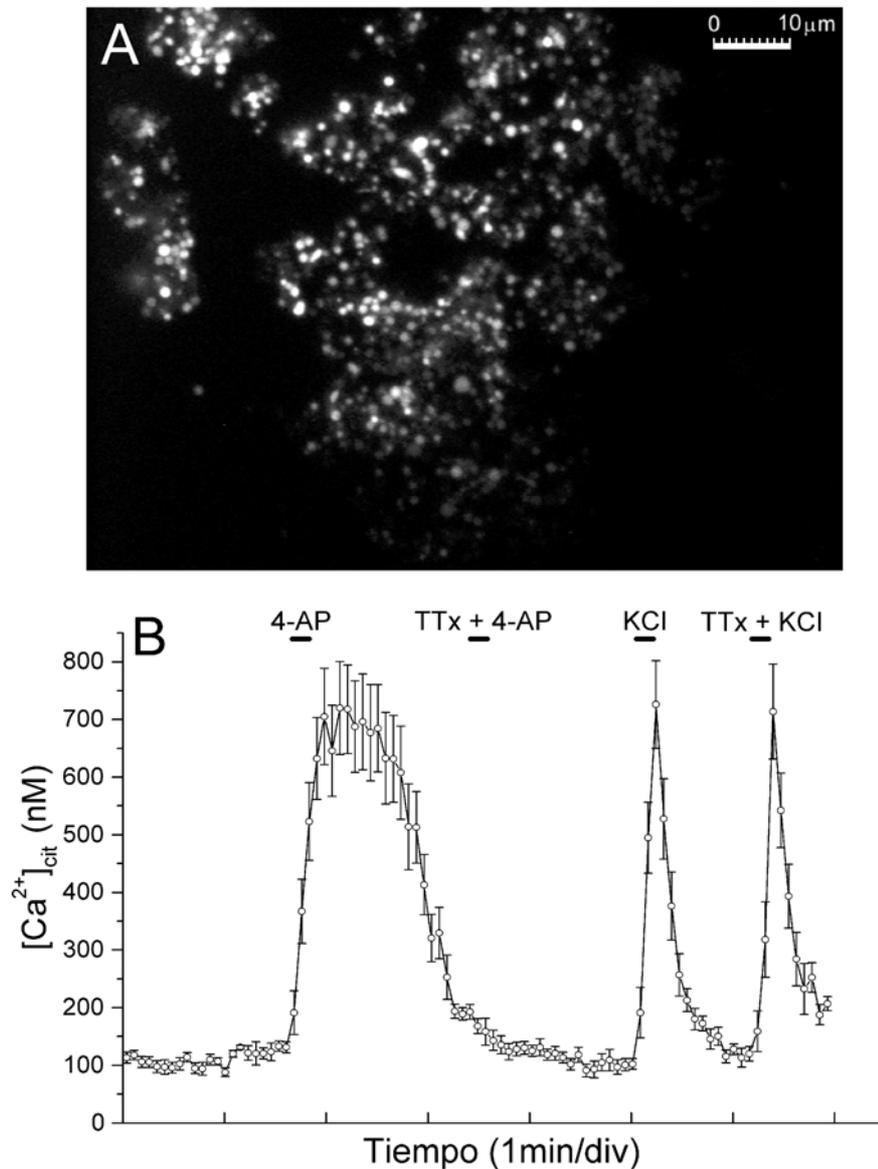


Figura IV. 11. Los agentes despolarizantes 4-aminopiridina y KCl inducen un incremento en la concentración citosólica de Ca^{2+} en terminales sinápticos individuales que es sensible e insensible respectivamente al bloqueante de canales de Na^+ dependientes de voltaje tetrodotoxina. Los sinaptosomas de corteza cerebral de ratas adultas (2-3 meses) se resuspendieron (2 mg/ml) en un medio HBM con BSA (1 mg/ml) libre de ácidos grasos y se preincubaron a 37°C con Fura 2-AM (5 μM) y $CaCl_2$ (1,33 mM) durante 45 minutos y sobre una placa cubierta de polilisina durante 1 hora. A continuación fueron transferidos a una cámara de perfusión para su visualización en un microscopio invertido Nikon, siendo continuamente perfundidos (1-1,5 ml/min) con un medio HBM con $CaCl_2$ (1,33 mM) a 37°C. Los campos fueron iluminados alternativamente a 340 y 380 nm, con un intervalo de 0.8 segundos, y la fluorescencia emitida fue recogida a través de un filtro centrado a 510 nm. La concentración citosólica de Ca^{2+} , $[Ca^{2+}]_{cit}$, se calculó a partir de la razón entre la fluorescencia emitida a 340 y la emitida a 380, tal y como se describe en Materiales y Métodos. La figura A muestra un campo representativo de sinaptosomas marcados con la sonda fluorescente fura 2-AM a 380 nm. Las respuestas de Ca^{2+} fueron inducidas por aplicaciones de 10 segundos de duración de 4-aminopiridina (4-AP) o KCl (30 mM) en ausencia o en presencia de tetrodotoxina (TTx) (1 μM) (B). Los resultados son la media \pm SEM de 8 respuestas individuales.

De un total de 4.191 partículas analizadas, un 28,4 % respondió a L-AP4 (1 mM), mientras que el resto (71,6 %) no mostró respuesta alguna al agonista (Fig IV. 12., B y C). Los efectos de L-AP4 fueron reversibles, ya que la aplicación de KCl (30 mM) al final del experimento provocó un incremento en la concentración citosólica de Ca^{2+} similar al observado con el pulso inicial. La inhibición producida por L-AP4 fue anulada por el antagonista de receptores glutamatérgicos del grupo III CPPG (100 μM) (Figura IV. 12., D).

Estos resultados sugieren que el efecto de L-AP4 sobre la liberación de glutamato se debe a la acción del agonista sobre una población restringida de terminales sinápticos, donde la activación del receptor reduciría de manera muy acusada la entrada de Ca^{2+} en el terminal, lo que explica porque L-AP4 reduce sólo parcialmente la liberación de glutamato en el conjunto de la población de sinaptosomas.

L-AP4 a bajas concentraciones (10 μM) no modificó el incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ inducido por KCl en prácticamente ninguno de los sinaptosomas que se analizaron (1.008 partículas) (Figura IV. 13.), lo que refuerza la hipótesis de que los terminales cerebrocorticales de ratas adultas no contienen receptores glutamatérgicos de alta afinidad por L-AP4.

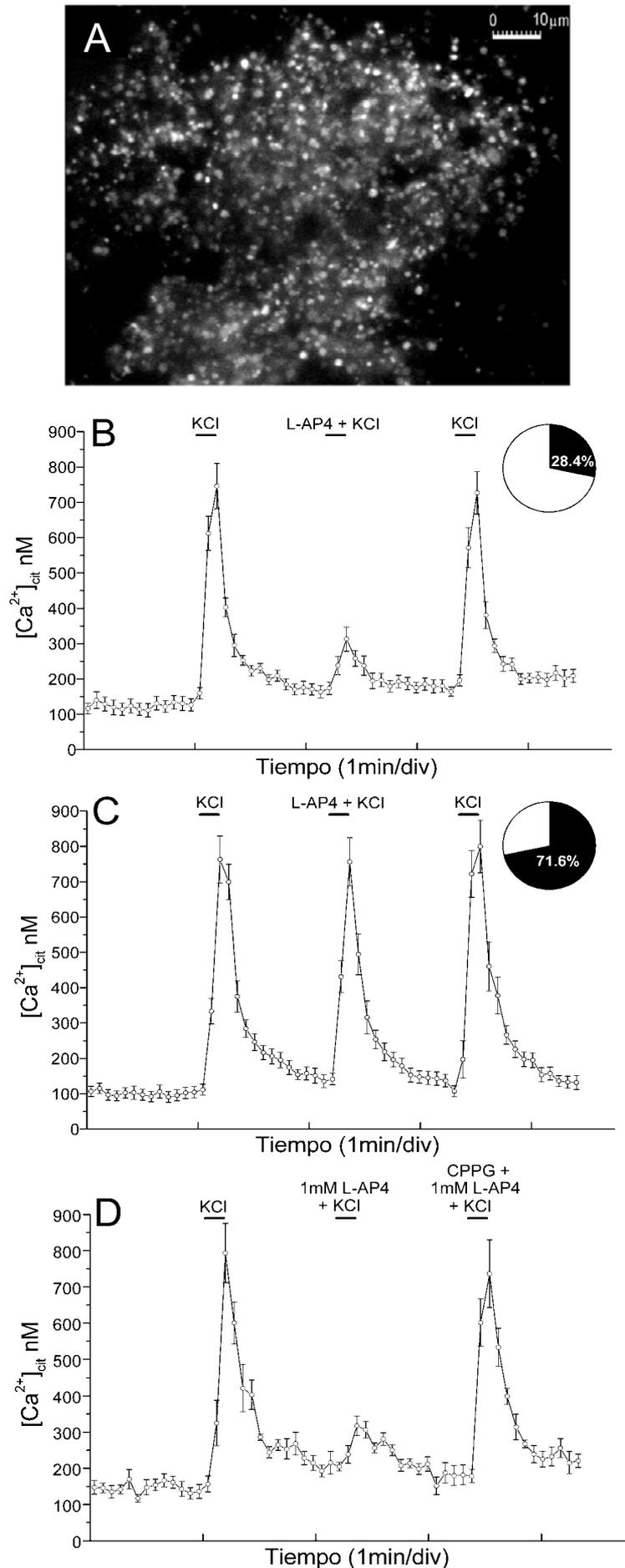


Figura IV. 12. L-AP4 inhibe drásticamente el incremento en la concentración citosólica de Ca^{2+} inducido por KCl en una subpoblación de terminales sinápticos. Los sinaptosomas de corteza cerebral de ratas adultas (2-3 meses) se resuspendieron (2 mg/ml) en un medio HBM con BSA (1 mg/ml) libre de ácidos grasos y se preincubaron a 37°C con Fura 2-AM (5 μM) y CaCl_2 (1,33 mM) durante 45 minutos, tras lo cual se fijaron a una placa cubierta de polilisina durante 1 hora. A continuación fueron transferidos a una cámara de perfusión para su visualización en un microscopio invertido Nikon, siendo continuamente perfundidos (1-1,5 ml/min) con un medio HBM con CaCl_2 (1,33 mM) a 37°C . La figura A muestra un campo representativo de sinaptosomas marcados con la sonda fluorescente fura 2-AM a 380 nm. Las respuestas de Ca^{2+} fueron inducidas por aplicaciones de 10 segundos de duración de KCl (30 mM) en ausencia o en presencia de L-AP4 (1mM) (B, C y D) y CPPG (100 μM) (D). Los resultados son la media \pm SEM de 6-8 respuestas de sinaptosomas individuales. Los diagramas de discos muestran el porcentaje de terminales que presentaron una determinada respuesta.

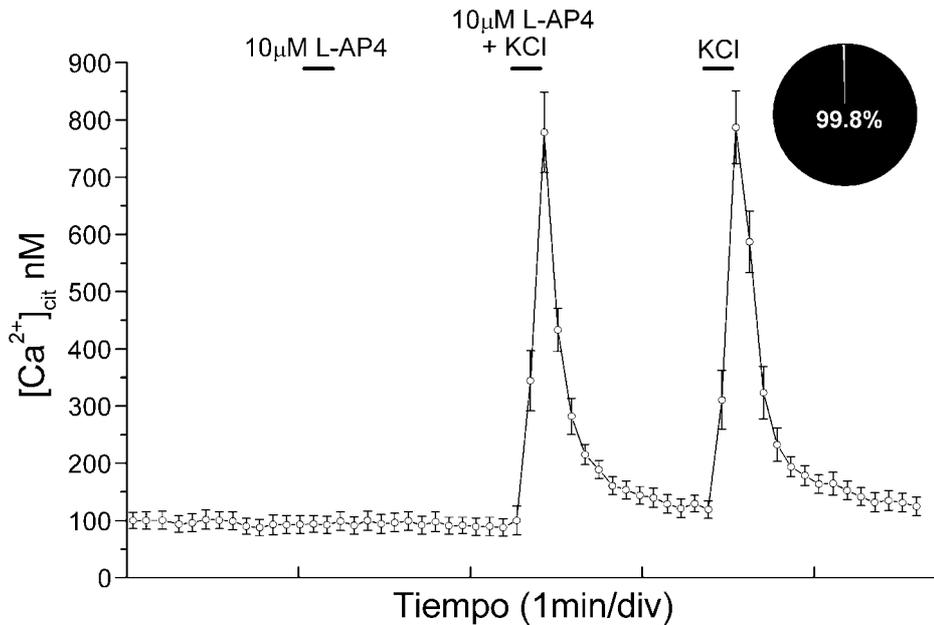


Figura IV. 13. Los terminales sinápticos cerebrocorticales de ratas adultas carecen de receptores de alta afinidad por L-AP4. Los sinaptosomas de corteza cerebral de ratas adultas (2-3 meses) se resuspendieron (2 mg/ml) en un medio HBM con BSA (1 mg/ml) y se preincubaron a 37°C con Fura 2-AM (5 μ M) y $CaCl_2$ (1,33 mM) durante 45 minutos, tras lo cual se fijaron a una placa cubierta de polilisina durante 1 hora. A continuación fueron transferidos a una cámara de perfusión para su visualización en un microscopio invertido Nikon, siendo continuamente perfundidos (1-1,5 ml/min) con un medio HBM con $CaCl_2$ (1,33 mM) a 37°C. Los campos fueron iluminados alternativamente a 340 y 380 nm, y la concentración citosólica de Ca^{2+} , $[Ca^{2+}]_{cit}$, se estimó a partir de la razón entre la fluorescencia emitida a ambas longitudes de onda. Bajas concentraciones de L-AP4 (10 μ M) no afectaron a los incrementos de Ca^{2+} citoplásmico inducidos por KCl. Los resultados son la media \pm SEM de 10 respuestas de terminales individuales. Los diagramas de discos muestran el porcentaje de terminales que presentan una determinada respuesta.

Los efectos de L-AP4 en ratas adultas están mediados por receptores metabotrópicos del tipo 7

Los resultados mostrados sugieren que el receptor presente en los terminales de ratas adultas es un receptor de baja afinidad por L-AP4, posiblemente mGluR7 (Conn y Pin., 1997; Cartmell y Schoepp, 2000). Con el objetivo de confirmar este punto, estudiamos, mediante experimentos de inmunocitoquímica, la presencia de los distintos tipos de receptores glutamatérgicos del grupo III en corteza cerebral de ratas adultas. Para ello, los sinaptosomas fueron fijados sobre polilisina e incubados en presencia de anticuerpos contra sinaptofisina, utilizado como marcador de vesículas sinápticas, y contra los receptores glutamatérgicos mGluR4, 7 y 8. mGluR6 se localiza exclusivamente en retina (Nakajima y cols., 1993; Vardi y cols., 2000), por lo que no fue considerado en esta serie de experimentos.

Entre las partículas que presentaron marcaje positivo para sinaptofisina, el $29,1 \pm 3,5$ % fueron positivas para mGluR7a (Figura IV. 14., A-C), mientras que sólo un $1,2 \pm 0,6$ % y un $1,7 \pm 0,6$ % lo fueron para mGluR4a y mGluR8a, respectivamente (Figura IV. 14., D-I). Los resultados son la media \pm SEM de datos obtenidos de 8 a 10 campos diferentes.

Estos datos confirman pues que los efectos de L-AP4 en ratas adultas son debidos mayoritariamente a la activación de receptores metabotrópicos de glutamato del tipo 7.

Contenido relativo de terminales glutamatérgicos y GABAérgicos en la preparación de sinaptosomas de corteza cerebral de ratas adultas

Llegados a este punto quisimos determinar el porcentaje relativo de terminales glutamatérgicos y GABAérgicos presentes en nuestra preparación. Para ello, los sinaptosomas fueron incubados en presencia de anticuerpos contra sinaptofisina, y contra los transportadores vesiculares de glutamato VGLUT1 o VGLUT2, utilizados como marcadores de terminales glutamatérgicos, o contra el enzima que sintetiza GABA a partir de glutamato, glutamato descarboxilasa (GAD-65), utilizado como marcador de terminales GABAérgicos.

Entre las partículas que presentaron marcaje para sinaptofisina, un $59,5 \pm 4,5$ % y un $20,3 \pm 2,4$ % fueron inmunopositivas para VGLUT1 (Figura IV. 15., A-C) y

VGLUT2 (Figura IV. 15., D-F), respectivamente, mientras que un $23,8 \pm 2,0$ % lo fue para GAD-65 (Figura IV. 15., G-I). Los resultados son la media \pm SEM de datos obtenidos de 7 a 8 campos diferentes.

Dado que los transportadores vesiculares de glutamato VGLUT1 y VGLUT2 no coexisten en los mismos terminales sinápticos (Herzog y cols., 2001), estos resultados indican que alrededor de un 80 % de los sinaptosomas presentes en la preparación de sinaptosomas de corteza cerebral de rata adulta son glutamatérgicos.

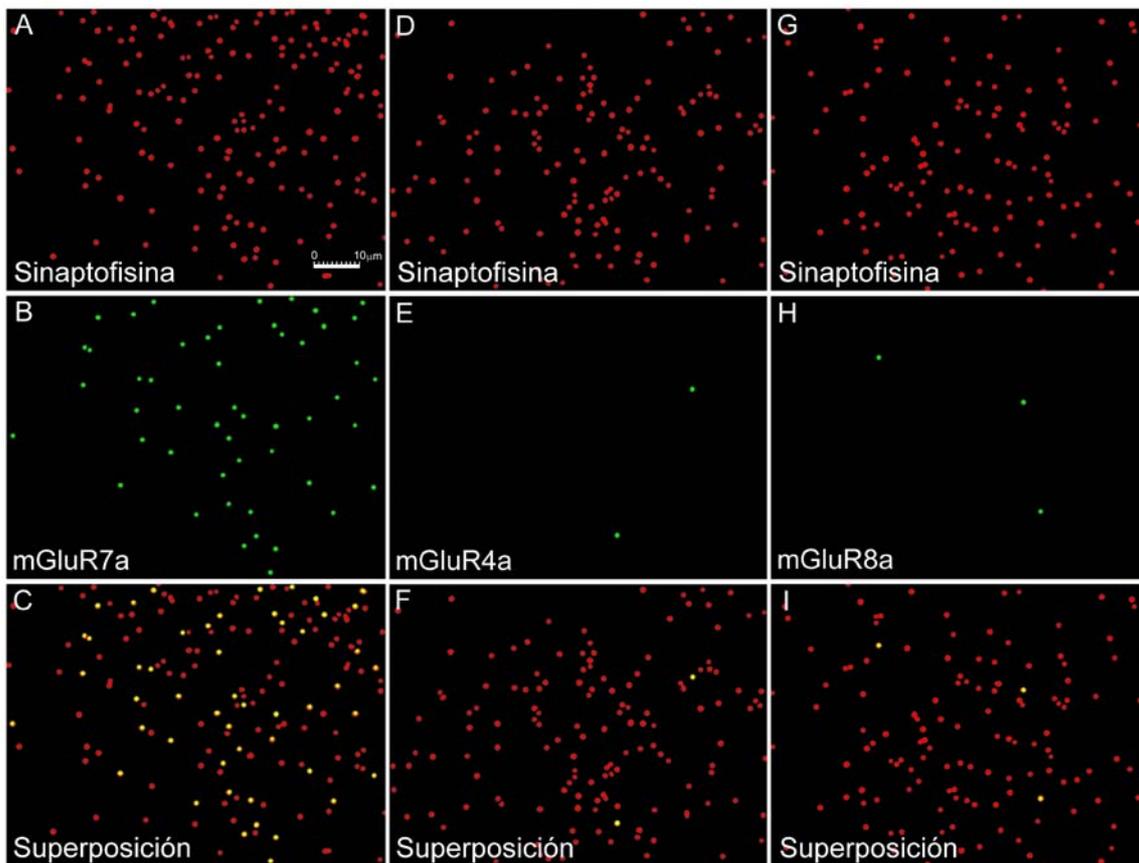


Figura IV. 14. mGluR7 es el único receptor metabotrópico de glutamato del grupo III relativamente abundante en la preparación de sinaptosomas de corteza cerebral de ratas adultas. Los sinaptosomas de corteza cerebral de ratas adultas (2-3 meses) se resuspendieron (2 mg/ml) en un medio HBM con BSA (1 mg/ml) libre de ácidos grasos a 37°C y se incubaron sobre una placa cubierta de polilisina durante 1 hora, tras lo cual fueron fijados durante 5 minutos con paraformaldehído 4 % diluido en tampón fosfato (0.1 M, pH 7.4), y preincubados durante 1 hora con una solución bloqueante de suero normal de cabra al 10 % (NGS) diluido en 50 mM de tampón Tris (pH 7.4) con NaCl al 0.9 % (TBS) y Triton X-100 al 0.2 %. A continuación fueron incubados durante 24 horas a 4°C con el anticuerpo primario correspondiente: mGluR7a (1 µg/ml), mGluR4a (1 µg/ml) o mGluR8a (1 µg/ml), y sinaptofisina (1:1000), diluidos en TBS, con NGS al 1 % y Triton X-100 al 0.2 %, e incubados durante otras 2 horas con los anticuerpos secundarios (de cabra anti-ratón o anti-conejo acoplados a Cy2 o Cy3, o de mono anti-cobaya acoplados a fluoresceína), diluidos en TBS 1:200. Después de varios lavados con TBS los sinaptosomas fueron visualizados con un microscopio Nikon mediante luz proveniente de una lámpara de mercurio, empleándose un filtro para rodamina en el caso de Cy3 y para fluoresceína en el caso de Cy2 y fluoresceína.

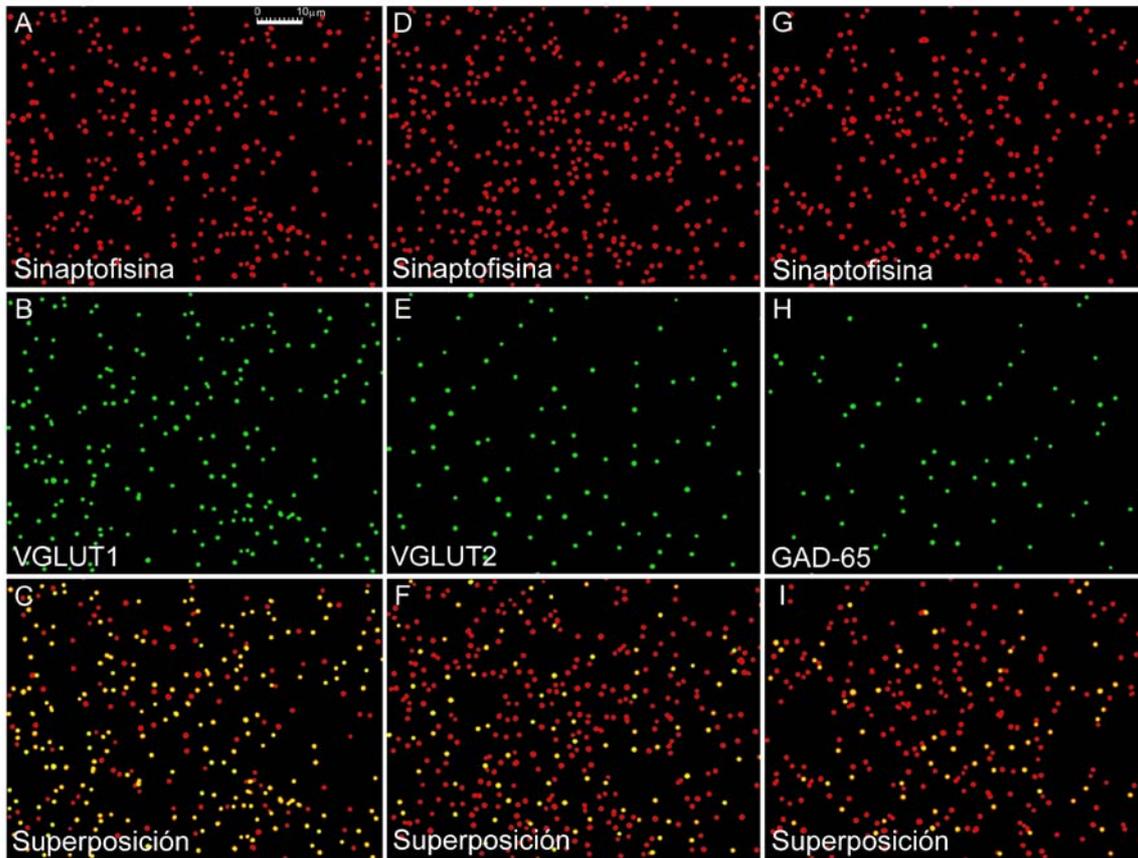


Figura IV. 15. Contenido relativo de terminales glutamatérgicos y GABAérgicos en la preparación de sinaptosomas de corteza cerebral de ratas adultas. Los sinaptosomas de corteza cerebral de ratas adultas (2-3 meses) se resuspendieron (2 mg/ml) en un medio HBM con BSA (1 mg/ml) libre de ácidos grasos a 37°C y se incubaron sobre una placa cubierta de polilisina durante 1 hora, tras lo cual fueron fijados durante 5 minutos con paraformaldehído 4 % diluido en tampón fosfato (0.1 M, pH 7.4), y preincubados durante 1 hora con una solución bloqueante de suero normal de cabra al 10 % (NGS) diluido en 50 mM de tampón Tris (pH 7.4) con NaCl al 0.9 % (TBS) y Triton X-100 al 0.2 %. A continuación fueron incubados durante 24 horas a 4°C con el anticuerpo primario correspondiente: VGLUT1 (1:1000), VGLUT2 (1:1000) o GAD-65 (1:1000), y sinaptofisina (1:1000), diluidos en TBS, con NGS al 1 % y Triton X-100 al 0.2 %, e incubados durante otras 2 horas con los anticuerpos secundarios (de cabra anti-ratón o anti-conejo acoplados a Cy3 o Cy2), diluidos en TBS 1:200. Después de varios lavados con TBS los sinaptosomas fueron visualizados con un microscopio Nikon mediante luz proveniente de una lámpara de mercurio, empleándose un filtro para rodamina en el caso de Cy3 y para fluoresceína en el caso de Cy2.

Los canales de calcio de los tipos N y P/Q no coexisten en terminales sinápticos cerebrocorticales de ratas adultas

La posibilidad de obtener respuestas individuales mediante técnicas de imagen de calcio nos permitió analizar la distribución de los canales de calcio de los tipos N y P/Q en la población de sinaptosomas, estudiando la coexistencia de ambos tipos de canales en un mismo terminal, una posibilidad que ha sido sugerida por algunos estudios electrofisiológicos (Mintz y cols., 1995; Wheeler y cols., 1996; Reid y cols., 1997; Qian y Noebels, 2001). De 3.803 sinaptosomas analizados, procedentes de 7 campos diferentes, un $31,1 \pm 1,4$ % fue sensible a ω -conotoxina-GVIA (ω -CgT-GVIA) pero no a ω -agatoxina-IVA (ω -Aga-IVA) (Figura IV. 16., A), un $64,3 \pm 2,4$ % lo fue a ω -agatoxina-IVA pero no a ω -conotoxina-GVIA (Figura IV. 16., B) y finalmente un $4,6 \pm 1,3$ % no fue sensible a ninguna de las dos toxinas (Figura IV. 16., C). La ausencia de terminales que respondieran a ambas toxinas indica que los dos tipos de canales de Ca^{2+} implicados de manera mayoritaria en la liberación de glutamato no coexisten en terminales sinápticos de corteza cerebral de ratas adultas.

Los receptores glutamatérgicos de baja afinidad por L-AP4 se localizan casi exclusivamente en terminales que expresan canales de calcio del tipo N

El hecho de que L-AP4 inhiba únicamente el componente de liberación asociado a canales de Ca^{2+} del tipo N podría ser debido a una colocalización preferente de los receptores metabotrópicos con este tipo de canales en los terminales sinápticos. Con el fin de confirmar esta posibilidad realizamos experimentos de imagen de Ca^{2+} combinando el agonista glutamatérgico con los bloqueantes de canales de Ca^{2+} . En este sentido hay que señalar que un 95,4 % del total de las partículas que respondieron a L-AP4 lo hicieron también a ω -conotoxina-GVIA (Figura IV. 17., A), mientras que sólo una minoría de los sinaptosomas que respondieron al agonista (4,6 %) lo hicieron a ω -agatoxina-IVA (Figura IV. 17., B). La fuerte asociación observada entre la respuesta a L-AP4 y la respuesta a ω -conotoxina-GVIA sugiere que los receptores metabotrópicos de glutamato del grupo 7 y los canales de calcio del tipo N se expresan preferentemente en los mismos terminales sinápticos, y explica, por tanto, la ausencia de modulación de los canales del tipo P/Q por parte de estos receptores en ratas adultas.

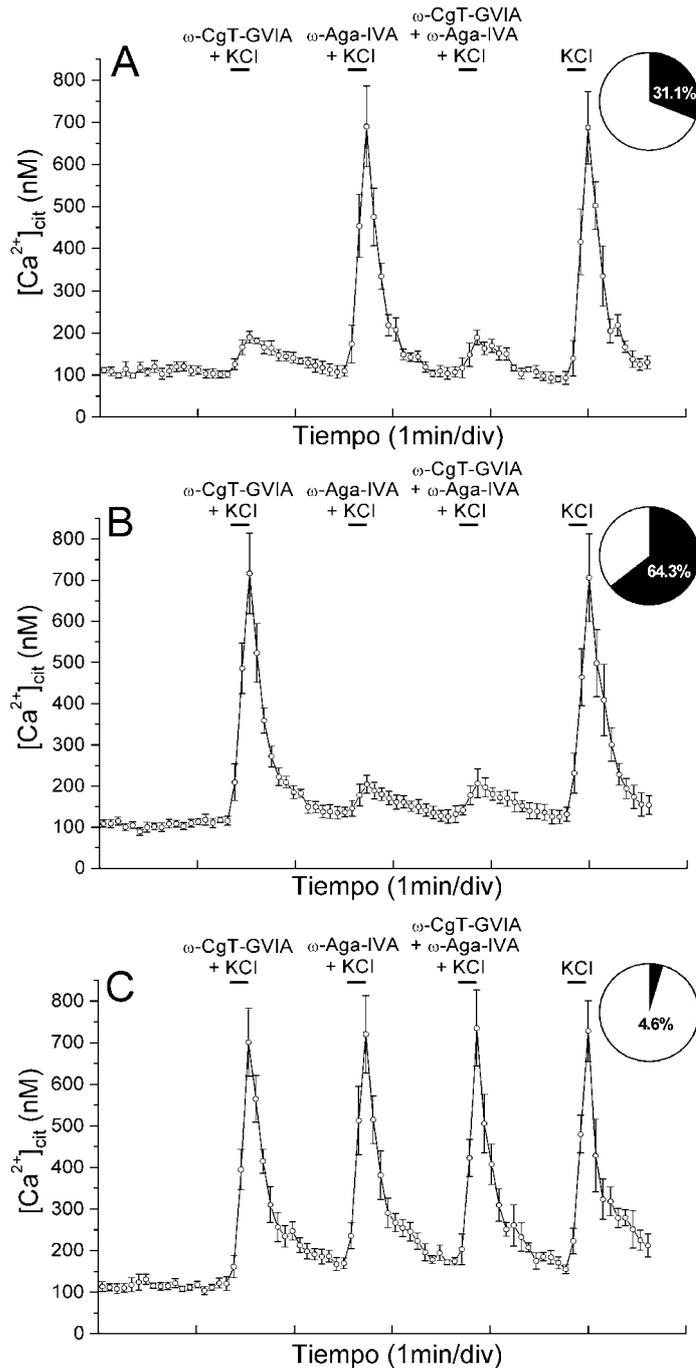


Figura IV. 16. Los canales de Ca^{2+} de tipo N y P/Q no coexisten en terminales sinápticos de ratas adultas. Los sinaptosomas de corteza cerebral de ratas adultas (2-3 meses) se resuspendieron (2 mg/ml) en un medio HBM con BSA (1 mg/ml) libre de ácidos grasos y se preincubaron a 37°C con Fura 2-AM (5 μ M) y $CaCl_2$ (1,33 mM) durante 45 minutos, tras lo cual se fijaron a una placa cubierta de polilisina durante 1 hora. A continuación fueron transferidos a una cámara de perfusión para su visualización en un microscopio invertido Nikon, siendo continuamente perfundidos (1-1,5 ml/min) con un medio HBM con $CaCl_2$ (1,33 mM) a 37°C. Los campos fueron iluminados alternativamente a 340 y 380 nm, y la concentración citosólica de Ca^{2+} , $[Ca^{2+}]_{cit}$, se estimó a partir de la razón entre la fluorescencia emitida a ambas longitudes de onda. Las respuestas de Ca^{2+} fueron inducidas por aplicaciones de KCl (30mM) de 10 segundos de duración en presencia y en ausencia de ω -Conotoxina-GVIA (ω -CgT-GVIA) (2 μ M), ω -Agatoxina-IVA (ω -Aga-IVA) (200 nM), o una combinación de ambas. Los resultados son la media \pm SEM de 6 a 9 respuestas de sinaptosomas individuales. Los diagramas de disco muestran el porcentaje de terminales que presentaron una determinada respuesta.

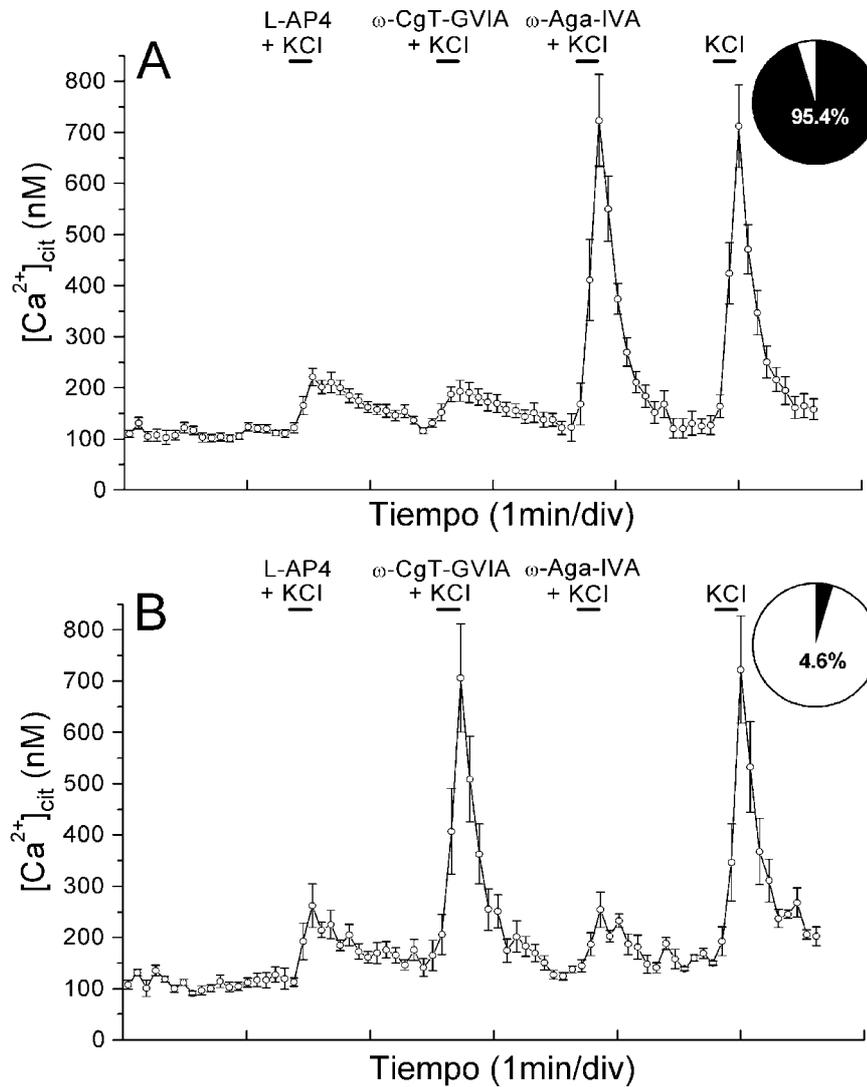


Figura IV. 17. Los receptores glutamatergicos del grupo 7 se localizan preferentemente en terminales sinápticas que expresan canales de Ca²⁺ del tipo N. Los sinaptosomas de corteza cerebral de ratas adultas (2-3 meses) se resuspendieron (2 mg/ml) en un medio HBM con BSA (1 mg/ml) libre de ácidos grasos y se preincubaron a 37°C con Fura 2-AM (5 μM) y CaCl₂ (1,33 mM) durante 45 minutos, tras lo cual fueron fijados a una placa cubierta de polilisina durante 1 hora. A continuación fueron transferidos a una cámara de perfusión para su visualización en un microscopio invertido Nikon, siendo continuamente perfundidos (1-1,5 ml/min) con un medio HBM con CaCl₂ (1,33 mM) a 37°C. Los campos fueron iluminados alternativamente a 340 y 380 nm, y la concentración citosólica de Ca²⁺, [Ca²⁺]_{cit}, se estimó a partir de la razón entre la fluorescencia emitida a ambas longitudes de onda. Las respuestas de Ca²⁺ fueron inducidas por aplicaciones de KCl (30 mM) de 10 segundos de duración en presencia o en ausencia de L-AP4 (1 mM), ω-Conotoxina-GVIA (ω-CgT-GVIA) (2 μM) u ω-Agatoxina-IVA (ω-Aga-IVA) (200 nM). Los resultados son la media ± SEM de entre 6 y 7 respuestas de sinaptosomas individuales. Los diagramas de disco muestran el porcentaje de terminales que presentaron una determinada respuesta, tomando como 100 % a aquellos que respondieron a L-AP4.

RECEPTORES METABOTRÓPICOS DE GLUTAMATO DEL GRUPO III EN CORTEZA CEREBRAL DE RATAS JÓVENES

Los terminales cerebrocorticales de ratas jóvenes presentan receptores de alta y de baja afinidad por L-AP4

En la preparación de sinaptosomas cerebrocorticales de ratas jóvenes la aplicación de KCl (30 mM) indujo una liberación de glutamato dependiente de calcio de $1,58 \pm 0,02$ nanomoles/mg de proteína (Figura IV. 18., A). La adición previa de L-AP4 redujo esta liberación en un $22,2 \pm 1,4$ %, cuando se empleó a una concentración de 20 μ M, y en un $46,3 \pm 1,3$ % cuando la concentración se incrementó a 1 mM (Figura IV. 18., A). La inhibición producida por L-AP4 siguió una curva bifásica, con valores de EC_{50} de 1,4 y 371,1 μ M respectivamente (Figura IV. 18., B).

Estos datos sugieren que al menos dos tipos de receptores glutamatérgicos del grupo III, con diferente afinidad por el agonista, están presentes en terminales de corteza cerebral de ratas jóvenes.

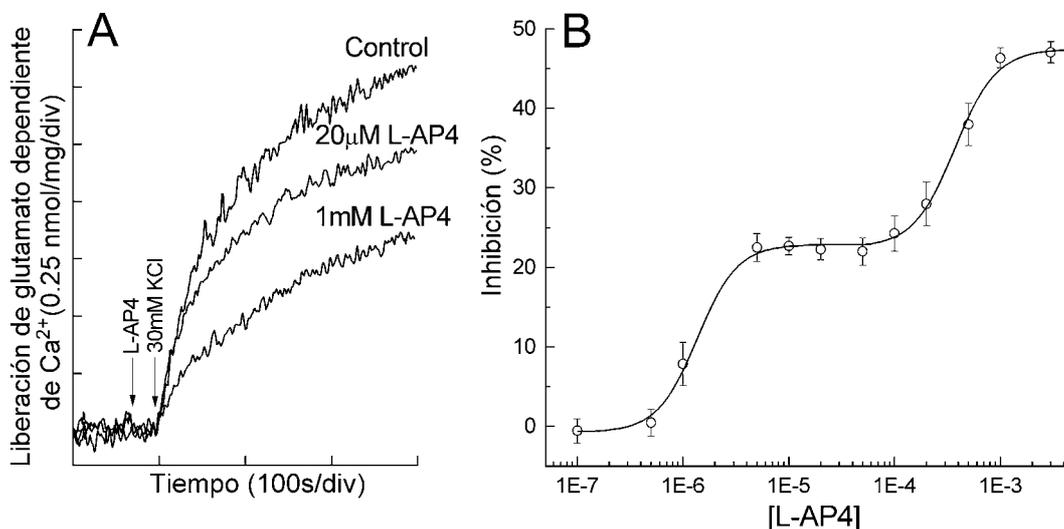


Figura IV. 18. Los sinaptosomas de corteza cerebral de ratas jóvenes presentan receptores de alta y de baja afinidad por L-AP4. Los sinaptosomas de corteza cerebral de ratas jóvenes (21 días) se incubaron (0,67 mg/ml) en medio HBM con BSA (1 mg/ml) libre de ácidos grasos a 37°C durante 1 hora. 1 ml de esta suspensión se utilizó para determinar la liberación de glutamato. La figura A muestra la liberación de glutamato dependiente de Ca^{2+} inducida por KCl (30 mM) en ausencia (Control) y presencia de 20 μ M o 1 mM L-AP4, añadido 30 segundos antes de la despolarización. La curva concentración-respuesta de L-AP4 (B) se determinó mediante la adición de diferentes concentraciones del agonista 30 segundos antes de la aplicación de KCl. Los datos mostrados son la media \pm SEM de 3 a 8 experimentos.

Los efectos de L-AP4 en ratas jóvenes están mediados principalmente por receptores del tipo 7 y del tipo 4

Nuestro siguiente objetivo fue identificar los receptores glutamatérgicos del grupo III responsables de las respuestas a L-AP4 en corteza cerebral de ratas jóvenes. Para ello realizamos experimentos de inmunocitoquímica en los que estudiamos la distribución relativa de los receptores de los tipos 4, 7 y 8 en la población de sinaptosomas. La localización exclusiva de mGluR6 en retina nos hizo descartar de antemano a este tipo de receptor como responsable de los efectos de L-AP4 en corteza cerebral.

Entre las partículas que mostraron marcaje positivo para sinaptofisina, un $29,5 \pm 3,4$ % mostró inmunopositividad para mGluR7a (Figura IV. 19., A-C), un $25,2 \pm 2,8$ % para mGluR4a (Figura IV. 19., D-F) y sólo un $1,9 \pm 0,6$ % para mGluR8a (Figura IV. 19., G-I). Los resultados son la media \pm SEM de datos obtenidos de 7 a 11 campos diferentes. Dado que mGluR4 muestra alta afinidad por L-AP4 (Conn y Pin, 1997; Schoepp y cols., 1999; Cartmell y Schoepp, 2000), es probable que este receptor sea el responsable mayoritario de los efectos observados con bajas concentraciones del agonista, mientras que la inhibición adicional observada a concentraciones de 0,5-1 mM sea debida a una activación de receptores del tipo 7 (Conn y Pin, 1997; Cartmell y Schoepp, 2000).

Contenido relativo de terminales glutamatérgicos y GABAérgicos en la preparación de sinaptosomas de corteza cerebral de ratas jóvenes

Aunque previamente habíamos determinado el porcentaje relativo de terminales glutamatérgicos y GABAérgicos en la preparación de ratas adultas, quisimos hacer lo mismo en ratas jóvenes, con el fin de determinar si existe algún cambio en este sentido con el desarrollo. Para ello, realizamos experimentos de inmunocitoquímica en los que utilizamos como marcadores de terminales glutamatérgicos anticuerpos frente a los transportadores vesiculares de glutamato VGLUT1 o VGLUT2 y como marcadores de terminales GABAérgicos, anticuerpos frente a GAD-65.

VGLUT1 fue detectado en un $62,0 \pm 3,3$ % de los sinaptosomas que presentaron marcaje positivo para sinaptofisina (Figura IV. 20., A-C), VGLUT2 en un $16,6 \pm 2,2$ %

(Figura IV. 20., D-F), y GAD-65 en un $23,0 \pm 2,8$ % (Figura IV. 20., G-I). Los resultados son la media \pm SEM de datos obtenidos de 6 a 11 campos diferentes.

Estos resultados indican que, al igual que ocurre en ratas adultas, alrededor de un 80 % de los terminales presentes en la preparación de sinaptosomas de corteza cerebral de ratas jóvenes son glutamatérgicos.

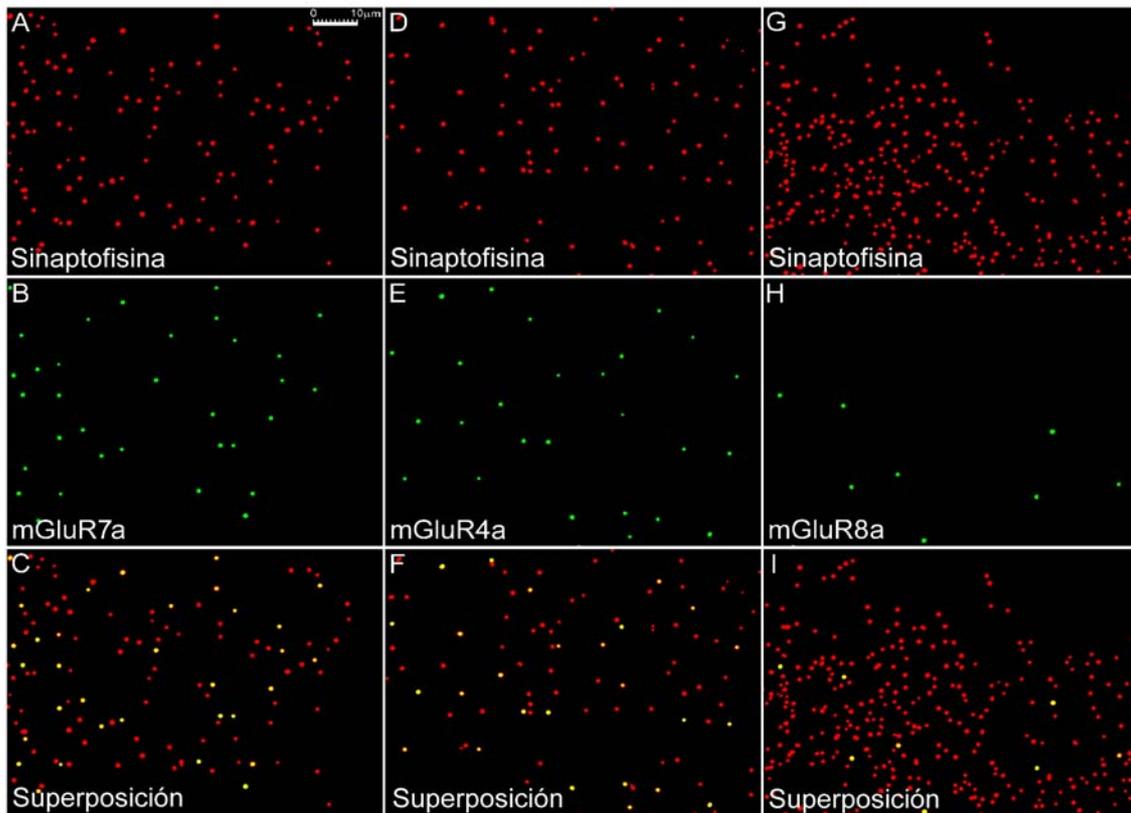


Figura IV. 19. mGluR7 y mGluR4 son los receptores mayoritarios en la preparación de sinaptosomas de corteza cerebral de ratas jóvenes. Los sinaptosomas de corteza cerebral de ratas jóvenes (21 días) se resuspendieron (2 mg/ml) en un medio HBM con BSA (1 mg/ml) libre de ácidos grasos a 37°C y se incubaron sobre una placa cubierta de polilisina durante 1 hora, tras lo cual fueron fijados durante 5 minutos con paraformaldehído 4 % diluido en tampón fosfato (0.1 M, pH 7.4), y preincubados durante 1 hora con una solución bloqueante de suero normal de cabra al 10 % (NGS) diluido en 50 mM de tampón Tris (pH 7.4) con NaCl al 0.9 % (TBS) y Triton X-100 al 0.2 %. A continuación fueron incubados durante 24 horas a 4°C con el anticuerpo primario correspondiente: mGluR7a (1 μ g/ml), mGluR4a (1 μ g/ml) o mGluR8a (1 μ g/ml), y sinaptofisina (1:1000), diluidos en TBS, con NGS al 1 % y Triton X-100 al 0.2 %, e incubados durante otras 2 horas con los anticuerpos secundarios (de cabra anti-ratón o anticonejo acoplados a Cy3 o Cy2, o de mono anti-cobaya acoplado a fluoresceína), diluidos en TBS 1:200. Después de varios lavados con TBS los sinaptosomas fueron visualizados con un microscopio Nikon mediante luz proveniente de una lámpara de mercurio, empleándose filtros para rodamina en el caso de Cy3 y para fluoresceína en el caso Cy2 y fluoresceína.

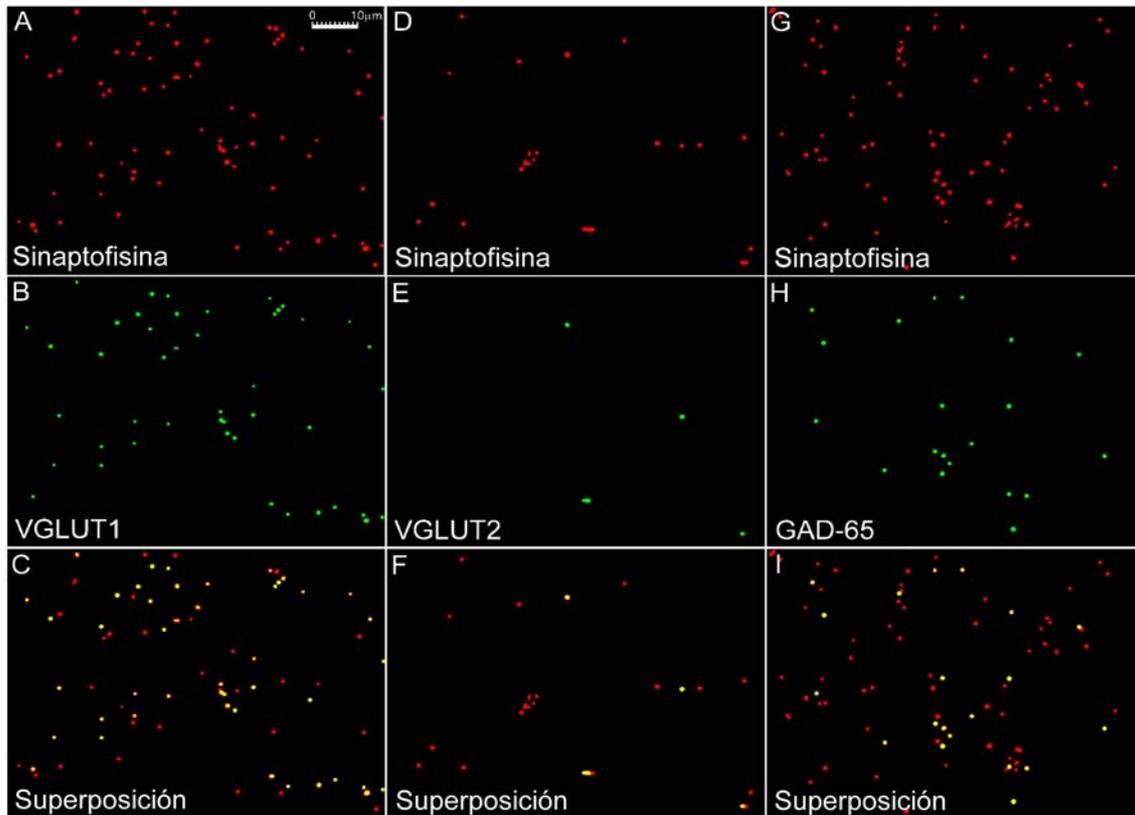


Figura IV. 20. Contenido relativo de terminales glutamatérgicos y GABAérgicos en la preparación de sinaptosomas de corteza cerebral de ratas jóvenes. Los sinaptosomas de corteza cerebral de ratas jóvenes (21 días) se resuspendieron (2 mg/ml) en un medio HBM con BSA (1 mg/ml) libre de ácidos grasos a 37°C y se incubaron sobre una placa cubierta de polilisina durante 1 hora, tras lo cual fueron fijados durante 5 minutos con paraformaldehído 4 % diluido en tampón fosfato (0.1 M, pH 7.4), y preincubados durante 1 hora con una solución bloqueante de suero normal de cabra al 10 % (NGS) diluido en 50 mM de tampón Tris (pH 7.4) con NaCl al 0.9 % (TBS) y Triton X-100 al 0.2 %. A continuación fueron incubados durante 24 horas a 4°C con el anticuerpo primario correspondiente: VGLUT1 (1:1000), VGLUT2 (1:1000) o GAD-65 (1:1000), y sinaptofisina (1:1000), diluidos en TBS, con NGS al 1 % y Triton X-100 al 0.2 %, e incubados durante otras 2 horas con los anticuerpos secundarios (de cabra anti-ratón o anti-conejo acoplados a Cy3 o Cy2), diluidos en TBS 1:200. Después de varios lavados con TBS los sinaptosomas fueron visualizados con un microscopio Nikon mediante luz proveniente de una lámpara de mercurio, empleándose filtros para rodamina en el caso de Cy3 y para fluoresceína en el caso de Cy2.

En sinaptosomas de ratas jóvenes L-AP4 sólo inhibe el componente de liberación asociado a canales de Ca^{2+} del tipo N a concentraciones fisiológicas de Ca^{2+}

En sinaptosomas cerebrocorticales de ratas jóvenes (21 días), la aplicación del agente despolarizante 4-AP (1 mM) indujo una liberación de glutamato dependiente de calcio de $1,53 \pm 0,02$ nanomoles/mg de proteína, que se vió reducida en un $39,6 \pm 2,4$ % en presencia de 1 mM de L-AP4 (1 mM) (Figura IV. 21., A). El agonista glutamatérgico también inhibió de forma significativa la elevación en la concentración citosólica de calcio, $[\text{Ca}^{2+}]_i$, inducida por 4-AP en la población de sinaptosomas (Figura IV. 21., B).

Para confirmar que los efectos de L-AP4 en ratas jóvenes son también debidos a una acción sobre canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje, y para determinar cual o cuales son los subtipos de canales implicados en el efecto, procedimos a la realización de experimentos de liberación en presencia de los bloqueantes de canales de Ca^{2+} del tipo P/Q, ω -agatoxina-IVA (ω -Aga-IVA), y del tipo N, ω -conotoxina-GVIA (ω -CgT-GVIA), ambos en ausencia y en presencia de L-AP4.

La inhibición producida por las toxinas en ausencia de L-AP4 fue de un $62,1 \pm 2,5$ % en el caso de ω -agatoxina-IVA y de un $33,6 \pm 2,2$ % en el caso de ω -conotoxina-GVIA (Figura IV. 21., C), lo que demuestra un papel mayoritario de los canales de Ca^{2+} del tipo P/Q sobre el control de la liberación de glutamato, tal y como se ha observado en ratas adultas. Por otro lado, la aplicación conjunta de ambas toxinas suprimió prácticamente la liberación ($92,7 \pm 3,9$ %) (Figura IV. 21., C), confirmando el hecho, ampliamente reconocido, de que los canales de los tipos P/Q y N dan cuenta de la mayor parte de la liberación dependiente de calcio en terminales cerebrocorticales (Takahashi y Momiyama, 1993; Luebke y cols., 1993; Wheeler y cols., 1994; Vázquez y Sánchez-Prieto, 1997; Qian y Noebels, 2001).

En presencia de L-AP4, la inhibición producida por ω -conotoxina-GVIA fue sólo ligeramente mayor ($40,9 \pm 3,3$ %) que la producida por el agonista. Por el contrario, la inhibición de la liberación en presencia de L-AP4 y de ω -agatoxina-IVA se incrementó hasta un $93,5 \pm 3,6$ % (Figura IV. 21., C). La mayor aditividad, casi lineal, entre los efectos de L-AP4 y de ω -agatoxina-IVA sugiere que la inhibición de la liberación de glutamato en ratas jóvenes por los receptores metabotrópicos del grupo III también se ejerce de una manera mayoritaria sobre el componente de liberación

asociado a los canales de Ca^{2+} del tipo N, aunque una modulación sobre canales del tipo P/Q no puede ser descartada.

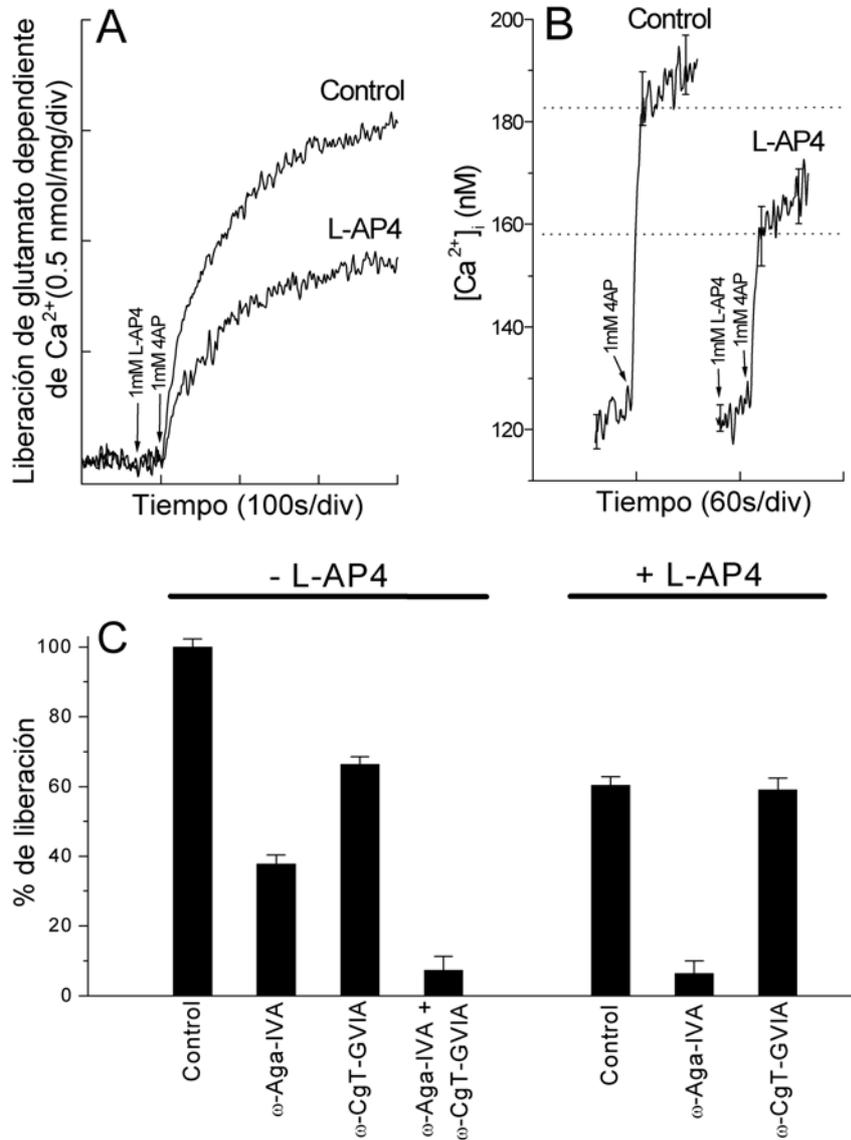


Figura IV. 21. L-AP4 inhibe la liberación de glutamato y el incremento en la concentración citosólica de Ca^{2+} inducidos por 4-AP en ratas jóvenes. Los sinaptosomas de corteza cerebral de ratas jóvenes (21 días) se incubaron (0.67 mg/ml) en medio HBM con BSA (1 mg/ml) libre de ácidos grasos a 37°C durante 1 hora. 1 ml de esta solución fue utilizado para determinar la liberación de glutamato. Para la determinación de la concentración citosólica de Ca^{2+} , $[\text{Ca}^{2+}]_i$, los sinaptosomas se resuspendieron (2 mg/ml) en un medio HBM con BSA (1 mg/ml) y se preincubaron a 37°C durante 30 minutos con Fura 2-AM (5 μM) y CaCl_2 (1,33 mM). A continuación se centrifugaron a 12.000 $\times g$ durante 1 minuto y se resuspendieron (0,67 mg/ml) en medio HBM con BSA libre de ácidos grasos, al que se añadió CaCl_2 (1,33 mM). L-AP4 (1 mM) redujo la liberación de glutamato dependiente de Ca^{2+} (A) y el incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (B) inducidos por 4-AP (1mM). El diagrama de barras (C) muestra la liberación de glutamato dependiente de Ca^{2+} inducida por 4-AP (1 mM) en ausencia (Control) y en presencia del bloqueante de canales de Ca^{2+} del tipo P/Q ω -Agatoxina-IVA (ω -Aga-IVA) (200nM) o/y del bloqueante de canales del tipo N ω -Conotoxina-GVIA (ω -CgT-GVIA) (2 μM), ambos en ausencia y presencia de L-AP4 (1 mM). Los resultados son la media \pm SEM de 3 a 6 experimentos independientes.

Los canales de calcio de tipo N y P/Q presentan un diferente acoplamiento a la exocitosis de glutamato en corteza cerebral de ratas jóvenes

La inhibición preferente de los canales del tipo N por parte de los receptores glutamatérgicos del grupo III podría explicarse por la acción más débil que las proteínas G acopladas a estos receptores ejercen sobre los canales del tipo P/Q en comparación con los del tipo N, tal y como ha sido descrito en algunos sistemas de expresión (Zhang y cols., 1996). Otra posibilidad es que un mejor acoplamiento de los canales del tipo P/Q a la maquinaria excitotóxica, como el observado en ratas adultas, pueda estar enmascarando las acciones inhibitorias del receptor sobre el componente de liberación asociado a estos canales de Ca^{2+} .

Los ensayos de liberación realizados a diferentes concentraciones de calcio extracelular, $[\text{Ca}^{2+}]_o$, revelaron, al igual que en ratas adultas, diferencias en la eficacia de ambos subtipos de canales de calcio en el control de la liberación de glutamato. Así, la reducción de $[\text{Ca}^{2+}]_o$ produjo una disminución paulatina del componente de liberación asociado a los canales de calcio del tipo N, que desapareció a 0,5 mM de Ca^{2+} extracelular, concentración a la cual prácticamente toda la liberación fue atribuible a la entrada de Ca^{2+} a través de canales del tipo P/Q (Figura IV. 22.).

L-AP4 inhibe el componente de liberación asociado a canales del tipo P/Q a bajas concentraciones de calcio extracelular

Si el alto grado de acoplamiento de los canales del tipo P/Q a la liberación de glutamato está enmascarando las acciones del receptor sobre el componente de liberación asociado a este tipo de canales, la reducción de la concentración extracelular de calcio debería favorecer la observación de dicha modulación. Dado que a la concentración extracelular de calcio, $[\text{Ca}^{2+}]_o$, de 0,5 mM toda la liberación es dependiente de canales de calcio del tipo P/Q, cualquier modulación observada en estas condiciones sería atribuible a una modulación de canales P/Q por parte del receptor metabotrópico.

La aplicación de L-AP4 redujo la liberación de glutamato inducida por 4-AP en un $32,8 \pm 2,5$ % a la $[\text{Ca}^{2+}]_o$ de 0,5 mM (Figura IV. 23., A), y en un $54,2 \pm 2,9$ % a la $[\text{Ca}^{2+}]_o$ de 0,25 mM (Figura IV. 23., C).

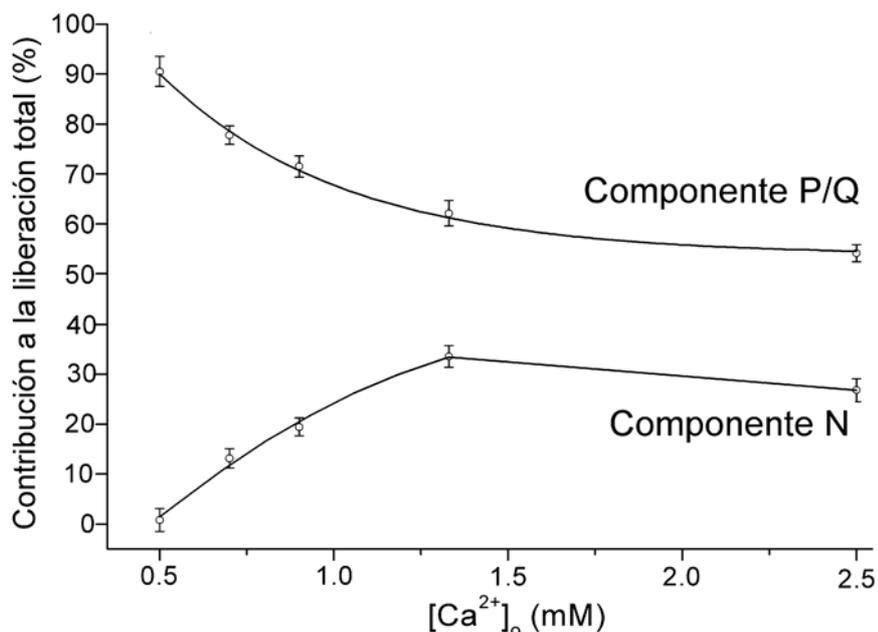


Figura IV. 22. La disminución de la concentración extracelular de Ca^{2+} suprime la contribución de los canales de Ca^{2+} del tipo N a la liberación de glutamato en ratas jóvenes. Los sinaptosomas de corteza cerebral de ratas jóvenes (21 días) se incubaron (0,67 mg/ml) en medio HBM con BSA (1 mg/ml) libre de ácidos grasos a 37°C durante 1 hora. 1 ml de esta suspensión se utilizó para determinar la liberación de glutamato. Los bloqueantes de canales de Ca^{2+} ω -Agatoxina-IVA (200nM) y ω -Conotoxina-GVIA (2 μM) fueron añadidos 100 segundos antes de la despolarización con 4-AP (1 mM). El componente de liberación asociado a cada tipo de canal para cada concentración de Ca^{2+} extracelular, $[\text{Ca}^{2+}]_o$, fue calculado como la fracción de la liberación total sensible a cada toxina a esa concentración. Los resultados son la media \pm SEM de 4 a 6 experimentos diferentes.

Por otro lado, la aplicación del bloqueante de canales de Na^+ dependientes de voltaje tetrodotoxina (TTx) suprimió completamente la liberación inducida por 4-AP a ambas $[\text{Ca}^{2+}]_o$ (Figura IV. 23., A y C), lo que indica que la liberación independiente de potenciales de acción es poco significativa en nuestra preparación, y que la inhibición observada no se debe a una acción del receptor sobre la maquinaria excitotónica. Por tanto, podemos concluir que la inhibición de la liberación producida por L-AP4 a estas concentraciones de Ca^{2+} extracelular está relacionada exclusivamente con una modulación de canales de Ca^{2+} del tipo P/Q. Esta hipótesis fue confirmada mediante experimentos en los que determinamos el efecto de L-AP4 sobre la elevación en la concentración intracelular de calcio inducida por 4-AP en la población de sinaptosomas, y en los que observamos que el agonista glutamatérgico reducía dicho incremento tanto a 0,5 como a 0,25 mM de Ca^{2+} extracelular (Figura IV. 23., B y D).

En resumen, estos resultados sugieren que, en ratas jóvenes, los receptores metabotrópicos de glutamato del grupo III, además de modular la actividad de los canales de Ca^{2+} del tipo N, modulan también la actividad de los canales del tipo P/Q, y

que esta modulación se ve enmascarada a altas concentraciones de Ca^{2+} extracelular por el mejor acoplamiento a la exocitosis de este tipo de canales.

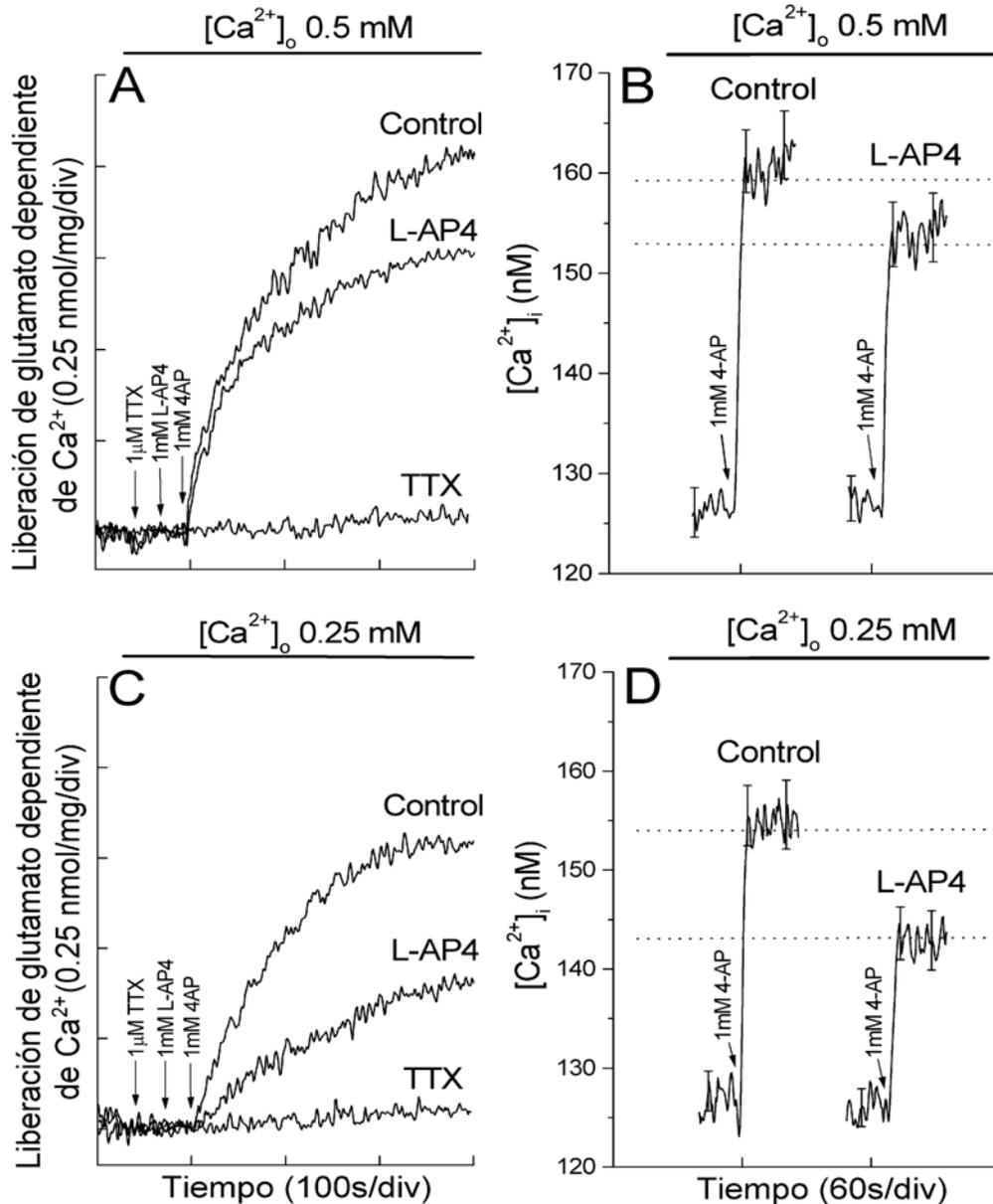


Figura IV. 23. L-AP4 reduce el componente de liberación y la entrada de Ca^{2+} asociados a canales del tipo P/Q a bajas concentraciones de Ca^{2+} extracelular en ratas jóvenes. Los sinaptosomas de corteza cerebral de ratas jóvenes (21 días) se incubaron (0.67 mg/ml) en medio HBM con BSA (1 mg/ml) libre de ácidos grasos a 37°C durante 1 hora. 1 ml de esta suspensión se utilizó para determinar la liberación de glutamato. Para la determinación de la concentración citosólica de Ca^{2+} , $[\text{Ca}^{2+}]_i$, los sinaptosomas se resuspendieron (2 mg/ml) en un medio HBM con BSA (1 mg/ml) y se preincubaron a 37°C durante 30 minutos con Fura 2-AM (5 μM) y CaCl_2 (1,33 mM). A continuación se centrifugaron a 12.000 $\times\text{g}$ durante 1 minuto y se resuspendieron (0,67 mg/ml) en medio HBM con BSA, al que se añadió CaCl_2 (1,33 mM). L-AP4 (1 mM) redujo la liberación de glutamato dependiente de Ca^{2+} (A y C) y el incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (B y D) a 0.5 mM y a 0.25 mM de Ca^{2+} extracelular, $[\text{Ca}^{2+}]_o$. Tetrodotoxina (TTx) fue añadida 1 minuto antes de la despolarización con 4-AP (1 mM). Los resultados son la media \pm SEM de 4 a 7 preparaciones diferentes.

La aplicación de L-AP4 a altas y bajas concentraciones reduce las respuestas de Ca^{2+} en dos subpoblaciones diferentes de terminales sinápticos

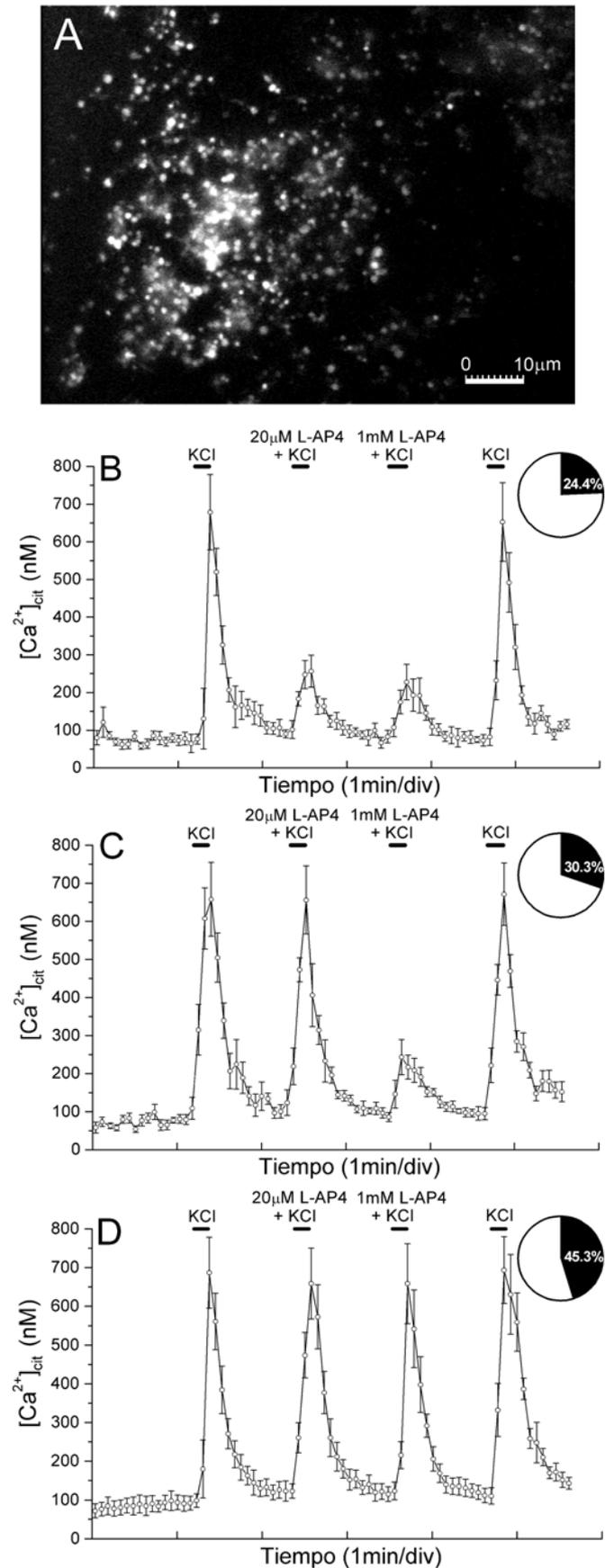
Dado que en ratas jóvenes los receptores metabotrópicos del grupo III modulan no sólo la actividad de los canales de Ca^{2+} del tipo N, sino también la de los canales de Ca^{2+} del tipo P/Q, nos planteamos, como objetivo final, conocer la distribución de los receptores metabotrópicos y de los distintos canales de Ca^{2+} en los terminales sinápticos a estas edades, y determinar si, al igual que sucede en ratas adultas, los receptores de baja afinidad por el agonista se localizan exclusivamente en terminales que contienen canales del tipo N.

Para ello, en primer lugar, y con el fin de confirmar la presencia de los dos subtipos de receptores sensibles a L-AP4 en ratas jóvenes, procedimos a la realización de experimentos de imagen de calcio, en los que estudiamos el efecto de altas y bajas concentraciones de L-AP4 sobre el incremento en la concentración citosólica de Ca^{2+} , $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$, inducido por KCl.

En sinaptosomas de ratas jóvenes, la concentración basal de calcio fue, en promedio, de $78,1 \pm 3,0$ nM, elevándose hasta 500-800 nM en presencia de KCl (30 mM). De un total de 2180 partículas analizadas, un 24,4 % respondió tanto a 20 μM como a 1 mM de L-AP4 (Figura IV. 24., B), mientras que un 30,3 % lo hizo sólo a la aplicación de 1mM de L-AP4 (Figura IV. 24., C). En un 45,3 % de las partículas L-AP4 no modificó la respuesta al agente despolarizante (Figura IV. 24., D). La viabilidad de los sinaptosomas se comprobó mediante una adición final de KCl, que indujo un incremento en la concentración citosólica de Ca^{2+} comparable al registrado con el pulso inicial.

Estos resultados ponen de manifiesto la existencia de 3 subpoblaciones de terminales sinápticos en corteza cerebral de ratas jóvenes: una que presenta receptores de alta afinidad por L-AP4, otra que presenta receptores de baja afinidad por el agonista, y una tercera que carece de receptores glutamatérgicos del grupo III.

Figura IV. 24. En ratas jóvenes la aplicación de L-AP4 a bajas y altas concentraciones revela la existencia de dos subpoblaciones de terminales sinápticos con diferente afinidad por el agonista. Los sinaptosomas de corteza cerebral de ratas jóvenes (21 días) se resuspendieron (2 mg/ml) en un medio HBM con BSA (1 mg/ml) libre de ácidos grasos y se preincubaron a 37°C con Fura 2-AM (5 μ M) y CaCl₂ (1,33 mM) durante 45 minutos, tras lo cual fueron fijados a una placa cubierta de polilisina durante 1 hora. A continuación fueron transferidos a una cámara de perfusión para su visualización en un microscopio invertido Nikon, siendo continuamente perfundidos (1-1,5 ml/min) con un medio HBM con CaCl₂ (1,33 mM) a 37°C. Los campos fueron iluminados alternativamente a 340 y 380 nm, y la concentración citosólica de Ca²⁺, [Ca²⁺]_{cit}, se estimó a partir de la razón entre la fluorescencia emitida a ambas longitudes de onda. Las respuestas de Ca²⁺ fueron inducidas por aplicaciones de 10 segundos de duración de KCl (30 mM) en ausencia o en presencia de 20 μ M o 1 mM L-AP4. Los resultados son la media \pm SEM de 6-8 respuestas de sinaptosomas individuales. Los diagramas de discos muestran el porcentaje de terminales que presentaron una determinada respuesta.



Los canales de calcio dependientes de voltaje de tipo N y P/Q coexisten en una fracción de terminales de corteza cerebral de ratas jóvenes

Con el fin de determinar cual es la distribución de los canales de calcio de los tipo N y P/Q en los terminales cerebrocorticales de ratas jóvenes, realizamos experimentos de imagen de calcio en los que medimos las respuestas individuales a la aplicación de los bloqueantes de canales del tipo P/Q ω -agatoxina-IVA y del tipo N ω -conotoxina, y a la combinación de ambos. De un total de 1.644 sinaptosomas analizados, procedentes de 4 campos diferentes, un $47,5 \pm 2,0$ % fue sensible a ω -conotoxina-GVIA (ω -CgT-GVIA) pero no a ω -agatoxina-IVA (ω -Aga-IVA) (Figura IV. 25., A), un $42,6 \pm 1,1$ % de los terminales respondió a ambas (Figura IV. 25., B), y únicamente un $3,9 \pm 2,0$ % lo hizo sólo a ω -agatoxina-IVA (Figura IV. 25., C). Un $6,1 \pm 2,5$ % de los terminales no fue sensible a ninguna de las dos toxinas (Figura IV. 25., D). Es interesante señalar que en aquellos terminales que respondieron a ambas toxinas, la aplicación de cada una de ellas por separado produjo sólo una inhibición moderada de la respuesta de Ca^{2+} , que sólo se redujo de manera drástica cuando se aplicaron simultáneamente ambas toxinas (Figura IV. 25., B).

Estos resultados revelan que los canales de Ca^{2+} de los tipos N y P/Q coexisten en un porcentaje significativo de terminales cerebrocorticales de ratas jóvenes, e indican una presencia mayoritaria de los canales del tipo N en el conjunto de terminales a estas edades, lo que contrasta con el efecto minoritario que el bloqueo de este tipo de canales tiene sobre la liberación de glutamato en esta preparación.

Los canales de calcio dependientes de voltaje del tipo L se expresan de forma minoritaria en terminales sinápticos de corteza cerebral

De un total de 1.526 partículas analizadas, procedentes de 3 campos distintos, sólo un $4,5 \pm 0,6$ % mostraron respuesta al bloqueante selectivo de canales de Ca^{2+} del tipo L nifedipino (10 μ M) (Figura IV. 26., B), lo que indica que la expresión de este tipo de canal en terminales sinápticos de corteza es muy reducida. En la misma serie de experimentos observamos como la respuesta inducida por KCl fue completamente abolida por Cd^{2+} (30 μ M), bloqueante inespecífico de canales de Ca^{2+} , en todos los sinaptosomas analizados (Figura IV. 26., A y B).

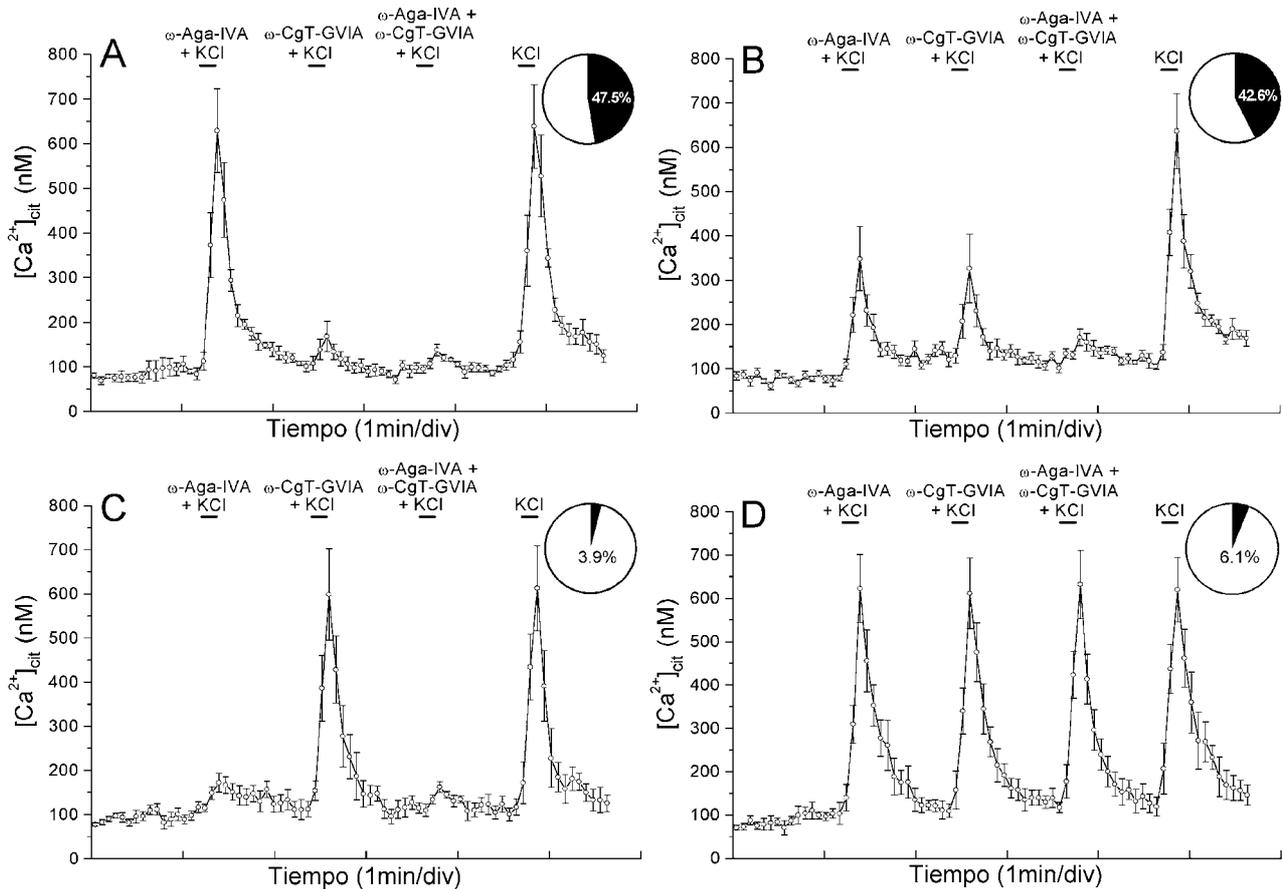


Figura IV. 25. Los canales de Ca^{2+} de los tipos P/Q y N coexisten en una subpoblación de terminales sinápticos de ratas jóvenes. Los sinaptosomas de corteza cerebral de ratas jóvenes (21 días) se resuspendieron (2 mg/ml) en un medio HBM con BSA (1 mg/ml) libre de ácidos grasos y se preincubaron a 37°C con Fura 2-AM ($5\ \mu\text{M}$) y CaCl_2 (1,33 mM) durante 45 minutos, tras lo cual se fijaron a una placa cubierta de polilisina durante 1 hora. A continuación fueron transferidos a una cámara de perfusión para su visualización en un microscopio invertido Nikon, siendo continuamente perfundidos (1-1,5 ml/min) con un medio HBM con CaCl_2 (1,33 mM) a 37°C . Los campos fueron iluminados alternativamente a 340 y 380 nm, y la concentración citosólica de Ca^{2+} , $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$, se estimó a partir de la razón entre la fluorescencia emitida a ambas longitudes de onda. Las respuestas de Ca^{2+} fueron inducidas por aplicaciones de KCl (30mM) de 10 segundos de duración en presencia y en ausencia de ω -Agatoxina-IVA (ω -Aga-IVA) (200 nM), ω -Conotoxina-GVIA (ω -CgT-GVIA) (2 μM) o una combinación de ambas. Los resultados son la media \pm SEM de 5 a 8 respuestas de sinaptosomas individuales. Los diagramas de disco muestran el porcentaje de terminales que presentaron una determinada respuesta.

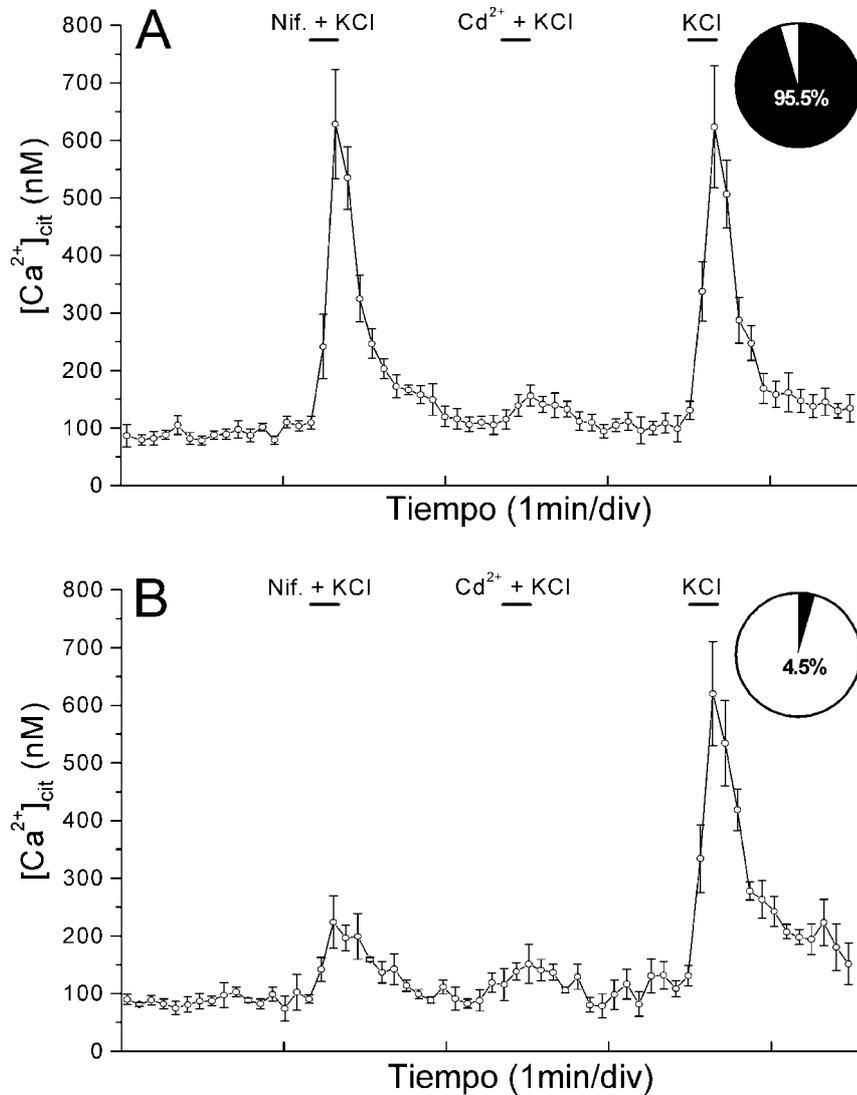


Figura IV. 26. El incremento en la concentración citosólica de Ca^{2+} inducido por KCl es insensible a nifedipino en la mayor parte de los terminales, y es revertido por el bloqueante inespecífico de canales de calcio Cd^{2+} . Los sinaptosomas de corteza cerebral de ratas jóvenes (21 días) se resuspendieron (2 mg/ml) en un medio HBM con BSA (1 mg/ml) libre de ácidos grasos y se preincubaron a $37^{\circ}C$ con Fura 2-AM (5 μM) y $CaCl_2$ (1,33 mM) durante 45 minutos, tras lo cual se fijaron a una placa cubierta de polilisina durante 1 hora. A continuación fueron transferidos a una cámara de perfusión para su visualización en un microscopio invertido Nikon, con perfusión continua (1-1,5 ml/min) de un medio HBM con $CaCl_2$ (1,33 mM) a $37^{\circ}C$. Los campos fueron iluminados alternativamente a 340 y 380 nm, y la concentración citosólica de Ca^{2+} , $[Ca^{2+}]_{cit}$, se estimó a partir de la razón entre la fluorescencia emitida a ambas longitudes de onda. Las respuestas de Ca^{2+} fueron inducidas por aplicaciones de KCl (30mM) de 10 segundos de duración en presencia y ausencia de nifedipino (10 μM) (Nif.) o $CdCl_2$ (30 μM) (Cd^{2+}). Los resultados son la media \pm SEM de 6 a 8 respuestas de sinaptosomas individuales. Los diagramas de disco muestran el porcentaje de terminales que presentaron una determinada respuesta.

En ratas jóvenes los receptores glutamatérgicos del grupo III se localizan preferentemente en terminales con una determinada distribución de canales de Ca^{2+}

Nuestro objetivo final fue determinar si los receptores glutamatérgicos con diferente afinidad por L-AP4 colocalizan preferentemente con un determinado tipo de canal de Ca^{2+} o si por el contrario se distribuyen de manera aleatoria en la población de terminales. Para ello, registramos las respuestas individuales a KCl en presencia de 20 μM de L-AP4, 1 mM de L-AP4, ω -agatoxina-IVA y ω -conotoxina-GVIA, y analizamos la posible asociación entre la presencia del receptor glutamatérgico y la presencia de un determinado subtipo de canal.

Un $69,9 \pm 1,5$ % de los terminales que respondieron a 1mM de L-AP4 pero no a 20 μM respondieron también a ω -conotoxina-GVIA (Figura IV. 27., A), mientras que el resto de los terminales ($30,1 \pm 1,5$ %) mostraron respuestas a ambas toxinas (Figura IV. 27., B). La respuesta a ω -agatoxina-IVA de los terminales que respondieron a 1 mM de L-AP4 fue excepcional (datos no mostrados).

En contraste, los terminales sensibles a 20 μM de L-AP4 respondieron a ambas toxinas en un $73,7 \pm 1,4$ % de los casos (Figura IV. 28., A), frente a un $26,3 \pm 1,4$ % que lo hizo sólo a ω -conotoxina-GVIA (Figura IV. 28., B). Ninguno de los terminales que respondió a 20 μM de L-AP4 mostró respuesta a ω -agatoxina-IVA.

Es interesante señalar que en aquellos casos en los que hubo respuesta a ambas toxinas L-AP4 redujo las respuestas de Ca^{2+} más allá de lo que lo hicieron las toxinas por separado, lo que sugiere que el receptor metabotrópico reduce la actividad de ambos tipos de canales de Ca^{2+} en estos terminales.

En resumen, estos datos revelan que en los terminales cerebrocorticales de ratas jóvenes existe una mayor heterogeneidad en la localización de los receptores glutamatérgicos y de los canales de Ca^{2+} que en ratas adultas. No obstante, hay que señalar que existe una expresión mayoritaria de los receptores de baja afinidad por L-AP4 en terminales que expresan canales de Ca^{2+} del tipo N, y de los receptores de alta afinidad en aquellos terminales que coexpresan canales de Ca^{2+} de los tipos N y P/Q.

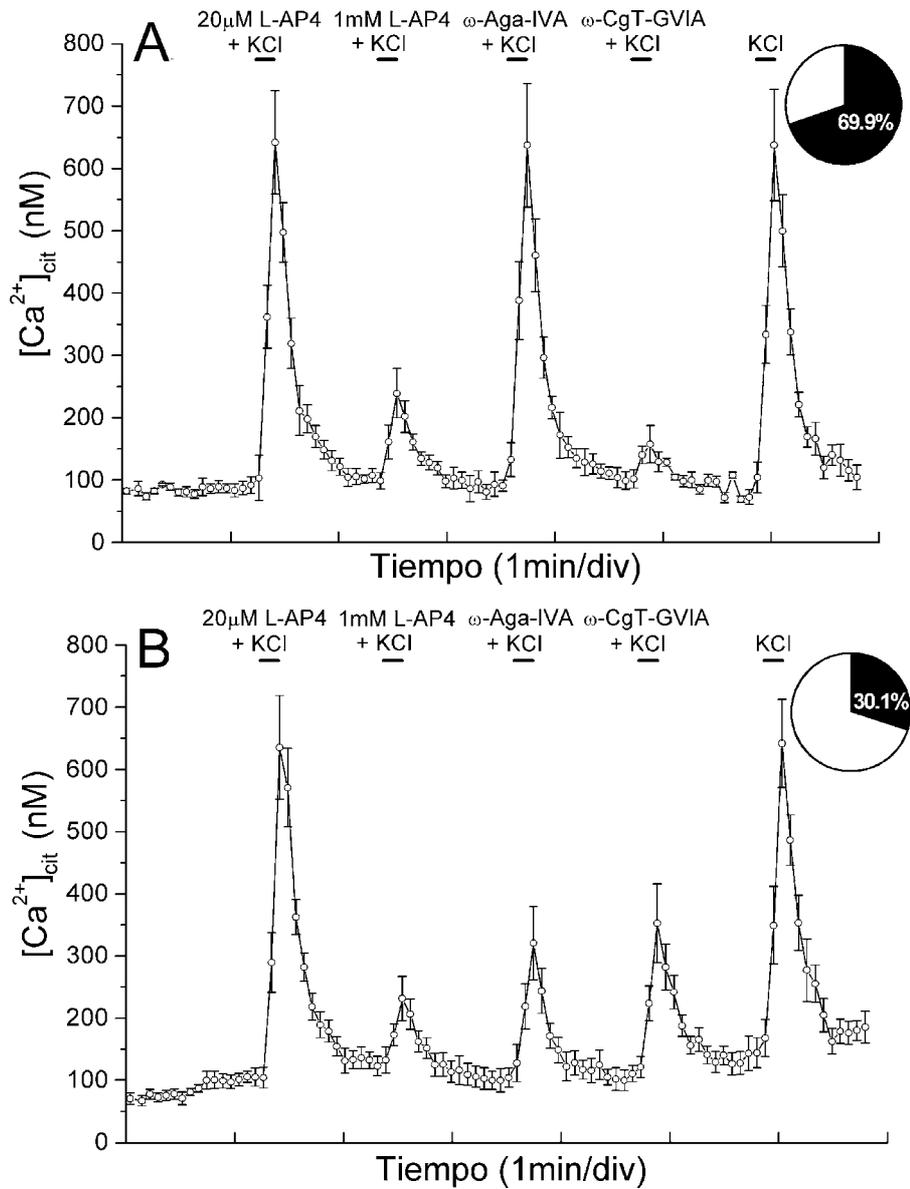


Figura IV. 27. En la preparación de sinaptosomas de corteza cerebral de ratas jóvenes mGluR7 aparece mayoritariamente en terminales que expresan exclusivamente canales de Ca²⁺ del tipo N. Los sinaptosomas de corteza cerebral de ratas jóvenes (21 días) se resuspendieron (2 mg/ml) en un medio HBM con BSA (1 mg/ml) libre de ácidos grasos y se preincubaron a 37°C con Fura 2-AM (5 μ M) y CaCl₂ (1,33 mM) durante 45 minutos, tras lo cual fueron fijados a una placa cubierta de polilisina durante 1 hora. A continuación fueron transferidos a una cámara de perfusión para su visualización en un microscopio invertido Nikon, con perfusión continua (1-1,5 ml/min) de un medio HBM con CaCl₂ (1,33 mM) a 37°C. Los campos fueron iluminados alternativamente a 340 y 380 nm, y la concentración citosólica de Ca²⁺, [Ca²⁺]_{cit}, se estimó a partir de la razón entre la fluorescencia emitida a ambas longitudes de onda. Las respuestas de Ca²⁺ fueron inducidas por aplicaciones de KCl (30mM) de 10 segundos de duración en presencia o en ausencia de L-AP4 (20 μ M o 1 mM), ω -Agatoxina-IVA (ω -Aga-IVA) (200 nM) u ω -Conotoxina-GVIA (ω -CgT-GVIA) (2 μ M). Los resultados son la media \pm SEM de 6 a 8 respuestas de sinaptosomas individuales. Los diagramas de disco muestran el porcentaje de terminales que presentaron una determinada respuesta, tomando como 100 % a aquellos que respondieron sólo a 1 mM de L-AP4.

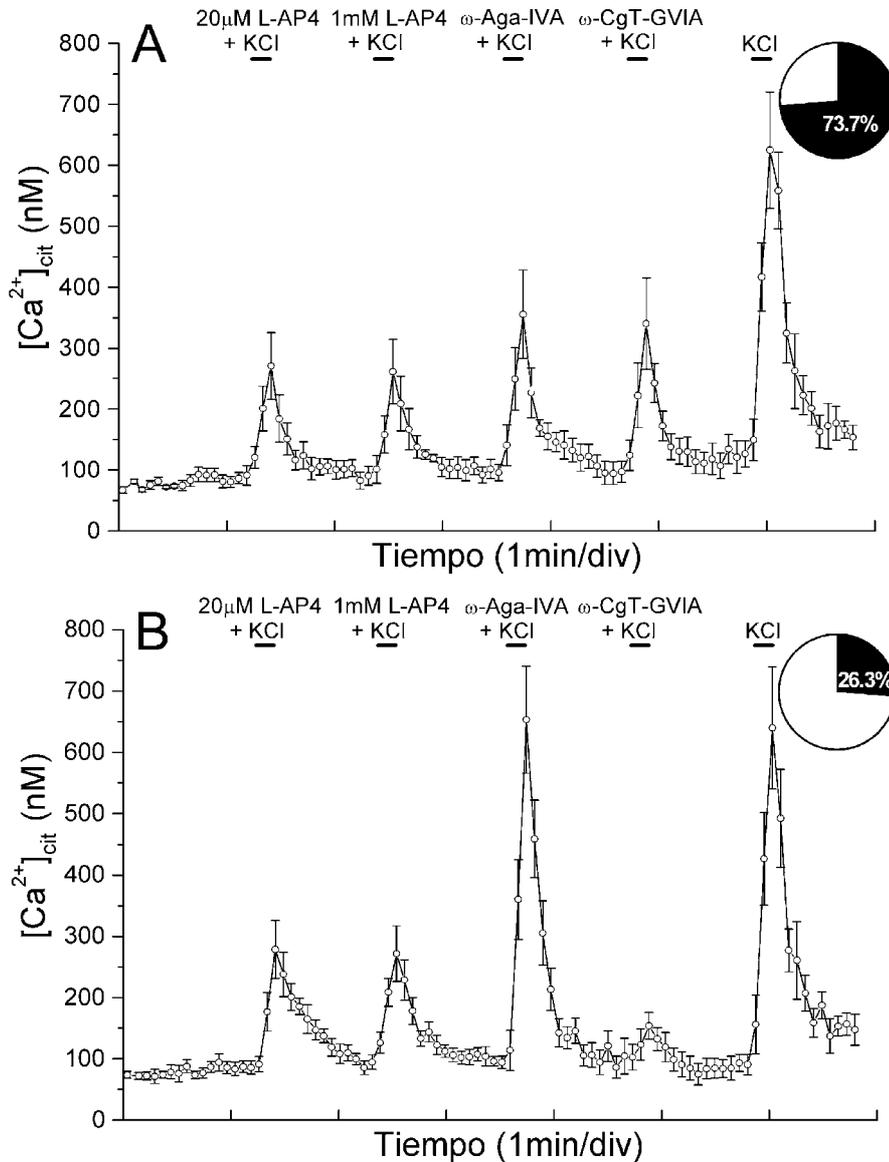


Figura IV. 28. En ratas jóvenes mGluR4 aparece mayoritariamente en aquellos terminales en los que coexisten canales de Ca^{2+} de los tipos N y P/Q. Los sinaptosomas de corteza cerebral de ratas jóvenes (21 días) se resuspendieron (2 mg/ml) en un medio HBM con BSA (1 mg/ml) libre de ácidos grasos y se preincubaron a 37°C con Fura 2-AM (5 μ M) y $CaCl_2$ (1,33 mM) durante 45 minutos y sobre una placa cubierta de polilisina durante 1 hora. A continuación fueron transferidos a una cámara de perfusión para su visualización en un microscopio invertido Nikon, siendo continuamente perfundidos (1-1,5 ml/min) con un medio HBM con $CaCl_2$ (1,33 mM) a 37°C. Los campos fueron iluminados alternativamente a 340 y 380 nm, y la concentración citosólica de Ca^{2+} , $[Ca^{2+}]_{cit}$, se estimó a partir de la razón entre la fluorescencia emitida a ambas longitudes de onda. Las respuestas de Ca^{2+} fueron inducidas por aplicaciones de KCl (30mM) de 10 segundos de duración en presencia o en ausencia de L-AP4 (20 μ M o 1 mM), ω -Agatoxina-IVA (ω -Aga-IVA) (200 nM) u ω -Conotoxina-GVIA (ω -CgT-GVIA) (2 μ M). Los resultados son la media \pm SEM de entre 6 y 7 respuestas de sinaptosomas individuales. Los diagramas de disco muestran el porcentaje de terminales que presentaron una determinada respuesta, tomando como 100 % a aquellos que respondieron a 20 μ M L-AP4.

EFFECTOS DE LA ACTIVACIÓN SIMULTÁNEA DE LAS PROTEÍNAS QUINASAS A Y C SOBRE LA LIBERACIÓN DE GLUTAMATO EN TERMINALES CEREBROCORTICALES

La activación de la proteína quinasa C potencia la liberación espontánea de glutamato inducida por proteína quinasa A

En sinaptosomas de corteza cerebral de ratas adultas, la activación de adenilato ciclasa mediante forskolina (100 μ M) indujo una liberación espontánea de glutamato de $0,59 \pm 0,06$ nmoles/mg a lo largo de los 5 primeros minutos tras la adición del diterpeno. El activador de proteína quinasa C (PKC), PDBu (1 μ M), incrementó la liberación sólo en $0,11 \pm 0,03$ nmoles /mg (Figura IV. 29., A y B). La aplicación conjunta de forskolina y PDBu produjo, sin embargo, un importante incremento de la liberación espontánea de glutamato ($1,67 \pm 0,08$ nmoles/mg). La liberación espontánea inducida por forskolina fue revertida por el inhibidor de proteína quinasa A H-89 (10 μ M) ($0,17 \pm 0,05$ nmoles /mg), y por el inhibidor de proteínas quinasas de amplio espectro staurosporina (100 nM) ($0,20 \pm 0,02$ nmoles/mg) (Figura IV. 29., B), sugiriendo que la acción del diterpeno es mediada por la activación de proteína quinasa A (PKA). El análogo inactivo de PDBu, α -PDD (1 μ M), no potenció la liberación inducida por forskolina ($0,45 \pm 0,06$ nmol/mg). De manera similar, la combinación del análogo inactivo de forskolina, 1,9-dideoxiforskolina (100 μ M), y de PDBu tampoco estimuló la liberación espontánea de glutamato de manera significativa ($0,22 \pm 0,06$ nmol/mg), indicando que los efectos de forskolina y PDBu son específicos. El inhibidor de amplio espectro staurosporina revirtió significativamente la liberación inducida por la aplicación conjunta de forskolina y PDBu ($0,35 \pm 0,05$ nmol/mg) (Figura IV. 29., B), indicando que las respuestas mediadas por estos agentes son dependientes de la activación de proteína quinasa A y proteína quinasa C, más que de un efecto de AMPc (Beaumont y Zucker, 2000) o de una acción directa de PDBu (Betz y cols., 1998).

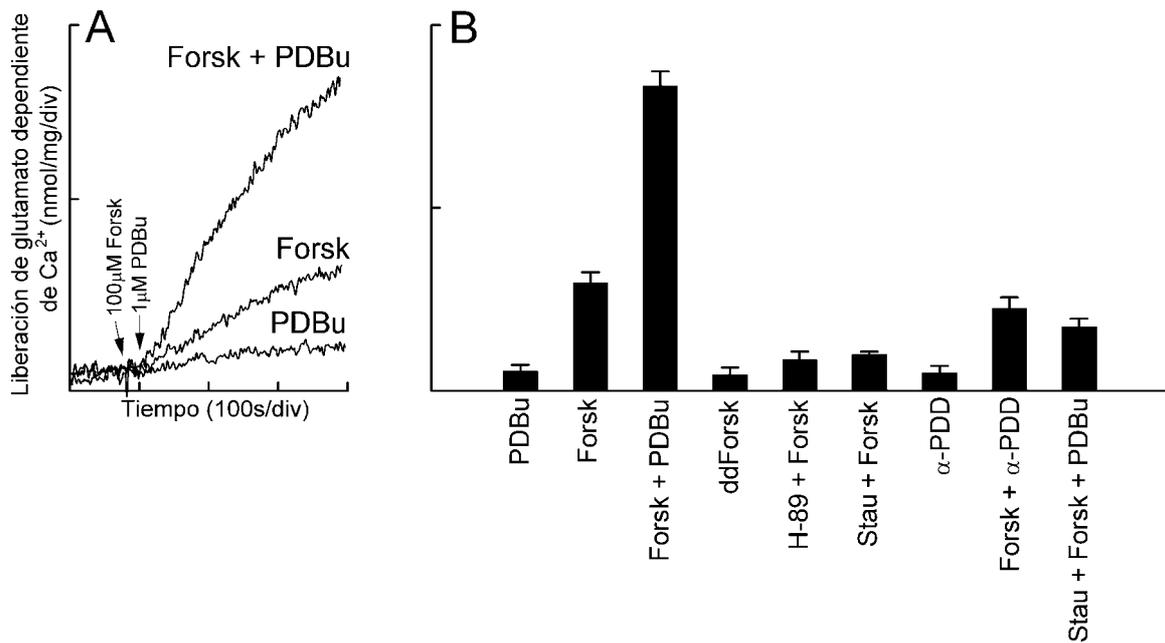


Figura IV. 29. La activación de proteína quinasa C potencia la liberación espontánea de glutamato inducida por proteína quinasa A. Los sinaptosomas de corteza cerebral de ratas adultas (2-3 meses) purificados mediante gradientes de Percoll se incubaron (0.67 mg/ml) en medio HBM con BSA (1 mg/ml) a 37°C durante 1 hora. 1 ml de esta suspensión se utilizó para determinar la liberación de glutamato. La liberación de glutamato dependiente de Ca^{2+} se calculó como la diferencia entre la liberación obtenida en los 5 minutos siguientes a la aplicación de forskolina (Forsk) (100 μ M) y/o PDBu (1 μ M) en presencia de $CaCl_2$ 1,33 mM y la obtenida en un medio en el que se mantuvo una concentración de Ca^{2+} libre de 200 nM. Los análogos inactivos de forskolina y PDBu, 1,9-dideoxiforskolina y α -PDD se emplearon a concentraciones de 100 μ M y 1 μ M respectivamente. El inhibidor de proteína quinasa staurosporina (Stau) (100 nM) y el inhibidor de proteína quinasa A H-89 (10 μ M) se añadieron 30 minutos antes de la realización de los ensayos correspondientes. Los resultados son la media \pm SEM de 6 a 8 experimentos diferentes.

La liberación espontánea inducida por forskolina fue enteramente sensible al bloqueante de canales de Na^+ dependientes de voltaje tetrodotoxina (TTx) (datos no mostrados; Herrero y Sánchez-Prieto, 1996b), lo que sugiere que la facilitación de la liberación producida por la activación de PKA podría ser debida a una modulación de canales de Na^+ o de K^+ . Dado que la fosforilación por PKA inhibe la actividad de los canales de Na^+ dependientes de voltaje (Gershon y cols., 1992; Smith y Golding, 1997; D'Alcantara y cols., 1999), parece más probable que la capacidad de PKA para inducir potenciales de acción espontáneos resulte de una inhibición de corrientes de K^+ , posiblemente de tipo $I_{K(A)}$ (Hoffman y Johnston, 1998; Anderson y cols., 2000; Schrader y cols., 2002). Por otro lado, el hecho de que la activación de PKC carezca de efecto por sí misma pero potencie la liberación inducida por forskolina apunta hacia una

modulación o bien de canales de Ca^{2+} o bien de los canales de K^+ que regulan la duración de los potenciales de acción. La modulación de estos canales de K^+ por proteína quinasa C estaría de acuerdo con la observación de que la aplicación conjunta de forskolina y del bloqueante de canales de K^+ tetraetilamonio (TEA) o la combinación de 4-AP y PDBu muestran un efecto supraaditivo sobre la liberación de glutamato, algo que no sucede cuando se combinan forskolina y 4-AP o TEA y PDBu (datos no mostrados).

La liberación espontánea inducida por forskolina y PDBu no depende de un incremento en el número de sitios de liberación

La actividad de PKA y PKC ha sido relacionada con un aumento en el número de sitios de liberación (Chavis y cols., 1998) y con un incremento de la movilización de vesículas desde el compartimento de reserva hacia la zona activa (Stevens and Sullivan, 1998; Waters y Smith, 2000; Foletti y cols., 2001). Con el fin de determinar si estos mecanismos contribuyen a los efectos observados en presencia de los activadores de las quinasas, realizamos experimentos de liberación de mayor duración (15 minutos), midiendo la liberación inducida por 30 mM de KCl al final de cada ensayo, con el objetivo de determinar el contenido de glutamato vesicular total de la preparación. En condiciones basales, la liberación espontánea de glutamato a lo largo de 10 minutos fue de $0,50 \pm 0,07$ nmoles/mg (Fig IV. 30., Ay B), de manera que la adición subsiguiente de KCl (30 mM) liberó la casi totalidad del glutamato vesicular ($3,55 \pm 0,12$ nmoles/mg). La aplicación de forskolina y PDBu indujo una liberación de $2,69 \pm 0,14$ nmoles/mg, mientras que el KCl añadido a continuación sólo liberó $1,35 \pm 0,09$ nmoles/mg (Figura IV. 30., A y B).

Estos resultados sugieren que el glutamato liberado por forskolina y PDBu y el liberado por KCl provienen del mismo compartimento vesicular, y que el tamaño de este compartimento no se modifica tras la activación de las proteínas quinasas A y C. Por tanto, podemos descartar que un incremento del número de sitios de liberación sea el responsable de los efectos de las quinasas en nuestra preparación. Si la facilitación de la liberación observada tras la activación de PKA y PKC resulta de un incremento de la movilización de vesículas, ésta debe ocurrir a costa del compartimento de reserva y sin cambio en el contenido de glutamato vesicular total.

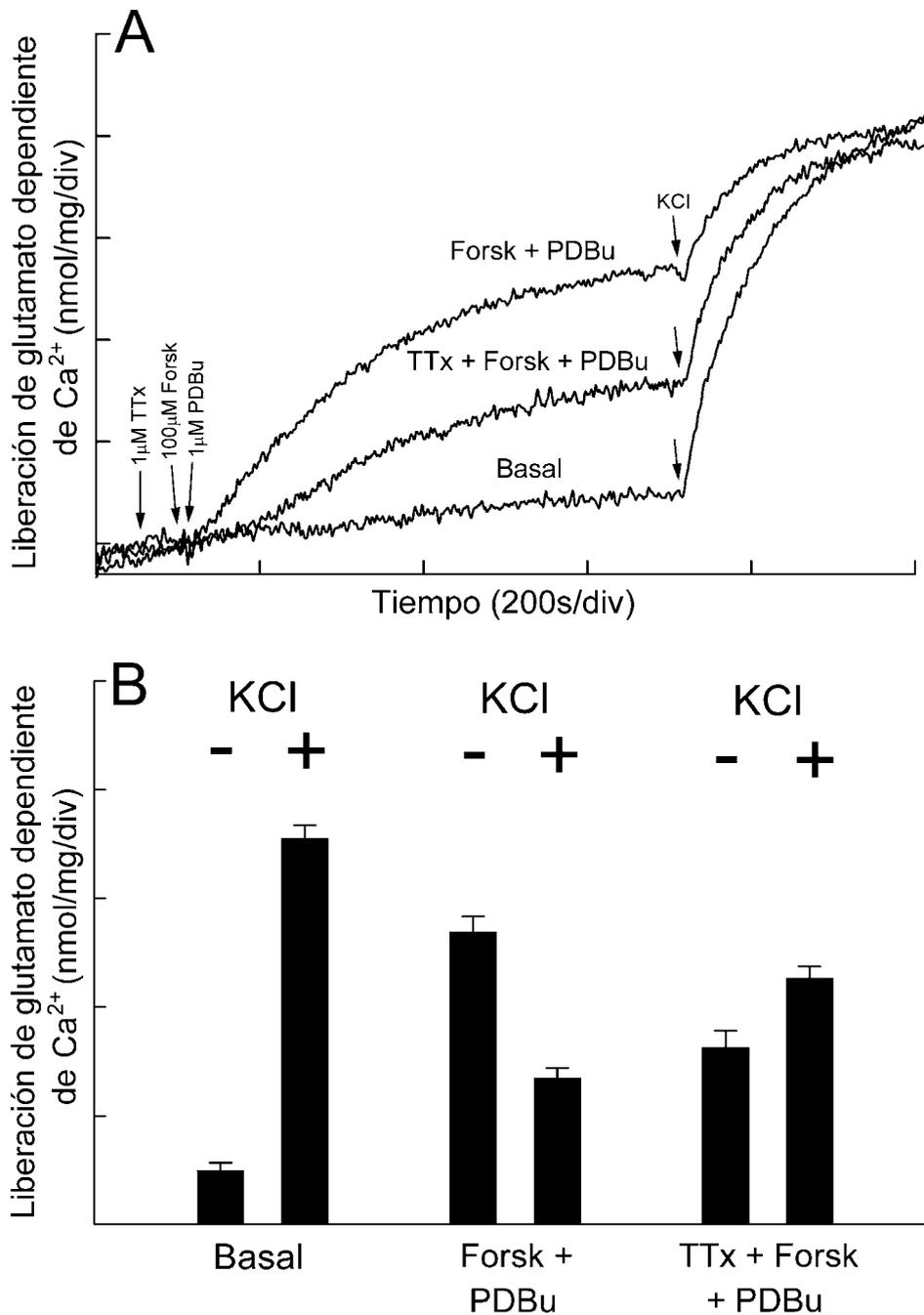


Figura IV. 30. El glutamato liberado por forskolina y PDBu y el liberado por KCl pertenecen al mismo compartimento vesicular. Los sinaptosomas de corteza cerebral de ratas adultas (2-3 meses) purificados mediante gradientes de Percoll se incubaron (0.67 mg/ml) en medio HBM con BSA (1 mg/ml) a 37°C durante 1 hora. 1 ml de esta suspensión se utilizó para determinar la liberación de glutamato. La liberación de glutamato dependiente de Ca^{2+} se calculó como la diferencia entre la liberación obtenida en los 15 minutos siguientes a la aplicación de forskolina (Forsk) (100 μ M) y PDBu (1 μ M) en presencia de $CaCl_2$ 1,33 mM y la obtenida en un medio en el que se mantuvo una concentración de Ca^{2+} libre de 200 nM. KCl (30 mM) se aplicó 10 minutos después del activador de proteína quinasa C. En los experimentos con tetrodotoxina (TTx) (1 μ M), ésta se aplicó 1 minuto antes que PDBu. Los resultados son la media \pm SEM de 7 a 8 experimentos diferentes.

La liberación inducida por forskolina y PDBu depende de la actividad de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje, pero sólo parcialmente de la génesis de potenciales de acción

Dado que la liberación espontánea de glutamato inducida por forskolina es abolida por el bloqueante de canales de Na^+ dependientes de voltaje tetrodotoxina (TTx) (datos no mostrados; Herrero y Sánchez-Prieto, 1996b), nos planteamos si la aplicación de la toxina era capaz de inhibir la liberación inducida por la combinación de forskolina y PDBu. Para nuestra sorpresa, esta liberación fue reducida sólo en un $51,6 \pm 2,8 \%$ en presencia de TTx ($1 \mu\text{M}$) (Figura IV. 30., A y B), indicando que una fracción sustancial de la liberación no depende de la génesis de potenciales de acción. La liberación inducida por forskolina y PDBu sí fue, por el contrario, dependiente de la entrada de Ca^{2+} a través de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje, ya que el bloqueante inespecífico de canales de tipo N y P/Q, ω -CgT-MVIIC ($10 \mu\text{M}$), suprimió en un $91,4 \%$ dicha liberación (Figura IV. 31., A y B).

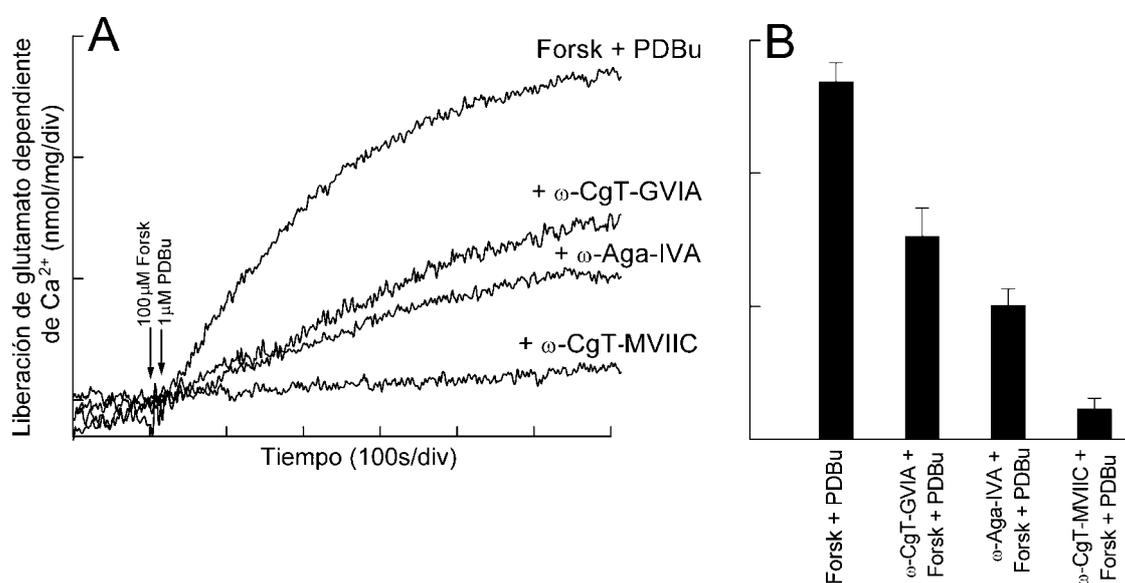


Figura IV. 31. La liberación espontánea de glutamato inducida por forskolina y PDBu depende de la actividad de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje. Los sinaptosomas de corteza cerebral de ratas adultas (2-3 meses) purificados mediante gradientes de Percoll se incubaron (0.67 mg/ml) en medio HBM con BSA (1 mg/ml) a 37°C durante 1 hora. 1 ml de esta suspensión se utilizó para determinar la liberación de glutamato. La liberación de glutamato dependiente de Ca^{2+} se calculó como la diferencia entre la liberación obtenida en los 10 minutos siguientes a la aplicación de forskolina (Forsk) ($100 \mu\text{M}$) y PDBu ($1 \mu\text{M}$) en presencia de CaCl_2 $1,33 \text{ mM}$ y la obtenida en un medio en el que se mantuvo una concentración de Ca^{2+} libre de 200 nM . Los bloqueantes de canales de Ca^{2+} del tipo N, ω -conotoxina-GVIA (ω -CgT-GVIA) ($2 \mu\text{M}$), del tipo P/Q, ω -agatoxina-IVA (ω -Aga-IVA) (200 nM), y el bloqueante inespecífico de canales de Ca^{2+} ω -conotoxina-MVIIC (ω -CgT-MVIIC) ($10 \mu\text{M}$) fueron añadidos 100 segundos antes que forskolina. Los resultados son la media \pm SEM de 7 a 8 experimentos diferentes.

El efecto de forskolina y PDBu sobre la liberación espontánea de glutamato depende en parte de una modulación directa de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje

Es improbable que el componente de liberación resistente a TTx observado en presencia de forskolina y PDBu esté relacionado con la actividad de canales de Na^+ dependientes de voltaje resistentes a la toxina. Aunque la existencia de estos canales está descrita, su expresión se encuentra limitada al Sistema Nervioso Periférico (Akopian y cols., 1996; Sangameswaran y cols., 1996; Dib-Hajj y cols., 1998; Rabert y cols., 1998; Renganathan y cols., 2000; Sleeper y cols., 2000; Scholz y Vogel, 2000; Steffens y cols., 2001; Fang y cols., 2002; Black y cols., 2003), no existiendo evidencias sobre su expresión a nivel central (Ogata y cols., 2000; Dib-Hajj y cols., 2002).

Otra posibilidad es que el componente resistente a TTx sea debido a una modulación directa de canales de Ca^{2+} por la activación de PKA (Fukuda y cols., 1996) o de PKC (Stea y cols., 1995) en ausencia de potenciales de acción. Para estudiar esta posibilidad procedimos a la realización de experimentos de liberación de glutamato en presencia de TTx y de concentraciones submáximas de KCl, analizando el efecto de los activadores de PKA y PKC y de las distintas toxinas de canales de Ca^{2+} sobre dicha liberación.

La liberación inducida por 30 mM de KCl fue totalmente insensible a TTx 1 μM (Figura IV. 32., A). Aunque la despolarización por KCl activa canales de Na^+ dependientes de voltaje, es probable que éstos se inactiven por la despolarización sostenida, y que permanezcan en este estado durante toda la duración del experimento de liberación, siendo mínima su contribución a la liberación total. En cambio la liberación inducida por el bloqueante de canales de K^+ 4-aminopiridina (4-AP) (1 mM), fue completamente abolida por la toxina (Figura IV. 32., B). Curiosamente, cuando se emplearon concentraciones submáximas de KCl (10 mM) observamos la presencia de dos componentes, uno sensible a TTx (60,3 %) y otro resistente a la toxina (39,7 %) (Figura IV. 32., C). El componente resistente a TTx ($0,89 \pm 0,07$ nmols/mg) se incrementó significativamente en presencia de forskolina (100 μM) y PDBu (1 μM) (Figura IV. 32., D), sugiriendo un efecto directo de las quinasas sobre canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje.

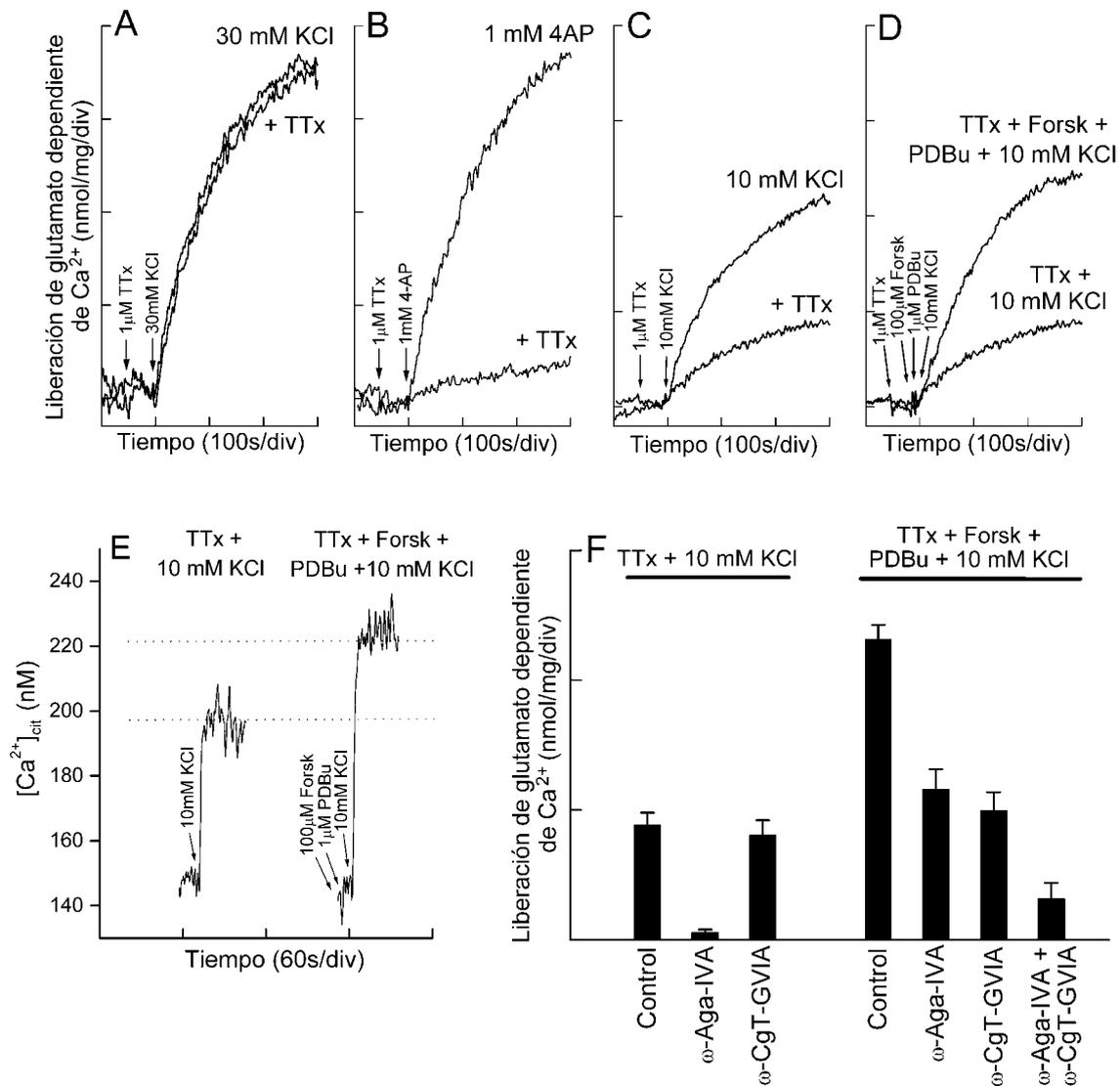


Figura IV. 32. La liberación espontánea de glutamato inducida por forskolina y PDBu depende en parte de una modulación positiva de canales de Ca²⁺ dependientes de voltaje del tipo N. Los sinaptosomas de corteza cerebral de ratas adultas (2-3 meses) purificados mediante gradientes de Percoll se incubaron (0.67 mg/ml) en medio HBM con BSA (1 mg/ml) a 37°C durante 1 hora. 1 ml de esta suspensión se utilizó para determinar la liberación de glutamato. La liberación de glutamato dependiente de Ca²⁺ se calculó como la diferencia entre la liberación obtenida en los 5 minutos siguientes a la despolarización mediante KCl (30 o 10 mM) o 4-aminopiridina (4-AP) (1 mM) en presencia de CaCl₂ 1,33 mM y la obtenida en un medio en el que se mantuvo una concentración de Ca²⁺ libre de 200 nM. TTx (1 μM) fue añadida 60 segundos antes de la despolarización. Forskolina (Forsk) (100 μM) y PDBu (1 μM) se añadieron 10 y 5 segundos respectivamente antes que KCl (10 mM). Los bloqueantes de canales de Ca²⁺ del tipo N, ω-conotoxina-GVIA (ω-CgT-GVIA) (2 μM) y del tipo P/Q, ω-agatoxina-IVA (ω-Aga-IVA) (200 nM) fueron añadidos 100 segundos antes de despolarizar. Para la determinación de la concentración citosólica de Ca²⁺, [Ca²⁺]_{cit}, los sinaptosomas se resuspendieron (2 mg/ml) en un medio HBM con BSA (1 mg/ml) y se preincubaron a 37°C durante 30 minutos con Fura 2-AM (5 μM) y CaCl₂ (1,33 mM). A continuación se centrifugaron a 12.000 xg durante 1 minuto y se resuspendieron (0,67 mg/ml) en medio HBM con BSA libre de ácidos grasos, al que se añadió CaCl₂ (1,33 mM). Los resultados son la media ± SEM de 3 a 6 experimentos diferentes.

Con el objetivo de confirmar que esta potenciación de la liberación es consecuencia de una acción sobre los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje determinamos los efectos producidos por forskolina y PDBu sobre el incremento en la concentración citoplásmica de Ca^{2+} , $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$, inducido por 10 mM de KCl en la población de sinaptosomas. Como se muestra en la Figura IV. 32., E, la elevación de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ inducida por el agente despolarizante fue potenciada significativamente por los activadores de las quinasas. Para determinar si la modulación de los canales de Ca^{2+} afecta específicamente a un tipo de canal realizamos experimentos de liberación en los que analizamos los efectos de los bloqueantes de canales de Ca^{2+} del tipo P/Q, ω -agatoxina-IVA (ω -Aga-IVA) (200 nM), y del tipo N, ω -conotoxina-GVIA (ω -CgT-GVIA) (2 μ M). La liberación inducida por 10 mM de KCl en presencia de TTx fue prácticamente insensible a ω -conotoxina-GVIA, siendo completamente abolida por ω -agatoxina-IVA (Figura IV. 32., F), lo que sugiere que, en aquellas situaciones en las que existe una menor entrada de Ca^{2+} en el terminal, toda la liberación de glutamato es dependiente de la entrada de Ca^{2+} a través de canales del tipo P/Q, hecho que está de acuerdo con el mejor acoplamiento de este tipo de canales a la exocitosis de glutamato. En presencia de forskolina y PDBu, buena parte de la liberación ($56,9 \pm 6,0$ %) fue, por el contrario, sensible a ω -conotoxina-GVIA (Figura IV. 32., F), lo que sugiere una modulación positiva por parte de las proteínas quinasas A y C sobre los canales de Ca^{2+} del tipo N.

Para confirmar que los resultados obtenidos representan realmente una modulación directa sobre canales de Ca^{2+} es necesario excluir un efecto despolarizante de forskolina y PDBu adicional al producido por la despolarización con 10 mM de KCl, que pudiera ser responsable del reclutamiento de canales de Ca^{2+} y del incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ y en la liberación de glutamato observados. Los experimentos realizados con la sonda fluorescente DiSC₃(5) mostraron, sin embargo, que la magnitud de la despolarización inducida por 10 mM de KCl en presencia de TTx no se modificó significativamente por la aplicación previa de forskolina y PDBu (Figura IV. 33.), lo que confirma que la potenciación de la liberación de glutamato observada en presencia de estos agentes es consecuencia de una acción directa de las quinasas sobre canales de Ca^{2+} .

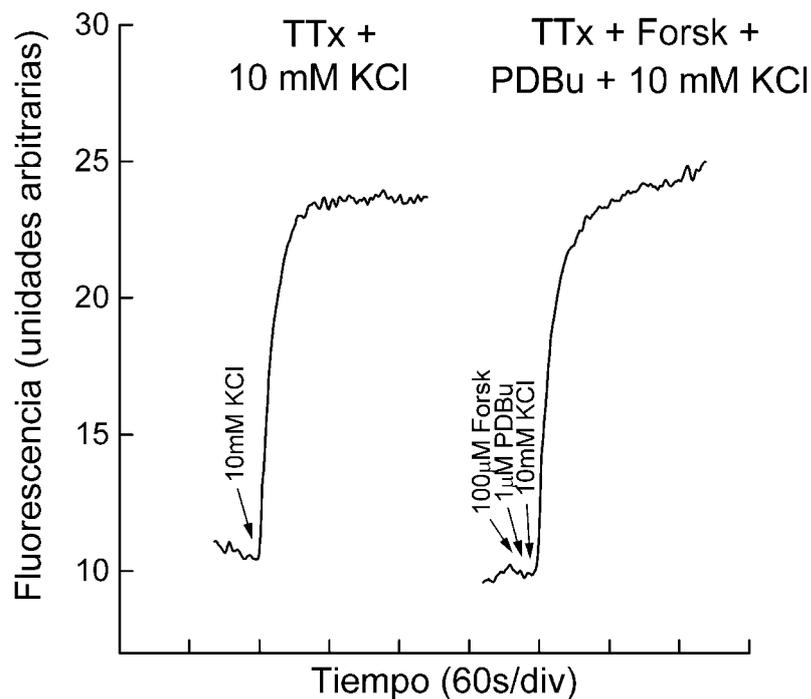


Figura IV. 33. Forskolina y PDBu no modifican la magnitud de la despolarización inducida por 10 mM de KCl en presencia de TTx. Los sinaptosomas de corteza cerebral de ratas adultas (2-3 meses) purificados mediante gradientes de Percoll se incubaron (0.67 mg/ml) en medio HBM con BSA (1 mg/ml) a 37°C durante 1 hora. 1 ml de esta suspensión se transfirió a una cubeta de fluorímetro que contenía CaCl_2 1,33 mM y el indicador fluorescente $\text{DiSC}_3(5)$ 5 μM , determinándose el potencial de membrana tal y como se describe en Materiales y Métodos. El bloqueante de canales de Na^+ dependientes de voltaje tetrodotoxina, TTx (1 μM) fue añadido 60 segundos antes de despolarizar con KCl (10 mM). En los ensayos con PDBu (1 μM) y forskolina (Forsk) (100 μM), éstos fueron añadidos 5 y 10 segundos antes respectivamente que KCl. Los resultados son la media \pm SEM de 3 experimentos diferentes.

Aunque los resultados obtenidos muestran que la activación de las proteínas quinasas A y C aumenta significativamente el componente de liberación asociado a los canales de Ca^{2+} del tipo N, no queda claro si estas quinasas afectan exclusivamente a este tipo de canales o actúan también sobre los canales del tipo P/Q. Una posibilidad es que las quinasas estén actuando sobre ambos tipos de canales de Ca^{2+} , pero que, debido a la menor eficacia con la que los canales del tipo N están acoplados a la exocitosis, el incremento en la corriente de Ca^{2+} afecte proporcionalmente más al componente dependiente de este tipo de canales que al asociado a los canales P/Q. Sin embargo, el hecho de que la magnitud de la inhibición observada en presencia de ω -conotoxina-GVIA (56,9 %) sea significativamente mayor a la encontrada en condiciones de despolarización máxima con 30 mM de KCl (25,0 %) (Figura IV. 3., C), parece indicar

que el efecto observado podría deberse realmente a una modulación selectiva sobre canales de Ca^{2+} del tipo N.

Forskolina y PDBu estimulan la liberación de glutamato por una acción directa sobre la maquinaria exocitótica

El ionóforo de Ca^{2+} ionomicina incrementa la concentración intrasínaptosomal de Ca^{2+} e induce la liberación espontánea de glutamato vesicular por un mecanismo independiente de la apertura de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje. El empleo de este ionóforo es, por tanto, una herramienta muy útil para estudiar aquellas modulaciones que tienen lugar sobre la maquinaria exocitótica (Sihra y cols, 1992). Como se muestra en la figura IV. 34., A y B, ionomicina 4 μM indujo una liberación espontánea de glutamato de $1,36 \pm 0,08$ nmols/mg, que fue potenciada por forskolina ($2,79 \pm 0,11$ nmoles/mg), PDBu ($3,48 \pm 0,12$ nmoles/mg) y por la aplicación conjunta de ambos ($4,44 \pm 0,09$ nmoles/mg). Dado que las proteínas quinasas A y C actúan sobre canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje, es posible que los datos obtenidos en los experimentos de ionomicina reflejen no sólo un efecto sobre la maquinaria exocitótica, sino también una acción sobre los canales de Ca^{2+} , por lo que repetimos estos ensayos de liberación en presencia de los bloqueantes de canales ω -agatoxina-IVA y ω -conotoxina-GVIA. En estas condiciones, la liberación inducida por ionomicina fue similar a la obtenida en ausencia de las toxinas ($1,44 \pm 0,07$ nmoles/mg) (Figura IV. 34., C y D), lo que confirma que la liberación inducida por el ionóforo es completamente independiente de la actividad de canales de Ca^{2+} . Las toxinas de canales de Ca^{2+} sí redujeron, sin embargo, la potenciación de la liberación producida por forskolina y PDBu, que aún así siguió siendo significativa (Figura IV. 34., C y D), reflejando una acción de las quinasas sobre la maquinaria exocitótica.

La modulación directa de la maquinaria exocitótica por la coactivación de las proteínas quinasas A y C está de acuerdo con la fosforilación por PKA de proteínas vesiculares como rabfilina, sinapsina I o snapina (Lonart y Sudhof, 1998a; Hosaka y cols., 1999; Chheda y cols., 2001), y con la capacidad de PKC para alterar el estado de fosforilación de algunas de las proteínas relacionadas con la fusión de las vesículas a la membrana como SNAP-25 y munc/nSec1 (Fujita y cols., 1996; Genoud y cols., 1999).

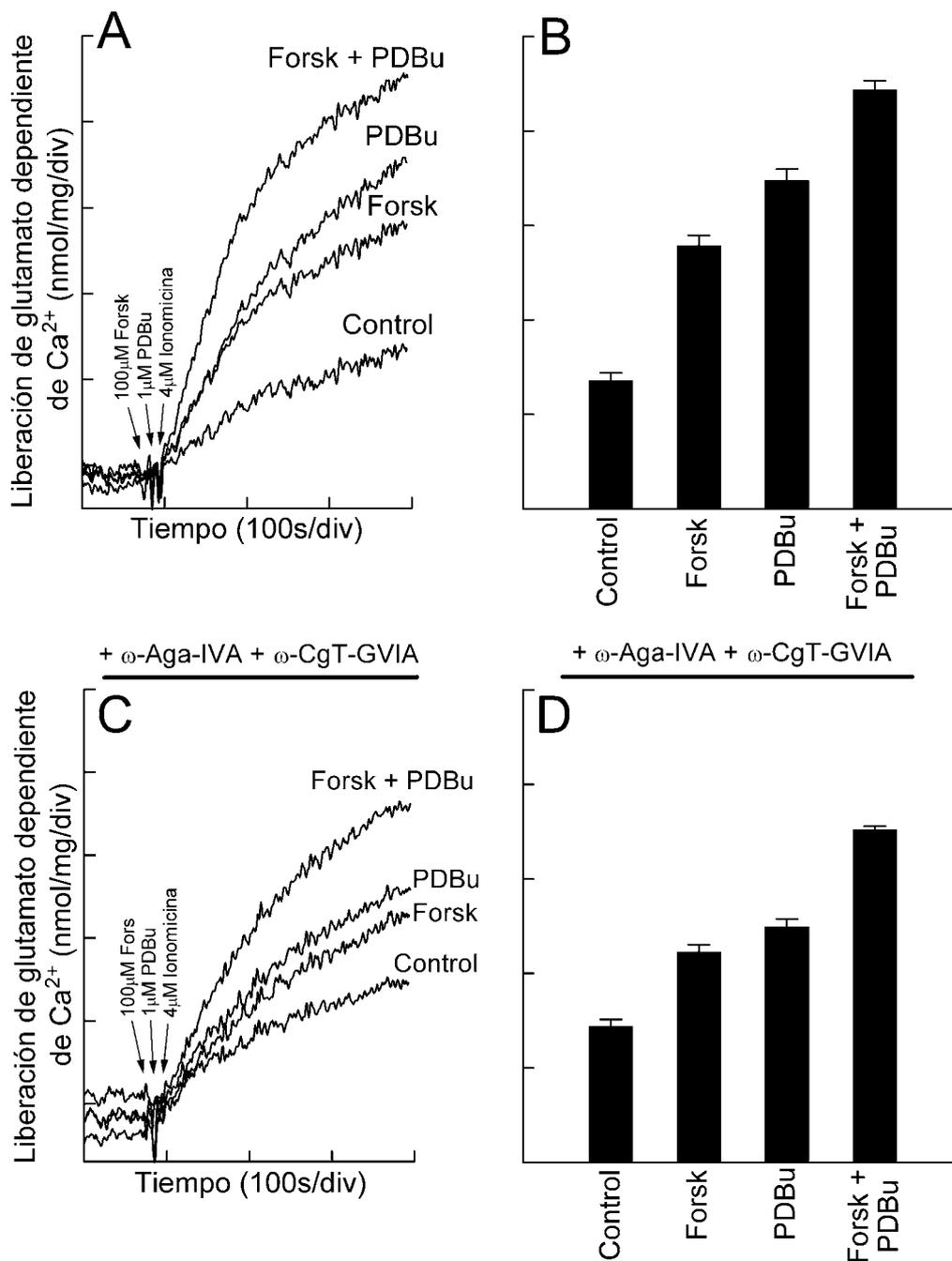


Figura IV. 34. Forskolina y PDBu estimulan la liberación espontánea de glutamato inducida por el ionóforo de Ca^{2+} ionomicina. Los sinaptosomas de corteza cerebral de ratas adultas (2-3 meses) purificados mediante gradientes de Percoll se incubaron (0.67 mg/ml) en medio HBM con BSA (1 mg/ml) a 37°C durante 1 hora. 1 ml de esta suspensión se utilizó para determinar la liberación de glutamato. La liberación de glutamato dependiente de Ca^{2+} se calculó como la diferencia entre la liberación obtenida en los 5 minutos siguientes a la aplicación de ionomicina (4 μM) en presencia de CaCl_2 1,33 mM y la obtenida en un medio en el que se mantuvo una concentración de Ca^{2+} libre de 200 nM. Forskolina (Forsk) (100 μM) y PDBu (1 μM) se añadieron 10 y 5 segundos antes, respectivamente, de la adición del ionóforo. Los bloqueantes de canales de Ca^{2+} del tipo N, ω -conotoxina-GVIA (ω -CgT-GVIA) (2 μM) y del tipo P/Q, ω -agatoxina-IVA (ω -Aga-IVA) (200 nM), fueron añadidos 100 segundos antes que ionomicina. Los resultados son la media \pm SEM de 7 experimentos diferentes.

El mecanismo por el cual la modulación directa de la maquinaria exocitótica estimula la liberación de glutamato es desconocido, aunque en nuestra preparación no parece estar relacionado con un incremento en la tasa de reciclamiento vesicular, ni con un aumento del número de sitios de liberación. Otra posibilidad es que la acción de las quinasas aumente la sensibilidad de la maquinaria exocitótica al Ca^{2+} , tal y como ha sido descrito en algunas sinapsis (Wu y Wu, 2001).

V. DISCUSIÓN

VALIDEZ DE LA PREPARACIÓN DE SINAPTOSOMAS PARA EL ESTUDIO DE MECANISMOS PRESINÁPTICOS

Una de las ventajas de la preparación de sinaptosomas en el estudio de los mecanismos presinápticos que modulan la liberación de neurotransmisores es que permite determinar los niveles de segundos mensajeros (Ca^{2+} , DAG, AMPc, GMPc, etc.), y así conocer las vías de transducción de señales activadas por los receptores presinápticos en relación con el mecanismo modulador. Otra ventaja de esta preparación frente a los estudios electrofisiológicos es que posibilita el análisis de respuestas individuales, permitiendo, por ejemplo, estudiar la distribución de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje en terminales individuales, o determinar el porcentaje de terminales que presentan un determinado receptor. Además, la fijación de los sinaptosomas a una cubierta polilisinada permite la aplicación de técnicas inmunocitoquímicas para conocer, por ejemplo, el porcentaje de terminales glutamatérgicos y GABAérgicos presentes en la preparación, o la identidad de los receptores objeto de estudio.

Entre los inconvenientes de la preparación figura la posibilidad de contaminación por elementos postsinápticos o por elementos gliales. Con el objetivo de evaluar el grado de contaminación postsináptica en nuestra preparación de sinaptosomas realizamos experimentos inmunocitoquímicos empleando anticuerpos frente a la subunidad NMDAR1 de los receptores NMDA y frente a las subunidades GluR2 y 3 de los receptores AMPA. Estos experimentos mostraron una inmunopositividad de entre un 1,89 % y un 7,91 % para NMDAR1 y de entre un 5,36 % y un 12,65 % para GluR2/3 (datos no mostrados), lo que en principio sugiere un bajo nivel de contaminación postsináptica en nuestra preparación. El hecho de que los receptores metabotrópicos del grupo III sean fundamentalmente presinápticos (Shigemoto y cols., 1996, 1997; Kinoshita y cols., 1996a, 1996b, 1998; Kosinski y cols., 1999; Corti y cols., 2002), minimiza, por otro lado, la influencia de una posible contaminación postsináptica. Esto está de acuerdo con el hecho de que todo el marcaje inmunocitoquímico para los receptores del grupo III se haya encontrado exclusivamente en partículas que muestran marcaje positivo para sinaptofisina (Figuras IV. 14 y IV. 19), empleada comúnmente como marcador presináptico.

Durante mucho tiempo se pensó que la alta capacidad de recaptación de glutamato exhibida por los sinaptosomas era debida a la contaminación por elementos gliales, ya que no se habían identificado transportadores de membrana en los terminales sinápticos, y el principal transportador de glutamato detectado en corteza cerebral, GLT1, parecía localizarse exclusivamente en astrocitos. La capacidad de los terminales para captar glutamato fue demostrada por Gundersen y cols. (1993) mediante experimentos con rodajas de tejido cerebral, que mostraron la existencia de un transporte de D-aspartato en terminales de sinapsis asimétricas, puesto de manifiesto mediante anticuerpos anti-aspartato. Recientemente, además, se ha encontrado que un subtipo de GLT1, GLT1b, que se expresa de manera abundante en corteza cerebral, hipocampo, estriado, tálamo y cerebro medio, se localiza en terminales sinápticos, además de en dendritas y en astrocitos (Chen y cols., 2002; Suchak y cols., 2003). Estos hallazgos confirman la capacidad intrínseca de los sinaptosomas para recaptar glutamato, aunque por sí mismos no excluyen la posibilidad de que exista un cierto grado de contaminación glial en la preparación de sinaptosomas.

MODULACIÓN DE LA LIBERACIÓN DE GLUTAMATO POR RECEPTORES METABOTRÓPICOS DEL GRUPO III EN CORTEZA CEREBRAL DE RATAS ADULTAS

Identidad del receptor

El perfil farmacológico de la respuesta a L-AP4 en los ensayos de liberación (Figura IV. 1), junto con los datos obtenidos en los experimentos de inmunocitoquímica (Figura IV. 14), sugieren que el receptor metabotrópico responsable de las acciones de L-AP4 en terminales de ratas adultas (2-3 meses) es un receptor del tipo 7. Este resultado está de acuerdo con trabajos previos que muestran un alto nivel de expresión en corteza cerebral tanto del ARNm de mGluR7 (Ohishi y cols., 1995; Kinzie y cols., 1995) como de su proteína (Kinoshita y cols., 1998), y con otros trabajos que muestran una expresión más restringida de los receptores de los tipos mGluR4 (Ohishi y cols.,

1995; Corti y cols., 2002) y mGluR8 (Saugstad y cols., 1997) en esta región cerebral. Las altas concentraciones de L-AP4 requeridas para inhibir la liberación de glutamato (0,1-1 mM) (Figura IV. 1.) están de acuerdo con la baja afinidad de mGluR7 por L-AP4 observada en sistemas heterólogos (Okamoto y cols., 1994; Saugstad y cols., 1994; Conn y Pin, 1997; Schoepp y cols., 1999; Cartmell y Schoepp, 2000). Por otro lado, el hecho de que concentraciones más bajas de L-AP4 no tengan efecto alguno, ni sobre la liberación de glutamato (Figura IV. 1.), ni sobre el incremento en la concentración citosólica de Ca^{2+} inducido por la despolarización (Figura IV. 13.), confirma la ausencia de acciones mediadas por receptores de alta afinidad por L-AP4 en la preparación de corteza cerebral de ratas adultas.

Los estudios de imagen de Ca^{2+} muestran que L-AP4 (1 mM) reduce drásticamente la entrada de Ca^{2+} inducida por la despolarización en una subpoblación de terminales (28,4 %) (Figura IV. 12) similar a la que se marca con anticuerpos frente a mGluR7 en los ensayos de inmunocitoquímica (29,1 %) (Figura IV. 14.). Esto sugiere, por un lado, que la mayoría de los terminales que expresan mGluR7 son funcionales en nuestra preparación y, por otro lado, que mGluR7 reduce la respuesta de Ca^{2+} en la mayoría de estos terminales. Aunque los experimentos de imagen de Ca^{2+} no nos permiten discriminar si las respuestas a L-AP4 se localizan exclusivamente en terminales glutamatérgicos, el hecho de que L-AP4 reduzca la liberación de glutamato inducida por KCl en un 25,5 % (Figura IV. 1.) sugiere que la mayoría de los terminales que expresan mGluR7 son glutamatérgicos, si bien no se puede descartar la presencia de estos receptores en terminales GABAérgicos, tal y como ha sido descrito recientemente (Dalezios y cols., 2002).

Mecanismo de acción

La reducción de la liberación de glutamato producida por L-AP4 parece debida a una inhibición de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje, como lo sugiere el hecho de que el agonista reduzca el incremento en la concentración citosólica de Ca^{2+} inducido por la despolarización tanto en ensayos en los que se mide la respuesta en el conjunto de la población de sinaptosomas (Figura IV. 3.) como en terminales individuales (Figura IV. 12.). Ahora bien, la aditividad observada entre la inhibición de la liberación

producida por el bloqueante de canales de Ca^{2+} del tipo P/Q, ω -agatoxina-IVA, y la producida por L-AP4, junto con la falta de aditividad entre la acción de L-AP4 y la del bloqueante de canales de Ca^{2+} del tipo N, ω -conotoxina-GVIA (Figura IV. 3.), sugieren una inhibición preferente de los canales de Ca^{2+} del tipo N por parte del receptor. Este dato es confirmado por los experimentos de imagen, que muestran que el 95,4 % de los terminales que responden a L-AP4 responden también a ω -conotoxina-GVIA, mientras que sólo un 4,6 % lo hace a ω -agatoxina-IVA (Figura IV. 17.). La escasa colocalización entre el receptor y los canales de Ca^{2+} del tipo P/Q en los terminales explicaría, por sí sola, la ausencia de acciones moduladoras de estos receptores sobre los canales del tipo P/Q en ratas adultas.

La inhibición de la liberación de glutamato producida por L-AP4 es revertida tras la incubación con toxina pertúsica (PTX) (Figura IV. 1.), lo que indica la participación de una proteína G de tipo Gi/Go. Esta inhibición tiene lugar además en ausencia de cambios detectables en los niveles intracelulares de AMPc (Figura IV. 2.), y es insensible a los inhibidores de proteína quinasa A y proteína quinasa C (Figura IV. 1.), lo que sugiere que no depende de la formación de segundos mensajeros difusibles ni de fosforilaciones mediadas por estas kinasas. Los antagonistas de calmodulina sí revierten, por el contrario, la inhibición de la liberación producida por L-AP4, probablemente porque favorecen el secuestro de las subunidades $\beta\gamma$ de la proteína G por el receptor (O'Connor y cols., 1999; El Far y cols., 2001; Dev y cols., 2001; Sorensen y cols., 2002), impidiendo sus acciones sobre el canal de Ca^{2+} . Globalmente estos resultados sugieren que la modulación de los canales de Ca^{2+} del tipo N por mGluR7 se debe a una interacción directa entre las subunidades $\beta\gamma$ de la proteína G y el canal de Ca^{2+} , efecto que tendría lugar a través de un mecanismo delimitado de membrana, sin mediación de segundos mensajeros que activen a las proteínas quinasas A ó C.

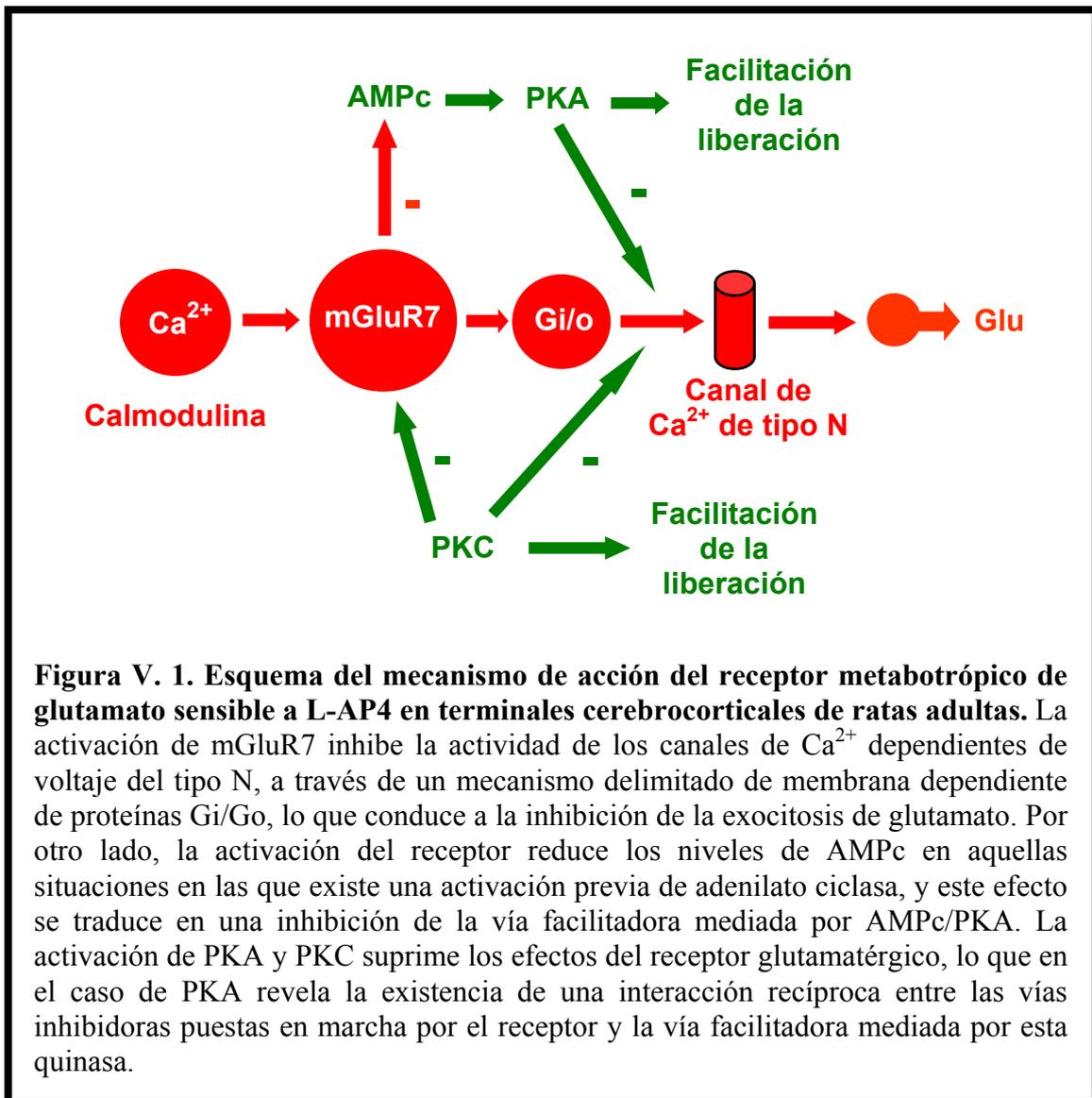
Repercusión funcional del acoplamiento negativo de los receptores metabotrópicos del grupo III a la vía de señalización de adenilato ciclasa/AMPc

Aunque los receptores metabotrópicos del grupo III están acoplados negativamente a adenilato ciclasa (Tanabe y cols., 1993; Okamoto y cols., 1994; Saugstad y cols., 1994; Duvoisin y cols., 1995; Wu y cols., 1998a), la relevancia

fisiológica de esta vía de señalización en terminales sinápticos es desconocida. En esta Tesis Doctoral hemos mostrado que la activación de mGluR7 reduce los niveles de AMPc sólo cuando existe una activación previa de la vía de adenilato ciclasa/AMPc/PKA (Figura IV. 8.), y que esta acción reduce la facilitación de la liberación de glutamato inducida por un incremento de AMPc (Figura IV. 9.).

El hecho de que L-AP4 reduzca significativamente la liberación inducida por forskolina, pero no la inducida por el análogo de AMPc Sp-8-Br-cAMPS (Figura IV. 9.), que activa directamente proteína quinasa A por un mecanismo independiente de adenilato ciclasa, indica que la inhibición de la liberación es consecuencia directa de la reducción de la actividad de adenilato ciclasa por el receptor. La activación de receptores β -adrenérgicos con isoproterenol mimetiza la acción de forskolina, provocando un incremento en los niveles intracelulares de AMPc y una liberación espontánea de glutamato, que también son revertidos por L-AP4 (Figura IV. 10.). Estos resultados revelan la existencia de una interacción funcional entre receptores β -adrenérgicos y receptores metabotrópicos del grupo III, que podrían modular la transmisión sináptica glutamatérgica en base a los niveles de AMPc y a la activación de la proteína quinasa A resultantes de esta interacción.

A pesar de que el efecto del receptor glutamatérgico sobre los canales de Ca^{2+} no depende de la activación de la proteína quinasa A ni de la proteína quinasa C, la activación de esta última previene no sólo la inhibición de la liberación de glutamato (Figura IV. 7.) y la reducción de la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ (Figura IV. 3.) inducidos por L-AP4, sino también la reducción de los niveles de AMPc (Figura IV. 8.), lo que sugiere una acción directa de la quinasa sobre el receptor. Esto estaría de acuerdo con la existencia de sitios de fosforilación para PKC en mGluR7 (Nakajima y cols., 1999; Dev y cols., 2000; Airas y cols., 2001), y con la subsiguiente supresión del acoplamiento entre el receptor y la proteína G tras la fosforilación del receptor (Macek y cols., 1998, 1999). A pesar de esto, no es descartable que parte de la acción de la quinasa sea debida a la fosforilación del canal de Ca^{2+} , y a la consiguiente supresión de la acción inhibidora de las subunidades $\beta\gamma$ sobre el canal (Zamponi y cols., 1997; Hamid y cols., 1999).



MODULACIÓN DE LA LIBERACIÓN DE GLUTAMATO POR RECEPTORES METABOTRÓPICOS DEL GRUPO III EN CORTEZA CEREBRAL DE RATAS JÓVENES

Identidad del receptor

El hecho de que la inhibición de la liberación inducida por L-AP4 en ratas jóvenes (21 días) siga una curva dosis-respuesta de tipo bifásico con valores de EC₅₀ de 1,4 y 371,1 μM, respectivamente, (Figura IV. 18.) revela la presencia de al menos

dos tipos de receptores sensibles a L-AP4 con diferente afinidad por el agonista. Los experimentos de inmunocitoquímica confirman esta hipótesis, al mostrar un amplio marcaje tanto para mGluR7 como para mGluR4, aunque no para mGluR8 (Figura IV. 19.), sugiriendo, por tanto, que mGluR7 es el receptor responsable de los efectos observados con altas concentraciones de L-AP4, mientras que mGluR4 media las acciones observadas con bajas concentraciones del agonista.

Los datos obtenidos en los estudios de imagen de Ca^{2+} son bastante similares a los observados en los ensayos inmunocitoquímicos. Así, la aplicación de 1 mM de L-AP4 redujo las respuestas de Ca^{2+} en un 30,3 % de los terminales (Figura IV. 24.), mientras que mGluR7 se detectó en un 29,5 % de las partículas positivas para sinaptofisina (Figura IV. 19.). Por su parte, 20 μ M de L-AP4 inhibió las respuestas de Ca^{2+} en un 24,4 % de los terminales (Figura IV. 24.), mientras que mGluR4 se detectó en un 25,2 % de las partículas en los experimentos de inmunocitoquímica (Figura IV. 19.). Dado que la inhibición de la liberación de glutamato atribuible a mGluR7 y a mGluR4 en los estudios de población fue de un 24,1 % y de un 22,2 % respectivamente (Figura IV., 18.), parece que tanto mGluR7 como mGluR4 se expresan predominantemente en terminales glutamatérgicos, aunque su presencia en terminales GABAérgicos no puede ser descartada (Semyanov y Kullman, 2000; Corti y cols., 2002).

La presencia de mGluR4 en corteza cerebral de ratas jóvenes y su ausencia en ratas adultas indica una caída en la expresión de estos receptores con el desarrollo. En este sentido, existen datos que sugieren un cambio de este tipo en otras áreas cerebrales, como en la región CA1 de hipocampo, donde concentraciones de L-AP4 del orden de 25-100 μ M inhiben la transmisión sináptica en ratas jóvenes (9-14 días) pero no en ratas adultas (Baskys y Malenka, 1991; Ross y cols., 2000), mientras que altas concentraciones de L-AP4 sí deprimen, sin embargo, la transmisión sináptica en estas sinapsis (Gereau y cols., 1995; Macek y cols., 1996).

Mecanismo de acción

Al igual que sucede en ratas adultas, en ratas jóvenes L-AP4 redujo el incremento en la concentración citosólica de Ca^{2+} inducido por la despolarización tanto

en la población de sinaptosomas (Figura IV. 21.) como en experimentos de imagen de Ca^{2+} de terminales individuales (Figura IV. 24.). La aditividad observada entre la inhibición de la liberación producida por el bloqueante de canales de Ca^{2+} del tipo P/Q, ω -agatoxina-IVA, y la producida por L-AP4 (Figura IV. 21.) sugiere que la inhibición de la liberación es debida a una inhibición preferente de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje del tipo N. Ahora bien, el hecho de que en aquellos terminales en los que hay respuesta a los dos bloqueantes de canales de Ca^{2+} , L-AP4 reduzca las respuestas de Ca^{2+} más allá de lo que lo hacen las toxinas por separado, sugiere que la activación del receptor metabotrópico reduce la actividad de ambos tipos de canales, y, por tanto, hace necesaria una explicación al hecho de que L-AP4 sólo module el componente de liberación acoplado a los canales del tipo N.

La aparente modulación selectiva de los receptores del grupo III sobre los canales del tipo N observada en los estudios de liberación podría ser debida a diferencias en el grado de acoplamiento de los distintos canales a la exocitosis. Así, un mejor acoplamiento de los canales del tipo P/Q a la exocitosis podría estar enmascarando las acciones inhibitorias del receptor sobre el componente de liberación asociado a este tipo de canal, de manera que, a pesar de la reducción en la entrada de Ca^{2+} , ésta sería todavía suficiente para inducir la liberación de toda la población de vesículas.

Dado que la exocitosis es desencadenada por un incremento de la concentración de Ca^{2+} en la zona activa, una disminución en la concentración extracelular de Ca^{2+} , $[\text{Ca}^{2+}]_o$, debe reducir, teóricamente, la corriente entrante y favorecer la detección de cualquier diferencia en el acoplamiento de los canales a la exocitosis de neurotransmisor, como se muestra en los ensayos de liberación, en los que la reducción de la $[\text{Ca}^{2+}]_o$ suprimió la contribución de los canales del tipo N a la liberación de glutamato, de manera que a una $[\text{Ca}^{2+}]_o$ de 0,5 mM toda la liberación fue dependiente de la actividad de los canales del tipo P/Q. Estos resultados sugieren que los canales de calcio del tipo P/Q están acoplados de manera más eficaz a la liberación de glutamato que los canales del tipo N.

Si el alto grado de acoplamiento de los canales del tipo P/Q a la liberación de glutamato enmascara las acciones del receptor sobre este tipo de canales, la reducción de la concentración extracelular de calcio debería favorecer la detección de dicha modulación. De hecho, la aplicación de L-AP4 redujo la liberación de glutamato y el

incremento en la concentración intracelular de calcio inducidos por la despolarización a concentraciones extracelulares de Ca^{2+} a las cuales toda la liberación es atribuible a la actividad de canales del tipo P/Q (Figura IV. 23.). La aplicación del bloqueante de canales de sodio dependientes de voltaje tetrodotoxina (TTx) suprimió completamente la liberación inducida por 4-aminopiridina a estas concentraciones (Figura IV. 23.), lo que indica, por un lado, que la liberación espontánea es poco significativa en nuestra preparación, y por otro, que la inhibición de la liberación producida por los receptores del grupo III a bajas concentraciones de Ca^{2+} extracelular no se debe a una acción del receptor sobre la maquinaria exocitótica, sino que está relacionada exclusivamente con una modulación de canales de Ca^{2+} del tipo P/Q.

En resumen, estos resultados indican que, en ratas jóvenes, los receptores metabotrópicos de glutamato del grupo III también modulan el componente de liberación asociado a los canales de Ca^{2+} del tipo P/Q, y que esta modulación se ve enmascarada, a altas concentraciones de Ca^{2+} , extracelular por el mejor acoplamiento de este tipo de canales a la exocitosis de glutamato.

El diferente acoplamiento de los canales de Ca^{2+} de los tipos N y P/Q a la liberación de neurotransmisor ha sido descrito recientemente en otras preparaciones, como en la unión neuromuscular, donde la disminución de la concentración extracelular de Ca^{2+} suprimió la contribución de los canales de Ca^{2+} del tipo N a la transmisión sináptica (Rosato-Siri y cols., 2002). Este distinto acoplamiento de los canales a la liberación de glutamato podría ser debido a la influencia de numerosos factores como diferencias en la densidad de ambos tipos de canales en el terminal o a una diferente localización subcelular relativa a los sitios de liberación. En este sentido, estudios inmunocitoquímicos realizados en el cuerpo trapezoide de la rata han mostrado una localización preferencial de los canales del tipo P/Q en las zonas activas de liberación, mientras que los canales del tipo N se localizan preferentemente distales a los sitios de liberación (Wu y cols., 1999). Estas diferencias se reflejan en un mayor control de la liberación de glutamato por los canales de Ca^{2+} del tipo P/Q en estas sinapsis (Wu y cols., 1999).

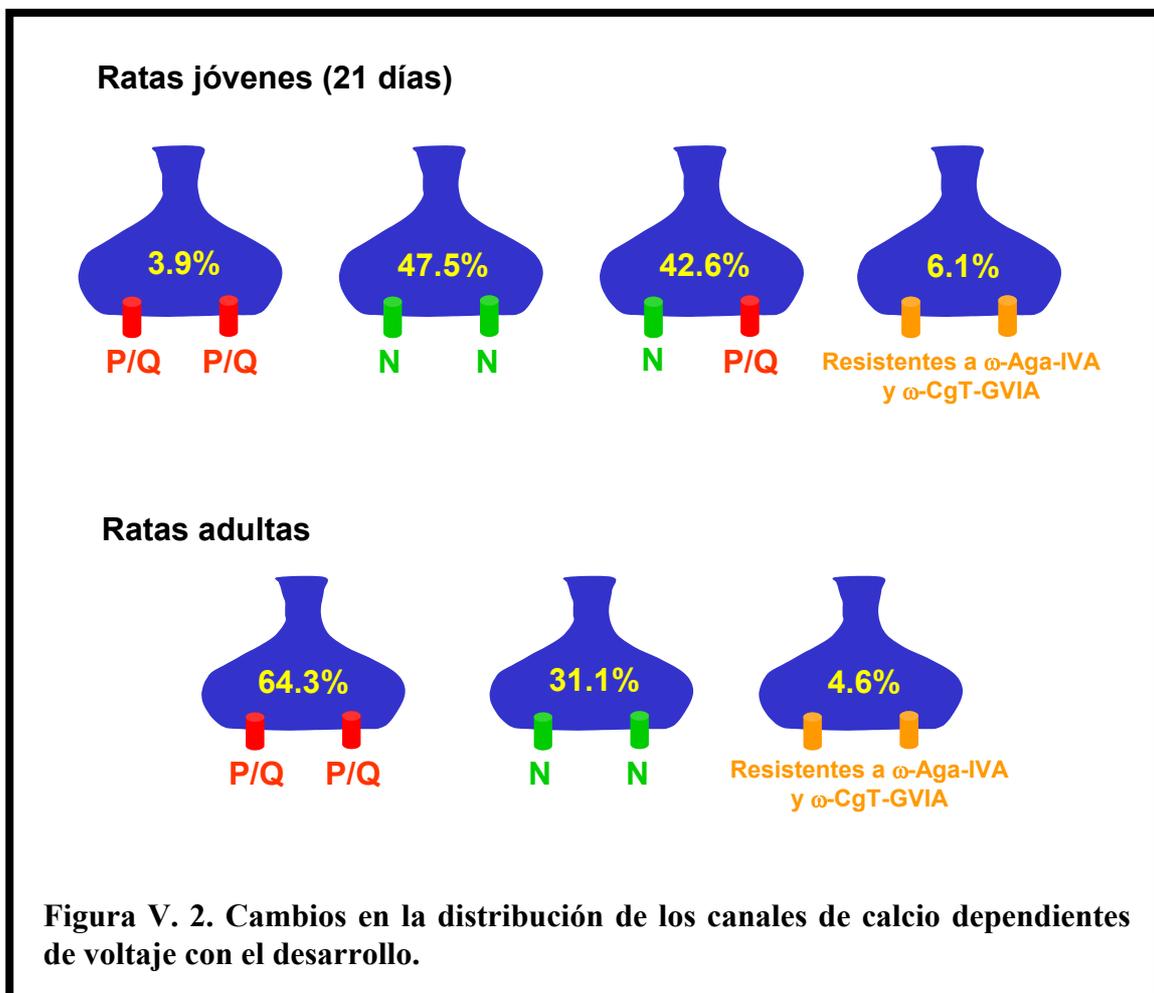
CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN DE LOS CANALES DE CALCIO DEPENDIENTES DE VOLTAJE CON EL DESARROLLO

La existencia de una distribución heterogénea de los canales de Ca^{2+} en los terminales sinápticos ha sido sugerida por varios estudios basados en el análisis de la aditividad de los efectos de los diferentes bloqueantes de canales de Ca^{2+} sobre la transmisión sináptica (Mintz y cols., 1995; Wheeler y cols., 1996; Reid y cols., 1997; Qian y Noebels, 2001), pero la cuantificación directa de esta heterogeneidad se ha visto limitada por el hecho de que los registros electrofisiológicos muestran un promedio de las respuestas de múltiples sinapsis y no permiten, salvo excepciones, el análisis de la respuesta de terminales individuales. En esta Tesis Doctoral hemos utilizado la técnica de imagen de Ca^{2+} para estudiar la distribución de los canales de Ca^{2+} de los tipos N y P/Q en los terminales sinápticos individuales, midiendo directamente el efecto de los bloqueantes de canales sobre las señales de Ca^{2+} inducidas por la despolarización en sinaptosomas individuales.

Mediante esta técnica hemos descrito una serie de cambios en la distribución de los canales de Ca^{2+} en los terminales sinápticos con el desarrollo. Esta redistribución implica la pérdida de la coexistencia de canales de los tipos N y P/Q en el mismo terminal, y una marcada disminución en la expresión de los canales del tipo N. Así, en corteza cerebral de ratas adultas hemos observado la existencia de sólo dos poblaciones mayoritarias de terminales, en relación con el tipo de canales de Ca^{2+} que expresan, una que contiene canales de Ca^{2+} del tipo P/Q (64,3 %) y otra que contiene canales de Ca^{2+} del tipo N (31,1 %) (Figura IV. 16). Estos resultados de imagen de Ca^{2+} muestran cierto paralelismo con los datos obtenidos en los ensayos de liberación, donde los canales del tipo P/Q controlan el 72,7 % de la liberación, mientras que los canales del tipo N controlan el 29,9 % (Figura IV. 3.), lo que sugiere que, en terminales cerebrocorticales de ratas adultas, la mayoría de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje están acoplados a la liberación de glutamato.

En ratas jóvenes los experimentos de imagen de Ca^{2+} muestran una distribución de canales diferente, existiendo dos poblaciones mayoritarias: una que sólo contiene canales de Ca^{2+} del tipo N (47,5 %) y otra que contiene una combinación de canales de los tipos N y P/Q (42,6 %) (Figura IV. 25.). Además, el 3,9 % de los terminales presentan canales del tipo P/Q, mientras que un 6,1 % son insensibles a los efectos de

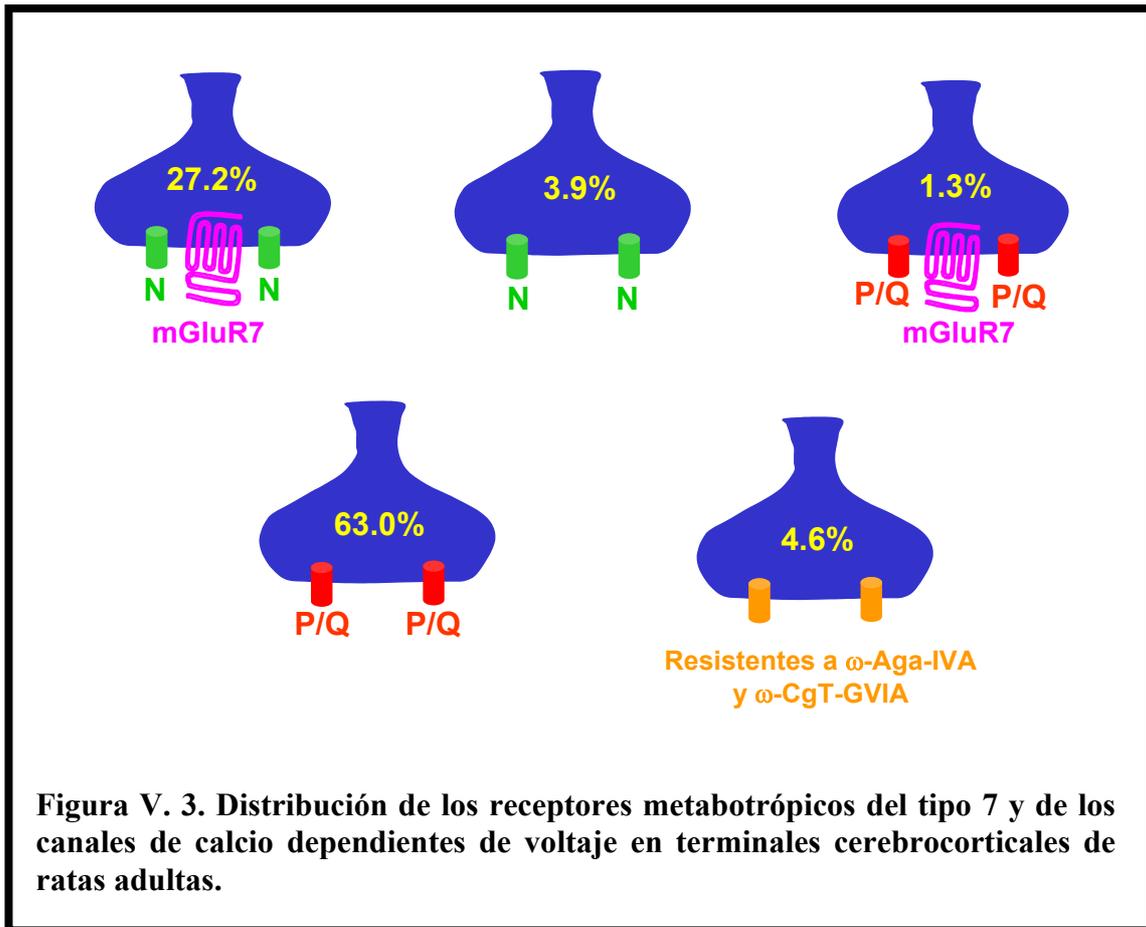
los bloqueantes de ambos canales (Figura IV. 25.). Dado que en los ensayos de liberación los canales del tipo P/Q controlan un 62,1 % de la liberación, mientras que los canales del tipo N controlan sólo un 33,6 % (Figura IV. 21.) parece, por tanto, que existe una falta de paralelismo entre la contribución de los canales a la entrada de Ca^{2+} en los terminales y a la liberación de glutamato en la preparación de ratas jóvenes, de manera que el papel predominante de los canales del tipo N en el control de la entrada de Ca^{2+} no se refleja en un mayor control sobre la liberación, y sugiere que muchos de los canales del tipo N no estarían acoplados a la liberación de glutamato. Este hecho podría reflejar la existencia de otras funciones para los canales del tipo N distintas a la exocitosis en edades postnatales (Vigers y cols., 1991; Komuro y Rakic, 1992; Toescu, 1999).



Aunque la contribución de los canales de Ca^{2+} a la entrada de Ca^{2+} en los terminales sinápticos cambia con el desarrollo, la contribución relativa de los canales N y P/Q a la liberación de glutamato no se modifica significativamente. La ausencia de cambios con el desarrollo en la contribución relativa de ambos tipos de canales de Ca^{2+} a la transmisión sináptica ha sido descrita previamente en algunos estudios electrofisiológicos de la corteza cerebral (Iwasaki y cols., 2000). Estos cambios en la contribución de los canales de Ca^{2+} a la transmisión sináptica sí han sido observados, sin embargo, en algunas sinapsis de otras localizaciones como tronco cerebral (Iwasaki y cols., 2000), hipocampo (Scholz y Miller, 1995), tálamo (Iwasaki y cols., 2000), cerebelo (Iwasaki y cols., 2000) y unión neuromuscular (Rosato-Siri y Uchitel, 1999) en las que se observa una reducción significativa de la contribución de los canales del tipo N a la transmisión sináptica a partir de la segunda semana de desarrollo postnatal.

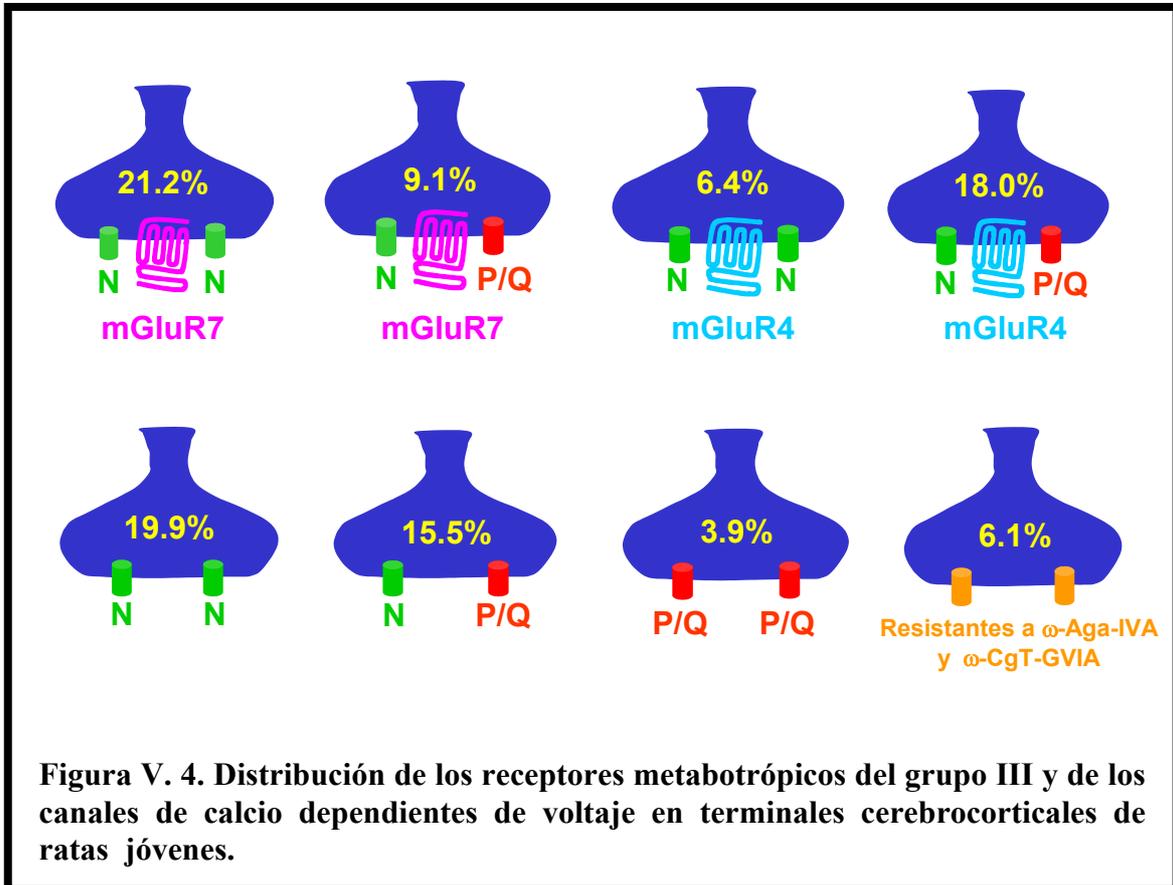
COLOCALIZACIÓN ESPECÍFICA DE LOS RECEPTORES METABOTRÓPICOS DEL GRUPO III Y DE LOS CANALES DE CALCIO DEPENDIENTES DE VOLTAJE EN TERMINALES SINÁPTICOS

En ratas adultas, las respuestas mediadas por mGluR7 se localizan casi exclusivamente (95,4 %) en terminales que expresan canales de Ca^{2+} del tipo N (Figura IV. 17.). Además, más del 85 % de los terminales que presentan canales del tipo N expresan mGluR7. Es probable, por tanto, que la expresión de ambas proteínas esté coordinada o tengan un mecanismo común de ensamblaje a la membrana presináptica. En este sentido, se ha descrito que tanto mGluR7 como los canales de Ca^{2+} del tipo N interaccionan, a través de sus extremos C-terminales, con proteínas con dominios PDZ, y que esta interacción está relacionada con el anclaje de ambas proteínas a la membrana presináptica. Así, se ha observado que la interacción entre mGluR7 y la proteína PICK1 es fundamental para la función del receptor y para su agrupamiento en la zona activa del terminal (Boudin y cols., 2000; Dev y cols., 2000; Perroy y cols., 2002). El agrupamiento de los canales del tipo N en el terminal también depende de interacciones con los dominios PDZ y SH3 de algunas proteínas presinápticas como Mint1 y CASK, respectivamente (Maximov y cols., 1999; Maximov y Bezprozvanny, 2002).



En ratas jóvenes, mGluR7 se localiza mayoritariamente (69,9 %) en terminales que expresan canales del tipo N (Figura IV. 27.), mientras que mGluR4 lo hace principalmente (73,7 %) en terminales que presentan coexistencia de canales de los tipos N y P/Q (Figura IV. 28.). La localización preferencial de los receptores glutamatérgicos en terminales con una determinada distribución de canales puede estar influenciada, al menos en parte, por la distinta afinidad que mGluR7 y mGluR4 presentan por glutamato (Conn y Pin, 1997; Schoepp y cols., 1999; Cartmell y Schoepp, 2000). Así, la baja afinidad de mGluR7 por glutamato puede limitar su activación a aquellas situaciones en las que se produzca un acúmulo de glutamato en la hendidura sináptica como ocurre tras un tren de potenciales de acción. En el caso de mGluR4, podría suceder que este receptor no se encuentre activado en condiciones basales, en cuyo caso el glutamato liberado tras un potencial de acción será suficiente para deprimir la liberación inducida por un segundo potencial de acción. Otra posibilidad es que los mGluR4 estén activados a las concentraciones basales de glutamato presentes en la hendidura sináptica, manteniendo una inhibición tónica sobre los canales de Ca^{2+} . Si

esto es así, la llegada de potenciales de acción repetitivos revertiría la inhibición de los canales de Ca^{2+} , con la consiguiente facilitación de la liberación de glutamato.



Globalmente, los resultados obtenidos muestran un cierto grado de heterogeneidad entre los terminales que contienen receptores metabotrópicos del grupo III en ratas jóvenes, heterogeneidad que se pierde en buena parte en el estado adulto. La significación funcional de esta heterogeneidad es desconocida, así como los mecanismos implicados en el agrupamiento específico de estos receptores con determinados subtipos de canales de Ca^{2+} , que podría depender de determinantes moleculares relacionados con el tráfico y la distribución subcelular de los receptores del grupo III.

VI. CONCLUSIONES

1.- En corteza cerebral de ratas adultas, la activación de receptores metabotrópicos de glutamato del tipo 7 inhibe la liberación de glutamato por un mecanismo que depende de la reducción de la entrada de Ca^{2+} en el terminal sináptico. Este efecto es ejercido a través de una acción directa sobre canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje del tipo N, sin la mediación de segundos mensajeros que activen a las proteínas quinasas A ó C.

2.- La activación de los receptores metabotrópicos de glutamato del grupo III reduce los niveles intracelulares de AMPc en aquellas situaciones en las que existe una activación previa de la adenilato ciclasa, como ocurre tras la activación de los receptores β -adrenérgicos. Este efecto se traduce en la supresión de la liberación espontánea de glutamato inducida por los receptores β -adrenérgicos, confiriendo una significación funcional a la reducción en los niveles de AMPc producida por el receptor metabotrópico de glutamato.

3.- La expresión de los receptores metabotrópicos del grupo III se encuentra restringida a una subpoblación de terminales sinápticos cerebrocorticales, donde su activación reduce drásticamente la entrada de Ca^{2+} .

4.- A diferencia de lo que sucede en ratas adultas, en terminales cerebrocorticales de ratas jóvenes (21 días) se expresan dos tipos de receptores metabotrópicos del grupo III, uno de baja afinidad por L-AP4, mGluR7, y otro de alta afinidad, posiblemente un mGluR4.

5.- La expresión de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje de los tipos P/Q y N varía con el desarrollo, observándose una disminución en las respuestas de Ca^{2+} mediadas por este último en ratas adultas, así como una pérdida de la coexistencia en un mismo terminal de ambos tipos de canales. Por otro lado, los canales de Ca^{2+} del tipo P/Q presentan un mejor acoplamiento a la excitación de glutamato que los canales del tipo N, tanto en ratas jóvenes como en adultas.

6.- En corteza cerebral de ratas adultas los receptores metabotrópicos del tipo 7 se expresan casi exclusivamente en terminales que expresan canales de Ca^{2+} del tipo N. Los terminales cerebrocorticales de ratas jóvenes presentan una mayor heterogeneidad, si bien los receptores del tipo 7 se expresan mayoritariamente en terminales que contienen canales de Ca^{2+} del tipo N, mientras que los del tipo 4 lo hacen mayoritariamente en terminales que presentan coexistencia de canales de los tipos N y P/Q.

7.- La coactivación de las proteínas quinasas A y C induce una potenciación sinérgica de la liberación de glutamato a través de mecanismos dependientes e independientes de la génesis de potenciales de acción, sugiriendo la existencia de una interacción funcional entre ambas vías de transducción de señales a nivel presináptico.

VII. BIBLIOGRAFÍA

Abe T., Sugihara H., Nawa H., Shigemoto R., Mizuno N. y Nakanishi S. (1992). Molecular characterization of a novel metabotropic glutamate receptor mGluR5 coupled to inositol phosphate/Ca²⁺ signal transduction. *J. Biol. Chem.* **267**, 13361-13368.

Acher F.C., Tellier F.J., Azerad R., Brabet I.N., Fagni L. y Pin J.P. (1997). Synthesis and pharmacological characterization of aminocyclopentanetricarboxylic acids: new tools to discriminate between metabotropic glutamate receptor subtypes. *J. Med. Chem.* **40**, 3119-3129.

Ahlijanian M.K., Striessnig J. y Catterall W.A. (1991). Phosphorylation of an alpha 1-like subunit of an omega-conotoxin-sensitive brain calcium channel by cAMP-dependent protein kinase and protein kinase C. *J. Biol. Chem.* **266**, 20192-20197.

Aiba A., Kano M., Chen C., Stanton M.E., Fox G.D., Herrup K., Zwingman T.A. y Tonegawa S. (1994). Deficient cerebellar long-term depression and impaired motor learning in mGluR1 mutant mice. *Cell* **79**, 377-388.

Airas J.M., Betz H. y El Far O. (2001). PKC phosphorylation of a conserved serine residue in the C-terminus of group III metabotropic glutamate receptors inhibits calmodulin binding. *FEBS Lett.* **494**, 60-63.

Akazawa C., Ohishi H., Nakajima Y., Okamoto N., Shigemoto R., Nakanishi S. y Mizuno N. (1994). Expression of mRNAs of L-AP4-sensitive metabotropic glutamate receptors (mGluR4, mGluR6, mGluR7) in the rat retina. *Neurosci. Lett.* **171**, 52-54.

Akopian A.N., Sivilotti L. y Wood J.N. (1996). A tetrodotoxin-resistant voltage-gated sodium channel expressed by sensory neurons. *Nature* **379**, 257-262.

Allen J.W., Vicini S. y Faden A.I. (2001). Exacerbation of neuronal cell death by activation of group I metabotropic glutamate receptors: role of NMDA receptors and arachidonic acid release. *Exp. Neurol.* **169**, 449-460.

Anderson A.E., Adams J.P., Qian Y., Cook R.G., Pfaffinger P.J. y Sweatt J.D. (2000). Kv4.2 phosphorylation by cyclic AMP-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* **275**, 5337-5346.

Ango F., Robbe D., Tu J.C., Xiao B., Worley P.F., Pin J.P., Bockaert J. y Fagni L. (2002). Homer-dependent cell surface expression of metabotropic glutamate receptor type 5 in neurons. *Mol. Cell Neurosci.* **20**, 323-329.

Annoura H., Fukunaga A., Uesugi M., Tatsuoka T. y Horikawa Y. (1996). A novel class of antagonists for metabotropic glutamate receptors, 7-(hydroxyimino)-cyclopropa[b]chromen-1a-carboxylates. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **6**, 763-766.

Awad-Granko H. y Conn P.J. (2001). Activation of groups I or III metabotropic glutamate receptors inhibits excitatory transmission in the rat subthalamic nucleus. *Neuropharmacol.* **41**, 32-41.

- Baker S.R., Clark B., Harris J., Griffy K., Kingston A. y Tizziano J. (1998). LY393675, an α -substituted-cyclobutylglycine, is a potent group I metabotropic glutamate receptor antagonist. *Soc. Neurosci. Abstr.* **24**, 576.
- Balschun D. y Wetzel W. (1998). Inhibition of group I metabotropic glutamate receptors blocks spatial learning in rats. *Neurosci. Lett.* **249**, 41-44.
- Balschun D. y Wetzel W. (2002). Inhibition of mGluR5 blocks hippocampal LTP in vivo and spatial learning in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **73**, 375-380.
- Barrett C.F. y Rittenhouse A.R. (2000). Modulation of N-type calcium channel activity by G-proteins and protein kinase C. *J. Gen. Physiol.* **115**, 277-286.
- Barrie A.P., Nicholls D.G., Sánchez-Prieto J. y Sihra T.S. (1991). An ion channel locus for the protein kinase C potentiation of transmitter glutamate release from guinea pig cerebrocortical synaptosomes. *J. Neurochem.* **57**, 1398-1404.
- Barrie A.P. y Nicholls D.G. (1993). Adenosine A1 receptor inhibition of glutamate exocytosis and protein kinase C-mediated decoupling. *J. Neurochem.* **60**, 1081-1086.
- Baskys A. y Malenka R.C. (1991). Agonists at metabotropic glutamate receptors presynaptically inhibit EPSCs in neonatal rat hippocampus. *J. Physiol.* **444**, 687-701.
- Baude A., Nusser Z., Roberts J.D., Mulvihill E., McIlhinney R.A y Somogyi P. (1993). The metabotropic glutamate receptor mGluR1 α is concentrated at perisynaptic membrane of neuronal subpopulations as detected by immunogold reaction. *Neuron* **11**, 771-787.
- Beaumont V. y Zucker R.S. (2000). Enhancement of synaptic transmission by cyclic AMP modulation of presynaptic Ih channels. *Nat. Neurosci.* **3**, 133-141.
- Benítez R., Fernandez-Capetillo O., Lazaro E., Mateos J.M., Osorio A., Elezgarai I., Bilbao A., Lingenhoehl K., Van Der Putten H., Hampson D.R., Kuhn R., Knopfel T., Grandes P. (2000). Immunocytochemical localization of the metabotropic glutamate receptor mGluR4a in the piriform cortex of the rat. *J. Comp. Neurol.* **417**, 263-274.
- Bergsman J.B. y Tsien R.W. (2000). Syntaxin modulation of calcium channels in cortical synaptosomes as revealed by botulinum toxin C1. *J. Neurosci.* **20**, 4368-4378.
- Berthele A., Platzer S., Laurie D.J., Weis S., Sommer B., Zieglgansberger W., Conrad B. y Tolle T.R. Expression of metabotropic glutamate receptor subtype mRNA (mGluR1-8) in human cerebellum. *Neuroreport* **10**, 3861-3867.
- Betz A., Ashery U., Rickmann M., Augustin I., Neher E., Sudhof T.C., Rettig J. y Brose N. (1998). Munc13-1 is a presynaptic phorbol ester receptor that enhances neurotransmitter release. *Neuron* **21**, 123-136.
- Bezprozvanny I., Scheller R.H. y Tsien R.W. (1995). Functional impact of syntaxin on gating of N-type and Q-type calcium channels. *Nature* **378**, 623-626.

Bezprozvanny I., Zhong P., Scheller R.H. y Tsien R.W. (2000). Molecular determinants of the functional interaction between syntaxin and N-type Ca^{2+} channel gating. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**, 13943-13948.

Black J.A., Cummins T.R., Yoshimura N., de Groat W.C. y Waxman S.G. (2003). Tetrodotoxin-resistant sodium channels Na(v)1.8/SNS and Na(v)1.9/NaN in afferent neurons innervating urinary bladder in control and spinal cord injured rats. *Brain Res.* **963**, 132-138.

Blaustein M.P., Barstschat D.K., Benishin C.G., Brown W.E., Colby K.A., Krueger B.K., Schneider M.J. y Sorensen R.C. (1988). Potassium channels in rat brain synaptosomes. *Pharmacology and Toxicology. Cellular and molecular basis of synaptic transmission*. Nato ASI Series, H21, 241-260.

Bockaert J. Y Pin J.P. (1999). Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *EMBO J.* **18**, 1723-1729.

Boland L.M. y Jackson K.A. (1999). Protein kinase C inhibits Kv1.1 potassium channel function. *Am. J. Physiol.* **277**, 100-110.

Boudin H., Doan A., Xia J., Shigemoto R., Huganir R.L., Worley P. y Craig A.M. (2000). Presynaptic clustering of mGluR7a requires the PICK1 PDZ domain binding site. *Neuron* **28**, 485-497.

Boudin H. y Craig A.M. (2001). Molecular determinants for PICK1 synaptic aggregation and mGluR7a receptor coclustering: role of the PDZ, coiled-coil, and acidic domains. *J. Biol. Chem.* **276**, 30270-30276.

Bradley S.R., Levey A.I., Hersch S.M. y Conn P.J. (1996). Immunocytochemical localization of group III metabotropic glutamate receptors in the hippocampus with subtype-specific antibodies. *J. Neurosci.* **16**, 2044-2056.

Bradley S.R., Standaert D.G., Rhodes K.J., Rees H.D., Testa C.M., Levey A.I. y Conn P.J. (1999). Immunohistochemical localization of subtype 4a metabotropic glutamate receptors in the rat and mouse basal ganglia. *J. Comp. Neurol.* **407**, 33-46.

Brakeman P., Lanahan A., O'Brien R., Roche K., Barnes C., Huganir R. Y Worley P. (1997). Homer: a protein that selectively binds metabotropic glutamate receptors. *Nature* **386**, 284-288.

Bramham C.R., Alkon D.L. y Lester D.S. (1994). Arachidonic acid and diacylglycerol act synergistically through protein kinase C to persistently enhance synaptic transmission in the hippocampus. *Neuroscience* **60**, 737-743.

Brown E.M., Gamba G., Riccardi D., Lombardi M., Butters R., Kifor O., Sun A., Hediger M.A., Lytton J. y Hebert S.C. (1993). Cloning and characterization of an extracellular Ca^{2+} -sensing receptor from bovine parathyroid. *Nature* **366**, 575-580.

Brown E.M. y McLeod R.J. (2001). Extracellular calcium sensing and extracellular calcium signaling. *Physiol. Rev.* **81**, 239-297.

Bruno V., Copani A., Knöpfel T., Kuhn R., Casabona G., Dell'Albani P., Condorelli D.F. y Nicoletti F. (1995). Activation of metabotropic glutamate receptors coupled to inositol phospholipid hydrolysis amplifies NMDA-induced neuronal degeneration in cultured cortical cells. *Neuropharmacol.* **34**, 1089-1098.

Bruno V., Copani A., Bonanno L., Knoepfel T., Kuhn R., Roberts P.J. y Nicoletti F. (1996). Activation of group III metabotropic glutamate receptors is neuroprotective in cortical cultures. *Eur. J. Pharmacol.* **310**, 61-66.

Cai Z., Saugstad J.A., Sorensen S.D., Ciombor K.J., Zhang C., Schaffhauser H., Hubalek F., Pohl J., Duvoisin R.M. y Conn P.J. (2001). Cyclic AMP-dependent protein kinase phosphorylates group III metabotropic glutamate receptors and inhibits their function as presynaptic receptors. *J. Neurochem.* **78**, 756-766.

Capogna M., Gähwiler B.H. y Thompson S.M. (1995). Presynaptic enhancement of inhibitory synaptic transmission by protein kinases A and C in the rat hippocampus in vitro. *J. Neurosci.* **15**, 1249-1260.

Cartmell J. y Schoepp D.D. (2000). Regulation of neurotransmitter release by metabotropic glutamate receptors. *J. Neurochem.* **75**, 889-907.

Castillo P.E., Weisskopf M.G. y Nicoll R.A. (1994). The role of Ca²⁺ channels in hippocampal mossy fiber synaptic transmission and long-term potentiation. *Neuron* **12**, 261-269.

Castle N.A., Haylett D.G. y Jenkinson D.H. (1989). Toxins in the characterization of potassium channels. *Trends Neurosci.* **12**, 59-65.

Catterall W.A. (2000). Structure and regulation of voltage-gated Ca²⁺ channels. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* **16**, 521-555.

Chapman A.G., Nanan K., Yip P. y Meldrum B.S. (1999). Anticonvulsant activity of a metabotropic glutamate receptor 8 preferential agonist, (R,S)-4-phosphonophenyl glycine. *Eur. J. Pharmacol.* **383**, 23-27.

Chapman A.G., Talebi A., Yip P.K. y Meldrum B.S. (2001). Anticonvulsant activity of a mGluR4a receptor selective agonist, (1S,3R,4S)-1-aminocyclopentane-1,2,4-tricarboxylic acid. *Eur. J. Pharmacol.* **424**, 107-113.

Chávez-Noriega L.E. y Stevens C.F. (1994). Increased transmitter release at excitatory synapses produced by direct activation of adenylate cyclase in rat hippocampal slices. *J. Neurosci.* **14**, 310-317.

Chavis P., Fagni L., Bockaert J. y Lansman J.B. (1995). Modulation of calcium channels by metabotropic glutamate receptors in cerebellar granule cells. *Neuropharmacol.* **34**, 929-937.

Chavis P., Mollard P., Bockaert J. y Manzoni O. (1998). Visualization of cyclic AMP-regulated presynaptic activity at cerebellar granule cells. *Neuron* **20**, 773-781.

- Chen W., Aoki C., Mahadomrongkul V., Gruber C.E., Wang G.J., Blitzblau R., Irwin N. y Rosenberg P.A. (2002). Expression of a variant form of the glutamate transporter GLT1 in neuronal cultures and in neurons and astrocytes in the rat brain. *J. Neurosci.* **22**, 2142-2152.
- Cheng G., Rong X.W. y Feng T.P. (1994). Block of induction and maintenance of calcium-induced LTP by inhibition of protein kinase C in postsynaptic neuron in hippocampal CA1 region. *Brain Res.* **646**, 230-234.
- Chheda M.G., Ashery U., Thakur P., Rettig J. y Sheng Z.H. (2001). Phosphorylation of snapin by PKA modulates its interaction with the SNARE complex. *Nat. Cell Biol.* **3**, 331-338.
- Choi S. y Lovinger D.M. (1996). Metabotropic glutamate receptor modulation of voltage-gated Ca^{2+} channels involves multiple receptor subtypes in cortical neurons. *J. Neurosci.* **16**, 36-45.
- Clark B.P., Baker S.R., Golsworthy J., Harris J.R. y Kingston A.E. (1997). (+)-2-methyl-4-carboxyphenylglycine (LY367385) selectively antagonizes metabotropic glutamate mGluR1 receptors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **7**, 2777-2780.
- Cochilla A.J. y Alford S. (1998). Metabotropic glutamate receptor-mediated control of neurotransmitter release. *Neuron* **20**, 1007-1016.
- Coffey E.T., Sihra T.S. y Nicholls D.G. (1993). Protein kinase C and the regulation of glutamate exocytosis from cerebrocortical synaptosomes. *J. Biol. Chem.* **268**, 21060-21065.
- Conn P.J. y Pin J.P. (1997). Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **37**, 205-237.
- Conquet F., Bashir Z.I., Davies C.H., Daniel H., Ferraguti F., Bordi F., Franz-Bacon K., Reggiani A., Matarese V. y Conde F. (1994). Motor deficit and impairment of synaptic plasticity in mice lacking mGluR1. *Nature* **372**, 237-243.
- Contractor A., Gereau R.W., Green T. y Heinemann S.F. (1998). Direct effects of metabotropic glutamate receptor compounds on native and recombinant N-methyl-D-aspartate receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**, 8969-8974.
- Cooper C.B., Arnot M.I., Feng Z.P., Jarvis S.E., Hamid J. y Zamponi G.W. (2000). Cross-talk between G-protein and protein kinase C modulation of N-type calcium channels is dependent on the G-protein beta subunit isoform. *J. Biol. Chem.* **275**, 40777-40781.
- Corti C., Restituito S., Rimland J.M., Brabet I., Corsi M., Pin J.P. y Ferraguti F. (1998). Cloning and characterization of alternative mRNA forms for the rat metabotropic glutamate receptors mGluR7 and mGluR8. *Eur. J. Neurosci.* **10**, 3629-3641.

Corti C., Aldegheri L., Somogyi P. y Ferraguti F. (2002). Distribution and synaptic localisation of the metabotropic glutamate receptor 4 (mGluR4) in the rodent CNS. *Neuroscience* **110**, 403-420.

Cousin M.A., McLaughlin M. y Nicholls D.G. (1999). Protein kinase C modulates field-evoked transmitter release from cultured rat cerebellar granule cells via a dendrotoxin-sensitive K⁺ channel. *Eur. J. Neurosci.* **11**, 101-109.

Cousin M.A., Tan T.C. y Robinson P.J. (2001). Protein phosphorylation is required for endocytosis in nerve terminals: potential role for the dephosphins dynamin I and synaptojanin, but not AP180 or amphiphysin. *J. Neurochem.* **76**, 105-116.

Couve A., Moss S.J. y Pangalos M.N. (2000). GABA_B receptors: a new paradigm in G protein signaling. *Mol. Cell Neurosci.* **16**, 296-312.

D'Alcantara P., Schiffmann S.N. y Swillens S. (1999). Effect of protein kinase A-induced phosphorylation on the gating mechanism of the brain Na⁺ channel: model fitting to whole-cell current traces. *Biophys J.* **77**, 204-216.

Dalezios Y., Luján R., Shigemoto R., Roberts J.D. y Somogyi P. (2002). Enrichment of mGluR7a in the presynaptic active zones of GABAergic and non-GABAergic terminals on interneurons in the rat somatosensory cortex. *Cereb. Cortex* **12**, 961-974.

Daniel H., Levenes C. y Crepel F. (1998). Cellular mechanisms of cerebellar LTD. *Trends Neurosci.* **21**, 401-407.

David H.N. y Abiraini J.H. (2002). Group III metabotropic glutamate receptors and D1-like and D2-like dopamine receptors interact in the rat nucleus accumbens to influence locomotor activity. *Eur. J. Neurosci.* **15**, 869-875.

De Blasi A., Conn P.J., Pin J. y Nicoletti F. (2001). Molecular determinants of metabotropic glutamate receptor signaling. *Trends Pharmacol. Sci.* **22**, 114-120.

Degtjar V.E., Scheller R.H. y Tsien R.W. (2000). Syntaxin modulation of slow inactivation of N-type calcium channels. *J. Neurosci.* **20**, 4355-4367.

De Sarro G., Chimirri A. y Meldrum B.S. (2002). Group III mGlu receptor agonists potentiate the anticonvulsant effect of AMPA and NMDA receptor block. *Eur. J. Pharmacol.* **451**, 55-61.

Dev K.K., Nakajima Y., Kitano J., Braithwaite S.P., Henley J.M. y Nakanishi S. (2000). PICK1 interacts with and regulates PKC phosphorylation of mGluR7. *J. Neurosci.* **20**, 7252-7257.

Dev K.K., Nakanishi S. y Henley J.M. (2001). Regulation of mGluR7 receptors by proteins that interact with the intracellular C-terminus. *Trends Pharmacol. Sci.* **22**, 355-361.

- Dib-Hajj S.D., Tyrrell L., Black J.A. y Waxman S.G. (1998). NaN, a novel voltage-gated Na⁺ channel, is expressed preferentially in peripheral sensory neurons and down-regulated after axotomy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**, 8963-8968.
- Dib-Hajj S., Black J.A., Cummins T.R. y Waxman S.G. (2002). NaN/Nav1.9: a sodium channel with unique properties. *Trends Neurosci.* **25**, 253-259.
- Dietrich D., Beck H., Kral T., Clusmann H., Elger C.E. y Schramm J. (1997). Metabotropic glutamate receptors modulate synaptic transmission in the perforant path: pharmacology and localization of two distinct receptors. *Brain Res.* **767**, 220-227.
- Dunkley P.R., Jarvie P.E., Heath J.W., Kidd G.J. y Rostas J.A. (1986). A rapid method for isolation of synaptosomes on Percoll gradients. *Brain Res.* **372**, 115-129.
- Duvoisin R.M., Zhang C. y Ramonell K. (1995). A novel metabotropic glutamate receptor expressed in the retina and olfactory bulb. *J. Neurosci.* **4**, 3075-3083.
- El Far O., Airas J., Wischmeyer E., Nehring R.B., Karschin A. y Betz H. (2000). Interaction of the C-terminal tail region of the metabotropic glutamate receptor 7 with the protein kinase C substrate PICK1. *Eur. J. Neurosci.* **12**, 4215-4221.
- El Far O., Bofill-Cardona E., Airas J.M., O'Connor V., Boehm S., Freissmuth M., Nanoff C. y Betz H. (2001). Mapping of calmodulin and Gβγ binding domains within the C-terminal region of the metabotropic glutamate receptor 7A. *J. Biol. Chem.* **276**, 30662-30669.
- Ertel E.A., Campbell K.P., Harpold M.M., Hofmann F., Mori Y., Perez-Reyes E., Schwartz A., Snutch T.P., Tanabe T., Birnbaumer L., Tsien R.W. y Catterall W.A. (2000). Nomenclature of voltage-gated calcium channels. *Neuron* **25**, 533-535.
- Fang X., Djouhri L., Black J.A., Dib-Hajj S.D., Waxman S.G. y Lawson S.N. (2002). The presence and role of the tetrodotoxin-resistant sodium channel Na(v)1.9 (NaN) in nociceptive primary afferent neurons. *J. Neurosci.* **22**, 7425-7433.
- Fendt M. y Schmid S. (2002). Metabotropic glutamate receptors are involved in amygdaloid plasticity. *Eur. J. Neurosci.* **15**, 1535-1541.
- Fisher T.E. y Bourque C.W. (2001). The function of Ca²⁺ channel subtypes in exocytotic secretion: new perspectives from synaptic and non-synaptic release. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **77**, 269-303.
- Fitzjohn S.M., Irving A.J., Palmer M.J., Harvey J., Lodge D. y Collingridge G.L. (1996). Activation of group I mGluRs potentiates NMDA responses in rat hippocampal slices. *Neurosci. Lett.* **203**, 211-213.
- Flor P.J., Lindauer K., Puttner I., Ruegg D., Lukic S., Knopfel T. y Kuhn R. (1995). Molecular cloning, functional expression and pharmacological characterization of the human metabotropic glutamate receptor type 2. *Eur. J. Neurosci.* **7**, 622-629.

Flor P.J., Van Der Putten H., Ruegg D., Lukic S., Leonhardt T., Bence M., Sansig G., Knöpfel T. y Kuhn R. (1997). A novel splice variant of a metabotropic glutamate receptor, human mGluR7b. *Neuropharmacol.* **36**, 153-159.

Folbergrova J., Haugvicova R. y Mares P. (2001). Attenuation of seizures induced by homocysteic acid in immature rats by metabotropic glutamate group II and group III receptor agonists. *Brain Res.* **908**, 120-129.

Foletti D.L., Blitzer J.T. y Scheller R.H. (2001). Physiological modulation of rabphilin phosphorylation. *J. Neurosci.* **21**, 5473-5483.

Fotuhi M., Sharp A.H., Glatt C.E., Hwang P.M., von Krosigk M., Snyder S.H. y Dawson T.M. (1993). Differential localization of phosphoinositide-linked metabotropic glutamate receptor (mGluR1) and the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor in rat brain. *J. Neurosci.* **13**, 2001-2012.

Fotuhi M., Standaert D.G., Testa C.M., Penney J.B. y Young A.B. (1994). Differential expression of metabotropic glutamate receptors in the hippocampus and entorhinal cortex of the rat. *Mol. Brain Res.* **21**, 283-292.

Fournier F., Charnet P., Bourinet E., Vilbert C., Matifat F., Charpentier G., Navarre P., Brule G. y Marlot D. (1993). Regulation by protein kinase C of putative P-type Ca^{2+} channels expressed in *Xenopus* oocytes from cerebellar mRNA. *FEBS Lett.* **317**, 118-124.

Francis H.W., Scott J.C. y Manis P.B. (2002). Protein kinase C mediates potentiation of synaptic transmission by phorbol ester at parallel fibers in the dorsal cochlear nucleus. *Brain Res.* **951**, 9-22.

Fujita Y., Sasaki T., Fukui K., Kotani H., Kimura T., Hata Y., Sudhof T.C., Scheller R.H. y Takai Y. (1996). Phosphorylation of Munc-18/n-Sec1/rbSec1 by protein kinase C: its implication in regulating the interaction of Munc-18/n-Sec1/rbSec1 with syntaxin. *J. Biol. Chem.* **271**, 7265-7268.

Fukuda K., Kaneko S., Yada N., Kikuwaka M., Akaike A. y Satoh M. (1996). Cyclic AMP-dependent modulation of N- and Q-type Ca^{2+} channels expressed in *Xenopus* oocytes. *Neurosci. Lett.* **217**, 13-16.

Fykse E.M., Li C. y Sudhof T.C. (1995). Phosphorylation of rabphilin-3A by Ca^{2+} /calmodulin- and cAMP-dependent protein kinases in vitro. *J. Neurosci.* **15**, 2385-2395.

Gabellini N., Manev R.M., Candeo P., Favaron M. y Manev H. (1993). Carboxyl domain of glutamate receptor directs its coupling to metabolic pathways. *Neuroreport* **4**, 531-534.

Gálvez T., Parmentier M.L., Joly C., Malitschek B., Kaupmann K., Kuhn R., Bittiger H., Froestl W., Bettler B. y Pin J.P. (1999). Mutagenesis and modeling of the GABA_B receptor extracellular domain support a venus flytrap mechanism for ligand binding. *J. Biol. Chem.* **274**, 13362-13369.

- Gasparini F., Bruno V., Battaglia G., Lukic S., Leonhardt T., Inderbitzin W., Laurie D., Sommer B., Varney M.A., Hess S.D., Johnson E.C., Kuhn R., Urwyler S., Sauer D., Portet C., Schmutz M., Nicoletti F. y Flor P.J. (1999a). (R,S)-4-phosphonophenylglycine, a potent and selective group III metabotropic glutamate receptor agonist, is anticonvulsive and neuroprotective in vivo. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **289**, 1678-1687.
- Gasparini F., Lingenhohl K., Stoehr N., Flor P.J., Heinrich M., Vranesic I., Biollaz M., Allgeier H., Heckendorn R., Urwyler S., Varney M.A., Johnson E.C., Hess S.D., Rao S.P., Sacaan A.I., Santori E.M., Velicelebi G. y Kuhn R. (1999b). 2-Methyl-6-(phenylethynyl)-pyridine (MPEP), a potent, selective and systemically active mGluR5 receptor antagonist. *Neuropharmacol.* **38**, 1493-1503.
- Genoud S., Pralong W., Riederer B.M., Eder L., Catsicas S. y Muller D. (1999). Activity-dependent phosphorylation of SNAP-25 in hippocampal organotypic cultures. *J. Neurochem.* **72**, 1699-1706.
- Gereau R.W. y Conn P.J. (1994). Presynaptic enhancement of excitatory synaptic transmission by β -adrenergic receptor activation. *J. Neurophysiol.* **72**, 1438-1442.
- Gereau R.W. y Conn P.J. (1995). Multiple presynaptic metabotropic glutamate receptors modulate excitatory and inhibitory synaptic transmission in hippocampal area CA1. *J. Neurosci.* **15**, 6879-6889.
- Gereau R.W. y Heinemann S.F. (1998). Role of protein kinase C phosphorylation in rapid desensitization of metabotropic glutamate receptor 5. *Neuron* **20**, 143-151.
- Gerlai R., Roder J.C. y Hampson D.R. (1998). Altered spatial learning and memory in mice lacking the mGluR4 subtype of metabotropic glutamate receptor. *Behav. Neurosci.* **112**, 525-532.
- Gershon E., Weigl L., Lotan I., Schreibmayer W. y Dascal N. (1992). Protein kinase A reduces voltage-dependent Na^+ current in *Xenopus* oocytes. *J. Neurosci.* **12**, 3743-3752.
- Glaum S.R. y Miller R.J. (1995). Presynaptic metabotropic glutamate receptors modulate omega-conotoxin-GVIA-insensitive calcium channels in the rat medulla. *J. Neurophysiol.* **88**, 1512-1522.
- Gomez J., Mary S., Brabet I., Parmentier M.L., Restituito S., Bockaert J. y Pin J.P. (1996). Coupling of metabotropic glutamate receptors 2 and 4 to $\text{G}\alpha_{15}$, $\text{G}\alpha_{16}$, and chimeric $\text{G}\alpha_{q/i}$ proteins: characterization of new antagonists. *Mol. Pharmacol.* **50**, 923-930.
- Gorcs T.J., Penke B., Boti Z., Katarova Z. y Hamori J. (1993). Immunohistochemical visualization of a metabotropic glutamate receptor. *Neuroreport* **4**, 283-286.
- Gornall A.C., Bardewill C.S. y David M.M. (1947). Determination of serum proteins by means of the Biuret reaction. *J. Biol. Chem.* **177**, 751-766.

Grandes P., Mateos J.M., Ruegg D., Kuhn R. y Knopfel T. (1994). Differential cellular localization of three splice variants of the mGluR1 metabotropic glutamate receptor in rat cerebellum. *Neuroreport* **5**, 2249-2252.

Grynkiewicz G., Poenie M. y Tsien R.Y. (1985). A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* **260**, 3440-3450.

Gubellini P., Saulle E., Centonze D., Bonsi P., Pisani A., Bernardi G., Conquet F. y Calabresi P. (2001). Selective involvement of mGlu1 receptors in corticostriatal LTD. *Neuropharmacol.* **40**, 839-846.

Gundersen V., Danbolt N.C., Ottersen O.P. y Storm-Mathisen J. (1993). Demonstration of glutamate/aspartate uptake activity in nerve endings by use of antibodies recognizing exogenous D-aspartate. *Neuroscience* **57**, 97-111.

Hamid J., Nelson D., Spaetgens R., Dubel S.J., Snutch T.P. y Zamponi G.W. (1999). Identification of an integration center for cross-talk between protein kinase C and G protein modulation of N-type calcium channels. *J. Biol. Chem.* **274**, 6195-6202.

Hamori J., Takacs J. y Gorcs T.J. (1996). Immunocytochemical localization of mGluR1a metabotropic glutamate receptor in inhibitory interneurons of the cerebellar cortex. *Acta Biol. Hung.* **47**, 181-194.

Hay M. y Kunze D.L. (1994). Glutamate metabotropic receptor inhibition of voltage-gated calcium currents in visceral sensory neurons. *J. Neurophysiol.* **72**, 421-430.

Hell J.W., Appleyard S.M., Yokoyama C.T., Warner C. y Catterall W.A. (1994). Differential phosphorylation of two size forms of the N-type calcium channel alpha 1 subunit which have different COOH termini. *J. Biol. Chem.* **269**, 7390-7396.

Hepp R., Cabaniols J.P. y Roche P.A. (2002). Differential phosphorylation of SNAP-25 in vivo by protein kinase C and protein kinase A. *FEBS Lett.* **532**, 52-56.

Herget T., Oehrlein S.A., Pappin D.J., Rozengurt E. y Parker P.J. (1995). The myristoylated alanine-rich C-kinase substrate (MARCKS) is sequentially phosphorylated by conventional, novel and atypical isoforms of protein kinase C. *Eur. J. Biochem.* **233**, 448-457.

Hermans E., Nahorski S.R. y Challiss R.A. (1998). Reversible and non-competitive antagonist profile of CPCCOEt at the human type 1 α metabotropic glutamate receptor. *Neuropharmacol.* **37**, 1645-1647.

Herrada G. y Dulac C. (1997). A novel family of putative pheromone receptors in mammals with a topographically organized and sexually dimorphic distribution. *Cell* **90**, 763-773.

Herrero I., Miras-Portugal M.T. y Sanchez-Prieto J. (1991). Inhibition of glutamate release by arachidonic acid in rat cerebrocortical synaptosomes. *J. Neurochem.* **57**, 718-721.

- Herrero I., Miras-Portugal M.T. y Sánchez-Prieto J. (1992). Positive feedback of glutamate exocytosis by metabotropic presynaptic receptor stimulation. *Nature* **360**, 163-166.
- Herrero I., Miras-Portugal M.T. y Sánchez-Prieto J. (1994). Rapid desensitization of the metabotropic glutamate receptor that facilitates glutamate release in rat cerebrocortical nerve terminals. *Eur. J. Neurosci.* **6**, 115-120.
- Herrero I., Vazquez E., Miras-Portugal M.T. y Sánchez-Prieto J. (1996a). Decrease in $[Ca^{2+}]_c$ but not in cAMP mediates L-AP4 inhibition of glutamate release: PKC-mediated suppression of this inhibitory pathway. *Eur. J. Neurosci.* **8**, 700-709.
- Herrero I. y Sánchez-Prieto J. (1996b). cAMP-dependent facilitation of glutamate release by β -adrenergic receptors in cerebrocortical nerve terminals. *J. Biol. Chem.* **271**, 30554-30560.
- Herrero I., Miras-Portugal M.T. y Sánchez-Prieto J. (1998). Functional switch from facilitation to inhibition in the control of glutamate release by metabotropic glutamate receptors. *J. Biol. Chem.* **273**, 1951-1958.
- Herzog E., Bellenchi G.C., Gras C., Bernard V., Ravassard P., Bedet C., Gasnier B., Giros B. y El Mestikawy S. (2001). The existence of a second vesicular glutamate transporter specifies subpopulations of glutamatergic neurons. *J. Neurosci.* **21**, RC181.
- Hirling H. y Scheller R.H. (1996). Phosphorylation of synaptic vesicle proteins: modulation of the alpha SNAP interaction with the core complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**, 11945-11949.
- Hoffman D.A. y Johnston D. (1998). Downregulation of transient K^+ channels in dendrites of hippocampal CA1 pyramidal neurons by activation of PKA and PKC. *J. Neurosci.* **18**, 3521-3528.
- Honda I., Kamiya H. y Yawo H. (2000). Re-evaluation of phorbol ester-induced potentiation of transmitter release from mossy fibre terminals of the mouse hippocampus. *J. Physiol.* **529**, 763-776.
- Hosaka M., Hammer R.E. y Sudhof T.C. (1999). A phospho-switch controls the dynamic association of synapsins with synaptic vesicles. *Neuron* **24**, 377-387.
- Houamed K.M., Kuijper J.L., Gilbert T.L., Haldeman B.A., O'Hara P.J., Mulvihill E.R., Almers W. y Hagen F. (1991). Cloning, expression and gene structure of a G-protein-coupled glutamate receptor from rat brain. *Science* **252**, 1318-1321.
- Huang Y.Y., Kandel E.R., Varshavsky L., Brandon E.P., Qi M., Idzerda R.L., McKnight G.S. y Bourchouladze R. (1995). A genetic test of the effects of mutations in PKA on mossy fiber LTP and its relation to spatial and contextual learning. *Cell* **83**, 1211-1222.

- Huang C.C., Hsu K.S. y Gean P.W. (1996). Isoproterenol potentiates synaptic transmission primarily by enhancing presynaptic calcium influx via P- and/or Q-type calcium channels in the rat amygdala. *J. Neurosci.* **16**, 1026-1033.
- Hudtloff C. y Thomsen C. (1998). Autoradiographic visualization of group III metabotropic glutamate receptors using [³H]-L-2-amino-4-phosphonobutyrate. *Br. J. Pharmacol.* **124**, 971-977.
- Ichise T., Kano M., Hashimoto K., Yanagihara D., Nakao K., Shigemoto R., Katsuki M. y Aiba A. (2001). mGluR1 in cerebellar Purkinje cells essential for long-term depression, synapse elimination, and motor coordination. *Science* **288**, 1832-1835.
- Ikeda S.R., Lovinger D.M., McCool B.A. y Lewis D.L. (1995). Heterologous expression of metabotropic glutamate receptors in adult rat sympathetic neurons: subtype-specific coupling to ion channels. *Neuron* **14**, 1029-1038.
- Iwasaki S., Momiyama A., Uchitel O.D. y Takahashi T. (2000). Developmental changes in calcium channel types mediating central synaptic transmission. *J. Neurosci.* **20**, 59-65.
- Jia Z., Lu Y., Henderson J., Taverna F., Romano C., Abramow-Newerly W., Wojtowicz J.M. y Roder J. (1998). Selective abolition of the NMDA component of long-term potentiation in mice lacking mGluR5. *Learn Mem.* **5**, 331-343.
- Joly C., Gomeza J., Brabet I., Curry K., Bockaert J. y Pin J.P. (1995). Molecular, functional, and pharmacological characterization of the metabotropic glutamate receptor type 5 splice variants: comparison with mGluR1. *J. Neurosci.* **15**, 3970-3981.
- Kalda A., Kaasik A., Vassiljev V., Pokk P. y Zharkovsky A. (2000). Neuroprotective action of group I metabotropic glutamate receptor agonists against oxygen-glucose deprivation-induced neuronal death. *Brain Res.* **853**, 370-373.
- Kammermeier P.J. e Ikeda S.R. (1999). Expression of RGS2 alters the coupling of metabotropic glutamate receptor 1a to M-type K⁺ and N-type Ca²⁺ channels. *Neuron* **22**, 819-829.
- Kammermeier P.J., Xiao B., Tu J.C., Worley P.F. e Ikeda S.R. (2000). Homer proteins regulate coupling of group I metabotropic glutamate receptors to N-type calcium and M-type potassium channels. *J. Neurosci.* **20**, 7238-7245.
- Kammermeier P.J. y Ikeda S.R. (2002). Desensitization of group I metabotropic glutamate receptors in rat sympathetic neurons. *J. Neurophysiol.* **87**, 1669-1676.
- Kauppinen R.A. y Nicholls D.G. (1986). Synaptosomal bioenergetics. The role of glycolysis, pyruvate oxidation and responses to hypoglycaemia. *Eur. J. Biochem.* **158**, 159-165.
- Kew J.N., Ducarre J.M., Pflimlin M.C., Mutel V. y Kemp J.A. (2001). Activity-dependent presynaptic autoinhibition by group II metabotropic glutamate receptors at the perforant path inputs to the dentate gyrus and CA1. *Neuropharmacol.* **40**, 20-27.

- Kingston A.E., Ornstein P.L., Wright R.A., Johnson B.G., Mayne N.G., Burnett J.P., Belagaje R., Wu S. y Schoepp D.D. (1998a). LY341495 is a nanomolar potent and selective antagonist of group II metabotropic glutamate receptors. *Neuropharmacol.* **37**, 1-12.
- Kingston A.E., Lowndes J., Evans N., Clark B., Tomlinson R., Burnett J.P., Mayne N.G., Cockerham S.L. y Lodge D. (1998b). Sulphur-containing amino acids are agonists for group I metabotropic receptors expressed in clonal RGT cell lines. *Neuropharmacol.* **37**, 277-287.
- Kinoshita A., Ohishi H., Neki A., Nomura S., Shigemoto R., Takada M., Nakanishi S. y Mizuno N. (1996a). Presynaptic localization of a metabotropic glutamate receptor, mGluR8, in the rhinencephalic areas: a light and electron microscope study in the rat. *Neurosci. Lett.* **207**, 61-64.
- Kinoshita A., Ohishi H., Nomura S., Shigemoto R., Nakanishi S. y Mizuno N. (1996b). Presynaptic localization of a metabotropic glutamate receptor, mGluR4a, in the cerebellar cortex: a light and electron microscope study in the rat. *Neurosci. Lett.* **207**, 199-202.
- Kinoshita A., Shigemoto R., Ohishi H., van der Putten H. y Mizuno N. (1998). Immunohistochemical localization of metabotropic glutamate receptors, mGluR7a and mGluR7b, in the central nervous system of the adult rat and mouse: a light and electron microscopic study. *J. Comp. Neurol.* **393**, 332-352.
- Kinzie J.M., Saugstad J.A., Westbrook G.L. y Segerson T.P. (1995). Distribution of metabotropic glutamate receptor 7 messenger RNA in the developing and adult rat brain. *Neuroscience* **69**, 167-176.
- Klann E., Chen S.J. y Sweatt J.D. (1991). Persistent protein kinase activation in the maintenance phase of long-term potentiation. *J. Biol. Chem.* **266**, 24253-24256.
- Komuro H. y Rakic P. (1992). Selective role of N-type calcium channels in neuronal migration. *Science* **257**, 806-809.
- Kosinski C.M., Risso-Bradley S., Conn P.J., Levey A.I., Landwehrmeyer G.B., Penney J.B., Young A.B. y Standaert D.G. (1999). Localization of metabotropic glutamate receptor 7 mRNA and mGluR7a protein in the rat basal ganglia. *J. Comp. Neurol.* **415**, 266-284.
- Krieger P., Hellgren-Kotaleski J., Kettunen P. y El Manira A.J. (2000). Interaction between metabotropic and ionotropic glutamate receptors regulates neuronal network activity. *J. Neurosci.* **20**, 5382-5391.
- Kudoh S.N., Nagai R., Kiyosue K. y Taguchi T. (2001). PKC and CaMKII dependent synaptic potentiation in cultured cerebral neurons. *Brain Res.* **915**, 79-87.
- Kunishima N., Shimada Y., Tsuji Y., Sato T., Yamamoto M., Kumasaka T., Nakanishi S., Jingami H. y Morikawa K. (2000). Structural basis of glutamate recognition by a dimeric metabotropic glutamate receptor. *Nature* **407**, 971-977.

Kuusinen A., Arvola M. y Keinanen K. (1995). Molecular dissection of the agonist binding site of an AMPA receptor. *EMBO J.* **14**, 6327-6332.

Lafon-Cazal M., Fagni L., Guiraud M.J., Mary S., Lerner-Natoli M., Pin J.P., Shigemoto R. y Bockaert J. (1999). mGluR7-like metabotropic glutamate receptors inhibit NMDA-mediated excitotoxicity in cultured mouse cerebellar granule neurons. *Eur. J. Neurosci.* **11**, 663-672.

Lee O., Lee C.J. y Choi S. (2002). Induction mechanisms for L-LTP at thalamic input synapses to the lateral amygdala: requirement of mGluR5 activation. *Neuroreport* **13**, 685-691.

Lerma J., Herranz A.S., Herreras O., Abaira V. y Martín del Río R. (1986). In vivo determination of extracellular concentration of amino acids in the rat hippocampus. A method based on brain dialysis and computerized analysis. *Brain Res.* **384**, 145-155.

Levenes C., Daniel H. y Crepel F. (1998). Long-term depression of synaptic transmission in the cerebellum: cellular and molecular mechanisms revisited. *Prog. Neurobiol.* **55**, 79-91.

Leveque C., El Far O., Martin-Moutot N., Sato K., Kato R., Takahashi M. y Seagar M.J. (1994). Purification of the N-type calcium channel associated with syntaxin and synaptotagmin. A complex implicated in synaptic vesicle exocytosis. *J. Biol. Chem.* **269**, 6306-6312.

Li M., West J.W., Numann R., Murphy B.J., Scheuer T. y Catterall W.A. (1993). Convergent regulation of sodium channels by protein kinase C and cAMP-dependent protein kinase. *Science* **261**, 1439-1442.

Liu J.P., Powell K.A., Sudhof T.C. y Robinson P.J. (1994). Dynamin I is a Ca^{2+} -sensitive phospholipid-binding protein with very high affinity for protein kinase C. *J. Biol. Chem.* **269**, 21043-21050.

Liu X.B., Muñoz A. y Jones E.G. (1998). Changes in subcellular localization of metabotropic glutamate receptor subtypes during postnatal development of mouse thalamus. *J. Comp. Neurol.* **395**, 450-465.

Lonart G. y Sudhof T.C. (1998a). Region-specific phosphorylation of rabphilin in mossy fiber nerve terminals of the hippocampus. *J. Neurosci.* **18**, 634-40.

Lonart G., Janz R., Johnson K.M. y Sudhof T.C. (1998b). Mechanism of action of rab3A in mossy fiber LTP. *Neuron* **21**, 1141-1150.

López-Bendito G., Shigemoto R., Fairén A. y Luján R. (2002). Differential distribution of group I metabotropic glutamate receptors during rat cortical development. *Cereb. Cortex* **12**, 625-638.

Lu Y.M., Jia Z., Janus C., Henderson J.T., Gerlai R., Wojtowicz J.M. y Roder J.C. (1997). Mice lacking metabotropic glutamate receptor 5 show impaired learning and

reduced CA1 long-term potentiation (LTP) but normal CA3 LTP. *J. Neurosci.* **17**, 5196-5205.

Luebke J.I., Dunlap K. y Turner T.J. (1993). Multiple calcium channel types control glutamatergic synaptic transmission in the hippocampus. *Neuron* **11**, 895-902.

Luján R., Nusser Z., Roberts J.D., Shigemoto R. y Somogyi P. (1996). Perisynaptic location of metabotropic glutamate receptors mGluR1 and mGluR5 on dendrites and dendritic spines in the rat hippocampus. *Eur. J. Neurosci.* **8**, 1488-1500.

Luján R., Roberts J.D., Shigemoto R., Ohishi H. y Somogyi P. (1997). Differential plasma membrane distribution of metabotropic glutamate receptors mGluR1 α , mGluR2 and mGluR5, relative to neurotransmitter release sites. *J. Chem. Neuroanat.* **13**, 219-241.

Macek T.A., Winder D.G., Gereau R.W., Ladd C.O. y Conn P.J. (1996). Differential involvement of group II and group III mGluRs as autoreceptors at lateral and medial perforant path synapses. *J. Neurophysiol.* **76**, 3798-3806.

Macek T.A., Schaffhauser H. y Conn P.J. (1998). Protein kinase C and A3 adenosine receptor activation inhibit presynaptic metabotropic glutamate receptor (mGluR) function and uncouple mGluRs from GTP-binding proteins. *J. Neurosci.* **18**, 6138-6146.

Macek T.A., Schaffhauser H. y Conn P.J. (1999). Activation of PKC disrupts presynaptic inhibition by group II and group III metabotropic glutamate receptors and uncouples the receptor from GTP-binding proteins. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **868**, 554-557.

Maiese K., Swiriduk M. y Tenbroeke M. (1996). Cellular mechanisms of protection by metabotropic glutamate receptors during anoxia and nitric oxide toxicity. *J. Neurochem.* **66**, 2419-2428.

Malenka R.C., Madison D.V. y Nicoll R.A. (1986). Potentiation of synaptic transmission in the hippocampus by phorbol esters. *Nature* **321**, 175-177.

Manzoni O.J., Finiels-Marlier F., Sasseti I., Bockaert J., Le Peuch C. y Sladeczek, F.A. (1990). The glutamate receptor of the Q ρ -type activates protein kinase C and is regulated by protein kinase C. *Neurosci. Lett.* **109**, 146-151.

Manzoni O., Prezeau L., Sladeczek F. y Bockaert J. (1992). Trans-ACPD inhibits cAMP formation via a pertussis toxin-sensitive G-protein. *Eur. J. Pharmacol.* **225**, 357-358.

Manzoni O. y Bockaert J. (1995). Metabotropic glutamate receptors inhibiting excitatory synapses in the CA1 area of rat hippocampus. *Eur. J. Neurosci.* **7**, 2518-2523.

Mary S., Stephan D., Gomeza J., Bockaert J., Pruss R.M. y Pin J.P. (1997). The rat mGluR1d receptor splice variant shares functional properties with the other short isoforms of mGluR1 receptor. *Eur. J. Pharmacol.* **335**, 65-72.

Masu M., Tanabe Y., Tsuchida K., Shigemoto R. y Nakanishi S. (1991). Sequence and expression of a metabotropic glutamate receptor. *Nature* **349**, 760-765.

Masu M., Iwakabe H., Tagawa Y., Miyoshi T., Yamashita M., Fukuda Y., Sasaki H., Hiroi K., Nakamura Y. y Shigemoto R. (1995). Specific deficit of the ON response in visual transmission by targeted disruption of the mGluR6 gene. *Cell* **80**, 757-765.

Masugi M., Yokoi M., Shigemoto R., Muguruma K., Watanabe Y., Sansig G., van der Putten H. y Nakanishi S. (1999). Metabotropic glutamate receptor subtype 7 ablation causes deficit in fear response and conditioned taste aversion. *J. Neurosci.* **19**, 955-963.

Mateos J.M., Azkue J., Benítez R., Sarria R., Losada J., Conquet F., Ferraguti F., Kuhn R., Knopfel T. y Grandes P. (1998a). Immunocytochemical localization of the mGluR1b metabotropic glutamate receptor in the rat hypothalamus. *J. Comp. Neurol.* **390**, 225-233.

Mateos J.M., Azkue J., Sarria R., Kuhn R., Grandes P., y Knopfel T. (1998b). Localization of the mGlu4a metabotropic glutamate receptor in rat cerebellar cortex. *Histochem. Cell. Biol.* **109**, 135-139.

Mateos J.M., Elezgarai I., Benítez R., Osorio A., Bilbao A., Azkue J.J., Kuhn R., Knopfel T. y Grandes P. (1999). Clustering of the group III metabotropic glutamate receptor 4a at parallel fiber synaptic terminals in the rat cerebellar molecular layer. *Neurosci. Res.* **35**, 71-74.

Mateos J.M., Benítez R., Elezgarai I., Azkue J.J., Lazaro E., Osorio A., Bilbao A., Donate F., Sarria R., Conquet F., Ferraguti F., Kuhn R., Knopfel T. y Grandes P. (2000). Immunolocalization of the mGluR1b splice variant of the metabotropic glutamate receptor 1 at parallel fiber-Purkinje cell synapses in the rat cerebellar cortex. *J. Neurochem.* **74**, 1301-1309.

Matsunami H. y Buck L.B. (1997). A multigene family encoding a diverse array of putative pheromone receptors in mammals. *Cell* **90**, 775-784.

Maximov A., Sudhof T.C. y Bezprozvanny I. (1999). Association of neuronal calcium channels with modular adaptor proteins. *J. Biol. Chem.* **274**, 24453-24456.

Maximov A. y Bezprozvanny I. (2001). Synaptic targeting of N-type calcium channels in hippocampal neurons. *J. Neurosci.* **22**, 6939-6952.

McCool B.A., Pin J.P., Brust P.F., Harpold M.M. y Lovinger D.M. (1996). Functional coupling of rat group II metabotropic glutamate receptors to an omega-conotoxin GVIA-sensitive calcium channel in human embryonic kidney 293 cells. *Mol. Pharmacol.* **50**, 912-922.

McCool B.A., Pin J.P., Harpold M.M., Brust P.F., Stauderman K.A. y Lovinger D.M. (1998). Rat group I metabotropic glutamate receptors inhibit neuronal Ca²⁺ channels via multiple signal transduction pathways in HEK 293 cells. *J. Neurophysiol.* **79**, 379-391.

- Meguro R., Ohishi H., Hoshino K., Hicks T.P. y Norita M. (1999). Metabotropic glutamate receptor 2/3 immunoreactivity in the developing rat cerebellar cortex. *J. Comp. Neurol.* **410**, 243-255.
- Meir A., Ginsburg S., Butkevich A., Kachalsky S.G., Kaiserman I., Ahdut R., Demirgoren S. y Rahamimoff R. (1999). Ion channels in presynaptic nerve terminals and control of transmitter release. *Physiol. Rev.* **79**, 1019-1088.
- Mellor J., Nicoll R.A. y Schmitz D. (2002). Mediation of hippocampal mossy fiber long-term potentiation by presynaptic Ih channels. *Science* **295**, 143-147.
- Messenger M.J., Dawson L.G. y Duty S. (2002). Changes in metabotropic glutamate receptor 1-8 gene expression in the rodent basal ganglia motor loop following lesion of the nigrostriatal tract. *Neuropharmacol.* **43**, 261-271.
- Minakami R., Iida K., Hirakawa N y Sugiyama H. (1995). The expression of two splice variants of metabotropic glutamate receptor subtype 5 in the rat brain and neuronal cells during development. *J. Neurochem.* **65**, 1536-1542.
- Minakami R., Jinnai N. y Sugiyama H. (1997). Phosphorylation and calmodulin binding of the metabotropic glutamate receptor subtype 5 (mGluR5) are antagonistic in vitro. *J. Biol. Chem.* **272**, 20291-20298.
- Mineff E. y Valtschanoff J. (1999). Metabotropic glutamate receptors 2 and 3 expressed by astrocytes in rat ventrobasal thalamus. *Neurosci. Lett.* **270**, 95-98.
- Mintz I.M., Sabatini B.L. y Regehr W.G. (1995). Calcium control of transmitter release at a cerebellar synapse. *Neuron* **15**, 675-688.
- Montoliu C., Llansola M., Cucarella C., Grisolia S. y Felipo V. (1997). Activation of the metabotropic glutamate receptor mGluR5 prevents glutamate toxicity in primary cultures of cerebellar neurons. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **281**, 643-647.
- Nakajima Y., Iwakabe H., Akazawa C., Nawa H., Shigemoto R., Mizuno N. y Nakanishi S. (1993). Molecular characterization of a novel retinal metabotropic glutamate receptor mGluR6 with a high agonist selectivity for L-2-amino-4-phosphonobutyrate. *J. Biol. Chem.* **268**, 11868-11873.
- Nakajima Y., Yamamoto T., Nakayama T. y Nakanishi S. (1999). A relationship between protein kinase C phosphorylation and calmodulin binding to the metabotropic glutamate receptor subtype 7. *J. Biol. Chem.* **274**, 27573-27577.
- Negyessy L., Vidnyanszky Z., Kuhn R., Knopfel T., Gorcs T.J. y Hamori J. (1997). Light and electron microscopic demonstration of mGluR5 metabotropic glutamate receptor immunoreactive neuronal elements in the rat cerebellar cortex. *J. Comp. Neurol.* **385**, 641-650.
- Neki A., Ohishi H., Kaneko T., Shigemoto R., Nakanishi S. y Mizuno N. (1996). Pre- and postsynaptic localization of a metabotropic glutamate receptor, mGluR2, in the rat

brain: an immunohistochemical study with a monoclonal antibody. *Neurosci. Lett.* **202**, 197-200.

Nichols R.A., Haycock J.W., Wang J.K. y Greengard P. (1987). Phorbol ester enhancement of neurotransmitter release from rat brain synaptosomes. *J. Neurochem.* **48**, 615-621.

Nicholls D.G., Sihra T.S. y Sánchez-Prieto J. (1987). Calcium-dependent and independent release of glutamate from synaptosomes monitored by continuous fluorometry. *J. Neurochem.* **49**, 50-57.

Nicholls D.G. (1989). Release of glutamate, aspartate, and gamma-aminobutyric acid from isolated nerve terminals. *J. Neurochem.* **52**, 331-341.

Nicoletti F., Meek J.L., Iadarola M.J., Chuang D.M., Roth D.L. y Costa E. (1986a). Coupling of inositol phospholipid metabolism with excitatory aminoacid recognition sites in rat hippocampus. *J. Neurochem.* **46**, 40-46.

Nicoletti F., Wroblewski J.T., Iadarola M.J. y Costa E. (1986b). Serine-O-phosphate, an endogenous metabolite, inhibits the stimulation of inositol phospholipid hydrolysis elicited by ibotenic acid in rat hippocampal slices. *Neuropharmacology* **25**, 335-338.

Nicoletti F., Wroblewski J.T., Novelli A., Alho H., Guidotti A. y Costa E. (1986c). The activation of inositol phospholipid metabolism as a signal-transducing system for excitatory aminoacids in primary cultures of cerebellar granule cells. *J. Neurosci.* **6**, 1905-1911.

Nishizuka Y. (1992). Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science* **258**, 607-614.

Numann R., Catterall W.A. y Scheuer T. (1991). Functional modulation of brain sodium channels by protein kinase C phosphorylation. *Science* **254**, 115-118.

Numata S., Shirataki H., Hagi S., Yamamoto T. y Takai Y. (1994). Phosphorylation of Rabphilin-3A, a putative target protein for Rab3A, by cyclic AMP-dependent protein kinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **203**, 1927-1934.

O'Connor V., El Far O., Bofill-Cardona E., Nanoff C., Freissmuth M., Karschin A., Airas J.M., Betz H. y Boehm S. (1999). Calmodulin dependence of presynaptic metabotropic glutamate receptor signaling. *Science* **286**, 1180-1184.

Ogata K., Jeong S.Y., Murakami H., Hashida H., Suzuki T., Masuda N., Hirai M., Isahara K., Uchiyama Y., Goto J. y Kanazawa I. (2000). Cloning and expression study of the mouse tetrodotoxin-resistant voltage-gated sodium channel alpha subunit NaT/Scn11a. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **267**, 271-277.

O'Hara P.J., Sheppard P.O., Thogersen H., Venezia D., Haldeman B.A., McGrane V., Houamed K.M., Thomsen C., Gilbert T.L. y Mulvihill E.R. (1993). The ligand-binding domain in metabotropic glutamate receptors is related to bacterial periplasmic binding proteins. *Neuron* **11**, 41-52.

- Ohishi H., Akazawa C., Shigemoto R., Nakanishi S. y Mizuno N. (1995). Distributions of the mRNAs for L-2-amino-4-phosphonobutyrate-sensitive metabotropic glutamate receptors, mGluR4 and mGluR7, in the rat brain. *J. Comp. Neurol.* **360**, 555-570.
- Ohishi H., Neki A. y Mizuno N. (1998). Distribution of a metabotropic glutamate receptor, mGluR2, in the central nervous system of the rat and mouse: an immunohistochemical study with a monoclonal antibody. *Neurosci. Res.* **30**, 65-82.
- Okamoto N., Hori S., Akazawa C., Hayashi Y., Shigemoto R., Mizuno N. y Nakanishi S. (1994). Molecular characterization of a new metabotropic glutamate receptor mGluR7 coupled to inhibitory cyclic AMP signal transduction. *J. Biol. Chem.* **269**, 1231-1236.
- Okamoto T., Sekiyama N., Otsu M., Shimada Y., Sato A., Nakanishi S. y Jingami H. (1998). Expression and purification of the extracellular ligand binding region of metabotropic glutamate receptor subtype 1. *J. Biol. Chem.* **273**, 13089-13096.
- Olivera B.M., Gray W.R., Zeikus R., McIntosh J.M., Varga J., Rivier J., de Santos V. y Cruz L.J. (1985). Peptide neurotoxins from fish-hunting cone snails. *Science* **230**, 1338-1343.
- Pearce B., Albrecht J., Morrow C. y Murphy S. (1986). Astrocyte glutamate receptor activation promotes inositol phospholipid turnover and calcium influx. *Neurosci. Lett.* **72**, 335-340.
- Pekhletski R., Gerlai R., Overstreet L.S., Huang X.P., Agopyan N. Slater N.T, Abramow-Newerly W., Roder J.C. y Hampson D.R. (1996). Impaired cerebellar synaptic plasticity and motor performance in mice lacking the mGluR4 subtype of metabotropic glutamate receptor. *J. Neurosci.* **16**, 6364-6373.
- Pellicciari R., Luneia R., Costantino G., Marinozzi M., Natalini B., Jakobsen P., Kanstrup A., Lombardi G., Moroni F. y Thomsen C. (1995). 1-Aminoindan-1,5-dicarboxylic acid: a novel antagonist at phospholipase C-linked metabotropic glutamate receptors. *J. Med. Chem.* **38**, 3717-3719.
- Peretz T., Levin G., Moran O., Thornhill W.B., Chikvashvili D. y Lotan I. (1996). Modulation by protein kinase C activation of rat brain delayed-rectifier K⁺ channel expressed in *Xenopus* oocytes. *FEBS Lett.* **381**, 71-76.
- Perroy J., Prezeau L., De Waard M., Shigemoto R., Bockaert J. y Fagni L. (2000). Selective blockade of P/Q-type calcium channels by the metabotropic glutamate receptor type 7 involves a phospholipase C pathway in neurons. *J. Neurosci.* **20**, 7896-7904.
- Perroy J., El Far O., Bertaso F., Pin J.P., Betz H., Bockaert J. y Fagni L. (2002). PICK1 is required for the control of synaptic transmission by the metabotropic glutamate receptor 7. *EMBO J.* **21**, 2990-2999.

Petralia R.S., Wang Y.X., Niedzielski A.S. y Wenthold R.J. (1996). The metabotropic glutamate receptors, mGluR2 and mGluR3, show unique postsynaptic, presynaptic and glial localizations. *Neuroscience* **71**, 949-976.

Petralia R.S., Wang Y.X., Singh S., Wu C., Shi L., Wei J. y Wenthold R.J. (1997). A monoclonal antibody shows discrete cellular and subcellular localizations of mGluR1 α metabotropic glutamate receptors. *J. Chem. Neuroanat.* **13**, 77-93.

Petralia R.S., Zhao H.M., Wang Y.X. y Wenthold R.J. (1998). Variations in the tangential distribution of postsynaptic glutamate receptors in Purkinje cell parallel and climbing fiber synapses during development. *Neuropharmacol.* **37**, 1321-1334.

Phillips T., Makoff A., Murrison E., Mimmack M., Waldvogel H., Faull R., Rees S. y Emson P. (1998). Immunohistochemical localisation of mGluR7 protein in the rodent and human cerebellar cortex using subtype specific antibodies. *Mol. Brain Res.* **57**, 132-141.

Phillips T., Rees S., Augood S., Waldvogel H., Faull R., Svendsen C. y Emson P. (2000). Localization of metabotropic glutamate receptor type 2 in the human brain. *Neuroscience* **95**, 1139-1156.

Pin J.P., Waeber C., Prezeau L., Bockaert J. y Heinemann S.F. (1992). Alternative splicing generates metabotropic glutamate receptors inducing different patterns of calcium release in *Xenopus* oocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 10331-10335.

Pin J.P., Joly C., Heinemann S.F. y Bockaert J. (1994). Domains involved in the specificity of G protein activation in phospholipase C coupled metabotropic glutamate receptor. *EMBO J.* **13**, 342-348.

Pin J.P. y Duvoisin R. (1995). The metabotropic glutamate receptors: structure and functions. *Neuropharmacol.* **34**, 1-26.

Pisani A., Calabresi P., Centonze D. y Bernardi G. (1997). Activation of group III metabotropic glutamate receptors depresses glutamatergic transmission at corticostriatal synapse. *Neuropharmacol.* **36**, 845-851.

Pisani A., Gubellini P., Bonsi P., Conquet F., Picconi B., Centonze D., Bernardi G. Y Calabresi P. (2001). Metabotropic glutamate receptor 5 mediates the potentiation of N-methyl-D-aspartate responses in medium spiny striatal neurons. *Neuroscience* **106**, 579-587.

Pizzi M., Benarese M., Boroni F., Goffi F., Valerio A. y Spano P.F. (2000). Neuroprotection by metabotropic glutamate receptor agonists on kainate-induced degeneration of motor neurons in spinal cord slices from adult rat. *Neuropharmacol.* **39**, 903-910.

Powell C.M., Johnston D. y Sweatt J.D. (1994). Autonomously active protein kinase C in the maintenance phase of N-methyl-D-aspartate receptor-independent long term potentiation. *J. Biol. Chem.* **269**, 27958-27963.

Powell K.A., Valova V.A., Malladi C.S., Jensen O.N., Larsen M.R., Robinson P.J. (2000). Phosphorylation of dynamin I on Ser-795 by protein kinase C blocks its association with phospholipids. *J. Biol. Chem.* **275**, 11610-11617.

Prézeau L., Manzoni O., Homburger V., Sladeczek F., Curry K. y Bockaert J. (1992). Characterization of a metabotropic glutamate receptor: direct negative coupling to adenylyl cyclase and involvement of a pertussis toxin-sensitive G protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**, 8040-8044.

Prézeau L., Carrette J., Helpap B., Curry K., Pin J.P. y Bockaert J. (1994). Pharmacological characterization of metabotropic glutamate receptors in several types of brain cells in primary cultures. *Mol. Pharmacol.* **45**, 570-577.

Qian J. y Noebels J.L. (2001). Presynaptic Ca²⁺ channels and neurotransmitter release at the terminal of a mouse cortical neuron. *J. Neurosci.* **21**, 3721-3728.

Rabert D.K., Koch B.D., Ilnicka M., Obernolte R.A., Naylor S.L., Herman R.C., Eglan R.M., Hunter J.C. y Sangameswaran L. (1998). A tetrodotoxin-resistant voltage-gated sodium channel from human dorsal root ganglia, hPN3/SCN10A. *Pain* **78**, 107-114.

Rahman S. y Neuman R.S. (1996). Characterization of metabotropic glutamate receptor-mediated facilitation of N-methyl-D-aspartate depolarization of neocortical neurones. *Br. J. Pharmacol.* **117**, 675-683.

Ramakers G.M., Pasinelli P., van Beest M., van der Slot A., Gispen W.H. y De Graan P.N. (2000). Activation of pre- and postsynaptic protein kinase C during tetraethylammonium-induced long-term potentiation in the CA1 field of the hippocampus. *Neurosci. Lett.* **286**, 53-56.

Rao A.M., Hatcher J.F. y Dempsey R.J. (2000). Neuroprotection by group I metabotropic glutamate receptor antagonists in forebrain ischemia of gerbil. *Neurosci. Lett.* **293**, 1-4.

Reid C.A., Clements J.D. y Bekkers J.M. (1997). Nonuniform distribution of Ca²⁺ channel subtypes on presynaptic terminals of excitatory synapses in hippocampal cultures. *J. Neurosci.* **17**, 2738-2745.

Renganathan M., Cummins T.R., Hormuzdiar W.N. y Waxman S.G. (2000). α -SNS produces the slow TTX-resistant sodium current in large cutaneous afferent DRG neurons. *J. Neurophysiol.* **84**, 710-718.

Riedel G., Wetzel W. y Reymann K.G. (1994). (R,S)- α -methyl-4-carboxyphenylglycine (MCPG) blocks spatial learning in rats and long-term potentiation in the dentate gyrus in vivo. *Neurosci. Lett.* **167**, 141-144.

Risinger C. y Bennett M.K. (1999). Differential phosphorylation of syntaxin and synaptosome-associated protein of 25 kDa (SNAP-25) isoforms. *J. Neurochem.* **72**, 614-624.

- Robbins M.J., Ciruela F., Rhodes A. y McIlhinney R.A. (1999). Characterization of the dimerization of metabotropic glutamate receptors using an N-terminal truncation of mGluR1 α . *J. Neurochem.* **72**, 2539-2547.
- Roche K.W., Tu J.C., Petralia R.S., Xiao B., Wenthold R.J. y Worley P.F. (1999). Homer 1b regulates the trafficking of group I metabotropic glutamate receptors. *J. Biol. Chem.* **274**, 25953-25957.
- Rodrigues S.M., Bauer E.P., Farb C.R., Schafe G.E. y LeDoux J.E. (2002). The group I metabotropic glutamate receptor mGluR5 is required for fear memory formation and long-term potentiation in the lateral amygdala. *J. Neurosci.* **22**, 5219-5229.
- Rodríguez-Moreno A., Sistiaga A., Lerma J. y Sánchez-Prieto J. (1998). Switch from facilitation to inhibition of excitatory synaptic transmission by group I mGluR desensitization. *Neuron* **21**, 1477-1486.
- Roisin M.P., Leinekugel X. y Tremblay E. (1997). Implication of protein kinase C in mechanisms of potassium-induced long-term potentiation in rat hippocampal slices. *Brain Res.* **745**, 222-230.
- Romano C., Sesma M.A., McDonald C.T., O'Malley K., Van den Pol A.N. y Olney J.W. (1995). Distribution of metabotropic glutamate receptor mGluR5 immunoreactivity in rat brain. *J. Comp. Neurol.* **355**, 455-469.
- Romano C., Yang W.L. y O'Malley K.L. (1996). Metabotropic glutamate receptor 5 is a diffusible-linked dimer. *J. Biol. Chem.* **45**, 28612-28616.
- Romano C., Miller J.K., Hyrc K., Dikranian S., Mennerick S., Takeuchi Y., Goldberg M.P. y O'Malley K.L. (2001). Covalent and noncovalent interactions mediate metabotropic glutamate receptor mGlu5 dimerization. *Mol. Pharmacol.* **59**, 46-53
- Rosato-Siri M.D. y Uchitel O.D. (1999). Calcium channels coupled to neurotransmitter release at neonatal rat neuromuscular junctions. *J. Physiol.* **514**, 533-540.
- Rosato-Siri M.D., Piriz J., Tropper B.A. y Uchitel O.D. (2002). Differential Ca²⁺-dependence of transmitter release mediated by P/Q- and N-type calcium channels at neonatal rat neuromuscular junctions. *Eur. J. Neurosci.* **15**, 1874-1880.
- Ross F.M., Cassidy J., Wilson M. y Davies S.N. (2000). Developmental regulation of hippocampal excitatory synaptic transmission by metabotropic glutamate receptors. *Br. J. Pharmacol.* **131**, 453-464
- Rossie S. (1999). Regulation of voltage-sensitive sodium and calcium channels by phosphorylation. *Adv. Second Messenger Phosphoprotein Res.* **33**, 23-48.
- Rubio I., Torres M., Miras-Portugal M.T. y Sanchez-Prieto J. (1991). Ca²⁺-independent release of glutamate during in vitro anoxia in isolated nerve terminals. *J. Neurochem.* **57**, 1159-1164.

Sahara Y. y Westbrook G.L. (1993). Modulation of calcium currents by a metabotropic glutamate receptor involves fast and slow kinetic components in cultured hippocampal neurons. *J. Neurosci.* **13**, 3041-3050.

Saito H., Kimura M., Inanobe A., Ohe T. y Kurachi Y. (2002). An N-terminal sequence specific for a novel Homer1 isoform controls trafficking of group I metabotropic glutamate receptor in mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **296**, 523-529.

Sangameswaran L., Delgado S.G., Fish L.M., Koch B.D., Jakeman L.B., Stewart G.R., Sze P., Hunter J.C., Eglen R.M. y Herman R.C. (1996). Structure and function of a novel voltage-gated, tetrodotoxin-resistant sodium channel specific to sensory neurons. *J. Biol. Chem.* **271**, 5953-5956.

Sansig G., Bushell T.J., Clarke V.R., Rozov A., Burnashev N., Portet C., Gasparini F., Schmutz M., Klebs K., Shigemoto R., Flor P.J., Kuhn R., Knoepfel T., Schroeder M., Hampson D.R., Collett V.J., Zhang C., Duvoisin R.M., Collingridge G.L. y van Der Putten H. (2001). Increased seizure susceptibility in mice lacking metabotropic glutamate receptor 7. *J. Neurosci.* **21**, 8734-8745.

Saugstad J.A., Kinzie J.M., Mulvihill E.R., Segerson T.P. y Westbrook G.L. (1994). Cloning and expression of a new member of the L-2-amino-4-phosphonobutyric acid-sensitive class of metabotropic glutamate receptors. *Mol. Pharmacol.* **45**, 367-372.

Saugstad J.A., Kinzie J.M., Shimonara M.M., Segerson T.P. y Westbrook G.L. (1997). Cloning and expression of a rat metabotropic glutamate receptor 8 reveals distinct pharmacological profile. *Mol. Pharmacol.* **51**, 119-125.

Scanziani M., Salin P.A., Vogt K.E., Malenka R.C. y Nicoll R.A. (1997). Use-dependent increases in glutamate concentration activate presynaptic metabotropic glutamate receptors. *Nature* **385**, 630-634.

Schaffhauser H., Cartmell J., Jakob-Rotne R. y Mutel V. (1997). Pharmacological characterization of metabotropic glutamate receptors linked to the inhibition of adenylate cyclase activity in rat striatal slices. *Neuropharmacol.* **36**, 933-940.

Schmalzing G. (1985). Mechanism of depolarization of rat cortical synaptosomes at submicromolar external Ca^{2+} activity. *Biochem. J.* **225**, 671-680.

Schoepp D.D., Bockaert J. y Sladeczek F. (1990). Pharmacological and functional characteristics of metabotropic excitatory aminoacid receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* **11**, 508-515.

Schoepp D.D. y Johnson B.G. (1993). Pharmacology of metabotropic glutamate receptor inhibition of cyclic AMP formation in the adult rat hippocampus. *Neurochem. Int.* **22**, 277-283.

Schoepp D.D., Jane D.E. y Monn J.A. (1999). Pharmacological agents acting at subtypes of metabotropic glutamate receptors. *Neuropharmacol.* **38**, 1431-1476.

Scholz K.P. y Miller R.J. (1995). Developmental changes in presynaptic calcium channels coupled to glutamate release in cultured rat hippocampal neurons. *J. Neurosci.* **15**, 4612-4617.

Scholz A. y Vogel W. (2000). Tetrodotoxin-resistant action potentials in dorsal root ganglion neurons are blocked by local anesthetics. *Pain* **89**, 47-52.

Schrader L.A., Anderson A.E., Mayne A., Pfaffinger P.J. y Sweatt J.D. (2002). PKA modulation of Kv4.2-encoded A-type potassium channels requires formation of a supramolecular complex. *J. Neurosci.* **22**, 10123-10133.

Schwartz N.E. y Alford S. (2000). Physiological activation of presynaptic metabotropic glutamate receptors increases intracellular calcium and glutamate release. *J. Neurophysiol.* **84**, 415-427.

Scott I.D. y Nicholls D.G. (1980). Energy transduction in intact synaptosomes. Influence of plasma-membrane depolarization on the respiration and membrane potential of internal mitochondria determined in situ. *Biochem. J.* **186**, 21-33.

Semyanov A. y Kullmann D.M. (2000). Modulation of GABAergic signaling among interneurons by metabotropic glutamate receptors. *Neuron* **25**, 663-672.

Servitja J.M., Masgrau R., Sarri E. y Picatoste F. (1999). Group I metabotropic glutamate receptors mediate phospholipase D stimulation in rat cultured astrocytes. *J. Neurochem.* **72**, 1441-1447.

Sheng Z.H., Yokoyama C.T. y Catterall W.A. (1997). Interaction of the synprint site of N-type Ca²⁺ channels with the C2B domain of synaptotagmin I. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**, 5405-5410.

Sheng Z.H., Westenbroek R.E. y Catterall W.A. (1998). Physical link and functional coupling of presynaptic calcium channels and the synaptic vesicle docking/fusion machinery. *J. Bioenerg. Biomembr.* **30**, 335-345.

Shigemoto R., Nomura S., Ohishi H., Sugihara H., Nakanishi S. y Mizuno N. (1993). Immunohistochemical localisation of metabotropic glutamate receptor, mGluR5, in the rat brain. *Neurosci. Lett.* **163**, 53-57.

Shigemoto R., Abe T., Nomura S., Nakanishi S. y Hirano T. (1994). Antibodies inactivating mGluR1 metabotropic glutamate receptor block long-term depression in cultured Purkinje cells. *Neuron* **12**, 1245-1255.

Shigemoto R., Kulik A., Roberts J.D., Ohishi H., Nusser Z., Kaneko T. y Somogyi P. (1996). Target-cell-specific concentration of a metabotropic glutamate receptor in the presynaptic active zone. *Nature* **381**, 523-525.

Shigemoto R., Kinoshita A., Wada E., Nomura S., Ohishi H., Takada M., Flor P.J., Neki A., Abe T., Nakanishi S. y Mizuno N. (1997). Differential presynaptic localization of metabotropic glutamate receptor subtypes in the rat hippocampus. *J. Neurosci.* **17**, 7503-7522.

Shinomura T., del Rio E., Breen K.C., Downes C.P. y McLaughlin M. (2000). Activation of phospholipase D by metabotropic glutamate receptor agonists in rat cerebrocortical synaptosomes. *Br. J. Pharmacol.* **131**, 1011-1018.

Sihra T.S., Bogonez E. y Nicholls D.G. (1992). Localized Ca^{2+} entry preferentially effects protein dephosphorylation, phosphorylation, and glutamate release. *J. Biol. Chem.* **267**, 1983-1989.

Sillevis P., Kinoshita A., De Leeuw B., Moll W., Coesmans M., Jaarsma D., Henzen-Logmans S., Vecht C., De Zeeuw C., Sekiyama N., Nakanishi S. y Shigemoto R. (2000). Paraneoplastic cerebellar ataxia due to autoantibodies against a glutamate receptor. *N. Engl. J. Med.* **342**, 21-27.

Sims P.J., Waggoner A.S., Wang C.H. y Hoffman J.F. (1974). Studies on the mechanism by which cyanine dyes measure membrane potential in red blood cells and phosphatidylcholine vesicles. *Biochemistry* **13**, 3315-3330.

Sistiaga A. y Sánchez-Prieto J. (2000a). Protein phosphatase 2B inhibitors mimic the action of arachidonic acid and prolong the facilitation of glutamate release by group I mGlu receptors. *Neuropharmacol.* **39**, 1544-1553.

Sistiaga A. y Sánchez-Prieto J. (2000b). Protein phosphatase 1 and 2A inhibitors prolong the switch in the control of glutamate release by group I metabotropic glutamate receptors: characterization of the inhibitory pathway. *J. Neurochem.* **75**, 1566-1574.

Skeberdis V.A., Lan J., Opitz T., Zheng X., Bennett M.V. y Zukin R.S. (2001). mGluR1-mediated potentiation of NMDA receptors involves a rise in intracellular calcium and activation of protein kinase C. *Neuropharmacol.* **40**, 856-865.

Sladeczek F., Pin J.P., Recasens M., Bockaert J. y Weiss S. (1985). Glutamate stimulates inositol phosphate formation in striatal neurons. *Nature* **317**, 717-719.

Sleeper A.A., Cummins T.R., Dib-Hajj S.D., Hormuzdiar W., Tyrrell L., Waxman S.G., Black J.A. (2000) Changes in expression of two tetrodotoxin-resistant sodium channels and their currents in dorsal root ganglion neurons after sciatic nerve injury but not rhizotomy. *J. Neurosci.* **20**, 7279-7289.

Smith R.D. y Goldin A.L. (1997). Phosphorylation at a single site in the rat brain sodium channel is necessary and sufficient for current reduction by protein kinase A. *J. Neurosci.* **17**, 6086-6093.

Snead O.C., Banerjee P.K., Burnham M. y Hampson D. (2000). Modulation of absence seizures by the GABA(A) receptor: a critical role for metabotropic glutamate receptor 4 (mGluR4). *J. Neurosci.* **20**, 6218-6224.

Snelling R. y Nicholls D. (1985). Calcium efflux and cycling across the synaptosomal plasma membrane. *Biochem. J.* **226**, 225-231.

- Son H., Madelian V. y Carpenter D.O. (1996). The translocation and involvement of protein kinase C in mossy fiber-CA3 long-term potentiation in hippocampus of the rat brain. *Brain Res.* **739**, 282-292.
- Sorensen S.D., Macek T.A., Cai Z., Saugstad J.A. y Conn P.J. (2002). Dissociation of protein kinase-mediated regulation of metabotropic glutamate receptor 7 (mGluR7) interactions with calmodulin and regulation of mGluR7 function. *Mol. Pharmacol.* **61**, 1303-1312.
- Stea A., Soong T.W. y Snutch T.P. (1995). Determinants of PKC-dependent modulation of a family of neuronal calcium channels. *Neuron* **15**, 929-940.
- Stefani A., Spadoni F. y Bernardi G. (1996). L-AP4 inhibits high voltage-activated Ca^{2+} currents in pyramidal cortical neurones. *Neuroreport* **7**, 421-424.
- Stefani A., Spadoni F. y Bernardi G. (1998a). Group III metabotropic glutamate receptor agonists modulate high voltage-activated Ca^{2+} currents in pyramidal neurons of the adult rat. *Exp. Brain. Res.* **119**, 237-244.
- Stefani A., Spadoni F. y Bernardi G. (1998b). Group I mGluRs modulate calcium currents in rat GP: functional implications. *Synapse* **30**, 424-432.
- Steffens H., Hoheisel U., Eek B. y Mense S. (2001). Tetrodotoxin-resistant conductivity and spinal effects of cutaneous C-fibre afferents in the rat. *Neurosci. Res.* **39**, 413-419.
- Stern-Bach Y., Bettler B., Hartley M., Sheppard P.O., O'Hara P.J. y Heinemann S.F. (1994). Agonist selectivity of glutamate receptors is specified by two domains structurally related to bacterial aminoacid-binding proteins. *Neuron* **13**, 1345-1357.
- Stevens C.F. y Sullivan J.M. (1998). Regulation of the readily releasable vesicle pool by protein kinase C. *Neuron* **21**, 885-893.
- Stinehelfer S., Vruwink M. y Burette A. (2000). Immunolocalization of mGluR1 α in specific populations of local circuit neurons in the cerebral cortex. *Brain Res.* **861**, 37-44.
- Stowell J.N. y Craig A.M. (1999). Axon/dendrite targeting of metabotropic glutamate receptors by their cytoplasmic carboxy-terminal domains. *Neuron* **22**, 525-536.
- Suchak S.K., Baloyianni N.V., Perkinton M.S., Williams R.J., Meldrum B.S. y Rattray M. (2003). The 'glial' glutamate transporter, EAAT2 (Glt-1) accounts for high affinity glutamate uptake into adult rodent nerve endings. *J. Neurochem.* **84**, 522-32.
- Takahashi K., Tsuchida K., Tanabe Y., Masu M. y Nakanishi S. (1993). Role of the large extracellular domain of metabotropic glutamate receptors in agonist selectivity determination. *J. Biol. Chem.* **268**, 19341-19345.
- Takahashi T. y Momiyama A. (1993). Different types of calcium channels mediate central synaptic transmission. *Nature* **366**, 156-158.

Takahashi T., Forsythe I.D., Tsujimoto T., Barnes-Davies M. y Onodera K. (1996). Presynaptic calcium current modulation by a metabotropic glutamate receptor. *Science* **274**, 594-597.

Tamaru Y., Nomura S., Mizuno N. y Shigemoto R. (2001). Distribution of metabotropic glutamate receptor mGluR3 in the mouse CNS: differential location relative to pre- and postsynaptic sites. *Neuroscience* **106**, 481-503.

Tanabe Y., Masu M., Ishii T., Shigemoto R. y Nakanishi S. (1992). A family of metabotropic glutamate receptors. *Neuron* **8**, 169-179.

Tanabe Y., Nomura A., Masu M., Shigemoto R., Mizuno N. y Nakanishi S. (1993). Signal transduction, pharmacological properties, and expression patterns of two rat metabotropic glutamate receptors, mGluR3 and mGluR4. *J. Neurosci.* **13**, 1372-1378.

Tanaka C. y Nishizuka Y. (1994). The protein kinase C family for neuronal signaling. *Annu. Rev. Neurosci.* **17**, 551-567.

Tang E., Yip P.K., Chapman A.G., Jane D.E. y Meldrum B.S. (1997). Prolonged anticonvulsant action of glutamate metabotropic receptor agonists in inferior colliculus of genetically epilepsy-prone rats. *Eur. J. Pharmacol.* **327**, 109-115.

Terrian D.M., Ways D.K. y Gannon R.L. (1991). A presynaptic role for protein kinase C in hippocampal mossy fiber synaptic transmission. *Hippocampus* **1**, 303-314.

Testa C.M., Friberg I.K., Weiss S.W. y Standaert D.G. (1998). Immunohistochemical localization of metabotropic glutamate receptors mGluR1a and mGluR2/3 in the rat basal ganglia. *J. Comp. Neurol.* **390**, 5-19.

Thesleff S. (1980). Aminopyridines and synaptic transmission. *Trends Neurosci.* **5**, 1413-1419.

Thomas N.K., Wright R.A., Howson P.A., Kingston A.E., Schoepp D.D. y Jane D.E. (2001). (S)-3,4-DCPG, a potent and selective mGlu8a receptor agonist, activates metabotropic glutamate receptors on primary afferent terminals in the neonatal rat spinal cord. *Neuropharmacol.* **40**, 311-318.

Thomsen C. (1996). Metabotropic glutamate receptor subtype 1A activates adenylate cyclase when expressed in baby hamster kidney cells. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* **20**, 709-726.

Thomsen C., Pekhletski R., Haldeman B., Gilbert T.A., O'Hara P. y Hampson D.R. (1997). Cloning and characterization of a metabotropic glutamate receptor, mGluR4b. *Neuropharmacol.* **36**, 21-30.

Tibbs G.R., Dolly J.O. y Nicholls D.G. (1989a). Dendrotoxin, 4-aminopyridine, and beta-bungarotoxin act at common loci but by two distinct mechanisms to induce Ca²⁺-dependent release of glutamate from guinea-pig cerebrocortical synaptosomes. *J. Neurochem.* **52**, 201-206.

Tibbs G.R., Barrie A.P., Van Mieghem F.J., McMahon H.T. y Nicholls D.G. (1989b). Repetitive action potentials in isolated nerve terminals in the presence of 4-aminopyridine: effects on cytosolic free Ca^{2+} and glutamate release. *J. Neurochem.* **53**, 1693-1699.

Tibbs G.R., Dolly J.O. y Nicholls D.G. (1996). Evidence for the induction of repetitive action potentials in synaptosomes by K^+ -channel inhibitors: an analysis of plasma membrane ion fluxes. *J. Neurochem.* **67**, 389-397.

Toescu E.C. (1999). Activity of voltage-operated calcium channels in rat cerebellar granule neurons and neuronal survival. *Neuroscience* **94**, 561-570.

Tones M.A., Bendali N., Flor P.J., Knopfel T. y Kuhn R. (1995). The agonist selectivity of a class III metabotropic glutamate receptor, human mGluR4a, is determined by the N-terminal extracellular domain. *Neuroreport* **7**, 117-120.

Trudeau L.E., Emery D.G. y Haydon P.G. (1996). Direct modulation of the secretory machinery underlies PKA-dependent synaptic facilitation in hippocampal neurons. *Neuron* **17**, 789-797.

Trudeau L.E., Fang Y. y Haydon P.G. (1998). Modulation of an early step in the secretory machinery in hippocampal nerve terminals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**, 7163-7168.

Tsuchiya D., Kunishima N., Kamiya N., Jingami H. y Morikawa K. (2002). Structural views of the ligand-binding cores of a metabotropic glutamate receptor complexed with an antagonist and both glutamate and Gd^{3+} . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 2660-2665.

Tsuji Y., Shimada Y., Takeshita T., Kajimura N., Nomura S., Sekiyama N., Otomo J., Usukura J., Nakanishi S. y Jingami H. (2000). Cryptic dimer interface and domain organization of the extracellular region of metabotropic glutamate receptor subtype 1. *J. Biol. Chem.* **275**, 28144-28151.

Turner T.J. y Dunlap K. (1995). Pharmacological characterization of presynaptic calcium channels using subsecond biochemical measurements of synaptosomal neurosecretion. *Neuropharmacol.* **34**, 1469-1478.

Turner K.M., Burgoyne R.D. y Morgan A. (1999). Protein phosphorylation and the regulation of synaptic membrane traffic. *Trends Neurosci.* **22**, 459-464.

Tyler E.C. y Lovinger D.M. (1995). Metabotropic glutamate receptor modulation of synaptic transmission in corticostriatal co-cultures: role of calcium influx. *Neuropharmacol.* **34**, 939-952.

Van Wagenen, B., Artman L., Hammerland L., Hung B., Johnson J., Krapcho K., Levinthal C., Logan M., Moe S., Mueller A., Simin R., Smith D., Storjohann L. y Stormann T. (1998). In vitro pharmacological characterizations of NPS2390: a highly potent and selective, non-competitive antagonist of group I metabotropic glutamate receptors. *Soc. Neurosci. Abst.* **24**, 576.

Vardi N. y Morigiwa K. (1997). ON cone bipolar cells in rat express the metabotropic receptor mGluR6. *Vis. Neurosci.* **14**, 789-794.

Vardi N., Duvoisin R., Wu G. y Sterling P. (2000). Localization of mGluR6 to dendrites of ON bipolar cells in primate retina. *J. Comp. Neurol.* **423**, 402-412.

Vázquez E., Budd D.C., Herrero I., Nicholls D.G. y Sanchez-Prieto J. (1995). Co-existence and interaction between facilitatory and inhibitory metabotropic glutamate receptors and the inhibitory adenosine A1 receptor in cerebrocortical nerve terminals. *Neuropharmacol.* **34**, 919-927.

Vázquez E. y Sánchez-Prieto J. (1997). Presynaptic modulation of glutamate release targets different calcium channels in rat cerebrocortical nerve terminals. *Eur. J. Neurosci.* **9**, 2009-2018.

Vigers A.J. y Pfenninger K.H. (1991). N-type and L-type calcium channels are present in nerve growth cones. Numbers increase on synaptogenesis. *Dev. Brain Res.* **60**, 197-203.

Vignes M., Clarke V.R., Davies C.H., Chambers A., Jane D.E., Watkins J.C. y Collingridge G.L. (1995). Pharmacological evidence for an involvement of group II and group III mGluRs in the presynaptic regulation of excitatory synaptic responses in the CA1 region of rat hippocampal slices. *Neuropharmacol.* **34**, 973-982.

Villacres E.C., Wong S.T., Chavkin C. y Storm D.R. (1998). Type I adenylyl cyclase mutant mice have impaired mossy fiber long-term potentiation. *J. Neurosci.* **18**, 3186-3194.

Wada E., Shigemoto R., Kinoshita A., Ohishi H. y Mizuno N. (1998). Metabotropic glutamate receptor subtypes in axon terminals of projection fibers from the main and accessory olfactory bulbs: a light and electron microscopic immunohistochemical study in the rat. *J. Comp. Neurol.* **393**, 493-504.

Wang J.K., Walaas S.I., Sihra T.S., Aderem A. y Greengard P. (1989). Phosphorylation and associated translocation of the 87-kDa protein, a major protein kinase C substrate, in isolated nerve terminals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **86**, 2253-2256.

Wang J.H. y Feng D.P. (1992). Postsynaptic protein kinase C essential to induction and maintenance of long-term potentiation in the hippocampal CA1 region. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**, 2576-2580.

Wang Y., Qin Z.H., Nakai M. y Chase T.N. (1997). Glutamate metabotropic receptor agonist 1S,3R-ACPD induces internucleosomal DNA fragmentation and cell death in rat striatum. *Brain Res.* **772**, 45-56.

Watabe A.M., Carlisle H.J. y O'Dell T.J. (2002). Postsynaptic induction and presynaptic expression of group 1 mGluR-dependent LTD in the hippocampal CA1 region. *J. Neurophysiol.* **87**, 1395-1403.

Waters J. y Smith S.J. (2000). Phorbol esters potentiate evoked and spontaneous release by different presynaptic mechanisms. *J. Neurosci.* **20**, 7863-7870.

Weisskopf M.G., Castillo P.E., Zalutsky R.A. y Nicoll R.A. (1994). Mediation of hippocampal mossy fiber long-term potentiation by cyclic AMP. *Science* **265**, 1878-1882.

Wermuth C.G., Mann A., Schoenfelder A., Wright R.A., Johnson B.G., Burnett J.P., Mayne N.G. y Schoepp D.D. (1996). (2S,4S)-2-amino-4-(4,4-diphenylbut-1-yl)-pentane-1,5-dioic acid: a potent and selective antagonist for metabotropic glutamate receptors negatively linked to adenylate cyclase. *J. Med. Chem.* **39**, 814-816.

Wheeler D.B., Randall A. y Tsien R.W. (1994). Roles of N-type and Q-type Ca^{2+} channels in supporting hippocampal synaptic transmission. *Science* **264**, 107-111.

Wheeler D.B., Randall A. y Tsien R.W. (1996). Changes in action potential duration alter reliance of excitatory synaptic transmission on multiple types of Ca^{2+} channels in rat hippocampus. *J. Neurosci.* **16**, 2226-2237.

Wittmann M., Marino M.J., Bradley S.R. y Conn P.J. (2001a). Activation of group III mGluRs inhibits GABAergic and glutamatergic transmission in the substantia nigra pars reticulata. *J. Neurophysiol.* **85**, 1960-1968.

Wittmann M., Hubert G.W., Smith Y. y Conn P.J. (2001b). Activation of metabotropic glutamate receptor 1 inhibits glutamatergic transmission in the substantia nigra pars reticulata. *Neuroscience* **105**, 881-889.

Wu S., Wright R.A., Rockey P.K., Burgett S.G., Arnold J.S., Rosteck P.R., Johnson B.G., Schoepp D.D. y Belagaje R.M. (1998a). Group III human metabotropic glutamate receptors 4, 7 and 8: molecular cloning, functional expression, and comparison of pharmacological properties in RGT cells. *Mol. Brain Res.* **53**, 88-97.

Wu L.G., Borst J.G. y Sakmann B. (1998b). R-type Ca^{2+} currents evoke transmitter release at a rat central synapse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**, 4720-4725.

Wu L.G., Westenbroek R.E., Borst J.G., Catterall W.A. y Sakmann B. (1999). Calcium channel types with distinct presynaptic localization couple differentially to transmitter release in single calyx-type synapses. *J. Neurosci.* **19**, 726-736.

Wu X.S. y Wu L.G. (2001). Protein kinase C increases the apparent affinity of the release machinery to Ca^{2+} by enhancing the release machinery downstream of the Ca^{2+} sensor. *J. Neurosci.* **21**, 7928-7936.

Xiao B., Tu J.C., Petralia R.S., Yuan J.P., Doan A., Breder C.D., Ruggiero A., Lanahan A.A., Wenthold R.J. y Worley P.F. (1998). Homer regulates the association of group 1 metabotropic glutamate receptors with multivalent complexes of homer-related, synaptic proteins. *Neuron* **21**, 707-716.

Yip P.K., Meldrum B.S. y Rattray M. (2001). Elevated levels of group-III metabotropic glutamate receptors in the inferior colliculus of genetically epilepsy-prone rats

following intracollicular administration of L-serine-O-phosphate. *J. Neurochem.* **78**, 13-23.

Yu S.P., Sensi S.L., Canzoniero L.M., Buisson A. y Choi D.W. (1997). Membrane-delimited modulation of NMDA currents by metabotropic glutamate receptor subtypes 1/5 in cultured mouse cortical neurons. *J. Physiol.* **499**, 721-732.

Zamponi G.W., Bourinet E., Nelson D., Nargeot J. y Snutch T.P. (1997). Crosstalk between G proteins and protein kinase C mediated by the calcium channel $\alpha 1$ subunit. *Nature* **385**, 442-446.

Zhang J.F., Ellinor P.T., Aldrich R.W. y Tsien R.W. (1996). Multiple structural elements in voltage-dependent Ca^{2+} channels support their inhibition by G proteins. *Neuron* **17**, 991-1003.

Zhong H., Yokoyama C.T., Scheuer T. y Catterall W.A. (1999). Reciprocal regulation of P/Q-type Ca^{2+} channels by SNAP-25, syntaxin and synaptotagmin. *Nat. Neurosci.* **2**, 939-941.