

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR IV



TESIS DOCTORAL

**POTENCIACIÓN DE LA LIBERACIÓN DE
GLUTAMATO POR LOS RECEPTORES
METABOTRÓPICOS DE GLUTAMATO DE TIPO 7
Y β -ADRENÉRGICOS**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

José Javier Ferrero López

Directores

José Sánchez-Prieto Borja
David Bartolomé Martín

Madrid, 2016

©José J Ferrero López, 2016

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular IV

**Potenciación de la liberación de glutamato por los
receptores metabotrópicos de glutamato de tipo 7
y β -adrenérgicos.**

Memoria presentada por: D. José Javier Ferrero López

Director de Tesis: Dr. José Sánchez-Prieto Borja

Co-director de Tesis: Dr. David Bartolomé Martín

Madrid, 2016

Vº Bº Director:

Vº Bº Co-director:

José Sánchez-Prieto Borja

David Bartolomé Martín

<u>RESUMEN</u>	10
<u>SUMMARY</u>	16
Concluding remarks	23
<u>ABREVIATURAS</u>	24
I. <u>INTRODUCCIÓN</u>	26
1. <u>SINAPSIS GLUTAMATÉRGICAS</u>	26
1.1. Sinapsis químicas	26
1.2. Glutamato: síntesis y transporte	28
1.3. El terminal presináptico	28
1.4. Liberación de glutamato	31
Mecanismos moleculares de exocitosis	33
1.5. Plasticidad sináptica	38
2. <u>RECEPTORES DE LAS SINAPSIS GLUTAMATÉRGICAS</u>	41
2.1. Receptores ionotrópicos	41
2.2. Receptores acoplados a proteínas G	43
2.2.1. Receptores metabotrópicos de glutamato	43
Receptores metabotrópicos del grupo III: receptores mGlu7	45
Isoformas y localización	45
Estructura	47
Interacciones y fosforilaciones	48
Farmacología	49
Modulación de la liberación de glutamato	51
Inhibición de la liberación	51
Potenciación de la liberación	54
Plasticidad sináptica	55
Funciones fisiológicas y patológicas	56
2.2.2. Heteroreceptores	58
Receptores β -adrenérgicos	59
Norepinefrina	59
Isoformas y localización	60
Estructura, regulación y farmacología	60
Modulación de la liberación de glutamato	61
Funciones fisiológicas y patológicas	63

3. <u>MODULACIÓN DE LA LIBERACIÓN DE GLUTAMATO POR MECANISMOS DE SEÑALIZACIÓN INTRACELULARES</u>	64
3.1. Mecanismos de señalización mediados por AMP cíclico	64
3.1.1. Proteínas quinasa A	64
Estructura y activación	65
Funciones en neurotransmisión	65
3.1.2. Epac (cAMP-GEF)	67
Isoformas y localización	67
Estructura y activación	68
Interacciones	70
Farmacología	70
Funciones en exocitosis y neurotransmisión	70
Funciones fisiológicas y patológicas	73
3.1.3. Proteínas RIM	74
Isoformas	74
Expresión cerebral y localización subcelular	74
Estructura	75
Interacciones	75
Fosforilaciones	76
Funciones en neurotransmisión	77
3.2. Mecanismos de señalización mediados por DAG	80
3.2.1. Fosfolipasa C	80
Isoformas y localización	82
Estructura y regulación	82
3.2.2. Funciones del PIP ₂ e IP ₃ en neurotransmisión	84
3.2.3. Proteínas quinasa C	85
Isoformas, estructura y activación	85
Funciones en neurotransmisión	86
3.2.4. Proteínas Munc13	86
Isoformas	87
Localización cerebral	87
Estructura	87
Interacciones	87
Funciones en neurotransmisión	88
II. <u>OBJETIVOS</u>	91

III. <u>MATERIALES Y MÉTODOS</u>	92
1. <u>MATERIALES</u>	92
1.1. Material biológico	92
1.2. Reactivos y aparatos	92
Reactivos y materiales	83
Fármacos	95
Anticuerpos	96
Medios	97
Equipos y aparatos	98
2. <u>MÉTODOS</u>	100
2.1. Preparación de sinaptosomas	100
2.2. Liberación de glutamato	102
2.3. Determinación de segundos mensajeros	105
2.3.1. Determinación de los niveles intracelulares de IP ₁ como indicador de la actividad de PLC	105
2.3.2. Determinación de los niveles intracelulares de cAMP	107
2.4. Translocación a membrana de la proteína Munc13	109
2.5. Co-inmunoprecipitación	111
2.6. Cultivos celulares primarios	114
2.6.1. Cultivo celular y transfección de neuronas corticales	114
2.6.2. Cultivos autópticos hipocampales	117
2.7. Inmunofluorescencia	120
2.7.1. Inmunofluorescencia en sinaptosomas	120
2.7.2. Inmunocitofluorescencia	121
2.7.3. Inmunohistofluorescencia	122
2.8. Microscopía electrónica de transmisión	123
2.8.1. Microscopía electrónica en sinaptosomas	124
2.8.2. Inmunomicroscopía electrónica con partículas de oro en rodajas de corteza cerebral	125
2.9. Electrofisiología	125
2.10. Imagen en cultivos primarios con vGlut1-pHlorina	128
2.10.1. Estudios de la liberación espontánea	129
2.10.2. Estudios de la liberación inducida por despolarización	132
2.10.3. Estudios del tamaño de los grupos de vesículas sinápticas	133
2.11. Genotipado	134

IV. <u>RESULTADOS</u>	137
1. <u>POTENCIACIÓN DE LA LIBERACIÓN DE GLUTAMATO POR RECEPTORES mGLU7</u>	137
1.1. Potenciación de la liberación de glutamato por receptores mGlu7 en sinaptosomas de corteza cerebral	137
1.1.1. Los inhibidores del metabolismo de DAG reducen el tiempo necesario para el desarrollo de la potenciación por receptores mGlu7	137
1.1.2. La activación prolongada de los receptores mGlu7 aumenta la interacción entre las proteínas Munc13 y RIM	140
1.1.3. La activación prolongada de los receptores mGlu7 incrementa el número de SVs cercanas a la zona activa	142
1.1.4. Potenciación de la liberación de glutamato por receptores mGlu7 en terminales con canales de calcio de tipo N y P/Q	143
1.1.4.1. La potenciación de la liberación de glutamato por el pretratamiento con L-AP4 es específica de la activación de los receptores mGlu7 e independiente de los VDCC	144
1.1.4.2. En el hipocampo, la potenciación dependiente de mGlu7 se observa tanto en botones sinápticos con canales tipo N, como en botones con canales tipo P/Q	145
1.1.4.3. En la corteza cerebral, la potenciación dependiente de mGlu7 sólo se observa en botones sinápticos con canales de tipo N	149
1.2. Estudios de electrofisiología de la potenciación de la liberación de glutamato por receptores metabotrópicos de tipo III en cultivos autápticos de neuronas hipocampales	146
1.2.1. Reversión de la inhibición de la liberación inducida por despolarización por la activación prolongada de los receptores metabotrópicos de tipo III	151
1.2.2. La activación prolongada de los receptores metabotrópicos del grupo III incrementa la frecuencia de la liberación espontánea	154

2.	<u>POTENCIACIÓN DE LA LIBERACIÓN DE GLUTAMATO POR RECEPTORES β-ADRENÉRGICOS Y EPAC</u>	160
2.1.	Mecanismo de potenciación de la liberación de glutamato por receptores β -adrenérgicos en sinaptosomas de corteza cerebral	160
2.1.1.	Potenciación de la liberación de glutamato independiente de la proteína quinasa A	160
2.1.2.	Los receptores β -adrenérgicos potencian la liberación de glutamato por mecanismos independientes de PKA, que implican la proteína Epac	163
2.1.3.	Los receptores β -adrenérgicos y de la proteína Epac activan la fosfolipasa C y proteínas dependientes de DAG	163
2.1.4.	La activación de los β -AR y de la proteína Epac promueve la translocación a la membrana plasmática de la proteína Munc13-1	170
2.1.5.	La activación de los β -AR y de la proteína Epac incrementan la interacción entre Munc13-RIM1 y Rab3a-RIM1	172
2.1.6.	La activación de los β -AR y de la proteína Epac promueven la aproximación de las SVs a la membrana de la zona activa presináptica	170
2.2.	Potenciación de la liberación de glutamato por receptores β -adrenérgicos y Epac en cultivos primarios de neuronas corticales	177
2.2.1.	Caracterización de la expresión de la vGlu1-pHluorina y mCherry bajo el promotor de la CaMKII	177
2.2.2.	Estudio de la liberación espontánea	180
2.2.3.	Estudio de la liberación inducida por despolarización	182
2.2.4.	Estudio del tamaño de los grupos de vesículas sinápticas	187
3.	<u>SEÑALIZACIÓN CRUZADA DE LOS RECEPTORES mGLU7 y β-ADRENÉRGICOS</u>	188
3.1.	Co-expresión e interacción de los receptores mGlu7 y β -AR	189
3.2.	La activación breve de los mGlu7 inhibe la potenciación de la liberación de glutamato dependiente de los receptores β -adrenérgicos	192
3.3.	La inhibición por mGlu7 de la generación de cAMP inducida por los β -AR persiste después del lavado del agonista L-AP4	194
3.4.	Sinergismo entre las vías de potenciación de la liberación dependientes de los receptores mGlu7 y β -AR	196
3.5.	Interacción entre la señalización de los receptores mGlu7 y β -AR en la activación de la PLC y la translocación de Munc13-1	199

V. <u>DISCUSIÓN</u>	201
1. <u>POTENCIACIÓN DE LA LIBERACIÓN POR RECEPTORES mGLU7</u>	201
1.1. Mecanismo	201
1.2. Tiempo de activación	203
1.3. Relación con la expresión de los VDCC en corteza e hipocampo	204
1.4. Potenciación de la transmisión sináptica en cultivos autópticos de hipocampo	208
1.5. Papel fisiológico del mecanismo	212
2. <u>POTENCIACIÓN DE LA LIBERACIÓN POR RECEPTORES β-ADRENÉRGICOS</u>	214
2.1. Modulación de la liberación de glutamato por vías dependientes de cAMP	214
2.2. Receptores β -adrenérgicos en sinápsis glutamatérgicas	216
2.3. Modulación de la maquinaria excitotóxica por la proteína Epac	217
2.4. Estudio de la potenciación de la transmisión sináptica empleando vGlut1-pHluorina en cultivos primarios de corteza cerebral	221
2.5. Papel fisiológico del mecanismo	227
3. <u>MODULACIÓN BIDIRECCIONAL DE LA VÍA DE POTENCIACIÓN DEPENDIENTE DE LOS β-AR Y EPAC POR LOS RECEPTORES mGLU7</u>	228
3.1. Acción inhibitoria de la liberación por receptores mGlu7 en ausencia del agonista	228
3.2. Sinergismo entre las vías de potenciación	231
VI. <u>CONCLUSIONES</u>	233
VII. <u>BIBLIOGRAFÍA</u>	234

ÍNDICE DE FIGURAS

INTRODUCCIÓN

Fig. 1.1. Sinapsis glutamatérgicas.	27
Fig. 1.2. Las zonas activas presinápticas.	32
Fig. 1.3. Mecanismos moleculares de exocitosis	34
Fig. 1.4. Receptores metabotrópicos de tipo	47
Fig. 1.5. Vías de señalización por cAMP, DAG y calcio que modulan la liberación de neurotransmisores	65
Fig. 1.6. Proteínas implicadas en la vía de señalización del cAMP	69
Fig. 1.7. Proteínas implicadas en la vía de señalización por DAG y su metabolismo	81

MATERIALES Y MÉTODOS

Fig. 3.1. Preparación de sinaptosomas	101
Fig. 3.2. Liberación de glutamato	104
Fig. 3.3. Determinación de los niveles intracelulares de IP ₁	108
Fig. 3.4. Translocación a membrana de la proteína Munc13	110
Fig. 3.5. Co-inmunoprecipitación	113
Fig. 3.6. Cultivo celular y transfección de neuronas corticales	116
Fig. 3.7. Cultivo autóptico de neuronas hipocámpales sobre islas de astrocitos	119
Fig. 3.8. vGlut1-pHluorina	129
Fig. 3.9. Protocolos de perfusión de fármacos, de estimulación eléctrica y registros de fluorescencia esquematizados de los experimentos con vGlut1-pHluorina	131
Fig. 3.10. Genotipado	135

RESULTADOS

Fig. 4.1. Los inhibidores del metabolismo del DAG reducen el tiempo necesario para el desarrollo de la potenciación de la liberación de glutamato por el receptor mGlu7	139
Fig. 4.2. La activación prolongada del receptor mGlu7 aumenta la interacción entre las proteínas Munc13-1 y RIM1	141
Fig. 4.3. La activación prolongada del receptor mGlu7 incrementa el número de SVs próximas a la membrana de la zona activa	142
Fig. 4.4. La potenciación de la liberación de glutamato por receptores los mGlu7 es independiente de la actividad de los VDCC de tipo N y P/Q	144
Fig. 4.5. Los receptores mGlu7 co-localizan con los canales de tipo N y P/Q en	

hipocampo y potencian la liberación a $[Ca^{2+}]_e$ de 1.33 y 0.1mM	146
Fig. 4.6. Los receptores mGlu7 co-localizan con los canales de tipo P/Q en hipocampo del ratón KO para los canales de tipo N y sólo potencian la liberación a bajas $[Ca^{2+}]_e$ (0.1mM)	147
Fig. 4.7. Los receptores mGlu7 co-localizan con los canales de tipo N en la corteza cerebral y potencian la liberación a $[Ca^{2+}]_e$ de 1.33 mM	149
Fig. 4.8. Los receptores mGlu7 co-localizan con los canales de tipo P/Q en la corteza cerebral del ratón KO para los canales de tipo N, pero no potencian la liberación	150
Fig. 4.9. La activación prolongada de receptores metabotrópicos del grupo III revierte la inhibición de la liberación inducida en neuronas glutamatérgicas	153
Fig. 4.10. La activación prolongada de receptores metabotrópicos del grupo III revierte la inhibición de la liberación inducida en neuronas GABAérgicas	155
Fig. 4.11. La activación prolongada de los receptores metabotrópicos del grupo III incrementa la liberación espontánea en neuronas glutamatérgicas	157
Fig. 4.12. Incremento de la liberación espontánea en neuronas GABAérgicas por activación prolongada de receptores metabotrópicos del grupo III	159
Fig. 4.13. Incremento del RRP por la activación prolongada de receptores metabotrópicos del grupo III	160
Fig. 4.14. La tetrodotoxina aisla el componente PKA-independiente de la potenciación de la liberación de glutamato por cAMP	162
Fig. 4.15. ... La activación de los receptores β -adrenérgicos y de la proteína Epac incrementa la liberación de glutamato por mecanismos independientes de PKA	164
Fig. 4.16. Los receptores β -adrenérgicos se localizan mayoritariamente a nivel presináptico	167
Fig. 4.17. La activación de los receptores β -adrenérgicos y de la proteína Epac activan la PLC	169
Fig. 4.18. La activación de los receptores β -adrenérgicos y de la proteína Epac transloca la proteína Munc13-1	171
Fig. 4.19. La activación de la proteína Epac incrementa la interacción entre las proteínas Rab3A y RIM1	173
Fig. 4.20. La activación de los receptores β -adrenérgicos aumenta la interacción entre las proteínas Munc13-1 y RIM1.	174
Fig. 4.21. La activación de los receptores β -adrenérgicos y de la proteína Epac incrementa el número de SVs próximas a la membrana de la zona activa	176
Fig. 4.22. Caracterización inmunocitoquímica de las expresión de mCherry y vGlut1-pHluorina en neuronas corticales en cultivo	179
Fig. 4.23. Modulación de la liberación espontánea por activación de los	

receptores β -AR y de la proteína Epac en cultivos primarios de neuronas corticales	181
Fig. 4.24. La activación de los β -AR y de la proteína Epac modula la liberación inducida por despolarización en cultivos primarios de neuronas corticales	184
Fig. 4.25. Modulación del tamaño de los grupos de SVs por los β -AR y Epac en cultivos primarios de neuronas corticales	188
Fig. 4.26. Co-expresión e interacción de los receptores mGlu7a y β_1 -adrenérgicos en terminales presinápticos de corteza cerebral	191
Fig. 4.27. La activación breve de los receptores mGlu7 inhibe la potenciación de la liberación dependiente de los receptores β -adrenérgicos	193
Fig. 4.28. La inhibición por los receptores mGlu7 de la potenciación de la liberación dependiente de los receptores β -adrenérgicos persiste después del lavado del agonista L-AP4	195
Fig. 4.29. Sinergismo entre las vías de potenciación de la liberación dependientes de los receptores mGlu7 y β -adrenérgico	198
Fig. 4.30. Señalización cruzada entre los receptores mGlu7 y β -adrenérgico en la activación de la PLC y la translocación de Munc13-1	200

DISCUSIÓN

Fig. 5.1. Potenciación de la liberación de glutamato dependiente de receptores mGlu7 en terminales con canales de Ca^{2+} de tipo P/Q y N en sinaptosomas de corteza cerebral e hipocampo	205
Fig. 5.2. Activación de los receptores mGlu del grupo III en neuronas de cultivos autápticos de hipocampo	210
Fig. 5.3. Señalización cruzada de los receptores mGlu7 y β -adrenérgicos en la potenciación de la liberación de glutamato	220

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1. Fármacos que modulan los receptores mGlu de tipo III	50
Tabla 1.2. Fármacos que modulan los β -AR	60
Tabla 3.1. Reactivos y materiales	93
Tabla 3.2. Fármacos	95
Tabla 3.3. Anticuerpos	96
Tabla 3.4. Medios	97
Tabla 3.5. Equipos y aparatos	98
Tabla 3.6. Anticuerpos primarios empleados en los ensayos de co-inmunoprecipitación	113
Tabla 3.7. Programas y mezclas de PCR del genotipado	136

POTENCIACIÓN DE LA LIBERACIÓN DE GLUTAMATO POR LOS RECEPTORES METABOTRÓPICOS DE TIPO 7 Y β -ADRENÉRGICOS.

1. Introducción.

La comunicación entre las neuronas es la base del funcionamiento cerebral y se establece por medio de uniones celulares altamente especializadas, denominadas sinapsis. En las sinapsis químicas, esta comunicación es mediada por la liberación de neurotransmisores desde el terminal presináptico, que da lugar a la despolarización de la neurona postsináptica. Los neurotransmisores son almacenados en vesículas sinápticas, que se organizan en torno a la denominada zona activa. Esta región de la membrana presináptica localiza las proteínas necesarias para el proceso de fusión de las vesículas sinápticas, denominadas maquinaria de exocitosis, así como una gran concentración de canales de calcio dependientes de voltaje. La llegada del potencial de acción a la zona activa induce la entrada de calcio a través de estos canales, que activa la maquinaria de exocitosis, provocando la fusión de las vesículas cargadas de neurotransmisores. Para que se produzca la fusión de las vesículas sinápticas, estas deben estar físicamente en contacto con la membrana de la zona activa (proceso de colocación o *docking*) y en un estado molecular competente para la fusión (proceso de preparación o *priming*). Estos procesos dependen de la acción de la maquinaria proteica de exocitosis, que comprende diversas proteínas (Sudhof et al., 2013), como Munc13, una proteína activada por diacilglicerol esencial para el proceso de preparación de las vesículas sinápticas (Rhee et al., 2002), que requiere para su acción su interacción con la proteína RIM (Deng et al., 2001).

Los procesos de plasticidad sináptica, que suponen cambios en la intensidad de la transmisión sináptica, codifican la comunicación entre neuronas y son considerados como el principal mecanismo implicado en la memoria y el aprendizaje cerebral (Kandel et al., 2014). La plasticidad presináptica depende principalmente de dos mecanismos: la señalización mediada por el calcio que participa en la exocitosis y la activación de receptores presinápticos por neurotransmisores y neuropéptidos. En las sinapsis excitadoras, en las que el glutamato actúa como principal neurotransmisor en el sistema nervioso central, los receptores metabotrópicos de glutamato (receptores mGlu), pertenecientes a la superfamilia de los receptores acoplados a proteínas G o GPCR, inician diferentes cascadas de señalización que dan lugar a la modulación de canales iónicos y proteínas quinasas (Niswender y Conn, 2010). Los receptores metabotrópicos del grupo III, que incluyen los mGlu de tipo 4, 6, 7 y 8, están localizados en la zona activa presináptica, donde median la inhibición de la liberación de glutamato a través de la regulación, mediada por proteínas Gi/o, de los canales de calcio dependientes de voltaje

(Takahashi et al, 1996; Millán et al., 2002; Pelkey et al., 2005). Sin embargo, los receptores mGlu7 están también acoplados a la activación de la fosfolipasa C, PLC (Perroy et al., 2002; Martín et al., 2010). Así, en sinaptosomas de corteza cerebral, la activación prolongada de los receptores mGlu7 incrementa la liberación de glutamato por medio de un mecanismo independiente de proteínas Gi/o, que, sin embargo, implica la hidrólisis de PIP₂ y proteínas activadas por DAG. Además, este mecanismo es resistente a los inhibidores la proteínas quinasa C, PKC, y está asociado a la translocación a la membrana presináptica y activación de la proteína Munc13-1, lo que sugiere que este fenómeno podría estar relacionado con la modulación de la maquinaria exocitótica (Martín et al., 2010). Es destacable que, en sinapsis de rodajas de hipocampo, también se produce aumento en la liberación de glutamato tras la activación prolongada de los receptores mGlu7 (Pelkey et al., 2005).

Los receptores mGlu7 está también acoplados a la inhibición de la generación de cAMP a través de la inhibición de la adenilato ciclasa por proteínas Gi/o (Schoepp and Johnson, 1993; Okamoto et al., 1994; Millán et al., 2002). Sin embargo, es destacable que este fenómeno sólo modula la liberación de glutamato después de la activación farmacológica de la adenilato ciclasa, por lo que su función fisiológica no ha sido completamente aclarada. Por otra parte, en sinapsis de hipocampo, la activación prolongada de los receptores mGlu7 induce sensibilidad a la modulación de la liberación por cAMP. De esta manera, estas sinapsis no desarrollan ninguna respuesta frente al incremento de los niveles de cAMP, pero tras la activación prolongada de los receptores mGlu7, las mismas sinapsis potencian su liberación de glutamato en respuesta a cAMP. Además, estos mecanismos de plasticidad están asociados a la reducción en la interacción entre los receptores mGlu7 y la proteína RIM1 α (Pelkey et al., 2008). Cabe destacar que la proteína RIM1 α es esencial para el desarrollo de procesos de plasticidad mediados por cAMP (Castillo et al., 2002). Por lo tanto, estas evidencias sugieren un posible papel bidireccional de los receptores mGlu7 en la regulación de los mecanismos de potenciación de la liberación mediados por cAMP relacionados con la modulación de la maquinaria exocitótica.

Por lo tanto, los objetivos de esta tesis doctoral fueron, por una parte, profundizar en el estudio de los mecanismos de potenciación de la liberación de glutamato por los receptores mGlu7, y por otro lado, investigar los mecanismos de modulación de la liberación de glutamato dependientes de cAMP que regulan la maquinaria exocitótica, con el propósito de analizar la modulación de los mismos por los receptores mGlu7.

2. Resultados

2.1. Potenciación de la liberación por receptores mGlu7.

Para alcanzar la magnitud máxima de este fenómeno de potenciación, es necesaria la exposición prolongada de los sinaptosomas al agonista de los receptores mGlu7, lo que sugiere que puede existir un acoplamiento débil entre el receptor y la cascada de señalización dependiente de PLC. Sin embargo, encontramos que la inhibición de dos enzimas diferentes implicadas en la degradación del diacilglicerol reduce el tiempo necesario para el desarrollo de la potenciación. Por lo tanto, la modulación del metabolismo del diacilglicerol puede jugar un importante papel en el desarrollo temporal de los mecanismos de potenciación por los receptores mGlu7.

La liberación de neurotransmisores depende principalmente de la actividad de los canales de tipo P/Q y de tipo N (Turner y Dunlap, 1997; Vázquez y Sánchez-Prieto, 1997). Además, en sinaptosomas de corteza cerebral, la expresión y acción inhibitoria sobre la liberación de los receptores mGlu7 está restringida a terminales sinápticos que expresan canales de tipo N (Millán et al., 2003), los cuales están peor acoplados a la entrada de calcio y a la liberación de neurotransmisores (Millán et al., 2003; Martín et al., 2007). Esto sugiere que la potenciación de la liberación de glutamato por los receptores mGlu7 podría ser un mecanismo compensatorio asociado a este tipo de terminales. Así, estudiando sinaptosomas cerebrocorticales e hipocampales de ratones de genotipo salvaje y carentes de los canales de calcio de tipo N (Ino et al., 2001), encontramos que la potenciación de la liberación por receptores mGlu7, en sinaptosomas de corteza, ocurre sólo en terminales con canales de tipo N, en condiciones en las que la liberación de glutamato es independiente de la actividad de los canales de calcio. Por otra parte, en sinaptosomas de hipocampo, en los que los receptores mGlu7 se expresan tanto en botones con canales de tipo N y P/Q, la potenciación por los receptores mGlu7 es independiente del tipo de canal canales de calcio expresado en el terminal.

Por otra parte, quisimos obtener evidencias adicionales de la implicación de la proteína Munc13-1 en los mecanismos de potenciación dependientes de los receptores mGlu7. Así, encontramos que la activación prolongada de estos receptores incrementa la co-inmunoprecipitación y por tanto, probablemente la interacción, entre Munc13-1 y la proteína RIM1; así como el número de vesículas sinápticas cercanas a la membrana de la zona activa y preparadas para su liberación.

La potenciación de la liberación por receptores mGlu7 había sido estudiada únicamente en sinaptosomas por medio de ensayos de medida de la liberación de glutamato. Por lo tanto, investigamos el efecto de la activación prolongada de los receptores metabotrópicos de tipo III en neuronas de cultivos autópticos de hipocampo, mediante técnicas de electrofisiología. Encontramos que este tratamiento farmacológico

revertió la inhibición de la liberación inducida por despolarización inicial asociada a estos receptores, siendo este fenómeno más complejo que la simple desensibilización de los receptores, ya que está asociado a un incremento de la frecuencia de la liberación espontánea y en el tamaño del grupo de vesículas listas para liberarse. Además, estos fenómenos ocurren tanto en neuronas glutamatérgicas, como en neuronas GABAérgicas.

2.2. Potenciación de la liberación de glutamato por los receptores β -adrenérgicos y la proteína Epac.

La forskolina, un activador de la adenilato ciclasa usado habitualmente para incrementar los niveles de cAMP, aumentó la liberación de glutamato inducida por bajas concentraciones de KCl, por mecanismos sólo parcialmente dependientes de la proteína quinasa A, PKA. Para estudiar los efectos de la modulación de la maquinaria exocitótica por cAMP, estudiamos la liberación espontánea, en condiciones de bloqueo de la generación de potenciales de acción con el bloqueante de los canales de Na^+ voltaje dependientes, tetrodotoxina (TTx), encontrando que la respuesta a forskolina es completamente independiente de PKA. Además, obtuvimos los mismos resultados cuando inducimos la liberación, en presencia de tetrodotoxina, con el ionóforo de calcio ionomicina, que provoca la entrada de calcio para activar la maquinaria exocitótica de manera independiente de los canales de calcio voltaje dependiente. Por lo tanto, la aplicación de TTx aísla el componente PKA independiente de la potenciación de la liberación de glutamato por cAMP, de acuerdo a evidencias previas obtenidas por otros autores (Gekel y Neher, 2008). Además, encontramos que el agonista de los receptores β -adrenérgicos (β -AR), isoproterenol, y el activador de Epac (proteína intercambiadora de nucleótidos de guanina activada por cAMP), 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP (8-pCPT), produce una respuesta de igual magnitud y que ocluye la potenciación de la liberación por forskolina. Así mismo, mediante el marcaje con partículas de oro, encontramos que los receptores β -AR se expresan principalmente en las zonas activas presinápticas de las sinapsis excitadoras en rodajas de corteza cerebral. Además, descubrimos que la activación de los β -AR/Epac, en presencia de TTx, está acoplada a la hidrólisis de PIP_2 , y que estos mecanismos de potenciación son sensibles a los inhibidores de la PLC y de proteínas activadas por DAG, pero no a los inhibidores de PKC. Así, se ha propuesto que Epac puede activar la isoforma PLC ϵ (Schmidt et al., 2001). Además, encontramos que isoproterenol y 8-pCPT dan lugar a la translocación y activación de la proteína Munc13-1; aumentan la co-inmunoprecipitación, y por tanto, probablemente la interacción, entre Munc13-1/RIM1 y entre RIM1/Rab3a; e incrementan el número de vesículas sinápticas cercanas a la membrana de la zona activa presináptica. Por lo tanto, los resultados obtenidos sugieren que los β -AR activan la proteína Epac para potenciar la liberación de

glutamato por medio de un mecanismo dependiente de PLC/DAG y que probablemente modula las proteínas excitóticas Munc13-1 y RIM.

A continuación, estudiamos el efecto de la activación de los β -AR y Epac en cultivos primarios de neuronas corticales transfectadas con el plásmido que codifica la expresión de vGluT1-pHluorina. Las sinapto-pHluorinas son proteínas de las vesículas sinápticas que modifican su fluorescencia durante los procesos de exo/endocitosis, permitiendo monitorizar la liberación y endocitosis de las vesículas sinápticas (Burrone et al., 2006). Descubrimos que isoproterenol y 8-pCPT aumentan la liberación espontánea en presencia de TTx, la liberación inducida por despolarización empleando estimulaciones eléctricas de campo, y el tamaño de los grupos de vesículas preparadas para la liberación y de reciclamiento. Además, estos tratamientos modificaron la cinética de endocitosis, sin alterar la cinética de exocitosis o la probabilidad de liberación. Así mismo, mediante el estudio del ratón mutante H567K de Munc13-1, que no une DAG, y el ratón carente de la proteína RIM1 α , encontramos que la respuesta a isoproterenol y 8-pCPT depende de la unión de DAG a Munc13-1 y de la expresión de la proteína RIM.

2.3. Señalización cruzada entre los receptores mGlu7 y β -adrenérgicos en la potenciación de la liberación de glutamato.

La co-expresión de GPCR en el terminal presináptico y la interacción funcional entre estos receptores puede tener un papel importante en la regulación de la liberación de neurotransmisores. Los receptores mGlu7 se expresan en la zona activa presináptica (Shigemoto et al., 1996), y hemos encontrado que los receptores β -AR se también se expresan en esta localización subcelular en la corteza cerebral, lo que sugiere que estos receptores podría presentar una relación funcional. La reducción en los niveles de cAMP por acción de los receptores mGlu7 requiere una activación previa de la AC (Millán et al., 2002; Martín et al., 2007), por lo que este fenómeno podría estar relacionado con cascadas de señalización que aumenten los niveles de cAMP, como la dependiente de los β -AR que hemos estudiado. Además, se ha sugerido que la activación prolongada de los receptores mGlu7 puede modular la sensibilidad a cAMP de las sinapsis, probablemente a través de la modulación de RIM1 α (Pelkey et al., 2008), y nuestros resultados muestran que las vías de potenciación dependientes de los receptores mGlu7 y β -AR probablemente dependan de las mismas proteínas de la maquinaria excitótica. Por lo tanto, estudiamos la co-expresión de estos receptores, así como la posible interacción funcional entre los mismos.

Encontramos que los receptores mGlu7 y β -AR co-localizan en una subpoblación de terminales presinápticos en la corteza cerebral, tanto en rodajas como en sinaptosomas de corteza cerebral, y que estos receptores forman parte de los mismos complejos

proteicos, estudiados mediante co-inmunoprecipitación. Además, descubrimos que la activación breve de los receptores mGlu7 inhibe sólo parcialmente la respuesta a forscolina, mientras que suprime completamente la potenciación dependiente de los β -AR, indicando la estrecha relación entre estos receptores. Por otra parte, encontramos que la activación conjunta de las vías de potenciación dependientes de los receptores mGlu7 y β -AR puede dar lugar a una respuesta supra-aditiva, en condiciones en las que se evita la inhibición por mGlu7/Gi/o/AC. En conjunto, estos resultados muestran que los receptores mGlu7 pueden desempeñar un papel bidireccional en la modulación de la vía de potenciación de la liberación dependiente de la modulación de la maquinaria excitotóxica por β -AR/cAMP/Epac.

CROSS-TALK BETWEEN METABOTROPIC GLUTAMATE 7 AND β -ADRENERGIC RECEPTORS IN GLUTAMATE RELEASE POTENTIATION.

1. Introduction.

The communication between neurons is the basis of the brain function. At chemical synapses, this phenomenon is mediated by neurotransmitter release from the presynaptic terminal, which subsequently induces a response in the postsynaptic neuron. Neurotransmitters are stored in synaptic vesicles which are distributed along the presynaptic boutons and close to the active zone. This presynaptic plasma membrane region localizes the proteins that are involved in vesicle fusion, known as the release machinery, and a high concentration of voltage dependent calcium channels. The arrival of an action potential to the active zone gates calcium influx through voltage dependent calcium channels, thereby activating the release machinery and triggering the synaptic vesicles fusion with the active zone plasma membrane, and the synaptic transmission. Synaptic vesicles must be physically attached to the active zone membrane (docking) and achieve a competent molecular state for fusion (priming). The release process involves the action of the release machinery that includes several proteins (Sudhof 2013), such as Munc13, a DAG-binding protein essential for the priming of synaptic vesicles for the release (Rhee et al., 2002) through its interaction with RIM protein (Deng et al., 2011).

Synaptic plasticity involves changes in synaptic transmission that are widely considered as a primary mechanism for learning and memory (Kandel et al., 2014). Therefore, use-dependent presynaptic plasticity is triggered mainly by first, the calcium influx through voltage dependent calcium channels during exocytosis, and secondly, the activation of presynaptic receptors by neurotransmitters or peptides (deJong y Verhage, 2009). At excitatory synapses, metabotropic glutamate receptors (mGlu receptors), of the G-protein coupled receptors superfamily (GPCR), triggers different signalling cascades involved in the modulation of ion channels and kinase proteins (Niswender and Conn, 2010). Group III metabotropic glutamate receptors, which include mGlu 4, 6, 7 and 8 subtypes, are localized at the active zone and mediate feedback inhibition of glutamate release through the modulation of voltage dependent calcium channels via Gi/o proteins (Takahashi et al, 1996; Millan et al., 2002; Pelkey et al., 2005). However, mGlu7 receptors are also coupled to phospholipase C (PLC) activation (Perroy et al., 2000; Martin et al., 2010). Furthermore, in cerebrocortical synaptosomes, the prolonged activation of mGlu7 receptors enhances glutamate release via a Gi/o-independent pathway that involves the hydrolysis of PIP₂ and DAG-binding proteins. Moreover, this mechanism is resistant to protein kinase C inhibitors, and it is associated with the translocation and activation of Munc13-1 protein, suggesting that this response targets the release machinery (Martin et

al., 2010). Interestingly, an increase in glutamate release after mGlu7 receptors prolonged activation is also observed at hippocampal slices (Pelkey et al., 2005).

mGlu7 receptors are also coupled to the inhibition of adenylate cyclase (AC), and thus, to cAMP generation, through a Gi/o-dependent signalling pathway (Schoepp and Johnson, 1993; Okamoto et al., 1994; Millan et al., 2002). However, this signalling pathway only modulates the glutamate release after pharmacological activation of AC, and therefore, the physiological role of this process remains unclear. Furthermore, in hippocampal synapses, prolonged activation of mGlu7 receptors induces cAMP sensitivity for release modulation. Thus, while naïve synapses are insensitive to cAMP elevation, after mGlu7 prolonged activation, these same synapses increase glutamate release in response to an increase in cAMP levels. In addition, this plasticity mechanism is associated to a reduction in the interaction between mGlu7 receptor and RIM1 α protein (Pelkey et al., 2008). Interestingly, RIM1 α protein is essential for cAMP-dependent plasticity mechanisms (Castillo et al., 2002). Therefore, these evidences argue again a possible bidirectional role of mGlu7 receptors in cAMP dependent increase of glutamate release, probably related with the targeting of the release machinery.

Thus, our aims in this thesis were, first to delve into the mGlu7 receptor-dependent increase of glutamate release mechanism and, secondly to analyse cAMP-dependent pathways that target the release machinery in order to study its modulation by mGlu7 receptor.

2. Results.

2.1. mGlu7 receptor-dependent enhancement of glutamate release.

In order to reach the maximum effect of the mGlu7-dependent enhance in the glutamate release, a prolonged exposure to the receptor agonist is needed, suggesting a weak receptor coupling to the PLC signalling cascade. Nevertheless, we found that the inhibition of two different enzymes involved in diacylglycerol degradation remarkably reduced the time required for triggering this phenomenon. Thus, the diacylglycerol metabolism modulation plays an important role in controlling the time course of the mGlu7 potentiation pathway.

Neurotransmitter release mainly depends on the activity of P/Q and N voltage dependent calcium channels (Turner and Dunlap, 1997; Vázquez and Sánchez-Prieto, 1997). In cerebrocortical synaptosomes, mGlu7 expression and its inhibitory effect on release is only observed in presynaptic terminals with N-type calcium channels (Millan et al., 2003), which are less efficiently coupled to calcium influx and neurotransmitter release (Millán et al., 2003; Martín et al., 2007), suggesting that the mGlu7-dependent

enhancement of glutamate release could be a compensatory mechanism associated to this kind of presynaptic boutons. By studying cerebrocortical and hippocampal synaptosomes from WT and N-type calcium channels KO, we found that in the cortex the mGlu7-dependent potentiation occurs only in synaptic boutons that expressed N-type calcium channels, under conditions in which glutamate release is independent of the calcium channels activity. On the other hand, in hippocampal synaptosomes, in which mGlu7 receptors are co-expressed in both P/Q and N-type containing synaptic terminals, the potentiation associated to this receptor was independent of the calcium channel expression.

Moreover, in order to obtain additional evidences about the role of Munc13-1 in the mGlu7-dependent enhancement of glutamate release, we discovered that the prolonged activation of the receptor increased the co-immunoprecipitation, and likely the interaction, between Munc13-1 and RIM protein; and also increased the number of synaptic vesicles closed to the active zone membrane analysed by electron microscopy.

The mGlu7-dependent mechanism of neurotransmitter release enhancement was only studied by glutamate release assays in synaptosomes. Thus, we investigated the effects of prolonged exposure to group III agonist by electrophysiology techniques in autaptic hippocampal cultures. We found that this pharmacological treatment, both in glutamatergic and GABAergic neurons, reversed the initial inhibition of evoked release, and this phenomenon goes beyond a simple receptor desensitization, because it is associated to an increase in the spontaneous release frequency and in the size of the readily releasable pool of synaptic vesicles.

2.2. β -adrenergic receptor and Epac dependent enhancement of glutamate release.

Forskolin, an AC activator commonly used to increase cAMP levels, enhanced the evoked glutamate release from synaptosomes induced by low concentrations of KCl through mechanisms only partially dependent of PKA. To isolate the cAMP action on the release machinery we analysed spontaneous release, using the Na⁺ channels blocker tetrodotoxin (TTx), with the result of a forskolin response that is largely independent of PKA. Similar results were obtained when, in the presence of TTx, glutamate release was induced with ionomycin, a calcium ionophore which deliveries calcium to the release machinery in a calcium channels independent manner. Therefore, TTx isolated the PKA independent component of cAMP-dependent enhance of glutamate release, according to previous evidences (Gekel and Neher, 2008). We also found that the β -adrenergic receptor (β -AR) agonist, isoproterenol, and the Epac (exchange protein directly activated by cAMP) protein activator, 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP (8-pCPT), mimicked and occluded the forskolin

induced response. Furthermore, by immunogold staining, we found that β -ARs were mainly expressed at the presynaptic active zone of excitatory synapses cerebrocortical slices. Moreover, we discovered that β -AR/Epac activation in the presence of TTx, was coupled to PIP_2 hydrolysis, and was sensitive to PLC and DAG-binding proteins inhibitors, but not to a PKC inhibitor. Thus, Epac is coupled to the activation of PLC ϵ isoform (Schmidt et al., 2001). In addition, we found that isoproterenol and 8-pCPT promoted Munc13-1 protein translocation/activation; increased the co-immunoprecipitation, and thus probably the interaction, between Munc13-1/RIM1 and RIM1/Rab3a; and enhanced the number of synaptic vesicles closed to the presynaptic plasma membrane analysed by electron microscopy. Then, our results indicate that β -AR activates Epac proteins to enhance glutamate release through a PLC/DAG signalling pathway and probably by targeting the release machinery proteins Munc13-1 and RIM1 α .

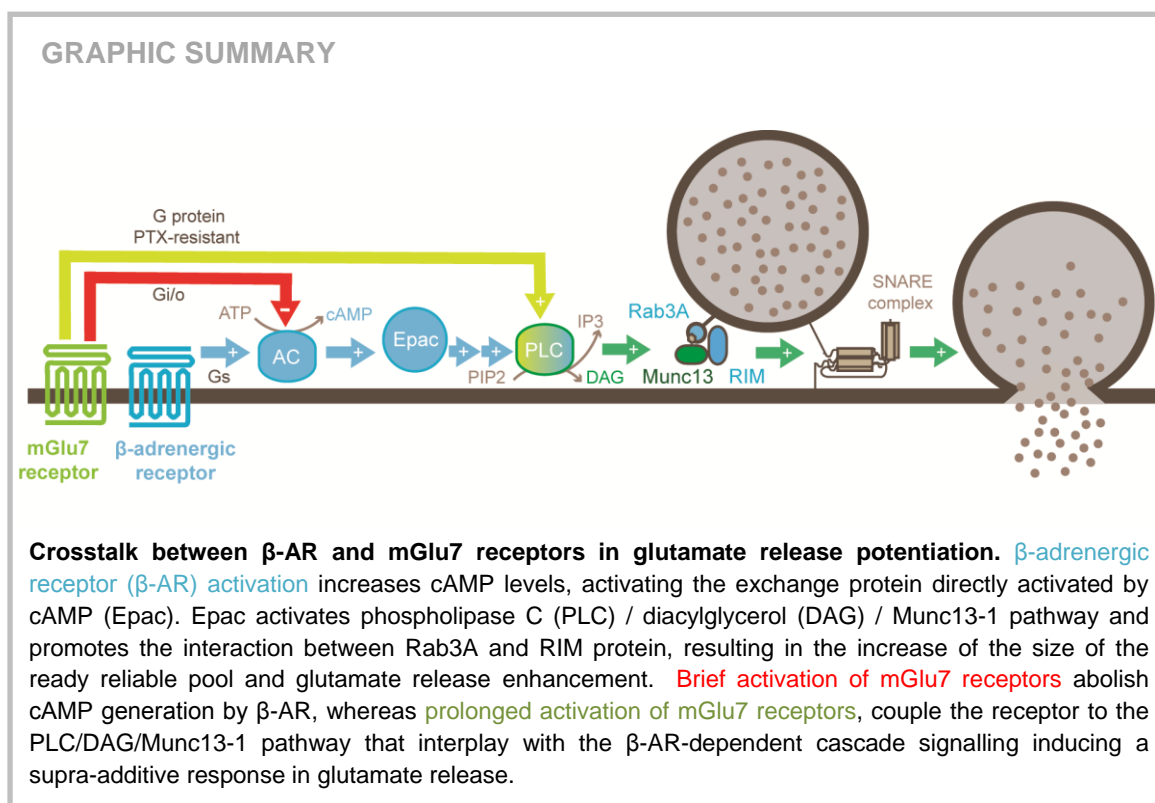
Next, we studied the effect of β -AR and Epac protein activation in cortical primary cultures transfected with vGlu1-pHluorin. Synapto-pHluorins are synaptic vesicle proteins that modify their fluorescence during the exo/endocytotic events, working as an optical indicator of vesicle release and recycling (Burrone et al., 2006). We found that isoproterenol and 8-pCPT enhanced the spontaneous release in the presence of TTx, the evoked release induced by field stimulation and the readily releasable and recycling pool of synaptic vesicles. These drugs also modulated endocytosis kinetics, without changing exocytosis kinetics or release probability. Moreover, by studying the Munc13-1 H567K (Rhee et al., 2002) and the RIM1 α KO (Schoch et al., 2002), we discovered that isoproterenol and 8-pCPT action involved the binding of DAG to Munc13-1 protein and the expression of RIM1 α protein.

2.3. Cross-talk between mGlu7 and β -adrenergic receptors in glutamate release modulation.

The co-expression of presynaptic GPCRs and the functional interaction between their signalling pathways might play an important role in the regulation neurotransmitter release. mGlu7 receptors are expressed at the active zone (Shigemoto et al., 1996) and we have found that β -ARs show a similar subcellular localization in the cerebral cortex, which prompted us to study the potential interaction between the signalling pathways associated to these receptors. It is well established that the reduction by mGlu7 receptors of cAMP levels is dependent on AC activation (Millan et al., 2002; Martin et al., 2007), and thereby related to signalling cascades involving cAMP generation, such as that initiated by β -ARs. Moreover, it has been proposed that the sensitivity of hippocampal nerve terminals to release enhancement by cAMP is switched by prolonged activation of mGlu7 receptors (Pelkey et al., 2008), and our results showed that glutamate release enhancement by β -AR

and mGlu7 receptors involve the same release machinery proteins. Thus, we searched for co-expression of these receptors and the interaction between their signalling pathways.

We found that mGlu7 and β -AR co-localized in a subpopulation of presynaptic terminals in the cerebral cortex, both in slices and in synaptosomes and that both proteins are part of the same protein complex as shown by immunoprecipitation. Moreover, we found that a brief activation of mGlu7 receptors inhibited cAMP generation and completely avoided the enhancement of glutamate release due to β -AR signalling cascade activation, showing the close relationship between these receptors. In contrast, mGlu7-dependent inhibition of forskolin responses was only partial. On the other hand, we found that the simultaneous activation of mGlu7 and β -AR enhance glutamate release to a supra-additive response, provided that the two signalling pathways are activated to bypass the mGlu7/Gi/o mediated inhibition of the β -AR/Gs mediated increase in cAMP. Overall, our results showed that mGlu7 receptor played a bidirectional role in the modulation of cAMP-dependent mechanisms which target the release machinery.



References

- Burrone, J., Z. Li and V. N. Murthy (2006). "Studying vesicle cycling in presynaptic terminals using the genetically encoded probe synaptopHluorin." *Nat Protoc* 1(6): 2970-2978.
- Castillo, P. E., S. Schoch, F. Schmitz, T. C. Sudhof and R. C. Malenka (2002). "RIM1alpha is required for presynaptic long-term potentiation." *Nature* 415(6869): 327-330.
- de Jong, A. P. and M. Verhage (2009). "Presynaptic signal transduction pathways that modulate synaptic transmission." *Curr Opin Neurobiol* 19(3): 245-253.
- Deng, L., P. S. Kaeser, W. Xu and T. C. Sudhof (2011). "RIM proteins activate vesicle priming by reversing autoinhibitory homodimerization of Munc13." *Neuron* 69(2): 317-331.
- Gekel, I. and E. Neher (2008). "Application of an Epac activator enhances neurotransmitter release at excitatory central synapses." *J Neurosci* 28(32): 7991-8002.
- Kandel, E. R., Y. Dudai and M. R. Mayford (2014). "The molecular and systems biology of memory." *Cell* 157(1): 163-186.
- Martin, R., M. Torres and J. Sanchez-Prieto (2007). "mGluR7 inhibits glutamate release through a PKC-independent decrease in the activity of P/Q-type Ca²⁺ channels and by diminishing cAMP in hippocampal nerve terminals." *Eur J Neurosci* 26(2): 312-322.
- Martin, R., T. Durroux, F. Ciruela, M. Torres, J. P. Pin and J. Sanchez-Prieto (2010). "The metabotropic glutamate receptor mGlu7 activates phospholipase C, translocates munc-13-1 protein, and potentiates glutamate release at cerebrocortical nerve terminals." *J Biol Chem* 285(23): 17907-17917.
- Millan, C., E. Castro, M. Torres, R. Shigemoto and J. Sanchez-Prieto (2003). "Co-expression of metabotropic glutamate receptor 7 and N-type Ca(2+) channels in single cerebrocortical nerve terminals of adult rats." *J Biol Chem* 278(26): 23955-23962.
- Millan, C., E. Castro, M. Torres, R. Shigemoto and J. Sanchez-Prieto (2003). "Co-expression of metabotropic glutamate receptor 7 and N-type Ca(2+) channels in single cerebrocortical nerve terminals of adult rats." *J Biol Chem* 278(26): 23955-23962.
- Millan, C., R. Lujan, R. Shigemoto and J. Sanchez-Prieto (2002). "The inhibition of glutamate release by metabotropic glutamate receptor 7 affects both [Ca²⁺]_i and cAMP: evidence for a strong reduction of Ca²⁺ entry in single nerve terminals." *J Biol Chem* 277(16): 14092-14101.
- Millan, C., R. Lujan, R. Shigemoto and J. Sanchez-Prieto (2002). "The inhibition of glutamate release by metabotropic glutamate receptor 7 affects both [Ca²⁺]_i and cAMP: evidence for a strong reduction of Ca²⁺ entry in single nerve terminals." *J Biol Chem* 277(16): 14092-14101.
- Niswender, C. M. and P. J. Conn (2010). "Metabotropic glutamate receptors: physiology, pharmacology, and disease." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 50: 295-322.
- Okamoto, N., S. Hori, C. Akazawa, Y. Hayashi, R. Shigemoto, N. Mizuno and S. Nakanishi (1994). "Molecular characterization of a new metabotropic glutamate receptor mGluR7 coupled to inhibitory cyclic AMP signal transduction." *J Biol Chem* 269(2): 1231-1236.
- Pelkey, K. A., G. Lavezzari, C. Racca, K. W. Roche and C. J. McBain (2005). "mGluR7 is a metaplastic switch controlling bidirectional plasticity of feedforward inhibition." *Neuron* 46(1): 89-102.
- Pelkey, K. A., L. Topolnik, X. Q. Yuan, J. C. Lacaille and C. J. McBain (2008). "State-dependent cAMP sensitivity of presynaptic function underlies metaplasticity in a hippocampal feedforward inhibitory circuit." *Neuron* 60(6): 980-987.
- Perroy, J., L. Prezeau, M. De Waard, R. Shigemoto, J. Bockaert and L. Fagni (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(21): 7896-7904.
- Rhee, J. S., A. Betz, S. Pyott, K. Reim, F. Varoqueaux, I. Augustin, D. Hesse, T. C. Sudhof, M. Takahashi, C. Rosenmund and N. Brose (2002). "Beta phorbol ester- and diacylglycerol-induced augmentation of transmitter release is mediated by Munc13s and not by PKCs." *Cell* 108(1): 121-133.
- Schmidt, M., S. Evellin, P. A. Weernink, F. von Dorp, H. Rehmann, J. W. Lomasney and K. H. Jakobs (2001). "A new phospholipase-C-calcium signalling pathway mediated by cyclic AMP and a Rap GTPase." *Nat Cell Biol* 3(11): 1020-1024.

Schoch, S., P. E. Castillo, T. Jo, K. Mukherjee, M. Geppert, Y. Wang, F. Schmitz, R. C. Malenka and T. C. Südhof (2002). "RIM1alpha forms a protein scaffold for regulating neurotransmitter release at the active zone." *Nature* 415(6869): 321-326.

Schoepp, D. D. and B. G. Johnson (1993). "Metabotropic glutamate receptor modulation of cAMP accumulation in the neonatal rat hippocampus." *Neuropharmacology* 32(12): 1359-1365.

Shigemoto, R., A. Kulik, J. D. Roberts, H. Ohishi, Z. Nusser, T. Kaneko and P. Somogyi (1996). "Target-cell-specific concentration of a metabotropic glutamate receptor in the presynaptic active zone." *Nature* 381(6582): 523-525.

Südhof, T. C. (2013). "Neurotransmitter release: the last millisecond in the life of a synaptic vesicle." *Neuron* 80(3): 675-690.

Takahashi, T., I. D. Forsythe, T. Tsujimoto, M. Barnes-Davies and K. Onodera (1996). "Presynaptic calcium current modulation by a metabotropic glutamate receptor." *Science* 274(5287): 594-597.

Turner, T. J. and K. Dunlap (1995). "Pharmacological characterization of presynaptic calcium channels using subsecond biochemical measurements of synaptosomal neurosecretion." *Neuropharmacology* 34(11): 1469-1478.

Vazquez, E. and J. Sanchez-Prieto (1997). "Presynaptic modulation of glutamate release targets different calcium channels in rat cerebrocortical nerve terminals." *Eur J Neurosci* 9(10): 2009-2018.

3. Concluding remarks.

3.1. The mGlu7-dependent enhancement of glutamate release requires a prolonged period of pharmacological receptor activation to reach high DAG levels.

3.2. The mGlu7-dependent potentiation of glutamate release probably involves Munc13-1 protein.

3.3. The mGlu7-dependent increase of glutamate release is independent of the type of voltage dependent calcium channels expressed at the nerve terminal.

3.4. Prolonged activation of type III metabotropic receptors in autaptic hippocampal cultures reverses the inhibition of evoked release and enhances spontaneous release frequency probably through an increase in the ready releasable pool of synaptic vesicles.

3.5. β -adrenergic receptors enhance glutamate release through Epac protein in cerebrocortical synaptosomes. This signalling cascade involves phospholipase C and probably, release machinery proteins Munc13-1 and RIM1 α .

3.6. β -adrenergic/Epac activation enhances spontaneous and evoked release in cortical primary cultures. This mechanism is associated with an increase in the ready releasable and recycling pools of synaptic vesicles and changes in the endocytosis kinetics.

3.7. β -adrenergic/Epac-dependent increase in release is abolished in Munc13-1 H567K mutant and in RIM1 α KO in cerebrocortical neurons.

3.8. mGlu7 receptors play a bidirectional role in the modulation of β -adrenergic/Epac-dependent potentiation of glutamate release.

8-pCPT	8-pCPT-2´O-Me-cAMP.
AC	adenilato ciclase.
ADA	adenosina desaminasa.
AgaTx	ω -Agatoxina-IVA.
AMPA	α -amino-3-hidroxi-5-metilisoxazolil-4 propionato.
AP	potencial de acción.
ATP	adenosin trifosfato.
β -AR	receptores β -adrenérgicos.
BFA	brefeldina A : 1, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 14 ^a -Decahidro-1,13-dihidroxi-6-metil-4H-ciclopenten-oxaciclodecin-4.
Bisindolil	bisindolilmaleimida I: 3,4 -Di(1H-indol-2-il)-1Hpirrol-2,5-diona.
BSA	albúmina de suero bovino.
CaM	calmodulina.
CaMK	calmodulina quinasa.
cAMP	adenosin 3',5'-monofosfato cíclico.
CMDZ	calmidazolium:1-[Bis(4 chlorofenil)metil]-3-[2-(2,4 diclorofenil)-2-(2,4-diclorobenziloxi)etil]-1H-imidazolium cloruro.
ConoTx	ω -Conotoxina-GVIA.
DAG	diacilglicerol.
DAPI	4',6-diamino-2-fenilindol.
DIV	días in vitro.
DTT	ditiotreitol.
EAAT	transportador de aminoácidos excitadores.
EBSS	solución de sales estabilizada de Earle.
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético.
EGTA	ácido etilenglicol-bis(β -aminoetil éter)- N, N, N', tetraacético.
Epac	proteína intercambiadora de nucleótidos de guanina activada por cAMP.
EPSC	corriente postsináptica excitadora.
Fosc	forscolina: (3R,4aR,5S,6S,6aS,10S,10aR,10bS)-6,10,10b-trihidroxi-3,4a,7,7,10a-pentametil-1-oxo-3-vinildodecahidro-1H-benzo[f]cromen-5-il acetato.
FRET	transferencia de energía por resonancia de fluorescencia.
GABA	ácido gamma amino butírico.
GDH	glutamato deshidrogenasa.
GEF	factor intercambiador de nucleótidos de guanina.
GFP	proteína verde fluorescente.
GIRK	canales responsables de la corriente rectificadora de entrada de K ⁺ modulados por proteínas G.
GPCR	receptores acoplados a proteínas G.
GTP/GDP	guanosin tri/difosfato.
H567K	mutación en el residuo 567 de Munc13-1, que evita su unión a diacilglicerol.
H-89	N-[2-((<i>p</i> -bromocinamil)amino)etil]-5-isoquinolinesulfonamida.
HBM	medio tampón HEPES.
HCN	canales catiónicos activados por despolarización y modulados por nucleótidos cíclicos.
HEPES	ácido 4-(2-hidroxi)etil)-1-piperazinetil sulfónico.
HFS	estimulación de alta frecuencia.
HRP	peroxidasa de rábano.
IB	inmunotransferencia.
IBMX	3-isobutilmetilxantina.
IP	inmunoprecipitado.
IP ₁	inositol monofosfato.
IP ₃	inositol 1,4,5-trifosfato.

IPSC	corriente postsináptica inhibitora.
KCl	cloruro potásico.
KO	<i>knockout</i> : modelo animal modificado genéticamente con ausencia de expresión de una proteína.
L-AP4	ácidoL-(+)-2-amino-4-fosfonobutírico.
LTP/LTD	potenciación/depresión sináptica a largo plazo.
MacM	proteína de macrófagos miristoilada rica en alanina sustrato de la quinasa C.
mGlu	receptor metabotrópico de glutamato.
MPIP	6-(4-Metoxifenil)-5-metil-3-(4-piridinil)-isoxazolo[4,5-c]piridin-4(5H).
NADP/H	forma oxidada/reducida del dinucleótido de nicotinamida adenina fosfato.
NE	norepinefrina.
NGS/NDS	suero normal de cabra/burro.
NMDA	N-metil-D-aspártico.
PAGE	electroforesis en geles de poliacrilamida.
PBS	tampón fosfato salino.
PCR	reacción de la polimerasa en cadena.
PDBu	4-β-forbol-12,13-dibutirato.
PDE	fosfodiesterasa.
PFA	paraformaldehído.
PIP ₂	fosfatidil inositol 4,5 bifosfato.
PKA	proteína quinasa A o dependiente de cAMP.
PKC	proteína quinasa C.
PLC	fosfolipasa C.
Pr	probabilidad de liberación.
Prop	propranolol: (RS)-1-(isopropilamino)-3-(naftalen-1-iloxi)propan-2.
PSD	densidad postsináptica.
PTP	potenciación sináptica posttetánica.
PTx	tóxina pertúsica.
Rab	proteína análoga a Ras en cerebro.
RIM	molécula de interacción con Rab.
RIM-BP	proteína de unión a RIM.
ROI	región de interés.
RP	grupo de SVs de reciclamiento.
RRP	grupo de SVs preparadas para su liberación.
RtP	grupo de SVs de reposo o de reserva.
SDS	dodecil sulfato sódico.
SNAP	proteína soluble unida a NSF.
SNARE	receptores de SNAP.
SNC	sistema nervioso central.
Sp-8-Br	8-bromoadenosina-3'-5'-monofosforotioato cíclico.
STP/STD	potenciación /depresión sináptica a corto plazo.
SVs	vesículas sinápticas.
TBS	tampón tris salino.
Tris	tris(hidroximetil)aminometano.
TRP	grupo de reciclamiento total.
TTx	tetrodotoxina.
U73122/343	1-[6-((17β-3-Metoxiestra-1, 3, 5(10)-trien-17-il)amino)hexil]- 1H-pirrol/idin-2, 5-diona.
v-ATPasa	ATPasa vacuolar.
VDCC	canales de calcio dependientes de voltaje.
vGlut	transportador vesicular de glutamato.
WT	genotipo salvaje.
ZD7288	4-Etilfenilamino-1,2-dimetil-6-metilaminopirimidinium cloruro.

I. INTRODUCCIÓN

1. SINAPSIS GLUTAMATÉRGICAS

1.1. Sinapsis químicas.

La comunicación entre las neuronas es la base del funcionamiento cerebral, y se establece por medio de uniones funcionales altamente especializadas, denominadas sinapsis, que pueden ser de tipo eléctrico o químico. En las sinapsis eléctricas la corriente se transmite a través de uniones de hendidura o “*gap junctions*”, conformadas por canales proteicos que permiten el paso de iones.

Sin embargo, la sinapsis más abundantes y de mayor relevancia en el sistema nervioso central (SNC) de vertebrados son las sinapsis químicas. En estas sinapsis, una molécula de neurotransmisor es liberada del terminal axónico de la neurona presináptica, activando receptores de la membrana de la neurona postsináptica (Fig. 1.1). Los neurotransmisores son almacenados en vesículas sinápticas (SVs) en el interior del terminal presináptico. Estas vesículas se organizan en torno a la zona activa, que contiene las proteínas necesarias para su fusión, denominada maquinaria exocitótica.

La bicapa lipídica de las membranas celulares impide el paso libre de iones, de manera que el potencial de membrana en reposo se debe a la diferencia en la permeabilidad y concentración de iones entre el interior y el exterior celular, siendo estos gradientes mantenidos por el transporte activo de dichos iones. De esta manera el potencial de membrana en reposo en la mayoría de neuronas es de aproximadamente -70mV. La despolarización de la membrana como consecuencia de la apertura de los canales de sodio (Na^+) dependientes de voltaje, tras superar el potencial umbral de disparo (aproximadamente -50 a -55mV), genera el potencial de acción. El potencial de membrana vuelve al estado de reposo, por la apertura de canales de potasio (K^+) e inactivación de los canales de sodio. El potencial de acción se propaga por la membrana axonal hasta alcanzar los canales de calcio dependientes de voltaje (VDCC), que se concentran en la zona activa. La apertura de los VDCC origina una elevación de la concentración de Ca^{2+} en la zona activa, desde aproximadamente 100nM en estado de reposo (Wadel et al., 2007) hasta concentraciones del rango de micromolar, estimadas como concentraciones umbral de disparo y máxima, 10 μM y 50 μM , respectivamente (Schneppenburger y Neher, 2005). El incremento de Ca^{2+} dispara la fusión de las vesículas sinápticas, al unirse este ión a las proteínas que actúan como sensores de Ca^{2+} de la maquinaria exocitótica, liberándose el neurotransmisor al espacio que separa las neuronas pre- y postsinápticas, denominado hendidura sináptica. El neurotransmisor activa receptores ionotrópicos, canales iónicos operados por la unión de ligandos, que median la despolarización de la membrana postsináptica, aumentando la posibilidad de la generación de un nuevo potencial de acción. La neurona postsináptica también puede recibir estímulos de sinápsis inhibitoras (GABAérgicas o glicinérgicas), que hiperpolarizan la célula, disminuyendo la

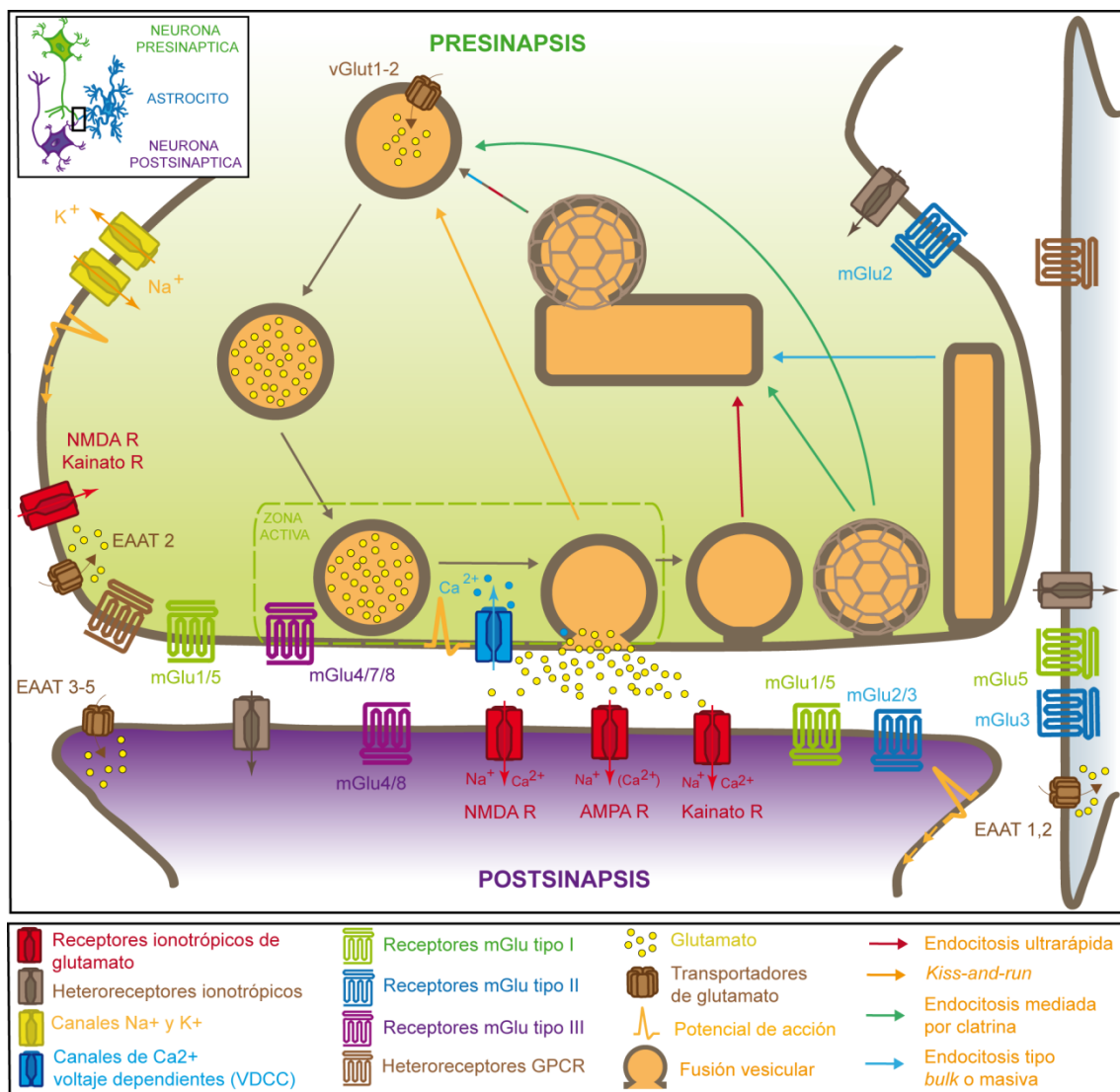


Fig 1.1. Sinápsis glutamatérgicas. Representación del ciclo vesicular sináptico y de los distintos tipos de receptores y canales presentes en las sinápsis glutamatérgicas (basado en Swanson et al., 2005; Janh y Fasshauer, 2012; Ackerman et al., 2015)

posibilidad de la generación de un nuevo potencial de acción. Por lo tanto, la neurona postsináptica integra espacial y temporalmente los impulsos excitadores e inhibidores, pudiendo generar un nuevo potencial de acción si el resultado de esta integración es una despolarización suficiente para activar los canales de Na⁺ dependientes de voltaje. El potencial de acción en la célula postsináptica se propaga por el axón hasta sus terminales presinápticos, continuando la transmisión del impulso nervioso a través de la red neuronal. Además, los neurotransmisores pueden actuar sobre receptores acoplados a proteínas G (GPCR), que median respuestas intracelulares que modulan la neurotransmisión.

1.2. Glutamato: síntesis y transporte

Las sinapsis glutamatérgicas se caracterizan por emplear como neurotransmisor el L-glutamato, forma ionizada del ácido L-glutámico, que es el principal neurotransmisor excitador del SNC. La síntesis del glutamato se produce en el ciclo de Krebs por medio de la transaminación del α -cetoglutarato, o por hidrólisis del grupo amino de la glutamina por acción de la enzima glutaminasa, localizada en las mitocondrias del terminal presináptico (Kandel et al. 2000).

El glutamato es almacenado en las vesículas sinápticas, a una concentración aproximada de 150mM (Takamori et al., 2006), por medio de los transportadores vesiculares específicos de glutamato (vGlut1-3). Estos transportadores acumulan glutamato gracias al gradiente electroquímico de protones generado por la bomba de protones v-ATPasa (Tabb et al., 1992) y como consecuencia del potencial de membrana de la vesícula sináptica (Omote et al., 2011).

El glutamato liberado en la hendidura sináptica es recaptado y transportado a través de las membranas plasmáticas por medio de transportadores específicos presentes en las células de glía (EAAT 1,2) y en las neuronas (EAAT 3-5). Los EAAT2 también se localizan en el terminal presináptico en el hipocampo, mientras que los EAAT3-5 presentan una expresión preferentemente postsináptica, limitándose la expresión de EAAT4 y EAAT5 a las células de Purkinje del cerebelo y a la retina, respectivamente (Fig. 1.1. Vandenberg y Ryan, 2013). En las células de glía, el glutamato recaptado se transforma en glutamina por acción de la glutamina sintasa, y se reincorpora a la presinápsis por medio de transportadores específicos. En los terminales presinápticos, la glutamina vuelve a ser convertida en glutamato por la enzima glutaminasa, para ser almacenado en las SVs por medio de los vGlut (Anderson y Swanson, 2000; Edwards, 2007).

El control de liberación de la glutamato y de su recaptación es de gran importancia, ya que la elevación anormal de la concentración de glutamato en la sinápsis es la causa de la degeneración y muerte neuronal asociada a determinadas patologías, tanto de carácter agudo, como los estados de hipoglucemia, hipoxia e isquemia cerebrales, como de desarrollo crónico, propias de procesos neurodegenerativos, como las enfermedades Alzheimer, Parkinson, Huntington o la esclerosis lateral amiotrófica.

1.3. El terminal presináptico.

Respecto a la estructura microscópica o ultraestructura del terminal presináptico, se distinguen dos tipos principales de **sinapsis**, las asimétricas, que se corresponden con las sinapsis excitadoras o glutamatérgicas (Fig. 1.2.A), y las simétricas, correspondientes a las sinapsis inhibitoras o GABAérgicas/glicinérgicas (Harris y Weinberg., 2012). Los terminales o botones presinápticos contactan con una o varias postsinapsis (Shepherd y

Harris, 1998), caracterizadas, en el caso de las sinápsis asimétricas, por la presencia de la densidad postsináptica, una zona electrodensa que se extiende 35-50 nm desde la membrana hacia el citoplasma postsináptico, y que es reflejo de la gran densidad proteica postsináptica (Gulley y Reese, 1981; Landis y Reese 1983; Fig. 1.2. A, flecha verde). La hendidura sináptica es un pequeño espacio (~20nm) que separa el terminal presináptico de la postsinápsis. Este espacio es muy electrodenso (Lucić et al., 2005; Zuber et al., 2005), por lo que realmente no se trata de un espacio vacío, sino que contiene muchas proteínas, como proteínas de adhesión celular que permiten la correcta aposición de las estructuras pre- y postsináptica (Dityatev et al., 2010).

Los **terminales presinápticos** del SNC contienen las vesículas sinápticas (SVs) rellenas de neurotransmisor, de tamaño ~30-50 nm, otros tipos de vesículas minoritarias, endosomas y de ninguna a varias mitocondrias. Sin embargo, ultraestructuralmente no se observan microtúbulos o elementos del citoesqueleto, retículo endoplasmático ni polirribosomas (Harris y Weinberg., 2012; Fig. 1.2. A y B), aunque puede existir síntesis de proteínas en los terminales (Akins et al., 2009). Además de las SVs, se han descrito vesículas claras de gran tamaño (más de 60nm), probablemente rellenas también de neurotransmisor (Henze et al., 2002) o vesículas grandes de núcleo denso (LDCV, del inglés *large dense core vesicles*) de diámetro ~80nm que contienen neuropéptidos (Torrealba y Carrasco, 2004).

Las técnicas de microscopía electrónica más recientes, como la de fijación a alta presión (Siksou et al., 2007) o la crio-tomografía electrónica (Fernandez-Busnadiego et al., 2010; Fig. 1.2.B), han mostrado que las SVs están unidas entre sí por conectores (*connectors*) (Siksou et al., 2007; Fernandez-Busnadiego et al., 2010; Fig. 1.2. B.1) y a la membrana de la zona activa por uno o varios filamentos de anclaje (*tethers*) (Fernández-Busnadiego et al., 2010; Fig. 1.2. B. 2).

Funcionalmente, las **SVs** se pueden clasificar funcionalmente en varios grupos o *pools* (Rizzoli y Betz, 2005; Alabi y Tsien, 2012; Fig.1.2.D.): 1) El grupo preparado para la liberación (RRP, del inglés *readily releasable pool*), que es liberado rápidamente en respuesta a un estímulo. A nivel ultraestructural o posicional, el RRP se corresponde con las SVs en contacto con la membrana de la zona activa (Iming et al., 2014). 2) El grupo de reciclamiento (RP, del inglés *recycling pool*), que es movilizado después de liberar el RRP (el RRP y el RP pueden ser denominados en su conjunto grupo de reciclamiento total o TRP; Alabi y Tsien, 2012) 3) El grupo de reserva o reposo (RtP, del inglés *resting o reserve pool*), que sólo puede ser movilizado en condiciones de estimulación muy intensas consideradas no fisiológicas. Salvo en el caso de RRP, no ha sido determinada la relación entre la posición ultraestructural de las SVs y su clasificación funcional. Además, se ha definido un cuarto grupo, el grupo de intercambio intersináptico o *superpool* (Staras et al., 2010; Herzog et al., 2011).

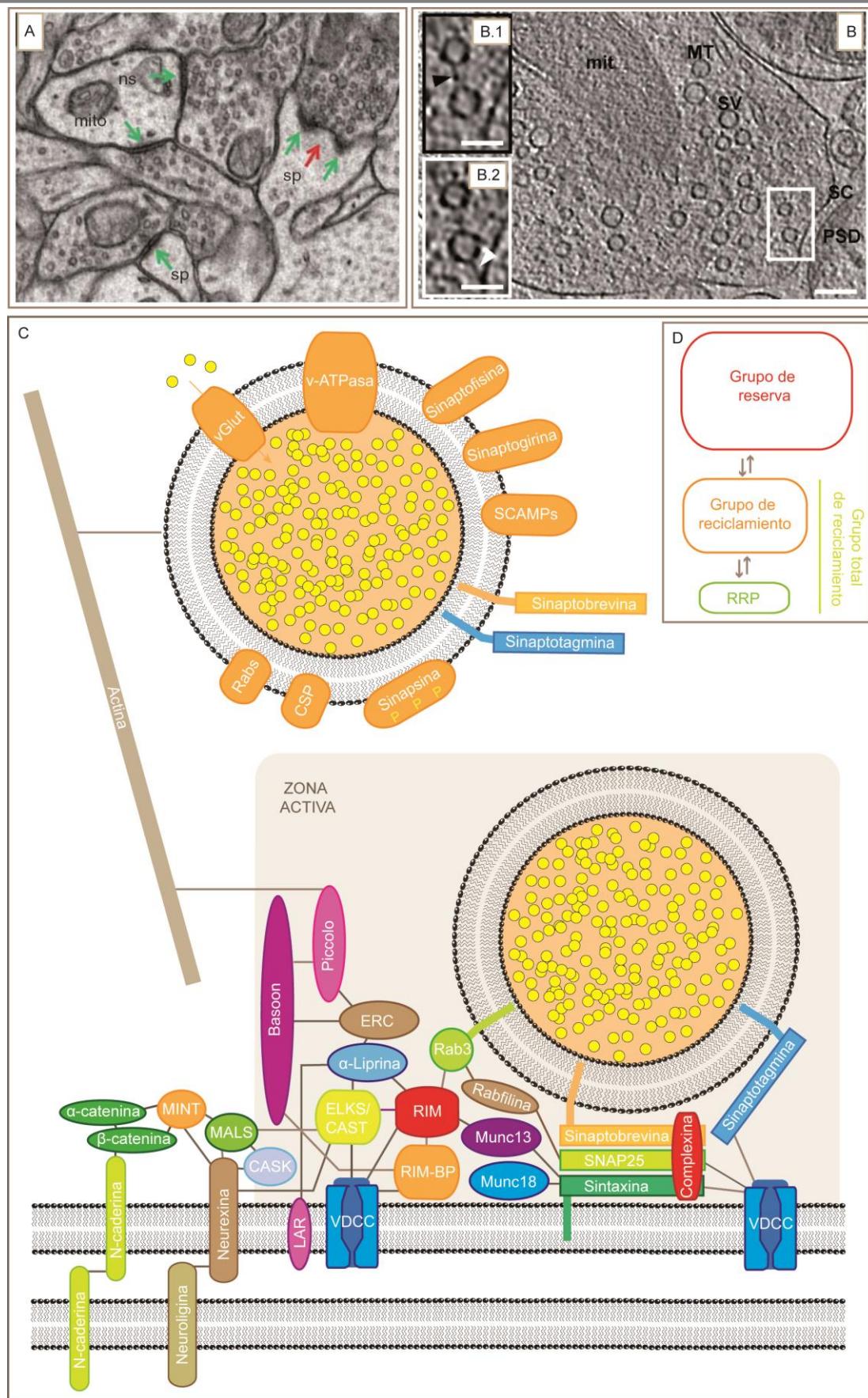


Fig 1.2. La zona activa presináptica. (A) Imagen de microscopía electrónica de la ultraestructura de las zonas activas. Flechas verdes, densidades postsinápticas de sinápsis asimétricas; sp, espina dendrítica; mito, mitocondria (Harris y Weinberg, 2012) (B) Imagen del terminal presináptico por crio-tomografía electrónica, mostrando los conectores (B.1) y los filamentos de anclaje (B.2). PSD, densidad postsináptica; SC, hendidura sináptica (Fernandez-Busnadiego et al., 2010). (C) Proteínas de la zona activa (basado en Mittelstaedt., 2010 y Chua et al., 2010). (D) Grupos funcionales de SVs.

Las **zonas activas** son zonas de la membrana presináptica altamente especializadas en el proceso de fusión vesicular, en las que las SVs entran en contacto con la membrana del terminal presináptico. Las zonas activas del SNC presentan una forma discoidal con un tamaño de 0.2-0.5µm de diámetro (Sudhof, 2012). Las técnicas tradicionales de fijación química muestran una serie de agregados electrodensos, denominados proyecciones electrodensas, que conforman una malla hexagonal entre los que se intercalan las SVs en contacto con la membrana (Pfenninger et al., 1972; Limbach et al., 2011; Stiglohet et al., 2011), aunque las técnicas de microscopía electrónica modernas no muestran estas proyecciones (Siksou et al., 2007; Fernandez-Busnadiego et al., 2010; Fig. 1.2. B. 2). Las microrregiones de la zona activa en las que ocurre la fusión de las SVs, son denominadas sitios activos. El núcleo de la zona activa está constituido por cinco **proteínas** (RIM, Munc13, RIM-BP, α-liprinas y ELKS) y los VDCC. Además, las proteínas Piccolo, Bassoon, el complejo CASK/MALS/MINT o ERC están asociadas a las zonas activas (Schoch y Gundelfinger, 2006; Sudhof et al., 2012). Esta distribución es corroborada por estudios de inmunodetección en microscopía electrónica (Limbach et al., 2011) o microscopía óptica de fluorescencia de alta resolución (Dani et al., 2010). Los receptores metabotrópicos de tipo III también están localizados en la zona activa presináptica (Shigemoto et al., 1996a; Corti et al., 2002; Kogo et al., 2004; Ferraguti et al., 2005) por medio de su interacción con PICK1 (proteína 1 de interacción con quinasa C; Dev et al., 2000; Boudin et al., 2000), al igual que ocurre, al menos parcialmente, con los receptores GABA B (Luján et al., 2004). Algunas moléculas de adhesión celular como los receptores tipo LAR (Sudhof, 2012) o neurexinas (Song et al.1999) podrían estar en la zona activa, mientras que otras como cadherinas se localizan en zonas perisinápticas (Uchida et al., 1996). Por último, las proteínas implicadas en la fusión vesicular SNAP-25, sintaxina y Munc18 están distribuidas por toda la membrana presináptica (Sudhof, 2012), aunque la acción de estas proteínas en la zona activa es muy importante para los procesos de fusión de las SVs (Sudhof, 2013). Las zonas colindantes a la zona activa se denominan zonas perisinápticas. En estas regiones tienen lugar los procesos de endocitosis de las SVs (Brodin y Shuplikov, 2006; Watanabe et al., 2013), y en ellos se localizan algunas de las moléculas de adhesión celular que permiten la aposición con la postsinápsis (Uchida et al., 1996), así como algunos receptores presinápticos (Nyiri et al., 2005). Estas proteínas, así como su intrincada red de interacciones, son mostradas en la Fig. 1.2. C.

1.4. Liberación de glutamato.

La liberación de los neurotransmisores ocurre por medio de la exocitosis o fusión de las SVs, siendo este un proceso altamente regulado. En la liberación **inducida**, la

despolarización de la neurona presináptica induce la generación de potenciales de acción, que se propagan a lo largo del axón y que, al llegar a la zona activa presináptica, dan lugar a la apertura de los VDCC. La elevación de la concentración de Ca^{2+} inicia mecanismos moleculares que provocan la fusión de las SVs y la respuesta postsináptica. Estas corrientes postsinápticas, medidas por técnicas de electrofisiología, se denominan PSCs (del inglés *postsynaptic currents*), siendo las originadas en sinápsis glutamatérgicas EPSCs (del inglés *excitatory postsynaptic currents*).

La liberación de neurotransmisores es un proceso rápido, que ocurre milisegundos después de la entrada de Ca^{2+} y que recibe el nombre de liberación inducida sincrónica. Sin embargo, existe otro tipo de liberación inducida por despolarización que está desfasada respecto del potencial de acción, que es denominada liberación asincrónica. Esta liberación es habitualmente enmascarada por la liberación inducida sincrónica (Geppert et al., 1994; Sun et al., 2007), probablemente por la acción inhibitoria de proteínas implicadas en la liberación sincrónica (Maximov y Sudhof, 2005). Sin embargo, en determinadas sinápsis, durante estimulaciones intensas, la liberación asincrónica puede cobrar especial relevancia (Hefft y Jonas, 2005; Best y Regehr, 2009; Daw et al., 2009).

Además, existe otra forma de liberación de neurotransmisores denominada liberación **espontánea**. Algunos trabajos denominan espontánea a la liberación en ausencia de estimulación (sEPSC, del inglés *spontaneous excitatory postsynaptic current*), aunque este tipo de liberación probablemente implica la apertura espontánea de los canales iónicos implicados en la generación de potenciales de acción. Sin embargo, en la mayoría de los casos, el término liberación espontánea se asocia con la liberación en situación de bloqueo de la generación de potenciales de acción, empleando el tratamiento farmacológico con el bloqueante de los canales de Na^+ tetrodotoxina (TTx). En estas condiciones, esta liberación ("mini" o mEPSC, del inglés *minimal excitatory postsynaptic current*) ha sido asociada con la fusión espontánea de una SV (Katz y Miledi, 1967). La liberación espontánea es independiente de la generación de potenciales de acción, pero altamente dependiente de Ca^{2+} (Xu et al., 2009) y de la maquinaria proteica de fusión vesicular (Sudhof, 2013). Por lo tanto, puede estar modulada por la liberación de Ca^{2+} de reservorios intracelulares (Llano et al., 2000), por la apertura espontánea de los VDCC (Caterall y Few, 2008), o por mecanismos que modulan la preparación de las SVs para su liberación (de Jong y Verhage, 2009; Sudhof, 2013).

Respecto a los mecanismos moleculares asociados a los tres modos de liberación existentes, la acción de la maquinaria proteica de fusión vesicular es similar, salvo en las proteínas que actúan como sensores de Ca^{2+} implicadas en cada tipo de liberación (Pang y Sudhof, 2010; Sudhof, 2013). Sin embargo, se han señalado diferencias en los grupos de SVs implicados en la liberación inducida y espontánea (Fredj y Burrone, 2009; Ramírez et

al., 2012; Kavalali et al., 2015), aunque existen muchas controversias al respecto (Groemer y Klingauf, 2007; Hua et al., 2010; Wilhelm et al., 2010; Loy et al., 2014).

La liberación sincrónica probablemente sea la base de la comunicación neuronal, aunque las tres formas de liberación contribuyen al funcionamiento de los circuitos neuronales y el cerebro (Pang y Sudhof, 2010; Harvey et al., 2009). Además, se ha propuesto un papel de la liberación espontánea en el desarrollo y mantenimiento de las sinapsis (Yu et al., 2004), así como en fenómenos de plasticidad o mantenimiento de la homeostasis, entre otras funciones (Kavalali, 2015).

Mecanismos moleculares de exocitosis.

El proceso de exocitosis podría dividirse en tres **etapas** (Fig. 1.3.): 1) La preparación de las SVs, que supone la colocación de las SVs cerca de los VDCC y la disposición de la maquinaria de fusión en un estado metaestable que permite la rápida fusión en respuesta a la entrada de Ca^{2+} . Las vesículas en este estado metaestable son denominadas vesículas preparadas para la liberación y se corresponden con el RRP. Cabe señalar que tradicionalmente se ha distinguido entre los procesos de colocación (*docking*) y preparación (*priming*). De esta manera, el proceso de colocación/*docking* se corresponde con el posicionamiento de las SVs en los sitios activos, cerca de los VDCC y de la maquinaria exocitótica, mientras que se denomina preparación/*priming* a los cambios moleculares de la maquinaria exocitótica que permiten el rápido disparo de la fusión en respuesta a Ca^{2+} . Sin embargo, las evidencias actuales (Imig et al., 2014) parecen indicar que estos mecanismos son simultáneos, y por lo tanto, representan distintas facetas del mismo proceso. 2) La apertura dependiente de Ca^{2+} del poro de fusión. 3) El desensamblaje de la maquinaria de exocitosis, para permitir nuevos ciclos de fusión de otras SVs. Para mantener la liberación de neurotransmisores de forma prolongada, es necesario la endocitosis y el reciclamiento de las SVs fusionadas, habiéndose descrito cuatro formas de reciclamiento de las SVs (Fig.1.1. Ackermann et al., 2015).

Estos procesos son llevados a cabo a nivel molecular por la acción de diversas proteínas, que denominamos **maquinaria exocitótica** (Jahn y Fasshauer., 2012; Sudhof, 2013). La preparación de las SVs y de fusión vesicular es dependiente de la interacción entre dos proteínas de la zona activa (SNAP-25 y sintaxina-1) y una proteína de las SVs (sinaptobrevina/VAMP), que forman un complejo proteico denominado complejo SNARE (Sollner et al., 1993a). El paso de la conformación “cerrada” de la sintaxina a la conformación “abierta” promueve el ensamblaje del complejo trans-SNARE (Duluvoba et al., 1999; Misura et al., 2000). La formación del complejo trans-SNARE depende del ensamblaje en dirección amino a carboxilo terminal de 4 hélices con motivos SNARE de estas proteínas (dos de SNAP25, una de sinaptobrevina/VAMP y otra de sintaxina; Hanson et al., 1997). El ensamblaje de este complejo trans-SNARE acerca las membranas de las

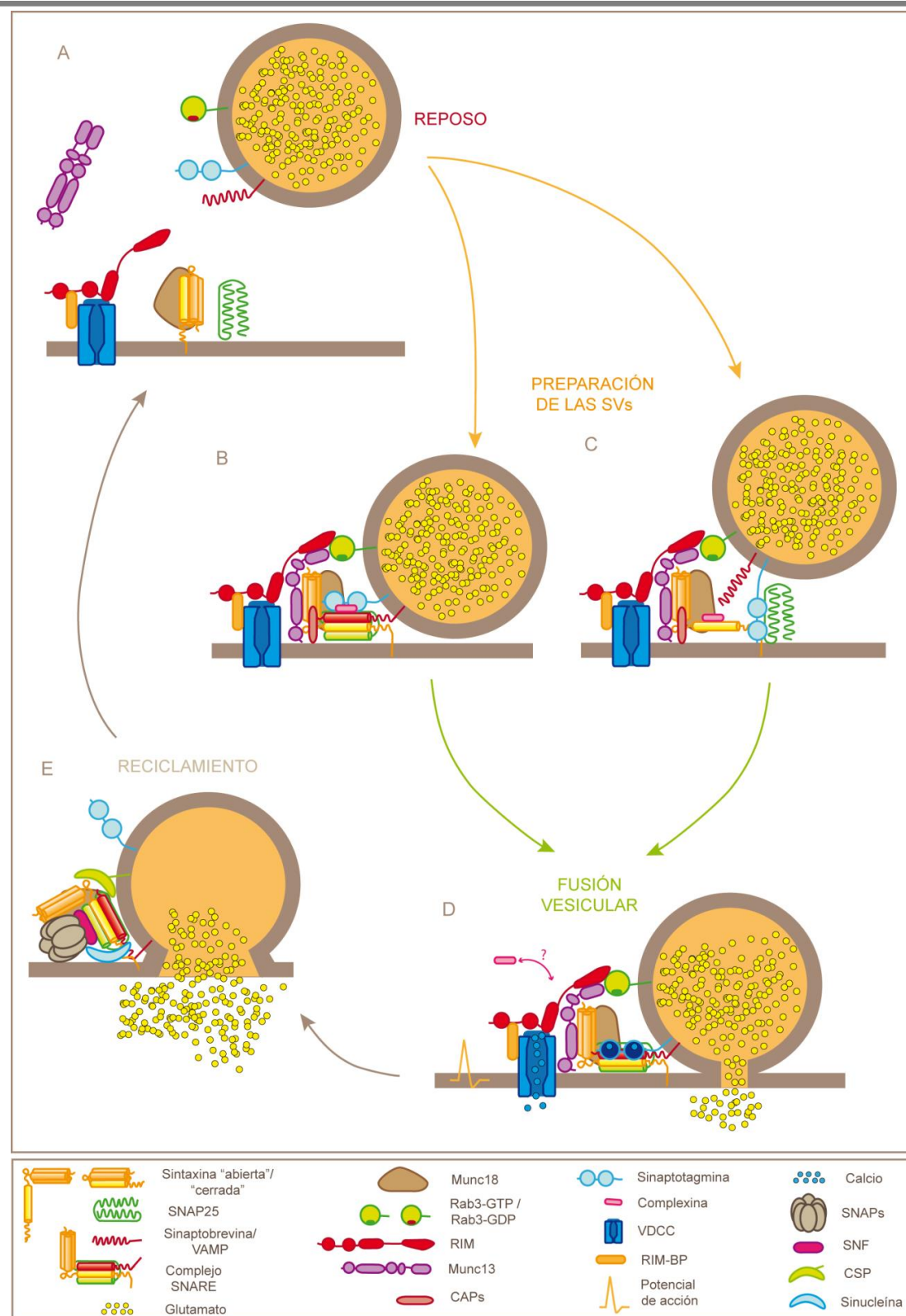


Fig 1.3. Mecanismos moleculares de exocitosis. Las SVs en reposo (A) son preparadas para su liberación por mecanismos que implican (B) la formación parcial del complejo trans-SNARE cuyo ensamblaje total se ve impedido por la acción inhibitoria de complexinas o sinaptotagmina sin Ca^{2+} unido o (C) la acción de complejo triple Munc13-RIM-Rab y la interacción de la sinaptotagmina con lípidos y proteínas de la zona activa, sin que el complejo SNARE esté totalmente ensamblado antes de la entrada de Ca^{2+} . (D) La llegada de potenciales de acción a la zona activa da lugar a la apertura de los VDCC, provocando la entrada de Ca^{2+} . De acuerdo a los modelos de preparación de las vesículas descritos anteriormente, la unión de Ca^{2+} a las sinaptotagminas, provocarían un cambio conformacional que revertiría la acción inhibitoria de las propias sinaptotagminas o de las complexinas, desplazándolas al menos parcialmente; o bien acercaría las proteínas del complejo SNARE para su ensamblaje. De cualquiera de estas maneras, se produce el ensamblaje completo del complejo trans-SNARE, que inicia la apertura del poro de fusión (E) Finalmente, la maquinaria proteica implicada es reciclada, para permitir su participación en ciclos posteriores de exocitosis (basado en Jahn y Fasshauer., 2012 y Sudhof et al., 2013)

vesículas sinápticas y de la zona activa, dando lugar a su fusión (Poirier et al., 1998; Sutton et al., 1998; Jahn y Grubmuller, 2002; Kozlovsky y Kozlov, 2002; Jahn y Scheller, 2006; Sudhof y Rizo, 2011), para lo que es necesario la acción de uno a tres complejos SNARE (Hua y Scheller, 2001; Mohrmann et al., 2010; Sinha et al., 2011; Shi et al., 2012). Además, para el ensamblaje de este complejo y la fusión vesicular, es necesaria la actuación de otras proteínas que interaccionan con el complejo SNARE: Munc18, el complejo triple Munc13-RIM-Rab3, CAPS, complexinas y sinaptotagminas. Finalmente, la expansión del poro de fusión provoca el cambio de conformación del complejo trans-SNARE a cis-SNARE, que da lugar al desensamblaje y reciclamiento del mismo.

Las proteínas Munc18 (proteínas SM o Sec1/Munc18) son esenciales para la fusión de las SVs (Grote et al., 2000; Verhage et al., 2000). Inicialmente se propuso la acción de Munc18 inhibiendo la formación del poro de fusión por medio de la estabilización de la conformación “cerrada” e inactiva de syntaxina-1 (Yang et al., 2000; Wu et al., 2001), aunque trabajos posteriores han desmentido esta teoría. Munc18 se asocia al complejo SNARE antes (Hata et al., 1993; Dulubova et al., 1999), después de su formación, (Dulubova et al., 2007; Shen et al., 2007), y después de la fusión (Khvotchev et al., 2007; Zhou et al., 2013). Además, Munc18 promueve la formación del poro de fusión (Shen et al., 2007; Diao et al., 2010; Rathore et al., 2010; Schollmeier et al., 2011; Jorgacevski et al., 2011; Yu et al., 2013). Teniendo en cuenta estas acciones se ha propuesto que Munc18 participa promoviendo la mezcla lipídica durante la fusión (Sudhof, 2013), organizando espacialmente el ensamblaje del complejo SNARE alrededor de los sitios de fusión (Rizo et al., 2006) o favoreciendo la formación del complejo SNARE (Grote et al., 2000). Además, se ha demostrado que la fosforilación de Munc18 por PKC participa en procesos de plasticidad sináptica mediados por DAG, aumentando la liberación de neurotransmisores y el tamaño del RRP (Dulubova et al., 1999; Verhage et al., 2000; Misura et al., 2000; de Vries et al., 2000; Barclay et al., 2003; Craig et al., 2003; Nili et al., 2006; Toonen et al., 2006; Wierda et al., 2007; Genc et al., 2014; Cijssouw et al., 2014).

El complejo Munc13-RIM-Rab3 participa en la preparación de las SVs a distintos niveles (apartados 3.1.3 y 3.2.4). Munc13, se transloca a la membrana de la zona activa por su unión a DAG (Rhee et al., 2002) y favorece el ensamblaje del complejo SNARE, promoviendo el cambio de la syntaxina de conformación “cerrada” a “abierta” (Betz et al., 1997; Richmond et al., 2001; Gladychева et al., 2004; Ma et al., 2011; 2013). Para esta actividad de Munc13 es necesaria su interacción con la proteína RIM (Betz et al., 2001; Dulubova et al., 2005; Adrews-Ziwilling et al., 2006; Weimer et al., 2006), ya que esta revierte la formación de su homodímero autoinhibitorio (Deng et al., 2011). Por otra parte, el correcto posicionamiento de los VDCC depende en gran medida de RIM (Kaeser et al., 2011; Han et al., 2011). Además, RIM interacciona con la proteína G pequeña o monomérica de las vesículas sinápticas Rab3, de manera dependiente de su intercambio

de GTP por GDP (Wang et al., 1997; 2000). Por lo tanto, el complejo triple formado por estas tres proteínas (Duluvoba et al., 2005; Adrew-Zwilling et al., 2006) supone el nexo de interacción entre las SVs y los VDCC, modulando también la formación del complejo SNARE. En este sentido, estudios ultraestructurales han demostrado la función de Munc13 (Weimer et al., 2006; Siksou et al., 2009; Imig et al., 2014), Rab3 (Weimer et al., 2006; Gracheva et al., 2008) y RIM (Kaeser et al., 2011; Han et al., 2011; Fernandez-Busnadiego et al., 2013) en la colocación de las SVs cerca de la membrana de la AZ. Por último se ha propuesto que este complejo es la diana molecular de mecanismos de plasticidad sináptica que afectan a la preparación de las SVs, como los mediados por DAG (Rhee et al., 2002), Ca/CaM (Junge et al., 2004; Lipstein et al., 2013) y cAMP (Castillo et al., 2002; Lonart et al., 2003).

Las proteínas CAPS son esenciales para la preparación de las vesículas sinápticas y el acoplamiento de la liberación a la entrada de Ca^{2+} (Jockusch et al., 2007). Así, la ausencia de las proteínas CAPS reduce el número de SVs en contacto con la membrana de la zona activa (Imig et al., 2014). Se ha propuesto que la acción de las proteínas CAPS depende de su unión PIP_2 (James et al., 2010; Kabachiski et al., 2014; Nyugen-Truong et al., 2014), de su fosforilación por CK2 (Nojiri et al., 2009), y de su interacción con syntaxina-1 a través de un dominio MUN similar al de Munc13 (James et al., 2009; Khodthong et al., 2011; Parsaud et al., 2013). Sin embargo, estudios recientes han propuesto que la acción de las proteínas CAPS en la preparación de las SVs no depende de su interacción con el complejo SNARE, sino de su dominio de interacción con PIP_2 (Nyugen-Truong et al., 2014), mediando por mecanismos de preparación distintos y no redundantes respecto a los dependientes de Munc13 (Nyugen-Truong et al., 2014; Kabachiski et al., 2014). Por lo tanto, las proteínas CAPS podrían favorecer procesos iniciales de la preparación de las SVs por su unión a PIP_2 , y tras la hidrólisis de este lípido por la fosfolipasa C, PLC, se reduciría la actividad de CAPS, incrementándose la de Munc13 (Kabachiski et al., 2014).

Las sinaptotagminas son proteínas con dominios C2 que unen Ca^{2+} y fosfolípidos (Perin et al., 1990; Davletov y Sudhof., 1993). Además, estos dominios interactúan con syntaxina-1 y el complejo SNARE (Bennet et al., 1992; Li et al., 1995). El proceso de fusión de las vesículas sinápticas ocurre en menos de $100\mu s$ después de la entrada de Ca^{2+} mediada por los VDCC (Sabatini and Regehr, 1996), en respuesta a la unión de este ión a las proteínas que actúan como sensores de Ca^{2+} de la exocitosis (Pang y Sudhof, 2010). La sinaptotagmina-1 es el principal sensor de Ca^{2+} para la exocitosis inducida por despolarización (Fernández-Chacón et al., 1991; Sorensen et al., 2003; Pang et al., 2006a). Además, las sinaptotagminas-2, 7 y 9, también actúan como sensores de Ca^{2+} de la liberación inducida por despolarización (Pang et al., 2006b; Sun et al., 2007; Xu et al., 2007; Bacañ et al., 2015) y sinaptotagmina-7 de la liberación asincrónica (Schonn et al.,

2008; Bacaj et al., 2013; Luo et al., 2015). Por otra parte, también se ha descrito que la sinaptotagmina-1 tiene un papel inhibitorio sobre la liberación espontánea (Littleton et al., 1993; Xu et al., 2009). Además, existen otros sensores de Ca^{2+} para las otras formas de liberación dependientes de Ca^{2+} . Así, se ha propuesto que la proteína DOC2 controla la liberación asincrónica (Yao et al., 2011) y espontánea (Groffen et al., 2010). Sin embargo, otros estudios proponen que este control es independiente de Ca^{2+} (Pang et al., 2011).

Las complexinas son proteínas pequeñas que actúan como un cofactor de las sinaptotagminas (Reim et al., 2001; Tang et al., 2006; Cai et al., 2008; Jorquera et al., 2012; Cao et al., 2013; Xu et al., 2013; Lai et al., 2014). Las complexinas se unen a los complejos SNARE ensamblados (Chen et al., 2002), compitiendo con la unión de sinaptotagmina (Tang et al., 2006; Xu et al., 2013), habiéndose propuesto un papel en la fase final de la preparación de las vesículas sinápticas para su liberación, activando el complejo SNARE (Sudhof, 2013), y controlando la preparación de las SVs (Cai et al., 2008, Jorquera et al., 2012; Diao et al., 2013). Además, se ha propuesto que las complexinas podrían mantener el estado metaestable de preparación de las SVs, frenando la exocitosis (Chang et al., 2015), para permitir la rápida fusión ante la entrada de Ca^{2+} (Maximov et al., 2009). En este sentido, se ha demostrado el papel inhibitorio de estas proteínas sobre la liberación espontánea y asincrónica (Huntwork y Littleton, 2007; Yang et al., 2010; Jorquera et al., 2012; Vaithianathan et al., 2013; Lai et al., 2014). Por otra parte, recientemente se ha propuesto que la fosforilación de la complexina por PKA aumenta la liberación espontánea (Cho et al., 2015). No obstante, dadas las evidencias sobre un papel dual y aparentemente contrapuesto de estas proteínas en la fusión vesicular (Trimbuch y Rosenmund, 2016), su función no ha sido completamente aclarada.

Las proteínas NSF llevan a cabo el desensamblaje del complejo SNARE por medio de la hidrólisis de ATP. Estas proteínas se unen al complejo SNARE por medio de las proteínas adaptadoras SNAP (Sollner et al., 1993b; Mayer et al., 1996). En este proceso son muy importantes dos chaperonas que mantienen la función de las proteínas SNARE durante los repetidos ciclos de ensamblaje/desensamblaje: las CSPs y las sinucleínas (Fig. 1.3.E). Las CSPs son co-chaperonas presentes en las SVs que forman un complejo catalítico activo con Hsc70 y SGT, evitando el mal plegamiento de SNAP-25 durante ciclos (Sharma et al., 2011), permitiendo su reciclamiento (Rozas et al., 2012), la formación de nuevos complejos SNARE (Sharma et al., 2012) y el mantenimiento del RRP (Rozas et al., 2012). Las sinucleínas son chaperonas no clásicas que favorecen el ensamblaje del complejo SNARE (Burré et al., 2010; 2013) formando grandes multímeros (Burré et al., 2014) y ayudando a colocar las vesículas en la zona activa mediante su interacción con sinaptobrevina2/VAMP2 (Diao et al., 2013). La ausencia de estas proteínas da lugar a un fenotipo neurodegenerativo (Chandra et al., 2005; Gallardo et al., 2008; Sharma et al., 2012), siendo posible que estas proteínas actúen conjuntamente, ya que la expresión de

sinucleínas rescata el fenotipo neurodegenerativo del ratón KO de CSP α (Chandra et al., 2005). Además, las sinucleínas están relacionadas con la enfermedad de Parkinson (Stefanis, 2012).

1.5. Plasticidad sináptica.

La neurotransmisión puede ser modulada, aumentando o disminuyendo la magnitud de la liberación presináptica de neurotransmisores y de la respuesta postsináptica. Estos mecanismos de modulación de la neurotransmisión son denominados plasticidad sináptica. Se ha propuesto que estos fenómenos de plasticidad son claves para la codificación de las señales neuronales y el funcionamiento cerebral (Regehr, 2012; Castillo, 2012), habiéndose demostrado su implicación en numerosos procesos de la fisiología cerebral, como los de aprendizaje y memoria (Kandel et al., 2014).

La **plasticidad presináptica a corto plazo** engloba fenómenos de 1) depresión (STD); 2) facilitación (STP); o 3) aumento acumulativo o potenciación posttetánica (PTP). Se ha propuesto que estos mecanismos coexisten en las mismas sinápsis, pero el efecto neto en plasticidad depende de la contribución de cada uno, de acuerdo a las propiedades de la sinápsis. Así, la probabilidad inicial de liberación está relacionada con el desarrollo de estos fenómenos de plasticidad: sinápsis con alta probabilidad de liberación tienden a desarrollar mecanismos de depresión, mientras que las sinapsis con baja probabilidad de liberación muestran procesos de potenciación (Regehr, 2012). Además, se ha descrito que las isoformas de la proteína Munc13 expresadas también influyen en el sentido de la plasticidad a corto plazo (apartado 3.2.4; Rosenmund et al., 2002).

Los mecanismos de **STD** iniciados por un primer estímulo presináptico pueden mantenerse desde cientos de milisegundos a segundos (Regehr, 2012). La STD se ha relacionado con: la inhibición de los VDCC (Caterall y Few, 2008); la depleción parcial del RRP y el tiempo necesario para su recuperación tras su liberación (Debanne et al., 1996; Scheuss et al., 2002); la inactivación temporal de los sitios de liberación por la necesidad del reciclaje de la maquinaria exocitótica por los mecanismos de endocitosis (Hosoi et al., 2009); y con cambios en la excitabilidad neuronal por la ATPasa Na⁺/K⁺ (Muñoz-Cuevas et al., 2004). Además, en algunos tipos de sinápsis, después de estimulaciones de alta frecuencia, se observa una depresión que dura varias decenas de segundos, que ha sido asociada a la depleción del RRP y a la necesidad de participación del RP (Stevens y Wesseling, 1999), o a inhibiciones prolongadas de los VDCC (Caterall y Few, 2008). La recuperación de la STD ha sido relacionada a nivel molecular con Ca/CaM (Sakaba y Neher., 2001; Hosoi et al., 2007), Munc13 (Junge et al., 2014; Lipstein et al., 2013), Basson (Hallerman et al., 2010), mecanismos dependientes de cAMP (Sakaba y Neher, 2001), α -sinucleína (Cabin et al., 2002) o sinapsina (Rosahl et al., 1995; Gittler et al., 2008).

La **STP**, iniciada por un primer estímulo presináptico, también presenta una escala temporal que va desde cientos de milisegundos a segundos (Regehr, 2012). Se ha propuesto que la STP depende de: un aumento en los niveles de Ca^{2+} tras el primer estímulo, por lo que puede ser dependiente de la modulación positiva de los VDCC (Inchuaspe et al., 2004; Ishikawa et al., 2005; Caterall y Few, 2008); el Ca^{2+} residual del primer estímulo, que, o bien se suma al de estímulos posteriores (Katz y Miledi, 1968), o bien active otros sensores de Ca^{2+} , de mayor afinidad que la sinaptotagmina, pero de respuesta lenta (Bertram et al., 1996); o de la saturación de las proteínas quelantes de Ca^{2+} tras el primer estímulo (Mateev et al., 2004).

La **PTP** consiste en la potenciación después de una estimulación de alta frecuencia, implicando potenciaciones acumulativas después de cada estímulo, que se puede mantener desde decenas de segundos hasta minutos o incluso más (PTP de larga duración). Esta potenciación implica un incremento en la amplitud de las respuestas inducidas y un aumento en la frecuencia de la liberación espontánea (Regehr, 2012). Los mecanismos propuestos incluyen dos fenómenos probablemente relacionados: el incremento del Ca^{2+} en la zona activa y el aumento del RRP. En primer lugar, el aumento en los niveles de Ca^{2+} se ha relacionado con el incremento de su entrada por los VDCC (Habets y Borst, 2006; Korogod et al., 2007) o con el incremento en el Ca^{2+} residual (Delanay et al., 1989; Habets y Borst, 2005). Este incremento en el Ca^{2+} residual puede ser debido al aclaramiento lento del Ca^{2+} (Zucker y Reher., 2002), asociado a la lenta salida del mismo de la mitocondria (Tang y Zucker, 1997; Lee et al., 2007), o a alteraciones en el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (Zhong et al., 2001). Por otra parte, la PTP se ha relacionado también con el aumento del RRP (Habets y Borst, 2005) como consecuencia de: 1) la activación de PKC (Alle et al., 2001; Korogod et al., 2007; Fioravante et al., 2011; Chu et al., 2014), posiblemente fosforilando Munc18 (Nili et al., 2006; Toonen et al., 2006); o 2) la activación de Munc13 (Brose y Rosenmund, 2002; Beirlener et al., 2007) por Ca/CaM (Junge et al., 2004) o por la actividad de la fosfolipasa C (PLC, Rosenmund et al., 2002) asociada a la generación de DAG (Rhee et al., 2002). Es destacable que estas dos vías de modulación del RRP pueden depender de PLC (Wierda et al., 2007), que a su vez puede ser activada por los GPCR presinápticos (apartado 3.2.1). También se ha asociado la PTP con CaMKII (Chapman et al., 1995; Wang y Maler, 1998; Fiumara et al., 2007), o la proteína sinapsina (Rosahl et al., 1995) por medio de su fosforilación por la proteína quinasa A (PKA) o CaMKII (Fiumara et al., 2007).

La **plasticidad a largo plazo** tiene una duración que va desde minutos a horas. Esta plasticidad se expresa ubicuamente en las sinapsis del cerebro de mamíferos mediante diferentes mecanismos (recogidos en Castillo, 2012 o Yang y Calakos, 2013).

Además, los fenómenos de plasticidad presinápticos a menudo pueden coexistir con procesos de plasticidad de LTP postsinápticos (Castillo, 2012).

Los procesos prototípicos de **LTP** presinápticos independientes de NMDA son inducidos por HFS o patrones de alta actividad con relevancia fisiológica (Gunderfinger et al., 2010; Mistry et al., 2011), dando lugar a un incremento de la amplitud de las respuestas evocadas, de la frecuencia de los eventos espontáneos y al aumento de la probabilidad de liberación (Nicholl y Schmitz, 2005). Se han involucrado diferentes mecanismos, dependiendo de la sinapsis: el aumento en la concentración de Ca^{2+} (Zalustsky y Nicholl, 1990; Mellor y Nicholl, 2001), la modulación de los VDCC de tipo R (Breustedt et al., 2003; Dietrich et al., 2003; Myoga y Regher, 2011), y de tipo L (Kapur et al., 1998; Fourcadout et al., 2009), la actividad de la vía cAMP/PKA (Sakurai, 1987; Shibuki y Okada, 1992), la actividad de PKC (Alle et al., 2001), o la acción postsináptica de receptores metabotrópicos (mGlu) de tipo I, mediando la liberación de Ca^{2+} de reservorios intracelulares, así como modulaciones retrógradas de la presinapsis (Yeckel et al., 1999; Galván et al., 2008; 2010)

Además, existen formas de LTP dependientes de los receptores NMDA presinápticos, que modifican la excitabilidad del terminal o dan lugar a señalizaciones mediadas por Ca^{2+} (Duguid y Sjostrom, 2006; Colew et al., 2008; Rodriguez-Moreno et al., 2010). Estos fenómenos han sido asociados, en algunas sinapsis, a la vía cAMP/PKA/RIM1 α (Fourcadout et al., 2008; Lachamp et al., 2009) o a la acción retrógrada del NO (Feil y Kleppish, 2008)

Las formas de **LTD** presináptica independiente de NMDA son inducidas también por estimulaciones de alta frecuencia, y han sido asociados a los receptores mGlu2/3 (Yokoi et al., 1996; Tzounopoulos et al., 1998; Kobayashi et al., 1999), así como a la activación de receptores mGlu7 modulando los VDCC de tipo P/Q por medio de PKC (Pelkey et al., 2005; 2006; apartado 2.2.1.). Estos mecanismos presinápticos también han sido relacionados con el incremento de Ca^{2+} postsináptico mediado por receptores AMPA, VDCC de tipo L, y con la salida de este ión de reservorios intracelulares por la acción de receptores mGlu de tipo I (Castillo et al., 2012).

Las formas de LTD dependientes de NMDA se han relacionado con la señalización retrógrada por el sistema endocanabinoide. De esta manera, la LTD mediada por endocannabinoides (eCB-LTD) depende de receptores postsinápticos (mGlu del tipo I o muscarínicos), o de la entrada de Ca^{2+} a través de VDCC (Sjostrom et al., 2003; Bender et al., 2006; Nevian y Sakmann, 2006). La síntesis de endocannabinoides como 2-AG o anandamida, activaría de manera retrógrada los receptores CB1 presinápticos y las vías dependientes de PKA/calcineurina (Kano et al., 2009; Heifets y Castillo, 2009). Otras vías de neurotransmisión retrógrada que median LTD son la LTD dependiente de receptores mGlu de tipo I postsinápticos/ácido araquidónico/12-(S)-HPETE/ receptores TRPV1

presinápticos (Gibson et al., 2008; Maione et al., 2009); la LTP dependiente de BDNF postsináptico/receptores TrkB presinápticos (Gubellini et al., 2005; Sivakumaran et al., 2009); o la LTP dependiente de receptores NMDA postsinápticos/ NO/ cGMP presináptico (Nugent et al., 2007, 2009)

A nivel molecular estos fenómenos de plasticidad han sido relacionados con la modulación de los VDCC (Caterall y Few, 2008) o de proteínas de la maquinaria excitotóxica. Este es el caso de RIM (Castillo et al., 2002, apartado 3.1.4), Rab3 (Castillo et al., 1997; Tzounopoulos et al., 1998; Huang et al., 2005), o Munc13 (Breustedt et al., 2010; Yang y Calakos, 2011; apartado 3.2.2.2). Sin embargo, el papel de estas proteínas en estas formas de plasticidad, y especialmente las vías de señalización que las modulan, no ha sido completamente aclarado.

2. RECEPTORES DE LAS SINAPSIS GLUTAMATÉRGICAS.

Los fenómenos de plasticidad sináptica que afectan a la liberación de glutamato son de gran importancia para la comunicación neuronal y funcionamiento cerebral. Estas formas de plasticidad son activadas principalmente por dos tipos de cascadas de señalización dependientes de actividad: la señalización por calcio, cuya concentración aumenta durante los procesos excitotóxicos, y la señalización iniciada por receptores del terminal presináptico. De esta manera, tanto los receptores ionotrópicos (apartado 2.1), que también pueden estar presentes en la presinápsis, como los receptores acoplados a proteínas G (GPCR), modulan la liberación de neurotransmisores. En las sinápsis glutamatérgicas, estos GPCR comprenden tanto los receptores metabotrópicos de glutamato (apartado 2.2.1), como heteroreceptores (apartado 2.2.2), que también se expresan en estas sinápsis, pero que son activados por otros neurotransmisores distintos a glutamato.

2.1.Receptores ionotrópicos.

Los receptores ionotrópicos están constituidos por canales catiónicos operados por su unión a ligando. De acuerdo con su diferente permeabilidad iónica, unión a ligandos específicos y función, existen tres tipos de receptores ionotrópicos de glutamato. Estos receptores forman dímeros entre sus diferentes tipos de subunidades, variando su funcionalidad de acuerdo a las diferentes combinaciones resultantes.

Los receptores de **AMPA** (α -amino-3-hidroxi-5-metilisoxazolil-4 propionato) son permeables a Na^+ y en algunos casos a Ca^{2+} . Están formados por heterotetrámeros de las subunidades GluA1-4, siendo las subunidades GluA2 impermeables a Ca^{2+} . Estos

receptores se localizan en la membrana postsináptica, tanto en sitios sinápticos como extrasinápticos. Intervienen principalmente en generación de la despolarización postsináptica rápida, aunque son también muy importantes en fenómenos de plasticidad. La variación en el número de receptores AMPA presentes en la densidad postsináptica, a nivel de la inserción/reciclamiento, así como difusión lateral entre sitios sinápticos y extrasinápticos, da lugar a fenómenos de plasticidad a largo plazo (tanto LTD como LTP). Además, la variación en el número de receptores AMPA es muy importante en la plasticidad homeostática, que es una respuesta de adaptación a variaciones a prolongadas de la actividad sináptica, que promueve su estabilización (Granger y Nicholl, 2013).

Los receptores de **NMDA** (N-metil-D-aspartico) dependen de glicina como co-activador y son permeables tanto a Na^+ como a Ca^{2+} . Están formados por heterotetrámeros de las subunidades NR1 (1a, 1b, 2a, 2b, 3a, 3c, 4a, 4b), NR2 (A, B, C, D) y NR3 (A, B). Estos receptores están bloqueados por Mg^{2+} al potencial de membrana en reposo, siendo necesaria la despolarización postsináptica por la acción de los receptores AMPA para quitar este bloqueo y activar el receptor. Su localización es principalmente postsináptica, a nivel sináptico como extrasináptico, pero también están presentes en la presinápsis y en las células de glía. Su función está relacionada con la entrada del Ca^{2+} y la regulación del tráfico de los receptores AMPA a nivel postsináptico, así como con fenómenos de plasticidad presinápticos (Paoletti y Neyton, 2007; Lüscher y Malenka, 2012).

Los receptores de **kainato** (formados por la subunidades $\text{GluR}_5/\text{GRIK1}$, $\text{GluR}_6/\text{GRIK2}$, $\text{GluR}_7/\text{GRIK3}$, $\text{KA1}/\text{GRIK4}$, $\text{KA2}/\text{GRIK5}$) se localizan tanto a nivel presináptico como postsináptico. Como receptores postsinápticos, median corrientes más lentas que la de los receptores AMPA, siendo permeables a Na^+ y en menor medida a Ca^{2+} , y modulan la excitabilidad neuronal, controlando las corrientes lentas activadas por hiperpolarización (Contractor et al., 2011; Lerma y Marques, 2013). A nivel presináptico, los receptores de kainato modulan de manera bidireccional tanto la liberación GABAérgica, como glutamatérgica (Sihra y Rodríguez-Moreno, 2013). Así, inhiben la liberación GABAérgica (Rodríguez-Moreno et al, 1997) por medio de una señalización metabotrópica no canónica que implica proteínas Gi/o y mecanismos de señalización intracelular (Rodríguez-Moreno y Lerma, 1998), mientras que también se ha propuesto que estos receptores también aumentan la liberación GABAérgica por mecanismos ionotrópicos canónicos (Jiang et al., 2001). Además, los receptores de kainato presinápticos modulan la liberación de glutamato de manera bidireccional, posiblemente por mecanismos similares a la modulación GABAérgica (Schmitz et al., 2001; Lauri et al., 2006; Sihra y Rodríguez-Moreno, 2013). Por último, se ha descrito el papel de los receptores de kainato en el desarrollo de las redes neuronales (Lerma y Marques, 2013).

En las sinapsis glutamatérgicas, también existen heteroreceptores ionotrópicos, que se activan por unión a ligandos distintos de glutamato y que tienen funciones diversas. Este es el caso de los receptores de GABA A, glicina, operados por ATP (P_2X), serotonina ($5-HT_3$), nicotínicos de acetilcolina (nAChR), u operados por PIP_2 (canales de K^+ tipo Kir).

2.2. Receptores acoplados a proteínas G.

Los receptores acoplados a proteínas G (GPCR) son proteínas transmembrana activadas por ligandos extracelulares, como péptidos o neurotransmisores, o incluso por la luz, que transducen estas señales extracelulares activando vías de señalización intracelulares. El cambio conformacional por unión a ligando de los GPCR activa proteínas G triméricas, compuestas por las subunidades α , β y γ . Estas proteínas se activan por el intercambio de GDP por GTP de la subunidad α , que origina la disociación del complejo heterotrimérico. De esta manera, pueden activarse distintas vías de señalización intracelulares mediadas por la subunidades α o $\beta\gamma$. La hidrólisis de GTP en GDP, producida de forma espontánea tras la inactivación del receptor, o modulada por proteínas RGS (reguladoras de señalización por proteínas G), induce el re-ensamblaje del heterotrímero inactivo. La diversidad de las señalizaciones que pueden mediar estas proteínas es muy amplia, ya que existen 4 familias de subunidades α (α_s , $\alpha_{i/o}$, $\alpha_{q/11}$, $\alpha_{12/13}$), que pueden combinarse de forma variable con los 5 tipos de subunidades β y los 12 tipos de subunidades γ . Además, un mismo receptor puede señalar por medio de varias proteínas G triméricas. Existen numerosos tipos de GPCR divididos clásicamente en 4 clases: A, tipo rodopsina; B, tipo secretina; C, tipo receptores de glutamato; D, otros, como los de adhesión, Frizzled y los que permanecen sin clasificar (Wettschureck y Offermanns, 2005).

En las sinapsis glutamatérgicas, están presentes tanto autoreceptores que unen el glutamato liberado, los receptores metabotrópicos de glutamato, como heteroreceptores que unen otros ligandos, modulando todos ellos la neurotransmisión glutamatérgica.

2.2.1. Receptores metabotrópicos de glutamato.

Los receptores metabotrópicos de glutamato (receptores mGlu) constituyen un conjunto de GPCRs del tipo C o-3, que actúan generalmente como autoreceptores, uniendo el glutamato liberado, y mediando mecanismos de señalización intracelular que modulan la neurotransmisión glutamatérgica. Los receptores mGlu realizan esta función principalmente por medio de la modulación directa de canales iónicos, la producción de

segundos mensajeros intracelulares, y la regulación de proteínas quinasas que determinan la fosforilación de proteínas (Fig.1.5)

Los receptores mGlu 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 (Niswender y Conn, 2010).

Los **receptores del grupo I** (receptores mGlu1 y 5) se localizan principalmente a nivel postsináptico (Houamed et al., 1991; Abe et al., 1992; Mateos et al., 2000; López-Bendito et al., 2002), aunque también a nivel presináptico (Fotuhi et al., 1993; Wittmann et al., 2001). Su principal mecanismo de señalización comprende la activación de la fosfolipasa C (PLC), para hidrolizar fosfatidilinositol 4,5 bifosfato (PIP₂). Este proceso genera diacilglicerol (DAG) e inositol-trifosfato (IP₃) (Manzoni et al., 1990; Schoepp et al., 1990), que activan la proteína quinasa C (PKC) y liberan Ca²⁺ del retículo endoplásmico, respectivamente (Fig. 1.5). Otros efectos atribuidos a los receptores mGlu del grupo I son el incremento de los niveles intracelulares de cAMP (Joly et al., 1995; Thomsen, 1996), la activación de fosfolipasa D (Servitja et al., 1999; Shinomura et al., 2000), la inhibición de canales de potasio (Ikeda et al., 1995; Kammermeier e Ikeda, 1999; Kammermeier et al., 2000), la inhibición de los VDCC del tipo N y P/Q (Choi y Lovinger, 1996; McCool et al., 1998; Stefani et al., 1998b; Kammermeier e Ikeda, 1999; Kammermeier et al., 2000), la fosforilación de la proteína quinasa activada por mitógenos p38 (p38MAPK) (Wang et al., 2007) y la activación de la proteína quinasa Jun (Li et al., 2007).

A nivel postsináptico, modulan la actividad de los receptores de AMPA y NMDA (Fitzjohn et al., 1996; Pisani et al., 2001; Stefani et al., 2010; Rosenbrock et al., 2010), participando en la potenciación a largo plazo (LTP) (Aiba et al., 1994; Piccinin et al., 2010) y en la depresión a largo plazo (LTD) (Wang et al., 2009; Suzuki y Okada, 2010)

A nivel presináptico, facilitan o inhiben la transmisión sináptica, modulando dualmente la liberación de glutamato (Herrero et al., 1992, 1994, 1998; Rodríguez-Moreno et al., 1998; Sistiaga y Sánchez-Prieto, 2000a, b; Schwartz y Alford, 2000; Paquet y Smith, 2003).

Los **receptores del grupo II** (receptores mGlu2 y mGlu3) se localizan a nivel post y presináptico, así como en células de glia (Petralia et al., 1996; Mineff y Valtschanoff, 1999). En la presinapsis estos receptores se sitúan preferentemente lejos de la zona activa, en la zona perisináptica (Tanabe et al., 1992, 1993; Shigemoto et al., 1997; Wada et al., 1998).

Estos receptores inhiben la transmisión glutamatérgica y GABAérgica por medio de (Fig. 1.5) la inhibición de los VDCC (Chavis et al., 1995; Ikeda et al., 1995; Choi y Lovinger, 1996; McCool et al., 1996) y de la adenilato ciclasa, disminuyendo los niveles de cAMP intracelulares (Manzoni et al., 1992; Prézeau et al., 1992, 1994; Tanabe et al., 1993; Conn y Pin, 1997).

Su localización perisináptica y su alta afinidad por el glutamato (Schoepp et al., 1999) sugieren que estos receptores podrían activarse tras la difusión del glutamato, en situaciones de estimulación de alta frecuencia. Además, se ha propuesto que también podrían ser activados por el glutamato procedente de las sinapsis vecinas (Scanziani et al., 1997; Vogt y Nicoll, 1999; Kew et al., 2001). De este modo, la inhibición de la liberación producida por el receptor evitaría la aparición de niveles neurotóxicos de glutamato en la hendidura sináptica, manteniendo su concentración a niveles fisiológicos. Por otro lado, de acuerdo con su presencia en células de glia estos receptores, podrían estar implicados en múltiples aspectos de la función glial y en la comunicación glía-neurona (Corti et al., 2007; Durand et al., 2010).

Receptores metabotrópicos del grupo III: receptores mGlu7.

Los receptores metabotrópicos de tipo III (receptores mGlu4/6/7/8) se expresan predominantemente en la zona activa presináptica, donde actúan principalmente como receptores inhibitorios, aunque se ha propuesto que, en algunas situaciones, pueden modular bidireccionalmente la liberación de glutamato.

Isoformas y localización.

Los receptores mGluIII presentan diferentes isoformas por procesamiento alternativo del extremo carboxilo terminal (Niswender y Conn, 2010; Mercier y Lodge, 2014).

Los receptores mGlu4 se localizan principalmente en la zona activa presináptica, presentando una alta expresión en cerebelo, niveles moderados en bulbo olfatorio y tálamo, y débil expresión en el giro dentado del hipocampo y en los ganglios basales (Oishi et al., 1995; Corti et al., 2002). Se ha propuesto la existencia de la variante mGlu4b (Thomsen et al., 1997), aunque existen discrepancias (Corti et al., 2002). Además, hay evidencias de la isoforma denominada taste-mGlu4, localizada en las papilas gustativas (Chaudhari et al., 2000).

Los receptores mGlu6 (mGlu6a-c) se localizan sólo en la retina (Nakajima et al., 1993) y a nivel postsináptico (Nomura et al., 1994).

Los receptores mGlu8 presentan tres isoformas (mGlu8a-c). Sus niveles de expresión en el CNS son más bajos que los de mGlu4/7, habiéndose descrito la expresión de las isoformas mGlu8a y b en bulbo olfatorio, hipocampo, retina, corteza cerebral, cerebelo y amígdala, mientras que mGlu8c se expresa en células gliales (Malherbe et al., 1999). Su localización es predominantemente presináptica (Shigemoto et al., 1997a), aunque se ha descrito su presencia a nivel postsináptico (Koulen y Brandstätter, 2002).

Las variantes mGlu6b/c y mGlu8c presentan sólo el extremo amino terminal y se ha propuesto que podrían funcionar como receptores solubles o como dominantes negativos.

Los receptores **mGlu7** presentan 5 isoformas (mGlu7a-e). Los receptores mGlu7 son los mGlu de tipo III más ampliamente expresados en el CNS, localizándose en la zona activa presináptica (Shigemoto et al., 1997a). mGlu7a se expresa en altos niveles en corteza cerebral, tálamo e hipotálamo, hipocampo, cerebelo, bulbo olfatorio, ganglios basales y médula espinal. La isoforma mGlu7b sólo se expresa de manera significativa en determinadas áreas cerebrales, como giro dentado, islotes de Calleja, sustancia innominada o globo pálido, donde colocaliza con mGlu7a (Kinoshita *et al.*, 1998). Las isoformas mGlu7c/d se expresan en tejidos no pertenecientes al CNS (Schulz et al., 2002).

Además, también se ha descrito la presencia de los receptores del grupo mGluIII en presinápsis GABAérgicas donde actúan como heteroreceptores (Kogo et al., 2004), así como en distintos tejidos fuera del SNC (Mercier y Lodge, 2014).

Además, la localización y expresión de los mGlu de tipo III está influenciada por otros aspectos:

1) La neurona postsináptica con la que establece sinapsis el terminal presináptico. Los receptores mGlu de tipo III presentan niveles de expresión altos en las presinápsis que contactan con ciertos subtipos de interneuronas, tal como se ha descrito en las áreas CA1 y CA3 (Shigemoto et al., 1996; 1997; Corti et al., 2002; Simogyi et al., 2003; Kogo et al., 2004; Ferraguti et al., 2005), o en la corteza somatosensorial (Dalezios et al., 2002). Así, los terminales presinápticos del axón de una neurona piramidal que establecen sinapsis con interneuronas que expresan el receptor mGlu1, presentan una concentración del receptor mGlu7 más de diez veces mayor que los botones sinápticos del mismo axón, que contactan con otras neuronas piramidales u otros tipos de interneuronas (Fig. 1.4. A; Shigemoto et al., 1996). Recientemente, se ha demostrado que la localización presináptica de los receptores mGlu7 depende del reclutamiento por la proteína postsináptica Eln1 (Tomioka et al., 2014).

2) El desarrollo neuronal. Se ha demostrado una regulación a la baja de los receptores mGlu del tipo III con el desarrollo, tanto en expresión (Bradley et al., 1998; Elezgari et al., 1999; Simonyi et al., 2000), como en función (Manahan-Vaughan y Reymann, 1995; Lacey et al., 2005; Ayala et al., 2008). Además, se ha propuesto que, en las etapas iniciales de desarrollo, actúan los receptores mGlu4/8 con alta afinidad por el glutamato, mientras que en etapas más avanzadas, sólo continúan activos los receptores mGlu7, de baja afinidad (Ayala et al., 2008). De acuerdo con esta idea, el fenotipo epiléptico de los ratones carentes de los receptores mGlu7 aparece sólo a partir de las diez semanas de edad (Sansing et al., 2001). Además, en terminales cerebrocorticales de corteza purificados de ratas jóvenes, se expresan los receptores mGlu4 y mGlu7, mientras que, en los obtenidos de ratas adultas, sólo se expresan los receptores mGlu7 (Millan et al., 2002b, Martín et al., 2010).

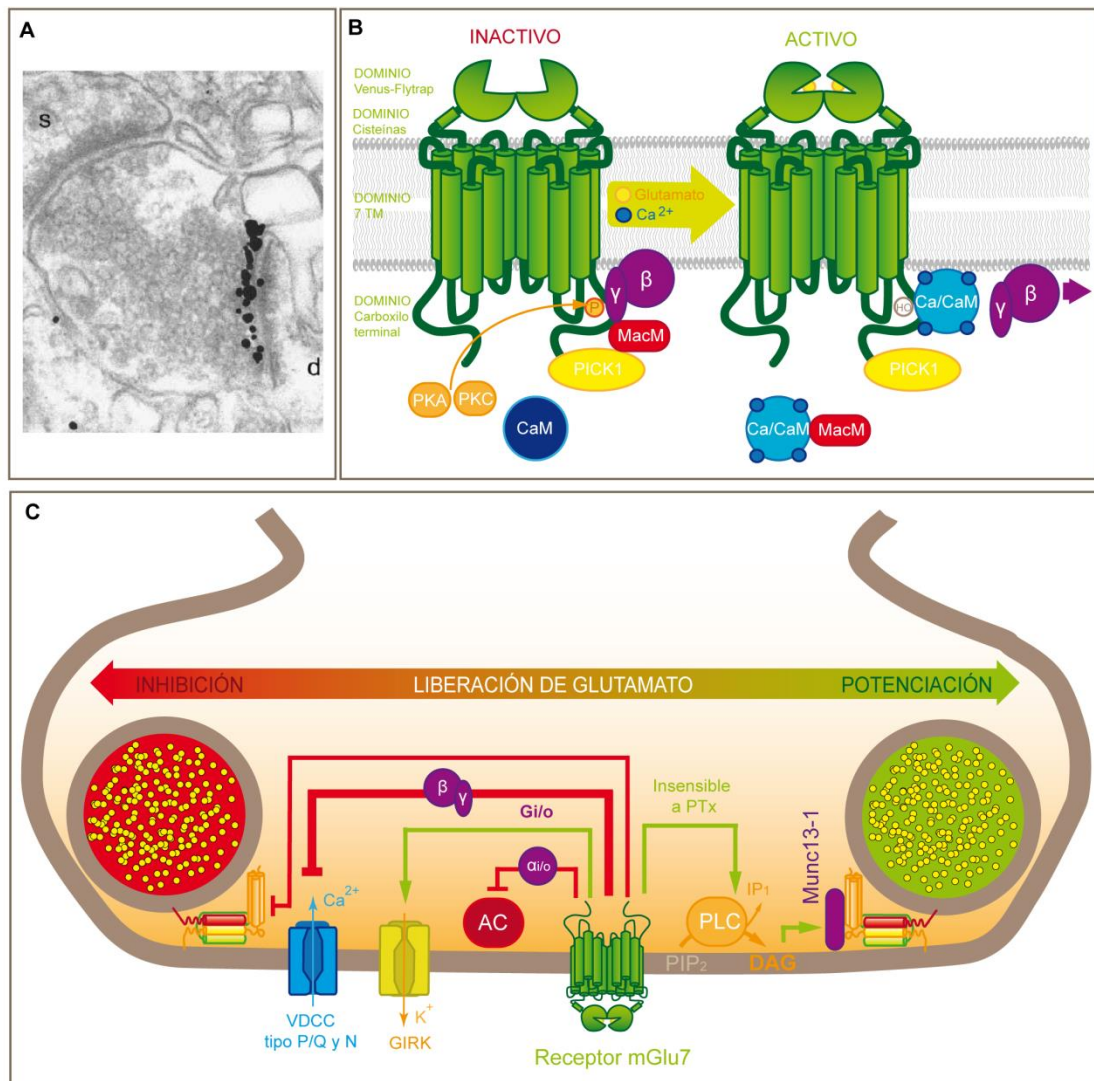


Fig 1.4. Receptores metabotrópicos de tipo 7. (A) Localización presináptica de los receptores mGlu7, en función de la neurona postsináptica con la que establecen sinápsis (Shigemoto et al., 1996). (B) Estructura y proteínas reguladoras de los receptores mGlu7 (adaptado de Niswender y Conn, 2010) (C) Vías de señalización de los receptores mGlu7 que regulan la liberación de glutamato.

3) La dotación de VDCC del terminal presináptico en la corteza cerebral. En terminales sinápticos de corteza cerebral de ratas jóvenes, se ha observado que el receptor mGlu4 se expresa y modula la liberación tanto en terminales con VDCC de tipo N como P/Q, mientras que el receptor mGlu7 sólo se expresan en terminales presinápticos con VDCC de tipo N (Millán et al., 2002b; 2003). Además, en el ratón KO para los canales de tipo N, en el que todos los terminales presinápticos presentan canales tipo P/Q, se pierde la acción inhibitoria del receptor mGlu7 (Martín et al., 2008). Por lo tanto, en corteza cerebral, es posible que el receptor mGlu7 esté asociado únicamente a terminales presinápticos con VDCC de tipo N. Sin embargo, en otras áreas, como el hipocampo, el receptor se expresa también en terminales con canales de tipo P/Q (Martín et al. 2008).

Estructura.

Los GPCR de tipo 3 o C están caracterizados por presentar un largo dominio extracelular amino terminal, una región rica en cisteínas que actúa como nexo de unión con los siete dominios transmembrana, y un dominio intracelular carboxilo terminal. Además, estos receptores se presentan funcionalmente como homodímeros (Pin et al., 2003).

La secuencia extracelular amino terminal contiene el dominio de unión a ligandos ortostéricos, que se unen al mismo lugar que el ligando endógeno, denominado VFD (del inglés *Venus Flytrap Domain*). La unión del glutamato a este dominio provoca el cambio a conformación cerrada, con los dos lóbulos globulares del dominio dispuestos en torno al ligando (Fig. 1.4. B; O'Hara et al., 1993; Muto et al 2007). De acuerdo a la dimerización de estos receptores, existen tres estados de activación de los dímeros (Jingami et al., 2003): abierto-abierto (inactivo), cerrado-abierto (parcialmente activo), cerrado-cerrado (activo) (Kniazeff et al., 2004). Además, este dominio VFD también puede unir cationes divalente (Ca^{2+} y Mg^{2+}), que modulan la acción del receptor (Kubo et al., 1998; Francesconi y Duvoisin, 2004). El dominio rico en cisteínas es necesario para la propagación del cambio conformacional, asociado a la activación del receptor por unión del agonista al VFD, que da lugar a la señalización intracelular (Rondard et al., 2006).

El dominio 7TM presenta 7 hélices transmembrana conectadas por 3 bucles extracelulares y 3 intracelulares. El bucle intracelular 2 es el responsable del reconocimiento específico de las proteínas G, aunque el resto de bucles y el extremo carboxilo terminal también participan en esta función (Pin et al., 1994; Gomeza et al., 1997). Además, al dominio 7TM se unen los moduladores alostéricos de estos receptores, potenciando la acción de los agonistas ortostéricos o actuando como antagonistas no competitivos (Niswender y Conn, 2010).

El dominio carboxilo terminal presenta tres secuencias muy importantes para la función del receptor. El extremo distal presenta una secuencia de unión a dominios PDZ. La región proximal interacciona con las subunidades $\beta\gamma$ de las proteínas G y con calmodulina, además de presentar los sitios de regulación por fosforilaciones. Y por último, la región intermedia de este dominio carboxilo terminal, es responsable de la localización presináptica del receptor (Stowell y Craig, 1999; Dev et al., 2001).

Finalmente, se ha descrito que, además de la forma homodimérica de estos receptores, pueden presentarse también como heterodímeros (Doumazane et al., 2011; González-Maezo et al., 2008; Yin et al., 2014), con variaciones en sus perfiles farmacológicos (Kammermier, 2012).

Interacciones y fosforilaciones.

Los receptores mGlu del grupo III interaccionan, por medio de su extremo carboxilo terminal, con numerosas proteínas, como calmodulina, filamina A, GRIP, GRK2, Plas1, Pias1,

PICK1, PKA, PKC, PP1 γ 1, syntenin o α -tubulina (Enz et al., 2007).

El extremo C terminal de los receptores mGlu7 interacciona con la proteína **PICK1** (proteína de interacción con la proteína quinasa C), por medio de su región distal de reconocimiento de dominios PDZ. Además, esta interacción es necesaria para la correcta localización del receptor en la zona activa (Boudin et al., 2000; El Far et al., 2000), para la correcta funcionalidad del mismo (Dev et al., 2000; Perroy et al., 2002; Zhang et al., 2008), y modula la fosforilación del receptor por PKC (Dev et al., 2000; Zhang et al., 2008).

La interacción con calcio/calmodulina (Ca/CaM), que afecta a la regulación del receptor. De esta manera, **Ca/CaM**, las subunidades $\beta\gamma$ de proteínas G triméricas ($G_{\beta\gamma}$) y la proteína MacMARKS (proteína de macrófagos miristoilada rica en alanina sustrato de la quinasa C, MacM, cuya función es estabilizar la unión de $G_{\beta\gamma}$) interaccionan con la misma región proximal del extremo C terminal (Fig.1.4.B). Se ha propuesto que, en estado de reposo, los receptores mGlu7 están unidos con PICK1, $G_{\beta\gamma}$ y MacM. El aumento de Ca^{2+} en la zona activa, concomitante con la liberación de glutamato, induciría la interacción con Ca/CaM, desplazando MacM y $G_{\beta\gamma}$, y permitiendo la señalización vía proteínas G triméricas (Fig. 1.4. B; El Far y Betz, 2002; Bertaso et al., 2006). De acuerdo con este modelo, los inhibidores de CaM suprimen la inhibición de la liberación de glutamato por el receptor mGlu7 (O'Connor et al., 1999; Millán et al., 2002a; Martín et., 2007).

El dominio carboxilo terminal del receptor mGlu7 también interacciona con otras proteínas, aunque se desconoce exactamente el papel funcional de estas interacciones. Este es el caso de α -tubulina (Saugstad et al., 2002), filamina A (proteína de unión a actina; Enz, 2002b), la subunidad catalítica γ 1 de la proteína fosfatasa 1 (PP1 γ 1; Enz, 2002a), GRIP (proteína con dominios PDZ, Hirbec et al., 2002), la proteína Pias1 relacionada con el proceso de SUMOilación (Tang et al., 2005) o sintenina (Hirbec et al., 2002; Enz y Croci, 2003).

Además, el receptor mGlu7 también participa en complejos proteicos con las proteínas de la maquinaria excitotóxica Munc13-1 (Martín et al., 2010) y RIM1 α (Pelkey et al., 2008).

Por último, el receptor mGlu7 es regulado por la **fosforilación** de la región de unión a Ca/CaM del dominio carboxilo terminal, que inhibe la acción del receptor (Fig.1.4.B). PKC fosforila la serina 862 inhibiendo la unión de Ca/CaM (Airas et al., 2001) y la funcionalidad del receptor (Macek et al., 1998; Millán et al., 2002a). Sin embargo, también se ha descrito que la fosforilación por PKC es necesaria para la correcta localización del receptor (Suh et al., 2008). PKA también fosforila la Ser862 suprimiendo la acción inhibitoria del receptor sobre la liberación (Cai et al., 2001).

Farmacología.

El agonista ortostérico exógeno más común de los receptores mGluIII es el ácido L-(+)-2-amino-4-fosfonobutírico (L-AP4). Tanto el glutamato endógeno, como el L-AP4, activan los receptores mGlu4/6/8 a bajas concentraciones, en el rango micromolar o incluso

COMPUESTOS	ACTIVIDAD	SELECTIVIDAD
L-AP4	AgoO	mGlu4,6,8 >mGlu7
L-SOP	AgoO	mGlu4,6,8>mGlu7
(1S,2R)-APCPr	AgoO	mGlu4,6,8>mGlu7
ACPT-I	AgoO	mGlu4,6,8
(+)-ACPT-III	AgoO	mGlu4,6,8
PPG	AgoO	mGlu8 >mGlu4,6>mGlu7
Z-ciclopentil AP4	AgoO	mGlu4>mGlu8
LSP1-2111	AgoO	mGlu4,6>mGlu7,8
Ácido Cinabárico	AgoO	mGlu4>mGlu6,7,8
DCPG	AgoO	mGlu8>mGlu2>mGlu4,6 >mGlu7
S-homo-AMPA	AgoO	mGlu6>mGlu4,7
LSP4-2022	AgoO	mGlu4>mGlu6,7 >mGlu8
MAP4	AgoO	Grupo III
MSOP	AntO	Grupo III
MPPG	AntO	Grupo III >grupo II
CPPG	AntO	Grupo III >group II
UBP1112	AntO	Grupo III >grupo II
LY341495	AntO	Grupo II > mGlu8 >mGlu7 >mGlu4
DCG-IV	AntO	Grupo II (Ago)>group III
MDCPG	AntO	mGlu8
XAP044	AntO	mGlu7 >mGlu8 >mGlu4,6
PHCCC	MAP	mGlu4 , mGlu1 (Ant)
VU0155041	MAP/AgoA	mGlu4
VU0364770	MAP	mGlu4 >mGlu6, mGlu5 (Ant)
ADX88178	MAP	mGlu4 >mGlu8 >mGlu6 (Ago)
AMN082	AgoA	mGlu7 > mGlu8,4 >mGlu6
MMPiP	MAN	mGlu7 >mGlu8,4
ADX71743	MAN	mGlu7 >mGlu4,6,8
AZ12216052	MAP	mGlu8 , mGlu4?

Tabla 1.1. Fármacos que modulan los receptores mGlu de tipo III. Los compuestos en negrita son considerados selectivos de los subtipos de receptores mGlu del grupo III. AgoO: agonista ortostérico; AgoA: agonista alostérico; AntO: antagonista ortostérico; MAN: modulador alostérico negativo; MAP: modulador alostérico positivo. Extraído de Mercier y Lodge, 2014, donde se indican las referencias bibliográficas de cada compuesto.

submicromolar, mientras que el receptor mGlu7 es activado a concentraciones submilimolares o milimolares (Schoepp et al, 1999). Existen multitud de fármacos agonistas y antagonistas, tanto ortostéricos como alostéricos, de estos receptores (recogidos en la Tabla1.1. y ampliamente en Nisweder y Conn, 2010 y Mercier y Lodge, 2014), aunque existen pocos fármacos específicos para cada uno de los subtipos de receptores mGluIII. Concretamente, para el receptor mGlu7 no existen agonistas ortostéricos específicos, pero sí ligandos alostéricos, como el modulador positivo AMN082, o los moduladores negativos MMPiP y ADX71743. Además, recientemente se ha propuesto la acción selectiva sobre el receptor mGlu7 del antagonista XAP044 (Gee et al., 2014). No obstante, la acción de estos moduladores alostéricos es compleja y puede que se restrinja a algunas acciones del receptor o al contexto celular. Aunque el AMN082 puede activar proteínas G en líneas celulares (Suzuki et al., 2007) e inducir la internalización del receptor (Pelkey et al., 2008), no activa las vías de señalización dependientes del receptor mGlu7 en algunas sinapsis (Ayala et al., 2008). Por otra parte, MMPiP, aunque bloquea la activación de proteínas G por L-AP4 en líneas celulares (Suzuki et al., 2007), no antagoniza la inhibición de la liberación de glutamato por activación del receptor en ciertas sinapsis (Niswender et al., 2010). Por otra parte, se ha propuesto que el agonista ortostérico del receptor mGlu4, LSP4-2022, y el modulador

alostérico negativo ADX71743, regulan también la actividad del receptor mGlu7 (Goudet et al., 2012; Klar et al., 2015).

Modulación de la liberación de glutamato.

Los receptores metabotrópicos de tipo III inhiben la liberación de neurotransmisor por distintos mecanismos, aunque también existen evidencias de su acción potenciadora (Fig. 1.4.C). Se ha demostrado que el receptor mGlu7 integra su vía de señalización inhibitoria (Ladera et al., 2007; Martín et al., 2008), y probablemente potenciadora (Martín et al., 2010), con los receptores de adenosina A₁ y GABA B, con los que se coexpresa. Además, se ha propuesto que los receptores metabotrópicos de tipo III se acoplan a otras señalizaciones, como la activación de las vías de MAPK o PI3K (Iacovelli et al., 2003), o la modulación de los receptores NMDA postsinápticos (Gu et al., 2012).

Por otra parte, la acción del receptor mGlu6 en retina es diferente a la del resto de receptores mGluIII. Este receptor, localizado a nivel postsináptico en las células bipolares ON, inhibe los canales catiónicos TRPM1 (Koike et al 2010; Morgans et al., 2010).

Inhibición de la liberación. La activación de los receptores metabotrópicos de tipo III por L-AP4 reduce la neurotransmisión excitadora en numerosas regiones cerebrales: hipocampo (White et al., 1979; Harris y Cotman, 1983; Basky et al., 1991; Bushell et al., 1996; Dietrich et al. 1997; Macek et al., 1996; Zhai et al., 2002; Capogna, 2004; Pelkey et al., 2005; Ayala et al., 2008), amígdala (Rainnie y Shinnick-Gallegher, 1992; Neugebauer et al., 1997), bulbo y tracto olfatorio (Tromboy y Westbrook, 1992; Anson y Collins 1987; Jones et al., 2008), estriado (Pisani et al., 1997; Cuomo et al., 2009), globo pálido (Matsui y Kita, 2003), tálamo (Turner y Salt, 1999; Kyuyoung y Huguenard, 2014), hipotálamo (Oliet et al., 2001; Panatier et al., 2004), cerebelo (Lorez et al., 2003), núcleo accumbens (Manzoni et al., 1997; Xi et al., 2003), colículo superior del mesencéfalo (Pothecary et al. 2002; Lacey et al., 2005), sustancia negra (Bonci et al., 1997; Wingmore y Lacey, 1998; Wittmann et al., 2001), cáliz de Held (Takahashi et al., 1996; Renden et al., 2005; Billups et al., 2005) o en sinaptosomas de corteza cerebral (Millán et al., 2002a, 2002b; 2003; Martín et al., 2007). Además, esta inhibición tiene un origen presináptico, ya que: 1) está asociada a un incremento en el cociente entre pares de pulsos (PPR, Harris y Cotman, 1983; Lorez et al., 2003; Manzoni et al., 1997; Bonci et al., 1997); 2) reduce la frecuencia, pero no la amplitud de la liberación espontánea o mEPSC (Gereau y Conn, 1995; Manzoni et al., 1997; Schrader y Tasker, 1997; Schoppa y Westbrook, 1997; Panatier et al., 2004); 3) y ha sido estudiada en terminales presinápticos purificados o sinaptosomas (Millán et al., 2002a, 2002b, 2003; Martín et al., 2007).

Además, estos receptores pueden actuar como heteroreceptores en terminales GABAérgicos (Salt y Eaton, 1995; Bonci et al., 1997; Schrader y Tasker, 1997; Wittmann et al., 2001; Semyanov y Kullman, 2000; Matsui y Kita, 2003; Valenti et al., 2003; Turner y Salt,

2003; Panatier et al., 2004; Kogo et al., 2004; Rusakov et al., 2004; Giustizieri et al., 2005; Chu y Moenter, 2005; MacInnes et al., 2008; Cuomo et al., 2009; Kyuyoung y Huguenard, 2014; Klar et al., 2015)

Estudios con agonistas ortostéricos no selectivos, agonistas selectivos y los ratones KO correspondientes, han permitido determinar la acción individual de los diferentes subtipos de receptores. El receptor mGlu4 tiene una acción inhibitoria en la sinapsis cerebral de la fibra paralela con la neurona de Purkinje (Pekhletski et al., 1996; Abibol et al., 2008; Goudet et al., 2012), en la sinapsis de la corteza lateral olfatoria del tracto piriforme (Jones et al., 2008), en los ganglios basales y sus circuitos motores asociados (Marino et al., 2003; Valenti et al., 2003; 2005; Cuomo et al., 2009; Beurrier et al., 2009) y en el hipotálamo (Panatier et al., 2004). El receptor mGlu8 actúa en el hipotálamo (Panatier et al., 2004), colículo superior (Pothecary et al. 2002), hipocampo (Zhai et al., 2002; Ayala et al., 2008; Mercier et al., 2013), tálamo (Kyuyoung y Huguenard, 2014), sustancia gris periacueductal (Marabese et al., 2005), amígdala (Ren et al., 2011; Palazzo et al., 2011) y cáliz de Held (Renden et al., 2005). El receptor mGlu7 presenta un papel inhibitorio en hipocampo (Laezza et al., 1999; Kogo et al., 2004; Pelkey et al., 2005; Ayala et al., 2008), tálamo (Turner y Salt, 2003; Kyuyoung y Huguenard, 2014), núcleo acumbes (Xi et al., 2003; Li et al., 2008), sustancia gris periacueductal (Marabese et al., 2007), amígdala (Ugolini et al., 2008; Ren et al., 2011; Gee et al., 2014) y corteza cerebral (Millán et al. 2002a, 2002b, 2003 ; Martín et al., 2007).

Los receptores mGlu del grupo III inhiben la liberación de glutamato por medio de distintos mecanismos:

1) La **inhibición de los VDCC**. Esta acción reduce tanto la liberación espontánea, como la inducida por despolarización, afectando tanto a canales de tipo P/Q, como de tipo N. Esta inhibición implica a proteínas Gi/o sensibles a PTx, por un mecanismo delimitado a la membrana plásmática, en el que participan las subunidades $\beta\gamma$ (Herlitze et al., 1996). Este mecanismo se ha descrito en cultivos neuronales (Trombley y Westbrook, 1992; Sahara y Westbrook, 1993; Hay y Kunze, 1994; Tyler y Lovinger, 1995), neuronas piramidales (Stefani et al., 1996; 1998), neuronas de hipocampo (Copogna; 2004; Pelkey et al., 2005), el cáliz de Held (Takahashi et al., 1996; Renden et al., 2005), interneuronas corticales (Rusakov, 2004), axón reticuloespinal (Cochilla y Alford, 1998), tracto solitario (Glaum y Miller, 1995) y preparaciones de terminales sinápticos purificados (sinaptosomas) de corteza cerebral (Herrero et al., 1996; Vazquez y Sánchez-Prieto, 1997; Millán et al., 2002a) e hipocampo (Martín et al., 2007). Estos mecanismos de inhibición pueden ser revertidos por la fosforilación del receptor por PKC y PKA, y requieren la acción de Ca/CaM. Por lo tanto, la regulación de estas proteínas afecta a los mecanismos de inhibición por receptores mGlu7, tal como se ha detallado previamente en el apartado *Interacciones y fosforilaciones*.

En cultivos de neuronas granulares de cerebelo, se ha observado que el receptor expresado a nivel somático, puede acoplarse a PLC y activar PKC para inhibir los VDCC (Perroy et al., 2000). En consonancia con este mecanismo, se ha descrito que la LTD inducida por activación del receptor mGlu7 en las fibras musgosas de hipocampo es dependiente de PKC (Pelkey et al., 2005).

2) Por otra parte, también se ha propuesto la capacidad de los receptores mGlu de tipo III de inhibir la liberación de glutamato por medio de la **inhibición de la maquinaria exocitótica**. Así, en rodajas de hipocampo el receptor mGlu8 inhibe los potenciales campo (fEPSC) y los mEPSCs, sin alterar la entrada, difusión o aclaramiento del Ca^{2+} . Se ha propuesto que esta acción es el resultado de una reducción en la afinidad por el Ca^{2+} de los sensores de la exocitosis, y, como consecuencia, de la tasa de liberación, lo que se ha asociado a la inhibición de la maquinaria exocitótica (Erdmann et al., 2012).

3) Los receptores metabotrópicos de tipo III también ponen en marcha mecanismos de **inhibición de la adenilato ciclasa (AC)**. Se ha demostrado que estos receptores se acoplan a proteínas G α /o sensibles a PTx, e inhiben el efecto potenciador de la estimulación de la AC y la formación de cAMP. Este fenómeno se ha puesto de manifiesto en sistemas de expresión (Okamoto et al., 1994; Wu et al., 1998), en rodajas de hipocampo (Schoepp y Johnson, 1993) y estriado (Schaffhauser et al., 1997), así como en sinaptosomas (Herrero et al., 1996; Millán et al. 2002b; Martín et al., 2007). Así mismo, es muy importante destacar que esta vía de señalización no reduce los niveles de cAMP en ausencia de estimulación de la AC (Schoppa y Westbrook, 1997; Herrero et al., 1996; Millán et al., 2002a, Martín et al., 2007). Así, el receptor mGlu7 inhibe la potenciación dependiente de la activación de los receptores β -adrenérgicos mediada por la vía AC/PKA en terminales presinápticos glutamatérgicos (Herrero et al., 1996; Millan et al., 2002a). Sin embargo, otros estudios demuestran que la activación prolongada del receptor favorece fenómenos de LTP dependientes de AC/PKA, asociadas a la disminución de la interacción con la proteína RIM, que se postula como uno de los efectores finales de esta vía (Pelkey et al., 2008). Por lo tanto, el papel fisiológico de este mecanismo inhibitorio en la modulación de la liberación de glutamato permanece sin aclarar completamente, aunque podría estar relacionado con la inhibición de vías de señalización dependientes de la activación de la AC.

4) Los receptores mGlu del grupo III también pueden dar lugar a la **activación de canales de K⁺**, inhibiendo de manera indirecta la activación de los VDCC y la liberación de neurotransmisores. Esta señalización depende de proteínas G α /o, por un mecanismo directo, por medio de las subunidades $\beta\gamma$, o indirecto, por la inhibición de la AC. Este efecto ha sido demostrado en distintas preparaciones para distintos tipos de canales K⁺. El receptor mGlu4 activa canales sensibles a 4-AP (4-aminopiridina) en rodajas de cerebelo (Daniel y Crepel, 2001) y en el axón reticuloespinal (Cochilla y Alford, 1998). Además, el receptor mGlu4, a través de la reducción de la actividad inhibidora de PKA, activa canales de doble poro

K(2P)2.1/TERK1 en sistemas de expresión (Cain et al., 2008); mientras que el receptor mGlu7 puede activar canales GIRK en sistemas de expresión (Saugstad et al., 1996; Niwender et al., 2008)

Potenciación de la liberación. Aunque el papel canónico de los receptores mGlu del grupo III es inhibitorio, existen diferentes evidencias acerca su acción aumentando la liberación de glutamato. En la corteza entorinal, la activación de los receptores mGlu4 y mGlu8, además de inhibir la liberación inducida por despolarización, aumenta la frecuencia de la liberación espontánea (Evans et al., 2000; Woodhall et al., 2007), habiéndose propuesto como mecanismo de potenciación la activación de la AC (Woodhall et al., 2007). También se ha observado, a través de microdiálisis *in vivo* en la sustancia gris periacueductal (PAG), un aumento en la liberación de glutamato y reducción en la de GABA, en la que está probablemente implicado el receptor mGlu8, siendo ambos procesos dependientes de la AC y PKA (Marabese et al., 2005). Un efecto similar ha sido descrito en el núcleo acumbens (Li et al., 2008). La activación por AMN082 del receptor mGlu7 en la amígdala aumenta la amplitud de los EPSC, así como la frecuencia, pero no la amplitud, de la liberación en ausencia de estimulación (sEPSC), sin afectar la liberación espontánea (mEPSC), por lo que se ha propuesto que este efecto es consecuencia indirecta de la inhibición de la transmisión GABAérgica (Ren et al., 2011). Además, en la amígdala se ha observado una forma de LTP por activación de los receptores de tipo III, que permanece a pesar del lavado del agonista (Neugebauer et al., 1997). Se ha propuesto también que la estimulación de alta frecuencia en el cáliz de Held presenta una modulación dual por receptores de tipo III, dando lugar a un mecanismo inhibitorio de disminución de probabilidad de liberación (Pr) y otro compensatorio, que implicaría el aumento del RRP (Billups et al., 2005). Así mismo, en las sinápsis de las fibras musgosas de hipocampo con interneuronas, se ha descrito la pérdida de inhibición por el receptor mGlu7 tras la exposición prolongada al agonista (Pelkey et al., 2005), aunque en este caso se ha propuesto como mecanismo la internalización del receptor, y no mecanismos adicionales de potenciación (Pelkey et al., 2005; 2008).

En sinaptosomas de corteza cerebral, tras la exposición prolongada al agonista L-AP4, también se ha observado una pérdida de la acción inhibitoria del receptor mGlu7 sobre estimulaciones con altas concentraciones de KCl (Martín et al., 2010). Se ha demostrado que este fenómeno es consecuencia de la aparición de una nueva señalización del receptor tras la exposición prolongada al agonista, que potencia la liberación de glutamato, compensando la acción inhibitoria del receptor. En esta preparación, la activación prolongada del receptor mGlu7 activa la fosfolipasa C (PLC), por un mecanismo insensible a PTx, y por lo tanto, no dependiente de proteínas Gi/o. El acoplamiento del receptor a PLC ha sido descrito previamente, aunque asociado a la respuesta inhibitoria del receptor (Perroy et al., 2000). En la preparación de sinaptosomas, la potenciación de la liberación es dependiente de proteínas que unen DAG, distintas de PKC, y promueve la translocación de la proteína Munc13-1 a la

membrana plasmática del terminal presináptico. Además el receptor forma complejos con esta proteína (Martín et al., 2010). Acorde con este mecanismo, la activación de Munc13 por PLC participa en procesos de STP (Rosenmund et al., 2002). Además, la activación del receptor mGlu7 promueve procesos de LTP dependientes de cAMP y de la proteína RIM (Perkey et al., 2008). Dado que Munc13 y RIM interaccionan para la preparación las vesículas sinápticas para su liberación (Deng et al., 2011), es posible que los receptores mGlu7 puedan participar en mecanismos de potenciación de la liberación de glutamato dependientes de la maquinaria excitotónica.

Plasticidad sináptica. Los receptores metabotrópicos de tipo III tienen un papel en procesos de plasticidad, tanto de carácter potenciador como inhibidor.

En las sinápsis de las fibras musgosas de hipocampo con interneuronas, se ha demostrado que la estimulación de alta frecuencia (HFS) puede inducir, mediante la activación del receptor mGlu7, fenómenos de **LTD** dependientes de PKC. Sin embargo, esta LTD desaparece por la aplicación prolongada del agonista, como consecuencia de la internalización del receptor (Pelkey et al., 2005). Además, se ha demostrado que la LTD en interneuronas requiere la acción combinada del receptor mGlu7, a nivel presináptico, con la entrada de Ca^{2+} por receptores AMPA, a nivel postsináptico (Laezza et al., 1999). Experimentos *in vivo* han corroborado la acción de estos receptores en LTD. Así, la aplicación del antagonista de los receptores mGlu de tipo III, CPPG, inhibe el desarrollo de LTD (Kluausnizar et al., 2004; Altinbilek y Manahan-Vaughan, 2007). Además, los tratamientos con el agonista L-AP4 (Naie et al., 2005; 2006) y el agonista selectivo del receptor mGlu8, DCPG (Lodge et al., 2013), inducen este fenómeno. Por otra parte, el ratón que carece del receptor mGlu7 muestra una reducción en la facilitación a corto plazo (**STP**) y en la fase inicial de la potenciación a largo plazo (LTP, Bushell et al., 2002). También se ha descrito que la activación de receptores mGlu del grupo III da lugar a una depresión durante la aplicación del agonista, seguida de fenómenos de **LTP** dependientes de la activación de receptores NMDA tras lavar el agonista (Tolchard et al., 2000). Otros estudios relacionan los receptores mGlu del grupo III con la LTP independiente de NMDA (Grover y Yan, 1999). Sin embargo, en otros trabajos de investigación, la aplicación del antagonista CPPG no inhibe la inducción de LTP (Manahan-Vaughan y Reymann, 1995; Altinbilek y Manahan-Vaughan, 2007). Además, estos receptores tienen un papel importante en la LTP en la amígdala, ya que el antagonista selectivo para mGlu7, XAP044, inhibe este fenómeno (Gee et al., 2014) y la eliminación del receptor mGlu7 reduce la LTP (Fend et al., 2013). Estudios recientes, en las proyecciones axonales colaterales de Schaffer de las piramidales de CA3, sobre la neuronas piramidales de CA1 en hipocampo, han demostrado que el bloqueo del receptor mGlu7 en sinapsis GABAérgicas inhibe el desarrollo de la LTP, y su activación incrementa la magnitud de procesos submaximos de LTP. Por lo tanto, la acción de los mGlu7 como heteroreceptores en las sinapsis GABAérgicas sería la desinhibición de la transmisión glutamatérgica (Klar et al.,

2015). Por otra parte, cabe destacar que la activación prolongada del receptor mGlu7 facilita el desarrollo de los fenómenos de LTP dependientes de la vía AC/PKA (Pelkey et al., 2008). Se ha propuesto que la activación prolongada del receptor produce su internalización, provocando la disminución en su interacción con la proteína RIM (Pelkey et al., 2008), y permitiendo la actuación de esta proteína en los fenómenos de potenciación sináptica (Castillo et al., 2002; Lonart et al., 2003).

Funciones fisiológicas y patológicas.

Los receptores mGlu del tipo III de alta afinidad por glutamato, mGlu4 y mGlu8, dada su función inhibitoria sobre la transmisión sináptica y su localización en la zona activa, podrían tener un papel en el control de la concentración de neurotransmisor durante la actividad neuronal normal. El uso de los antagonistas de los receptores mGlu III, ha llevado a proponer la posible **activación tónica** de estos receptores (Pekhletski et al., 1996; Cao et al., 1997; Schader y Tasker, 1997; Xi et al., 2003; Losonczy et al., 2003; Acuna-Goycolea et al., 2004; Chu y Moenter, 2005; Li y Neugebauer, 2006). Además, el aumento en la probabilidad de liberación de los ratones carentes de los receptores mGlu4, estaría de acuerdo con la activación tónica de este receptor (Pekhletski et al., 1996).

Así mismo, en condiciones de gran actividad sináptica, en las que se alcancen altas concentraciones de glutamato en la sinapsis, además de estos receptores, se podrían activar también los receptores de baja afinidad mGlu7, que permanecerían inactivos en condiciones de actividad sináptica moderada. Así, en condiciones de **estimulación de alta frecuencia** (HFS), se ha demostrado que la depresión sináptica puede ser revertida ligeramente por los antagonistas de los receptores mGlu de tipo III (von Gersdorff et al., 1997; Chen et al., 2002; Lorez et al., 2003; Cosgrove et al., 2011), aunque en otros casos no se han observado estos efectos (Capogna, 2004). Una explicación a la reducida o nula acción de los antagonistas, podría estar en el posible papel compensatorio de los mecanismos potenciadores sobre los inhibidores (Billups et al., 2005). Así, la potenciación de la liberación de glutamato observada (Martín et al., 2010), podría desempeñar un papel homeostático a corto plazo en la regulación de este proceso, manteniendo la liberación en situaciones de inhibición prolongada. Apoyando el papel de los receptores mGlu III en estos fenómenos, se ha demostrado que la HFS recluta estos receptores (Semyanov y Kullmann, 2000), y que el aumento en la concentración de neurotransmisor en la hendidura sináptica produce un aumento en los efectos inhibitorios de los receptores mGlu del grupo III (Oliet et al., 2001; Semyanov y Kullmann, 2000; Piet et al., 2004; Vera y Tapia, 2012).

Además, estos receptores pueden tener un papel relevante en los procesos cognitivos como la consolidación de la **memoria y el aprendizaje** (Riedel et al., 2003). Así, el tratamiento con el antagonista no selectivo CPPG produce deficiencias en la memoria espacial a largo plazo (Altinbilek y Manahan-Vaughan, 2007) y los ratones que carecen de los

receptores mGlu7 (Hölscher et al., 2004, 2005), mGlu4 (Gerlai et al., 1998) y mGlu8 (Gerlai et al., 2002), sufren deficiencias en procesos relacionados con el aprendizaje y la memoria.

Los receptores mGlu de tipo III está implicada en en diversas patologías, destacando la acción anticonvulsionante y neuroprotectora de sus agonistas.

La acción de estos receptores se ha relacionado con la **epilepsia**. Se ha demostrado que los agonistas de estos receptores tiene efectos protectores frente a los ataques epilépticos con diferentes modelos (Tizzano et al., 1995; Suzuki et al., 1996; Tang et al., 1997; Chapman et al., 1999; Sansig et al., 2001; Folbergrová et al., 2003; Moldrich et al., 2003). La baja afinidad del receptor mGlu7 por glutamato lo hace un candidato ideal para la acción anticonvulsionante en situaciones patológicas de exceso de liberación de este neurotransmisor, como ocurre en los ataques epilépticos. Así, el ratón carente de los receptores mGlu7 muestra, a partir de las diez semanas de edad, un aumento en la susceptibilidad a los ataques epilépticos y una disminución en el efecto de fármacos anticonvulsionante (Sansig et al., 2001). Es posible que, en animales más jóvenes, exista una compensación por otros receptores del tipo III, como mGlu4 (Millán et al., 2002b), debido a los cambios en la expresión de los mismos durante el desarrollo (expuestos en el apartado *Isoformas y localización*). Además, se ha demostrado que los receptores mGlu8 (Moldrich et al., 2001; Robbins et al. 2007; Folbergrová et al., 2008) y mGlu4 (Snead et al., 2000), tienen también un papel anticonvulsionante.

Se ha propuesto un papel de los receptores mGlu del grupo III en **neuroprotección**. Los agonistas de los receptores mGluIII protegen frente a agentes neurotóxicos en cultivos (Bruno et al., 1996; Gasparini et al., 1999; Iacovelli et al 2002), así como en modelos animales de daño cerebral (Zhou et al., 2003) o de enfermedades neurodegenerativas (Battaglia et al., 2006; Austin et al., 2010; Betts et al., 2012; Domin et al., 2014).

Este es el caso de la **enfermedad de Parkinson** (Battaglia et al., 2006; Austin et al., 2010; Betts et al., 2012), donde los agonistas de los receptores mGlu del grupo III tienen efectos positivos en modelos de esta enfermedad (MacInnes et al., 2004; Konieczny et al., 2007), incluso en las etapas asintomáticas iniciales (Lopez et al., 2007; 2012). El receptor mGlu4 parece responsable de estos efectos debido a su localización (Bradley et al., 1999) y a su perfil farmacológico (Marino et al., 2003; Beurrier et al., 2009; Battaglia et al., 2006; Lopez et al., 2007; Hopkins et al., 2009; Jones et al., 2012; Betts et al., 2012; Bennouar et al. 2013; Amalric et al. 2013).

Los receptores mGlu III están presentes en áreas del sistema nervioso relacionadas con la **nocicepción**, como las fibras aferentes primarias, médula espina, amígdala o sustancia gris periacueductal (Goudet et al., 2009). De acuerdo a esta expresión, los agonistas de estos receptores reducen la hiperalgesia en modelos de inflamación y dolor neuropático (Goudet et al., 2008). Además, las acciones inhibitoras de estos receptores

están exacerbadas en algunos modelos de patologías nociceptivas (Li y Neugebauer, 2006; Han et al., 2004). Sin embargo, los distintos subtipos de receptores parecen desarrollar respuestas diferentes. Así, mientras que la activación de los receptores mGlu4 (Goudet et al., 2008) y mGlu8 produce efectos analgésicos, el activador de mGlu7, AMN082, produce un efecto nociceptivo y su inhibidor, MMPIP, da lugar a efectos analgésicos (Marabese et al., 2007; Palazzo et al., 2008; 2011; 2013).

Así mismo, los receptores mGlu III están relacionados con la **ansiedad**, ya que sus agonistas producen efectos ansiolíticos (Tatarczynska et al., 2001; Palucha, 2004; Stachowicz et al., 2009). Estos efectos se han relacionado con la acción del receptor mGlu8, tal como se ha demostrado con estudios empleando los ratones carentes de este receptor (Linden et al. 2002; Duvoisin et al., 2005; Robbins et al., 2007; Davis et al., 2013) o con sus agonistas específicos (Duvoisin et al., 2010). Además, los receptores mGlu4 también median efectos ansiolíticos (Palazzo et al. 2008). Por otra parte, los receptores mGlu7 ha sido relacionados tanto con acciones ansiolíticas (Cryan et al., 2003; Stachowicz et al., 2008; Fendt et al., 2013; Gee et al., 2014), como ansiogénicas (Palazzo et al. 2008).

Por último, los receptores mGlu del grupo III también se ha relacionado con la **adicción a drogas** (Mao et al., 2013). El agonista L-AP4 reduce el comportamiento adictivo (Mao y Wang, 2000; David y Abraini, 2003), probablemente por su acción inhibitoria sobre la liberación de dopamina (Mao et al., 2000). El activador de mGlu7, AMN082, también reduce el comportamiento adictivo por cocaína (Li et al., 2009) y alcohol (Bahi et al., 2012), mientras que su inhibidor MMPIP aumenta el consumo de alcohol (Bahi et al., 2012). Así mismo, el agonista selectivo de mGlu8, DCPG, también reduce el comportamiento adictivo asociado al alcohol (Backstrom y Hyytia, 2005). Además, el consumo crónico de drogas altera la expresión de estos receptores: el tratamiento con cocaína reduce la expresión de mGlu8 (Zhang et al., 2009) y la respuesta a L-AP4 (Neugebauer et al., 2000), mientras que la administración crónica de anfetaminas produce el aumento de la expresión de este receptor (Parelkar y Wang, 2008).

2.2.2. Heteroreceptores.

Además del glutamato, otros neurotransmisores o neuropéptidos desempeñan un papel en la modulación de la transmisión sináptica glutamatérgica. Estos otros neurotransmisores son liberados por sinápsis cercanas o por la misma neurona (Hnasko y Edwards, 2012), y se unen a sus correspondientes receptores que se expresan también en las sinápsis glutamatérgicas (heteroreceptores). Los GPCRs que actúan como heteroreceptores en las sinápsis glutamatérgicas, están acoplados a diferentes proteínas G triméricas, dando lugar a distintas vías de señalización (Fig. 1.5).

Receptores β -adrenérgicos.

Los receptores β -adrenérgicos (β -AR) son un tipo de GPCRs, perteneciente a la familia de los receptores adrenérgicos, que actúan como heteroreceptores en las sinápsis glutamatérgicas. Esta familia de receptores pertenece al tipo A de GPCR o receptores tipo rodopsina, concretamente a la subfamilia A17. Estos receptores, en el SNC, son activados por norepinefrina, y están acoplados a la estimulación de la adenilato ciclasa (AC) por medio de proteínas Gs, generando el segundo mensajero AMP cíclico, cAMP. Los β -AR ejercen importantes y variadas funciones biológicas en diferentes tejidos, participando también en mecanismos de plasticidad sináptica en el cerebro.

Norepinefrina.

Las catecolaminas epinefrina (o adrenalina) y norepinefrina (NE o noradrenalina), son los neurotransmisores endógenos que activan los receptores adrenérgicos. Las catecolaminas son sintetizadas en distintos tipos celulares: la epinefrina en las células cromafines de la médula adrenal, mientras que, en el CNS, la NE y dopamina son sintetizadas en los terminales presinápticos de las neuronas noradrenérgicas y dopaminérgicas, respectivamente. Por la acción de la enzima tirosina hidroxilasa, empleando O_2 y bipterina como cofactor, la tirosina es transformada en L-DOPA. Después de esta etapa limitante y altamente regulada, otras enzimas participan en las reacciones secuenciales que dan lugar a las catecolaminas. La acción de la descarboxilasa de L-aminoácidos aromáticos (AADC) produce dopamina a partir de L-DOPA. A continuación, la dopamina β -hidroxilasa produce norepinefrina, de la que se obtiene la epinefrina por la acción de la feniletanolamina N-metiltransferasa (Hein, 2006).

La dopamina es sintetizada en el interior del terminal presináptico, siendo transportada al interior de SVs por medio de transportadores vesiculares de monoaminas (VMAT2). La norepinefrina es el neurotransmisor que activa los receptores adrenérgicos en las sinapsis del CNS. La NE es sintetizada y almacenada en el interior de las SVs, que contienen la enzima dopamina β -hidroxilasa. La NE liberada a la hendidura sináptica es recaptada al terminal presináptico por el transportador de norepinefrina (NET), o a otras células, como la neurona postsináptica, por el transportador extracelular de monoaminas (EMT/OCT3/SLC22A3). La NE recaptada en el terminal presináptico puede ser empleada para el relleno de las SVs a través del VMAT2, o puede ser metabolizada por la monoamina oxidasa (MAO) presente en la membrana externa mitocondrial, o por la catecol-O-metiltransferasa (COMT; Torres et al., 2003).

Isoformas y localización.

Los receptores adrenérgicos presentan 9 isoformas clasificadas en 3 clases: los receptores α_1 (α_1A , α_1B , α_1C), α_2 (α_2A , α_2B , α_2C) y β (β_1 , β_2 , β_3). Los receptores adrenérgicos se expresan en gran variedad de tejidos como corazón, riñón, hígado, adipocitos, músculo liso vascular y bronquial, linfocitos y sistema nervioso central. En el cerebro, la inervación noradrenérgica se origina en el locus ceruleus (Foote et al., 1983), una región del trocero encefálico, cuyas neuronas proyectan a diversas áreas del cerebro, como la corteza, la amígdala, el hipocampo, el tálamo o el cerebelo (Kvetnasky et al., 2009).

Los receptores β_1 -adrenérgicos se localizan mayoritariamente en la corteza cerebral, el núcleo olfatorio anterior, núcleo septal lateral intermedio, núcleo del retículo del tálamo, complejo oculomotor, núcleo vestibular, núcleo profundo del cerebelo, núcleo trapezoidal, núcleo abducens, formación reticular, glándula pineal y médula espinal (Nicholas et al., 1993; Paschalis et al., 2009). Los receptores β_2 -adrenérgicos se expresan mayoritariamente en el bulbo olfatorio, la corteza piriforme, giro dentado del hipocampo y núcleo del tálamo y corteza cerebral (Nicholas et al., 1993). Los receptores β_3 se expresan en tejido cerebral en menor medida que los otros receptores β -AR, pero su presencia ha sido detectada principalmente en hipocampo, corteza y estriado (Summers et al., 1995).

A nivel subcelular los β -AR se expresan en neuronas catecolaminérgicas a nivel postsináptico y en menor medida a nivel presináptico (Aoki et al., 1989), así como en astrocitos asociados a estas neuronas (Aoki y Pickel, 1992a, b). A pesar de que existen evidencias funcionales de la acción de los β -AR en sinápsis glutamatérgicas, como se describe a continuación, no existen estudios que muestren datos ultraestructurales acerca de su localización en sinápsis excitatorias.

Estructura, regulación y farmacología

Los β -AR son uno de los tipos de GPCR más profundamente estudiados a nivel estructural (Cherezov et al., 2007; Rasmussen et al., 2011a, b). En general, su estructura y dominios, son similares a los descritos para otros receptores con 7 segmentos

COMPUESTOS	SELECTIVIDAD
Agonistas	
BRL 35135A	β_3 -AR
Bambuterol	β -AR
CGP-12177A	β -AR
CL316,243	β_3 -AR
Clenbuterol	β_2 -AR
Dobutamina	β_1 -AR
Fenoterol	β_2 -AR
Formoterol	β_2 -AR
Isoetarina	β -AR
Isoproterenol	β -AR
Isoprenalina	β -AR
L755507	β_3 -AR
Levalbuterol	β -AR
Metaproterenol	β_2 -AR
Procaterol	β_2 -AR
Denopamina	β_1 -AR
Ritodrina	β_2 -AR
SR-58611A	β_3 -AR
Salbutamol	β_2 -AR
Salmeterol	β_2 -AR
Terbutalina	β_3 -AR
ZD7114	β_3 -AR
Zinterol	β_2 -AR
Antagonistas	
Metoprolol	β_1 -AR
Propranolol	β -AR
Sotalol	β -AR
Atenolol	β_1 -AR
Betaxolol	β_1 -AR
Bisoprolol	β_1 -AR
CGP-20712A	β_1 -AR
IC118,551	β_2 -AR
L-765,314	β_3 -AR
Pindolol	β_1 -AR
SR59230A	β_3 -AR
Timolol	β -AR

Tabla 1.2. Fármacos que modulan los receptores β -AR.

transmembrana, como los receptores mGlu del grupo III (apartado 2.2.1.) Se ha demostrado que los receptores β_1 y β_2 pueden formar homo y heterodímeros (Mercier et al., 2002), y se ha sugerido que, o bien la unión del agonista favorece esta dimerización, o el agonista se une preferentemente a los dímeros ya formados (Angers et al., 2000). Además, se ha propuesto que los receptores β_2 pueden formar homo- (Angers et al., 2000) y heterodímeros con las otras isoformas de los β -AR (Lavoie et al., 2002; Mercier et al., 2002; Breit et al., 2004).

Los mecanismos de regulación de los β -AR, asociados a su internalización, también han sido ampliamente estudiados y aplicados al estudio de otros tipos de GPCR (Ferguson, 2001). Después de su activación, los β -AR son fosforilados por quinasas, como PKA, PKC o quinasas de receptores acoplados a proteínas G (GRK), lo que reduce el acoplamiento del receptor a la señalización por proteínas G triméricas. Estas fosforilaciones dan lugar al reclutamiento de β -arrestina, que evita el acoplamiento con las proteínas G y prepara al receptor para su internalización. De esta manera, los receptores se internalizan en endosomas, pudiendo ser desfosforilados y reciclados a la membrana para una nueva estimulación, o degradarse en lisosomas (Lefkowitz et al., 1998; Drake et al., 2006; Vasudevan et al., 2011). Además, recientemente se ha propuesto que los β -AR pueden continuar señalizando para la generación de cAMP después de ser internalizados, aunque se desconoce la función de estos mecanismos (Irannejad et al., 2013; Irannejad y von Zastrow, 2014).

Respecto a su farmacología, dada la importancia fisiopatológica de los receptores β -AR en el organismo, existen gran variedad de agonistas y antagonistas, muchos de uso clínico. Los más ampliamente utilizados para el estudio de los receptores β -AR son mostrados en la Tabla 1.2.

Modulación de la liberación de glutamato

Los receptores α -adrenérgicos modulan la neurotransmisión por distintas vías de señalización (Hein et al., 2006). Los α_1 -AR, acoplados a proteínas $G_{q/11}$, mediante la generación de IP_3 , incrementan de los niveles intracelulares de Ca^{2+} . Los α_2 -AR están acoplados a proteínas $G_{i/o}$, que inhiben la adenilato ciclasa y la generación de cAMP por medio de las subunidades $G\alpha$, mientras que, a través de las subunidades $G\beta\gamma$, pueden inhibir los VDCC, canales de K^+ tipo GIRK y las quinasas ERK1/2 (Cussac et al., 2002).

La vía canónica de señalización de los receptores β -AR implica su acoplamiento a proteínas Gs, que activan la adenilato ciclasa y la generación de cAMP, aunque bajo ciertas condiciones puede inhibir esta enzima acoplándose a G_i (Daaka et al., 1997). Además, la interacción con β -arrestina, propia de la desensibilización de los receptores, puede iniciar mecanismos de señalización independientes de proteínas G (Shenoy y Lefkowitz, 2011).

Las vías de señalización dependientes de cAMP activadas por los β -AR modulan la liberación de neurotransmisores de diversas maneras. En primer lugar, la activación de los

receptores β -AR postsinápticos modula la **excitabilidad neuronal** (Mueller y Dunwiddie, 1983; Stoop et al., 2000) por la apertura de los VDCC de tipo L (Hoogland y Saggau, 2004), la modulación de canales de K^+ (Yuan et al. 2002) y la fosforilación de los mGlu de tipo I (Vanhoose y Winder, 2003).

Además, se ha demostrado que la activación de los receptores β -AR **potencia la liberación de glutamato** en corteza (Huang y Hsu, 2006; Ji et al., 2008; Kobayashi et al., 2009), amígdala (Gean et al., 1992; Huang et al., 1994; 1996; 1998a; 1998b; Abraham et al., 2008), hipocampo (Gereau y Conn 1994a; 1994b; Gereau et al., 1995; Hillman et al., 2005) y en sinaptosomas de corteza cerebral (Herrero y Sánchez-Prieto, 1996; Millán et al., 2003). Esta potenciación se manifiesta como un aumento en la liberación inducida por despolarización (Gereu y Conn, 1994; Ji et al., 2008; Huang y Hsu, 2006; Kobayashi et al., 2009), un aumento en la frecuencia, pero no la amplitud, de la liberación espontánea o mEPSC (Gereu y Conn, 1994; Ji et al., 2008; Kobayashi et al., 2009) y facilitación por pares de pulsos (Ji et al., 2008; Kobayashi et al., 2009).

Los cambios en la neurotransmisión asociados a estos mecanismos, así como su presencia en sinaptosomas, sugieren que estos fenómenos tienen un origen presináptico, tal como proponen algunos estudios (Gereu y Conn, 1994a; Kobayashi et al., 2009). Sin embargo, también se ha descrito que la potenciación dependiente de receptores β -AR incrementa las corrientes de los receptores NMDA y es sensible a los antagonistas de estos receptores (Huang et al., 1998; Li et al., 2008). Por lo tanto, la potenciación de la liberación de glutamato por los receptores β -AR probablemente presenta componentes pre- y postsinápticos (Ji et al., 2008).

Además, se ha observado que la potenciación de la liberación de glutamato por los β -AR depende de la modulación de los VDCC de tipo P/Q y N (Huang et al., 1996; 1998), ya que es bloqueada por cadmio (Ji et al., 2008). Esta potenciación también se ha relacionado con PKA (Gereu y Conn, 1994; Herrero et al., 1996), de acuerdo a la capacidad de esta quinasa de modular los VDCC (Hell et al., 1995; Millan et al., 2003). Sin embargo, existen otros mecanismos de acción del cAMP, PKA-independientes, que modulan la liberación de glutamato (apartado 3.1). Además, el incremento sinérgico de cAMP, por coactivación de los β -AR y los receptores mGlu del grupo II gliales acoplados a PLC, potencia la liberación de glutamato en hipocampo (Gereau y Conn, 1994b; Gereau et al., 1995; Winder et al., 1996).

La activación de los β -AR participa en la inducción de fenómenos de **LTP** en el hipocampo (Thomas et al., 1996; Moody et al., 1998; Lin et al., 2003; Walling et al., 2004; Gelinás y Nguyen, 2005; Hansen y Manahan-Vaughan; 2015), reduciendo el umbral para el desarrollo de los mismos (Thomas et al., 1996; Katsuki et al., 1997; Moody et al. 1998; Lin et al., 2003). Así mismo, el bloqueo de los β -AR evita el desarrollo de la fase tardía de LTP (Huang y Kandel, 1996). Se ha propuesto que estos mecanismos podrían depender de la activación por PKA (Gelinás et al., 2008a; Zhou et al., 2013) o Epac (Gelinás et al., 2008b), y

de la vía ERK/mTOR (Gelinás et al., 2007), que induce la síntesis de proteínas (Gelinás y Nguyen, 2005). Además, la activación conjunta de los β -AR y los receptores muscarínicos promueve la conversión de plasticidad a corto plazo en plasticidad a largo plazo, por mecanismos que también dependen de mTOR y ERK (Connor et al., 2012).

Los β -AR también se expresan en neuronas GABAérgicas (Waterhouse et al. 1982; Yeh y Woodward, 1983; Sessler et al. 1995; Cox et al., 2008), regulando su actividad por mecanismos dependientes de PKA (Zsiros y Maccaferri, 2008), o del cambio en el potencial de membrana (Bergles et al., 1996), así como aumentando la liberación espontánea (Doze et al., 1991).

Funciones fisiológicas y patológicas

Uno de los papeles más destacados de los β -AR en el CNS es su participación en los procesos de **aprendizaje y memoria**. El bloqueo de los β -AR afecta, en la región CA1 de hipocampo, a la consolidación de la memoria contextual por miedo y a la memoria espacial (Ji et al., 2003a, 2003b); en la amígdala basolateral, origina déficits en la memoria por miedo (Debiec y Ledouz, 2004; Hurlleman et al., 2005) y de la memoria asociada al gusto (Miranda et al., 2003); y en la corteza prefrontal, produce amnesia (Tronel et al., 2004) y déficits en la memoria de trabajo (Ramos et al., 2005). Por el contrario, la activación de los β -AR facilita procesos de aprendizaje y memoria (Nielson y Jensen, 1994; Sternberg et al., 1985; Roulet y Sara, 1998; Cahill et al., 2000). Además, los β -AR se han relacionado con la memoria emocional y la memoria asociada al estrés (Cahill et al., 1997; Hu et al., 2007), la vigilia (Berridge et al., 2012; Schmeichel y Berridge, 2013) y la respuesta al miedo (Do Monte et al., 2008)

Se ha descrito que la expresión y función de los β -AR se ve afectada en desordenes emocionales como la esquizofrenia (Friedman et al., 2004), la depresión (van Waarde et al., 2004) o el estrés (Wong et al., 2012), así como por el tratamiento con antidepresivos (van Waarde et al., 2004) o el envejecimiento (Scarpace y Abrass, 1988; Santulli y Laccarino; 2013). Sin embargo, destaca el papel que desempeñan los β -AR en la **enfermedad de Alzheimer** (Yu et al., 2011; Wang y Xiang, 2011), que se asocia a un aumento en la expresión (Kalaria et al., 1989) y a la presencia de polimorfismos (Yu et al., 2008) de estos receptores. Además, la activación de los β -AR produce un aumento en la expresión de péptidos β amiloides (Lee et al., 1997; Ni et al., 2006; Yu et al., 2010). Además, los antagonistas de los β -AR reducen la acumulación de péptidos beta amiloides en modelos de esta enfermedad (Arrieta-Cruz et al., 2010; Wang et al., 2011). Sin embargo, también se ha descrito que los mecanismos de plasticidad dependientes de los β -AR revierten los efectos nocivos causados por la acumulación de β amiloide (Li et al., 2013)

3. MODULACIÓN DE LA LIBERACIÓN DE GLUTAMATO POR MECANISMOS DE SEÑALIZACIÓN INTRACELULARES.

Los GPCR presinápticos se acoplan a proteínas G triméricas, e inician cascadas de señalización intracelulares que generan segundos mensajeros. Estos segundos mensajeros activan diferentes proteínas que regulan diferentes aspectos del proceso de liberación de neurotransmisores (Fig. 1.5.; de Jong y Verhage, 2009). Unos de los principales mecanismos presinápticos de señalización activados por GPCR, que modulan la liberación de glutamato, son la vía mediada por AMP cíclico (apartado 3.1.) y la vía de hidrólisis de fosfoinosítidos (apartado 3.2.)

3.1. Mecanismos de señalización mediados por AMP cíclico.

El AMP cíclico (cAMP) es uno de los principales segundos mensajeros intracelulares. Es sintetizado por la acción de la enzima adenilato ciclasa (AC), y degradado por las enzimas fosfodiesterasas (PDE). Aunque su principal diana es la proteína quinasa A (PKA), existen otras proteínas que pueden ser activadas por cAMP, entre las que destaca la proteína intercambiadora de nucleótidos de guanina activada por cAMP, Epac. Tanto las vías de señalización por cAMP mediadas por la acción de PKA, como vías de señalización PKA-independientes, modulan la neurotransmisión.

Otras proteínas activadas por cAMP son los canales iónicos operados por nucleótidos cíclicos o CNG, entre los que destacan, por su papel en la modulación de la neurotransmisión, los canales catiónicos activados por despolarización y operados por nucleótidos cíclicos o HCN. Estos canales son permeables a K^+ y Na^+ , y generan la denominada corriente de entrada activada por hiperpolarización (I_h) en el sistema nervioso (Biel et al., 2009; Wahl-Schott y Biel., 2009; He et al., 2014). Los HCN se han relacionado a nivel presináptico tanto con la inhibición (Boyes et al., 2007; Lin et al., 2010; Huang et al., 2011), como con la potenciación (Southan et al., 2000; Lupica et al., 2001; Aponte et al., 2006; Park et al., 2011) de la liberación de la neurotransmisión, así como con procesos de plasticidad sináptica, tanto a corto (Bender et al., 2007) como a largo plazo (Beaumont y Zucker., 2000; Beaumont et al., 2002; Mellor et al., 2002).

3.1.1. Proteína quinasa A.

La proteína quinasa dependiente de cAMP o proteína quinasa A (PKA, EC 2.7.11.11) es una serina/treonina quinasa activada por cAMP, que cataliza la fosforilación

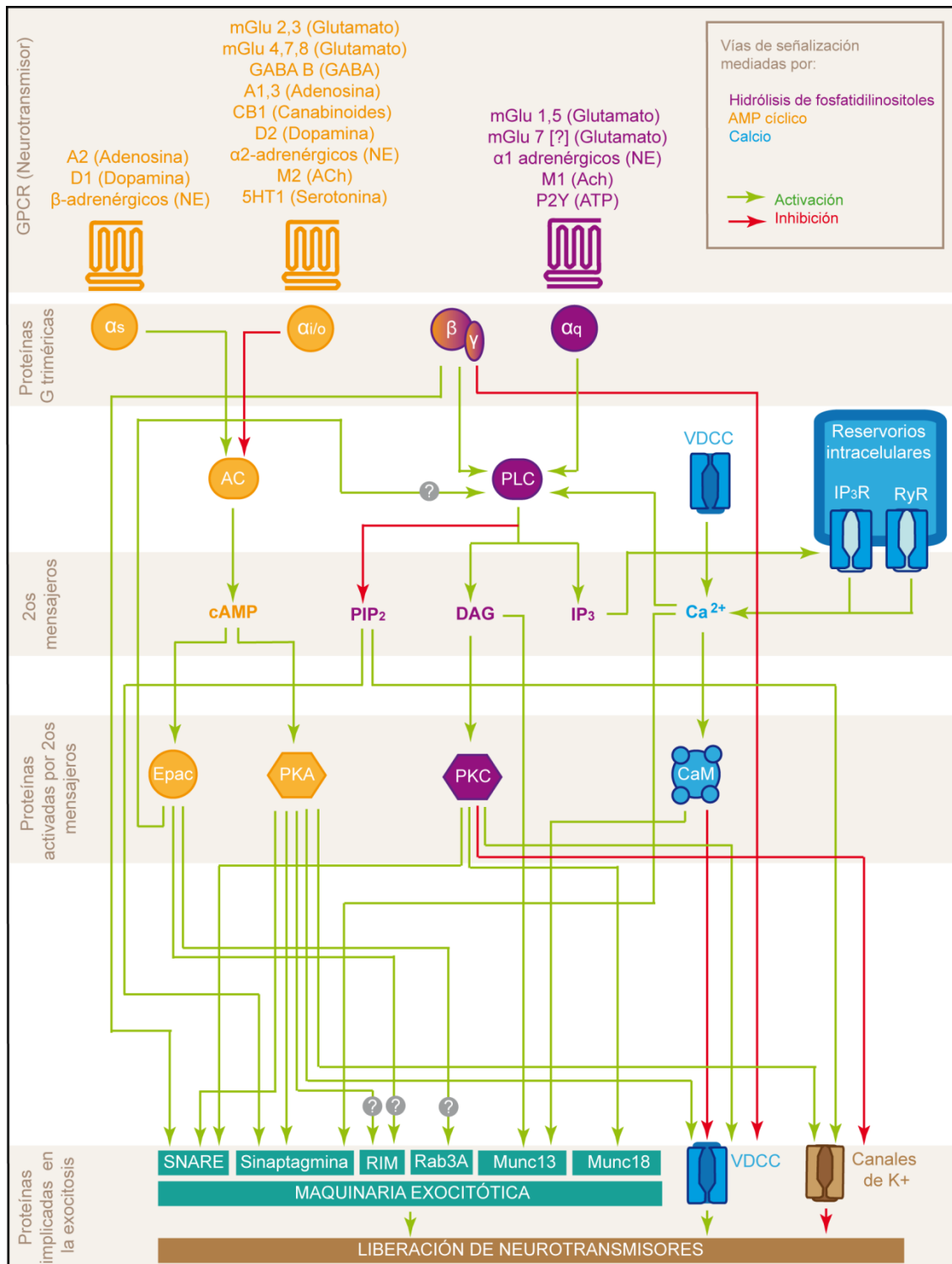


Fig 1.5. Vías de señalización por cAMP, DAG y calcio que modulan la liberación de neurotransmisores. Los receptores acoplados a proteínas G (GPCR) activan diferentes tipos de proteínas G, que, a su vez, regulan enzimas, como la adenilato ciclasa (AC) o la fosfolipasa C (PLC), que participan en la generación de segundos mensajeros intracelulares. Estos segundos mensajeros activan diversas proteínas que dan lugar a la modulación de la liberación de neurotransmisores (adaptado de deJong y Verhage, 2009)

de numerosas proteínas. Esta quinasa es el efector más común y más estudiado de este segundo mensajero. Esta proteína y sus dianas de fosforilación participan en una gran diversidad de funciones biológicas, incluidos los procesos de liberación de neurotransmisores.

Estructura y activación.

Existen dos tipos de PKA según sus subunidades: tipo I ($R\alpha_2C_2$, $R\beta_2C_2$) y tipo II ($R\text{II}\alpha_2C_2$, $R\text{II}\beta_2C_2$). Esta proteína conforma un heterotetrámero formado por dos subunidades catalíticas (de 4 subtipos: $C\alpha$, $C\beta$, $C\gamma$ y $PrKX$) y dos reguladoras (de 4 subtipos: $R\alpha$, $R\beta$, $R\text{II}\alpha$, $R\text{II}\beta$), que presentan dos sitios de unión (sitios A y B) para cAMP (Fig. 1.6. A; Seino y Shibashaki., 2005). La forma inactiva de la enzima está compuesta por un tetrámero R_2C_2 , en el que las regiones catalíticas inhiben la unión de cAMP al sitio A de las regiones reguladoras. La unión de cAMP al sitio B permite el desbloqueo del sitio A de manera cooperativa. De esta manera, la unión de 4 moléculas de cAMP a sus dos subunidades catalíticas, promueve la disociación del tetrámero formando dos monómeros de subunidades catalíticas activas (R) y un dímero de subunidades reguladoras (R_2) (Francis y Corbin, 1994).

Funciones en neurotransmisión.

Se ha demostrado que la PKA facilita la liberación de neurotransmisores mediante el control de la excitabilidad neuronal, de la entrada de Ca^{2+} , y del reclutamiento y fusión de las SVs (Fig. 1.5). Además, puede participar en procesos de aprendizaje y memoria cerebral por medio de su implicación en procesos de plasticidad sináptica (Seino y Shibashaki., 2005; de Jong y Verhage, 2009). Estas funciones están mediadas por la fosforilación de diferentes proteínas, principalmente canales iónicos y proteínas de la maquinaria de exocitosis.

PKA fosforila **canales de K^+** , aumentando la actividad de los Kir6.2, o disminuyendo la cinética de apertura de las subunidades SUR1 (Begúin et al., 1999). Esta quinasa también fosforila diversas subunidades de los **VDCC**, promoviendo su activación e incrementando la entrada de Ca^{2+} (Hell et al., 1995; Gao et al., 1997; Bunnemann et al., 1999).

Así mismo, PKA fosforila **proteínas de la maquinaria exocitótica**, modulando la liberación de neurotransmisores. La fosforilación de la proteína de las SVs **CSP**, altera su interacción con sintaxina y sinaptotagmina, prolongando la apertura del poro de fusión (Evans et al., 2001; 2002). La fosforilación de la proteína de las SVs **snapina**, favorece la formación del complejo SNARE por medio de su interacción con SNAP25 (Chheda et al. 2001). Además, la fosforilación de **SNAP-25** es necesaria para el mantenimiento del RRP (Nagy et al., 2005). La fosforilación de **sinaptotagmina12** incrementa la liberación

espontánea (Maximov et al., 2007). Se ha descrito que PKA fosforila las proteínas **RIM** (apartado 3.1.3.; Lonart et al., 2003). Estas proteínas son necesarias para la plasticidad a largo plazo dependiente de cAMP (LTP, Castillo et al., 2002). Aunque inicialmente se relacionó la fosforilación por PKA con la LTP dependientes de cAMP (Lonart et al., 2003), estudios posteriores desmintieron la implicación de esta fosforilación en estos procesos de plasticidad (Kaesler et al., 2008b; Yang y Calakos., 2010). Recientemente, se ha descrito que la fosforilación por PKA de las proteínas **complexinas** incrementa la liberación espontánea (Cho et al., 2015). La fosforilación de **sinaptofilina** reduce la acción inhibitoria de esta proteína (Boczan et al., 2004) sobre las proteínas sintaxina1 y dinamina1 (Lao et al., 2000). La fosforilación de la proteína de las SVs **sinapsina**, se ha relacionado con el crecimiento de las neuritas (Kao et al., 2002) o en el reclutamiento de las SVs (Fiumara et al., 2004). Por último, se ha descrito la fosforilación por PKA de **α SNAP** (Hirling y Scheller, 1996) y de **rafilina3**, disminuyendo la afinidad por las membranas de esta última (Fykse et al., 1995; Schluter et 1999; Foletti et al., 2001), aunque la función en neurotransmisión de estos procesos no ha sido esclarecida.

3.1.2. Epac (cAMP-GEF)

La familia de proteínas Epac son factores intercambiadores de nucleótidos de guanina (GEF) para proteínas G pequeñas directamente activados por cAMP (de Rooij et al., 1998; Kawasaki et al., 1998). Estas proteínas desempeñan numerosos papeles como efectores del cAMP, mediando muchos de los efectos PKA-independientes de este segundo mensajero (Seino y Shibashaki, 2005). Entre estos, se encuentra la regulación de diferentes aspectos de la neurotransmisión.

Isoformas y localización.

Las proteínas Epac están codificadas por dos genes que dan lugar a la expresión de cuatro isoformas: Epac1 (también denominada cAMP-GEF I o Rap-GEF 3), Epac 2 o Epac2A (cAMP-GEF II o Rap-GEF 4) y otras dos isoformas de Epac 2 resultantes de procesos de splicing alternativo, Epac2B y Epac2C (Fig. 1.6.B ; Ueno et al., 2001; Niimura et al., 2009; Hoivik et al., 2013).

Epac 1 se expresa de forma ubicua, siendo abundante en algunos tejidos como corazón, riñón, músculo esquelético o tiroides, así como en células del sistema inmune (de Rooj et al., 1998), mientras que la expresión en el sistema nervioso y cerebro es baja y regulada durante el desarrollo (Ulucan et al., 2007). Por otra parte, Epac2 es predominante en cerebro y en tejidos neuroendocrinos y endocrinos, presentando una gran expresión en corteza cerebral, cerebelo, hipocampo, bulbo olfativo, tálamo, habénula y pituitaria

(Kawasaki et al., 1998; Ozaki et al., 2000). Epac2A se expresa en la corteza cerebral e islas pancreáticas, mientras que la expresión de Epac2B se restringe a las glándulas adrenales y testículos, y Epac2C se expresa sólo en hígado (Ueno et al., 2001; Niimura et al., 2009; Hoivik et al., 2013). Además, se ha demostrado que la expresión de estas proteínas varía en gran medida durante el desarrollo, mostrando distintos patrones de expresión en el sistema nervioso en los estados embrionario, neonatal y adulto, existiendo una reducción en la expresión de Epac1 y un gran aumento en la de Epac2 (Ulacan et al., 2007). También se han observado cambios en la expresión de estas proteínas en condiciones fisopatológicas, como en la regeneración del sistema nervioso (Murray y Shewan, 2008) o la enfermedad de Alzheimer (McPhee et al., 2005).

Las proteínas Epac forman parte de complejos multiproteicos de señalización dependiente de cAMP y coordinados por las proteínas de andamiaje AKAPs. Estos complejos se han estudiado y caracterizado en cardiomiocitos (Dodge-Kafka et al., 2005), células endoteliales (Sehrawat et al., 2011) y también en neuronas (Nijholt et al., 2008). Por último, se ha demostrado que mecanismos de translocación contribuyen a la localización y activación de Epac1 y Epac2 en membrana (Niimura et al., 2009; Ponsioen et al., 2009).

Estructura y activación.

Las proteínas de la familia Epac presentan una región N terminal reguladora y una región C terminal catalítica (Fig. 1.5. B; Seino y Shibasaki, 2005; Grandoch et al., 2010).

La región reguladora consta de un dominio de alta afinidad por cAMP (cAMP-B) y de un dominio DEP (dominio con homología a Disheveled, EGL-10 y Plecstrina). Epac2 presenta además un segundo dominio de baja afinidad por cAMP, cAMP-A, cuya función biológica se desconoce, aunque es necesario para localizar Epac2A cerca de la membrana plasmática de forma independiente de su unión a cAMP (Niimura et al., 2009). La región catalítica contiene un dominio de homología CDC25 (CDC25HD), que presenta la actividad GEF para proteínas G pequeñas de la familia Ras; un dominio REM (motivo de intercambio con Ras), que se cree que estabiliza la actividad GEF; y un dominio de asociación a Ras (RA), que es un dominio característico de proteínas que interaccionan con esta familia de proteínas G pequeñas. Se ha propuesto que, en ausencia de unión de cAMP al dominio cAMP-B, se da una interacción autoinhibitoria entre los dominios regulador y catalítico que inhibe la actividad GEF de Epac. La unión de cAMP produce un cambio conformacional que rompe la interacción autoinhibidora, revelando el dominio CDC25HD e induciendo la actividad GEF (Rehmann et al., 2003 a,b,c). Además, se ha demostrado que esta unión de cAMP es necesaria para inducir la translocación de Epac1 a la membrana plasmática, por un proceso dependiente del dominio DEP (Ponsioen et al., 2009).

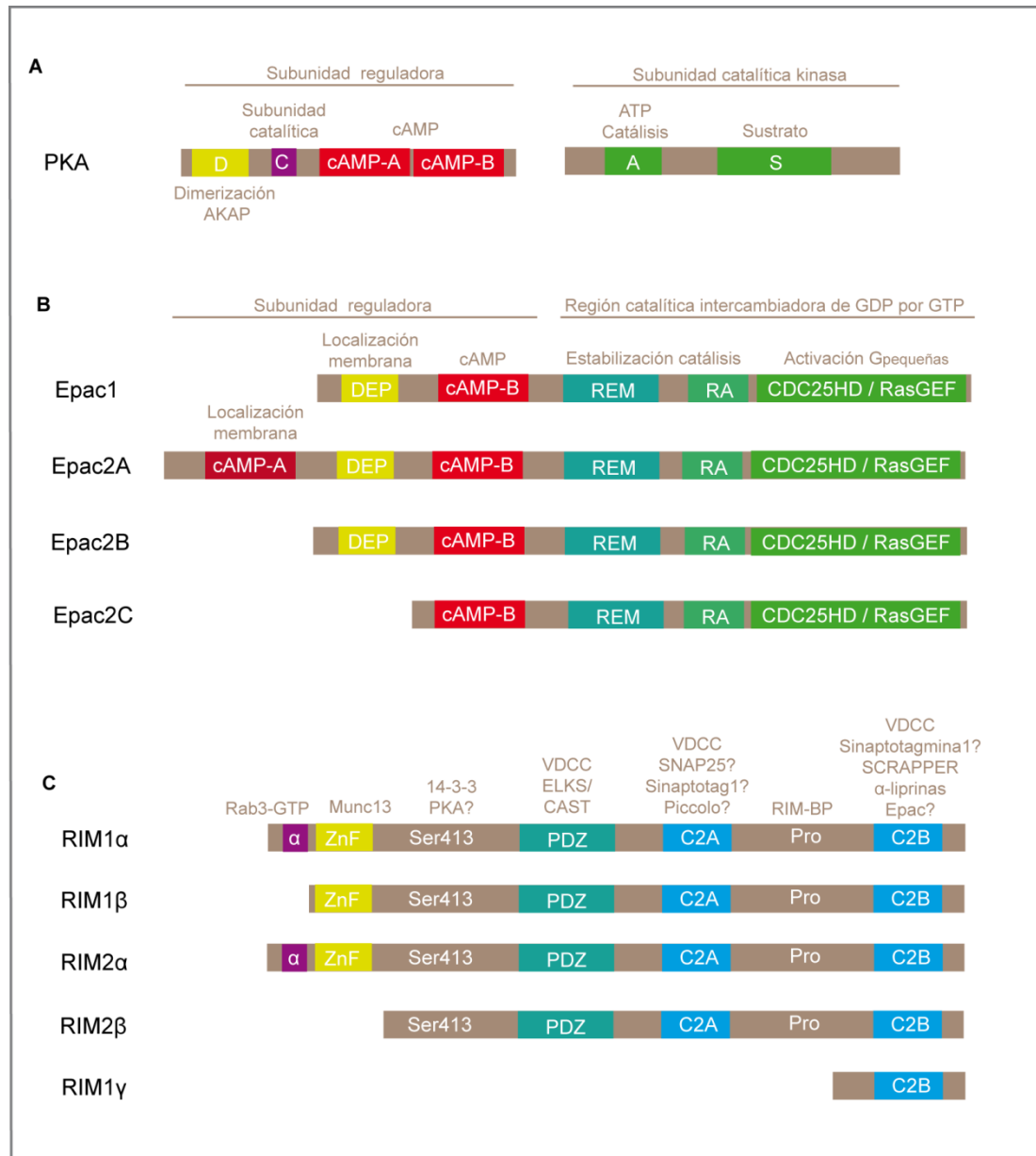


Fig 1.6. Proteínas implicadas en la vía de señalización del cAMP. (A) Proteína quinasa dependiente de cAMP o PKA. cAMP-A y B, sitios de unión cAMP; D, región de dimerización y unión a la proteína de andamiaje AKAP; C, región de unión a la subunidad catalítica; A, región de unión a ATP; S, región de unión a sustrato. (B) Isoformas de la proteína intercambiadora de nucleótidos de guanina activada por cAMP o Epac. cAMP-A y B, sitios de unión cAMP; DEP, dominio con homología a Disheveled, EGL-10 y Plecstrina; CDC25HD/RasGEF, dominio de homología con CDC25 con actividad intercambiadora de nucleótidos de guanina para Ras; REM, motivo de intercambio con Ras; RA, dominio de asociación a Ras. (C) Isoformas de la proteína RIM o molécula de interacción con Rab3. α, secuencia de interacción con Rab3; ZnF, dominio dedo de Zn; Ser413, serina en la posición 413; PDZ, dominio de interacción presente en PSD-95, DigA y zo-1; C2, dominio de unión a lípidos y calcio; Pro, secuencia rica en prolinas (adaptado de Seino y Shibashaki, 2005; Grandoch et al., 2010; Mittelstaedt et al., 2010)

Interacciones.

Se ha descrito la interacción de las proteínas Epac con numerosas proteínas: con el dominio PDZ de RIM2 y Piccolo (Ozaki et al., 2000; Fujimoto et al., 2002); con las proteínas MAP1 (proteína asociada a los microtúbulos) y microtubulina del citoesqueleto (Magiera et al., 2004; Gupta y Yatwood, 2005; Mei y Cheng, 2005; Borland et al., 2006); con la proteína Ras (Li et al., 2006; López de Jesús et al., 2006; Liu et al., 2008); con las proteínas Ran y RanBP2; y con las proteínas ERM (Gloerich et al., 2010). Epac forma parte de complejos multiproteicos de señalización por cAMP dependientes de proteínas de andamiaje AKAP, habiéndose descrito la participación de Epac en los complejos mAKAP-PKA-PDE4D3-Epac1 o AKAP450 (AKAP9)-Epac1-VE-cadherina-actina (Dodge-Kafka et al., 2005); AKAP79/150 (AKAP5)-PKA-Epac2-PKB/Akt (Nijholt et al., 2008); (Sehrawat et al., 2011). Además, se ha observado una reducción en los niveles de Rab3a en el ratón KO para Epac2, lo que sugiere una posible interacción con esta proteína (Fernandes et al., 2015).

Farmacología.

Los valores de Kd, para la unión de cAMP a los correspondientes dominios de las isoformas de Epac, son 4 y 1,2 μM , respectivamente (de Rooij et al., 2000). Estas constantes son mucho mayores que las de unión de cAMP a PKA (5,0 – 24,6 nM) (Bubis et al. 1988; Kuno et al. 1988; Ringheim y Taylor, 1990), por lo que Epac actúa a un rango de concentraciones de cAMP mayores (de Rooij et al., 2000; Seino y Shibasaki, 2005).

Se han desarrollados compuestos análogos de cAMP que activan e inhiben específicamente Epac, sin acción sobre PKA. Estos compuestos son ampliamente comentados en Schmidt et al., 2013 y Chen et al., 2014. El activador ortostérico altamente específico 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP, activa tanto Epac1 como Epac2 (Enserink et al., 2002; Rehmann et al., 2003 b, c; Vliem 2008). Además, existen otros activadores derivados de este compuesto, como su análogo no hidrolizable Sp-8-pCPT-2'-O-Me-cAMPS (Laxman et al., 2006; Poppe et al., 2008) y su precursor acetometil 8-pCPT-29-O-Me-cAMP-AM de mayor potencia (Vliem et al., 2008). Por otra parte, se ha propuesto que las sulfonilureas, un fármaco empleado en el tratamiento de la diabetes, actúa como activador alostérico de Epac2 (Zhang et al., 2009), aunque existen controversias (Tsalkova et al., 2011; Rehman, 2012). Existen diferentes inhibidores de Epac: brefeldina A, que es un inhibidor de las proteínas Arf de actividad GEF (Zhong and Zucker, 2005); HJC0197 y HJC0198 (Chen et al., 2012); ESI-05 y ESI-07, que se han propuesto como inhibidores específicos de Epac2, ya que no inhiben Epac1 (Tsalkova et al., 2012) o ESI-09 (Almahariq et al., 2012). Sin embargo, estudios posteriores han demostrado que sólo el ESI-05 es un inhibidor específico, ya que la brefeldina A tiene una acción inespecífica, mientras que HJC0197 y el ESI-09 tienen acción desnaturalizante (Rehmann, 2013).

Funciones en exocitosis y neurotransmisión.

Las proteínas Epac están implicadas en numerosos procesos biológicos, revisados ampliamente en Schmidt et al., 2013. En el sistema nervioso la señalización mediada por proteínas Epac desempeña numerosos papeles, como el control del desarrollo y crecimiento neuronal, la remodelación sináptica o la modulación de la neurotransmisión (Laurent et al., 2012).

Epac está implicada en la modulación de la exocitosis en distintos tipos de células y tejidos no neurales, como células beta secretoras de insulina (Holz, 2004; Kwan et al., 2007a, b), melanotropos de la pituitaria (Sedej et al., 2005), la reacción acrosómica de los espermatozoides (Braham et al., 2006; 2009; Ruete et al., 2014; Lucchesi et al., 2016), o los cuerpos de Weibel-Palade en células endoteliales (van Hooren et al., 2012).

Además, se ha demostrado la implicación de Epac en **neurotransmisión** en numerosas regiones del sistema nervioso, como la unión neuromuscular (Zhong y Zucker, 2005; Cheung et al., 2006), el cáliz de Held (Sakaba y Neher, 2003; Kaneko y Takahashi, 2004; Gekel y Neher, 2008), neuronas de corteza cerebral (Huang y Hsu, 2006; Woolfrey et al., 2009), de cerebelo (Ster et al. 2007), o de hipocampo (Gelinás et al., 2008; Ster et al., 2009; Yang et al., 2012; Fernandes et al., 2015). La importancia de Epac en los mecanismos de liberación de neurotransmisores se ha demostrado claramente con el estudio del ratón KO para Epac1 y Epac2 (Yang et al., 2012). Este modelo muestra que, en rodajas de hipocampo, la ausencia conjunta de estas proteínas, pero no así de cada isoforma individualmente, provoca una disminución en la liberación inducida por despolarización (EPSC), y en la frecuencia pero no en la amplitud de la liberación espontánea (mEPSC), sin mostrar alteraciones en las corrientes de los receptores postsinápticos. Además, si bien la ausencia de Epac1/2 no altera la potenciación a corto plazo, sí anula la plasticidad sostenida a largo plazo (LTP, Yang et al., 2012). En consonancia con estos estudios, recientemente se ha demostrado que el KO para Epac2 muestra deficiencias en la potenciación a largo plazo y en la modulación por cAMP (Fernandes et al., 2015)

Se ha observado que la generación de cAMP por el activador de la AC, forskolina, así como la aplicación del activador específico de Epac, 8-pCPT-2´O-Me-cAMP (8-pCPT), **potencian la liberación** de glutamato dependiente de Epac. En el cáliz de Held, la potenciación presináptica de los EPSC dependiente de cAMP es insensible a los inhibidores de PKA (Sakaba y Neher, 2003), mientras que el activador de Epac mimetiza estos efectos (Kaneko y Takahashi, 2004; Gekel y Neher, 2008). Además, el aumento en la liberación espontánea (mEPSC) inducido por cAMP depende exclusivamente de Epac (Gekel y Neher, 2008). La aplicación de 8-pCPT también aumenta la potenciación de la liberación inducida por el análogo de DAG, PDBu, postulándose la participación de PKC en la potenciación dependiente de Epac (Gekel y Neher., 2008). En rodajas de corteza, el

activador de Epac aumenta los EPSC, aunque la respuesta a foscolina es insensible a brefeldina A (Huang y Hsu, 2006), de acuerdo con la acción inespecífica propuesta para este inhibidor de Epac (Rehmann et al., 2013). También se ha demostrado la implicación de Epac en la potenciación de la liberación mediada por cAMP en otras sinapsis como la unión neuromuscular de cangrejo (Zhong and Zucker, 2005) o de *Drosophila* (Cheung et al., 2006). Sin embargo, los mecanismos de señalización de Epac en la potenciación de la liberación de neurotransmisores no han sido completamente aclarados. Epac inhibe la subunidad SUR1 de los canales K^+ sensibles a ATP, potenciando la liberación de glutamato (Zhao et al., 2013). Así mismo, se ha relacionado la acción de Epac con mecanismos dependientes de PKC (Gekel y Neher, 2008; Hucho et al., 2005), en un mecanismo relacionado con la nocicepción que implica la activación por Epac de la vía PLC/PLD (Hucho et al., 2005; Wang et al., 2007) o ERK (Eijkelkamp et al., 2010) y la activación de PKC ϵ (Hucho et al., 2005; Wang et al., 2007; Eijkelkamp et al., 2010). Por último, también se ha relacionado la acción de Epac con el mantenimiento del RRP, de acuerdo a la disminución del mismo en el ratón KO para Epac2 (Fernandes et al., 2015). Además, Epac previene el silenciamiento presináptico inducido por la activación por cannabinoides del receptor CB1 (Ramírez-Franco et al., 2104).

Las posibles vías de señalización de Epac en la potenciación de la neurotransmisión se muestran en la Fig 1.5. Los mecanismos propuestos se basan en gran medida en la acción de esta proteína en otros sistemas de exocitosis, ya que no han sido corroborados en neuronas. Estas vías de señalización de Epac podrían incrementar el RRP por: 1) la interacción directa y activación de la proteína RIM, tal como se ha demostrado que ocurre en células secretoras de insulina (Ozaki et al., 2000; Kashima et al., 2001; Park et al., 2012); 2) la activación directa de Rab3A a través de la actividad GEF de Epac, tal como se ha demostrado en la secreción de insulina (Park et al., 2012) y en la reacción acrosómica (Branham et al., 2009; Ruete et al., 2014). En este sentido hay que señalar que existe una disminución en la expresión neuronal de Rab3A en el KO de Epac2 (Fernandes et al., 2015). Otro mecanismo propuesto es 3) la activación de PLC ϵ , a través de la diana de Epac, Rap2B (Schmidt et al., 2001), como ocurre en la secreción de insulina (Dhuzura et al., 2011), miocitos cardíacos (Oestreich et al., 2007), o en la reacción acrosómica (Lucchesi et al., 2016), para generar DAG y dar lugar a 4) la activación de Munc18 por medio de PKC (Hucho et al., 2005; Gekel y Neher, 2008) o 5) la activación de la proteína Munc13.

Por otra parte, es posible que Epac tenga un papel en el control de la **excitabilidad neuronal**. Se ha descrito que en cerebelo la activación de Epac por PCAP (péptido de activación de la AC de pituitaria), activa Rap y p38 MAPK, movilizándolo Ca^{2+} de reservorios intracelulares. Esta señalización activa canales de K^+ sensibles a Ca^{2+} (canales BK), que se expresan tanto en el soma como en los terminales sinápticos, controlando la

excitabilidad neuronal. Sin embargo, dado el papel inhibitor sobre la liberación que tendría la activación de estos canales en los terminales presinápticos, y la ausencia de evidencias de la acción inhibitora presináptica de Epac, se ha propuesto que este mecanismo es somático y que ocurre a nivel postsináptico (Ster et al., 2007). Otra evidencia de la acción inhibitora postsináptica de Epac es que, en cultivos de neuronas corticales, el tratamiento durante una hora con 8-pCPT reduce la frecuencia y la amplitud de los mEPSC, por medio de la reducción en el contenido en receptores AMPA con subunidades GluR2/3 en las espinas dendríticas (Woolfrey et al., 2009).

En hipocampo, Epac participa en procesos de potenciación a largo plazo o **LTP**. En primer lugar, se ha demostrado que Epac controla la transcripción del microRNA miR-124, permitiendo la expresión de Zif268 y el desarrollo de procesos de LTP (Yang et al., 2012). Además, Epac mantiene el RRP necesario para el desarrollo de estos procesos de plasticidad (Fernandes et al., 2015). Por último, Epac promueve la síntesis de proteínas necesaria para controlar la fase tardía de la LTP, por medio de la activación de Rap-1, ERK y mTOR (Gelinas et al., 2007; 2008). Por otra parte, se ha descrito que la proteína Epac, activada por PACAP, también participa a nivel postsináptico en procesos de depresión sináptica a largo plazo (**LTD**) en hipocampo (Ster et al, 2009). Por lo tanto, es posible que Epac pueda modular la plasticidad sináptica a largo plazo tanto positiva como negativamente.

Funciones fisiológicas y patológicas.

Existen muchas evidencias acerca del importante papel de Epac en procesos cognitivos, especialmente en procesos de **aprendizaje y memoria**. El KO de Epac1/2 presenta problemas en el aprendizaje espacial y en las interacciones sociales (Yang et al., 2012). El KO de Epac 2 también muestra deficiencias en interacciones sociales y de comunicación (Srivastava et al., 2012a). Además, se ha observado que Epac tiene un papel en el establecimiento de la memoria a largo plazo, de manera independiente de PKA (Ma et al., 2009). Así, el activador de Epac, 8-pCPT, rescata los déficits en la memoria y en el condicionamiento por miedo del ratón KO en dopamina β -hidroxilasa, que es deficiente en NE/E (Ouyang et al., 2008). Así mismo, la inyección de 8-pCPT en el hipocampo mejora la recuperación de la memoria asociada al miedo (Ostroveanu et al., 2010). Por último, otros estudios relacionan la activación de Epac por receptores β -AR con cambios bidireccionales en la memoria emocional en hipocampo (Schutsky et al., 2011).

Epac está relacionada con mecanismos de **nocicepción**. Así, en modelos de dolor inflamatorio, hay un aumento en la expresión de Epac1 (Wang et al., 2007). Además, se ha demostrado que en este tipo de modelos, la activación de Epac por medio de la vía de señalización prostaglandina E2/P2X3 (Wang et al., 2007) o la vía GRK2, promueve la

activación de PKC ϵ por medio de PLC/PLD (Hucho et al. 2005; Wang et al., 2007) o ERK (Eijkelkamp et al., 2010).

Por otra parte, Epac participa en los cambios circadianos de síntesis de proteínas que establecen la **actividad marcapasos cerebral** en mamíferos (O'Neill et al., 2008).

Epac también interviene en numerosas patologías que afectan al cerebro. En humanos diagnosticados de **autismo**, una variante anómala de Epac2 controla la morfología de las espinas dendríticas (Srivastava et al., 2012b). Además, Epac está implicada en la remodelación de las espinas dendríticas en relación con neuroliginas, con su posible implicación en el autismo (Woolfrey et al., 2009). La disminución en la señalización de Epac se ha asociado con síntomas de **esquizofrenia** (Kelly et al., 2009). Además, se ha relacionado Epac con **ansiedad y depresión** (Middeldorp et al., 2010), proponiéndose su participación en la señalización por corticotropinas (Hauger et al., 2009). También se ha relacionado la disminución de la expresión de Epac2 con la enfermedad de **Alzheimer** (McPhee et al., 2005), asociado al papel neuroprotector de esta proteína (Nijholt et al., 2008). Así mismo, Epac puede modular la secreción del péptido β -amiloide (Maillet et al., 2003; Robert et al., 2005; Zaldua et al., 2007). Por último, también se ha relacionado Epac con la enfermedad de **Huntington** (Sarkar et al., 2009), por su papel en la acción de calpaínas (Williams et al., 2008).

3.1.3. Proteínas RIM.

Las proteínas RIM, del inglés *Rab-3-interacting molecule*, tienen un papel esencial en la liberación de neurotransmisor dependiente de la entrada de Ca²⁺ (Schoch et al., 2002; 2006) y en la plasticidad a largo plazo dependiente de cAMP (Castillo et al. 2002).

Isoformas.

Las proteínas de la familia RIM son codificadas por un único gen en *C.elegans* (UNC-10), mientras que en vertebrados han sido identificados 4 genes (RIM1-4), que codifican para 7 isoformas distintas (Fig. 1.6.C): dos isoformas completas α (RIM1 α , RIM2 α); dos isoformas β , que carecen de algunos dominios (RIM1 β , RIM2 β); y tres isoformas cortas γ (RIM2 γ , RIM3 γ y RIM4 γ). Además, las isoformas α y β están sujetas a modificaciones por procesamiento alternativo, aunque se desconoce el significado funcional de estas modificaciones (Wang and Sudhof, 2003).

Expresión cerebral y localización subcelular.

La expresión de estas isoformas sigue patrones diferenciados, aunque solapados. RIM1 α es la isoforma mayoritaria, expresándose de forma ubiqa en todo el cerebro, con

mayores niveles en corteza cerebral, cerebelo, hipocampo y tálamo. RIM2 α se concentra en cerebelo, bulbo olfatorio y giro dentado del hipocampo, aunque se expresa en bajos niveles en todo el cerebro. El patrón de expresión de RIM2 β y RIM1 γ es similar al de RIM1 α , pero con niveles de expresión menores (Schoch et al., 2006), al igual que ocurre con RIM1 β (Kaeser et al., 2008a). Por último, las isoformas RIM3 γ y RIM4 γ se expresan a niveles similares en todas las áreas del cerebro (Urui et al., 2010).

RIM se localiza en la zona activa presináptica (Schoch et al., 2002), por medio de las múltiples interacciones que establece con las proteínas de la matriz presináptica (Fig. 1.2.C). La interacción con la proteína ELK2 α parece determinar su localización en la zona activa, ya que su delección aumenta la solubilidad de RIM (Kaeser et al., 2009). Además se ha demostrado que la E3 ubiquitina ligasa sináptica SCRAPPER, regula la degradación de RIM mediada por el proteosoma (Yao et al., 2007).

Estructura.

Las isoformas largas RIM1 α y RIM2 α presentan diferentes dominios de importancia funcional (Fig. 1.6.C): un dominio amino terminal de tipo dedo de Zn que incluye una secuencia de unión a Rab3; un dominio PDZ central; y dominios C2A y C2B, en el extremo carboxilo terminal, que no contienen sitios de unión a Ca²⁺ ni a fosfolípidos, y que flanquean un corto dominio de interacción SH3 rico en prolinas (secuencia PxxP). El resto de isoformas carecen de algunas regiones propias de las isoformas largas. RIM1 β no presenta la secuencia amino terminal de unión a Rab3 presente en el dominio tipo dedo de Zn; RIM2 β carece del dominio dedo de Zn; y las isoformas cortas (RIM2 γ , RIM3 γ y RIM4 γ) sólo conservan el dominio C2B (Wang y Sudhof, 2003; Urui et al., 2010).

Interacciones.

Las proteínas RIM interactúan directamente con un gran número de proteínas, siendo un componente central de la zona activa (Fig. 1.2.C). Interaccionan con la proteína Rab3, por medio de secuencias que flanquean el dominio tipo dedo de Zn en el extremo amino terminal, siendo esta interacción dependiente de la unión de Rab3 a GTP (Wang et al., 1997; 2000). Por medio de su dominio tipo dedo de Zn interacciona con el dominio C2A de Munc13, compitiendo con la formación del homodímero autoinhibitorio de Munc13 (Betz et al., 2001; Dulobova et al., 2005; Deng et al., 2011). Esta interacción probablemente ayuda a la localización de la proteína Munc13 en la membrana plasmática, ya que los ratones KO para las isoformas que presentan el dominio dedo de Zn muestran un incremento en la solubilidad de Munc13 (Schoch et al., 2002; 2006; Kaeser et al. 2008a; Deng et al., 2011). Las secuencias de interacción de RIM con Rab3 y Munc13 son adyacentes, pero están separadas, permitiendo la interacción simultánea con ambas proteínas para formar un complejo triple (Andrews-Zwilling et al., 2006).

Existen además varias interacciones directas de RIM con los VDCC: 1) por medio del dominio C2B carboxilo terminal, con la subunidad $\beta 4$ presente en todos los tipos de VDCC, habiéndose demostrado esta interacción tanto para las isoformas largas de RIM (Kiyonaka et al., 2007), como para las cortas (Urui et al., 2010); 2) por medio del dominio PDZ, con secuencias citoplasmáticas del carboxilo terminal de los canales de tipo P/Q y N y posiblemente con los de tipo R, aunque no con los de tipo L y T (Kaeser et al., 2011); 3) por medio de los dominios C2A y C2B, con la subunidad $\alpha 1B$ de los canales de tipo N y más débilmente con la subunidad $\alpha 1C$ de los canales de tipo L (Coppola et al., 2001). Además, RIM interacciona con las RIM-BP, proteínas de unión a RIM, por medio de la secuencia rica en prolinas PxxP del dominio SH3 (Wang et al., 2000), que a su vez interaccionan con los VDCC (Hibino et al., 2002; Liu et al., 2011).

RIM también interacciona con otras proteínas de la zona activa. 1) El dominio PDZ interacciona con las proteínas ELKS/CAST (Ohtsuka et al., 2002; Lu et al., 2005). El aumento de la solubilidad de RIM1 en el ratón KO para las proteínas ELKS2 α podría indicar un papel de esta interacción en la localización de RIM en la zona activa (Kaeser et al., 2009), aunque en *C.elegans* la supresión de ELKS no afecta a la localización de RIM/UNC10 (Deken et al., 2005). 2) El dominio C2A y C2B interacciona con sinaptotagmina-1 y SNAP-25 (Coppola et al., 2001), aunque estas interacciones no han podido ser demostradas en estudios estructurales (Dai et al., 2005; Guan et al., 2007). 3) De manera indirecta, con las proteínas ELKS, con Piccolo y Basson (Takao-Rikitsu et al., 2004), mientras que en células pancreáticas se ha propuesto la interacción directa con de su dominio C2A con Piccolo (Fujimoto et al., 2002).

Otras proteínas que podrían interaccionar con RIM son: 1) Epac2 por medio del dominio C2B de RIM en células secretoras de insulina (Kashima et al., 2001); 2) las proteínas adaptadoras 14-3-3 por medio de una región intermedia entre el dedo de Zn y el dominio PDZ que contiene la Ser413 (Sun et al., 2003; Simsek-Duran et al., 2004); 3) receptores presinápticos como el receptor tirosina fosfatasa por medio de liprinas (Serra-Pages et al., 1998) o el receptor mGlu7 (Pelkey et al., 2008).

Por último, se ha relacionado el dominio C2A con la correcta localización de la proteína RIM/UNC10 (Deken et al., 2005) y estudios estructurales han propuesto la importancia de la dimerización del dominio C2B (Guan et al., 2007).

Fosforilaciones.

La PKA fosforila la Ser413, situada entre los dominios dedo de Zn y PDZ (Fig. 1.6.C), induciendo la unión a RIM1 α de las proteínas adaptadoras 14-3-3 (Simsek-Duran et al., 2004), y pudiendo participar procesos de plasticidad sináptica a largo plazo (LTP, Lonart et al., 2003). Sin embargo, estudios posteriores han demostrado que esta fosforilación no es necesaria para la LTP (Kaeser et al., 2008b; Yang y Calakos, 2010). Por otra parte, ERK2,

activada por BDNF, también fosforila RIM1 α en la Ser477, aumentando la liberación de glutamato de manera dependiente de Rab3 (Simsek-Duran y Lonart, 2008). Por último, RIM1 α es fosforilada, de manera específica cerca del dominio C2B, por la Ser/Thr quinasa asociada a las vesículas sinápticas, SAD-B, que está implicada en la regulación de la liberación de neurotransmisores, pero se desconoce si este proceso depende de RIM o de otras dianas (Inoue et al., 2006; Watabe et al., 2016).

Funciones en neurotransmisión.

Las proteínas RIM tienen un papel muy importante en la liberación basal de neurotransmisores. Se ha observado que la ausencia de la proteína UNC10/RIM en *C.elegans* reduce la frecuencia de los mEPSC y la respuesta inducida por despolarización (Koushika et al., 2001). En mamíferos, se ha descrito que el ratón KO para RIM1 α presenta una reducción en el RRP, en la probabilidad de liberación (Calakos et al., 2004; Fourcaudot et al., 2008; Kaeser et al., 2008a), anomalías en la liberación asincrónica (Schoch et al., 2002) y reducción en los mIPSC (Kaeser et al., 2008a). Estos defectos están agravados en el DKO para RIM1 α y RIM1 β (Kaeser et al., 2008a). El DKO para RIM1 α y RIM2 α , muestra además una reducción en la liberación inducida y pérdida de la modulación por Ca²⁺ de los mEPSC (Schoch et al., 2006). Por último, el KO condicional para todas las isoformas largas de RIM muestra defectos en el RRP, la frecuencia de los mEPSC, la amplitud de las respuestas evocadas y presenta una desincronización entre la entrada de Ca²⁺ y la exocitosis (Kaeser et al., 2011). El hecho de que la sola pérdida de la expresión de la isoforma RIM2 α (Schoch et al., 2006) no afecte a las propiedades basales de la neurotransmisión, se debe probablemente a la compensación por la isoforma RIM1 α . Igualmente ocurre con RIM1 α en las fibras musgosas del cerebelo (Castillo et al., 2002), compensada probablemente por RIM2 α , cuya expresión es mayor en cerebelo, (Schoch et al., 2006). La importancia de estas funciones se pone de manifiesto en la letalidad del DKO de RIM1 α y RIM2 α (Schoch et al., 2006) y del DKO de RIM1 α y RIM1 β (Kaeser et al., 2008a).

Debido al gran número de interacciones con otras proteínas, se ha hipotetizado el papel de RIM como posible proteína de andamiaje de la zona activa. Sin embargo, los ratones KOs para las distintas isoformas no muestran una alteración clara en la zona activa, ni en las proteínas de la misma (Koushika et al., 2001). A pesar de ello, en algunos de estos estudios, se han observado alteraciones en la localización de algunas de estas proteínas: la pérdida de la correcta localización de los VDCC (Kaeser et al., 2011); un claro aumento en la solubilidad de Munc13-1 (Schoch et al., 2006; Kaeser et al., 2008a; Deng et al., 2011); así como un incremento en la solubilidad de las RIM-BP, α -liprinas y ELKS/CAST en el DKO para RIM1 α y RIM1 β (Kaeser et al., 2008a).

Además, se ha descrito que la SUMOilación de la proteína RIM es necesaria para el mantenimiento de la exocitosis rápida inducida por despolarización (Girach et al., 2013).

El importante papel de las proteínas RIM en la liberación de neurotransmisores se debe a las funciones que desempeña:

Localización de los VDCC en la zona activa. Se han descrito varias interacciones directas e indirectas de RIM con los VDCC (detalladas previamente), habiéndose demostrado la implicación funcional de algunas de ellas. La interacción de RIM1 α (Kiyonaka et al., 2007) y de las isoformas cortas (Urui et al., 2010), por medio de su dominio C2B, con la subunidad β 4 presente en todos los tipos de VDCC disminuye la cinética de inactivación de los mismos, prolongando la entrada de Ca^{2+} y aumentando la exocitosis. Este efecto también ha sido propuesto para los canales de tipo L, en células secretoras de insulina (Gandini et al., 2011). Por otra parte, la interacción de RIM1 α con los VDCC, tanto directa por medio de su dominio PDZ, como indirecta por las RIM-BP (Liu et al., 2011; Acuna et al., 2015), es responsable de la localización de los VDCC de tipo P/Q y N en la zona activa, y del acoplamiento de la entrada de Ca^{2+} y la exocitosis (Kaesler et al., 2011).

Preparación de las vesículas sinápticas para su liberación. Las proteínas RIM también participan en el proceso de preparación de las SVs para su liberación, por medio de su interacción con las proteínas Munc13. Munc13 es una proteína esencial para la preparación de las vesículas sinápticas, ya que favorece la conformación abierta de la syntaxina-1, necesaria para la formación del complejo SNARE (apartado 1.4.; Richmond et al., 2001; Ma et al., 2011; 2013). RIM forma un complejo triple con Munc13 y Rab3 (Andrews-Zwilling et al., 2006). Así, la expresión de la forma abierta de la syntaxina-1, pero no de la cerrada, rescata las alteraciones sinápticas observadas en el KO de Unc10/RIM en *C.elegans* (Kushika et al., 2001). Se ha observado que la interrupción de la interacción entre RIM y Munc13 provoca la pérdida del RRP, imitando el fenotipo del KO de Munc13 (Betz et al., 2001). Así mismo, el reclutamiento de las proteínas Munc13 está regulado por su interacción con RIM1 α (Andrews-Zwilling et al., 2006). Además, el estudio del KO condicional para todas las isoformas largas de RIM demostró que la interacción de RIM con Munc13 evita la formación del dímero autoinhibitorio de Munc13 y que la interacción de RIM con Rab3 también es necesaria para este proceso, siendo el efecto de ambas interacciones independiente y aditivo (Deng et al. 2011). Este papel de RIM se ha estudiado en otros sistemas de exocitosis, como las células secretoras de insulina, en el que la interacción Munc13-1-RIM2 rescata el fenotipo propio de la ausencia de Munc13-1 (Kwan et al., 2007)

Esta función de RIM afecta a la posición de las SVs a nivel ultraestructural, estudiada por microscopía electrónica mediante fijación química. Así, el KO de UNC10/RIM en *C.elegans* presenta una disminución en el número de SVs situadas muy

próximas a la zona activa (Weimer et al., 2006). Aunque otros modelos animales previos no mostraban cambios ultraestructurales (Schoch et al., 2002; 2006), los ratones KO para todas las isoformas largas de RIM muestran una reducción en el número de SVs en contacto con la zona activa (Han et al., 2011; Kaeser et al., 2011). Estos resultados han sido confirmados por el estudio del KO de RIM1 α empleando crio-tomografía electrónica (Fernandez-Busnadiego et al., 2013).

Es posible que la colocación de las SVs sea altamente dependiente de la interacción RIM-Rab3, como sugiere que el doble KO para UNC10/RIM y Rab3 presente deficiencias en la colocación de las SVs similares a las de los KOs individuales (Gracheva et al., 2008). Además, aunque algunos estudios no muestran alteraciones en la colocación de las SVs en los animales KO de Rab3 (Schluter et al., 2006), otros autores han descrito alteraciones en este sentido (Nonet et al., 1997; Coleman et al., 2007; Gracheva et al., 2008) o en su reclutamiento a la zona activa (Leenders et al., 2001). Otros estudios también han señalado la importancia de la interacción RIM-SYD2/ α -liprina en el posicionamiento de las SVs (Stigloher et al., 2011).

Plasticidad sináptica. Además de su importancia en la liberación basal de neurotransmisores, las proteínas RIM han sido relacionadas con procesos de potenciación de la liberación a corto plazo y con la potenciación a largo plazo dependiente de cAMP (Kaeser y Sudhof, 2005; Mittelstaed et al., 2010). En este sentido, el ratón KO para RIM1 α muestra deficiencias en la **STP** determinadas por pares de pulsos y trenes de pulsos, tanto en rodajas de hipocampo (Schoch et al., 2002) y amígdala (Fourcaudot et al., 2008), como en cultivos autópticos de neuronas hipocámpales (Calakos et al., 2004).

Además, el estudio del KO de RIM1 α puso de manifiesto que esta proteína está implicada en la **LTP dependiente de cAMP/PKA** en las fibras musgosas de hipocampo y cerebelo (Castillo et al., 2002; Huang et al., 2005). Este fenotipo es similar al observado en el KO de Rab3 (Lonart et al., 1998; Huang et al., 2005), por lo que se ha postulado que estas proteínas actúan conjuntamente. Los estudios iniciales en cerebelo propusieron que la fosforilación de RIM en la Ser413 (Lonart et al., 2003), que conlleva el reclutamiento de las proteínas adaptadoras 14-3-3 (Simsek-Duran et al., 2004), es necesaria para el desarrollo de la LTP. Sin embargo, estudios posteriores cuestionaron la implicación de esta fosforilación (Kaeser et al., 2008b; Yang y Calakos, 2010), manteniéndose el mecanismo de este fenómeno sin esclarecer. Otros estudios confirman la implicación de RIM1 α en procesos de plasticidad dependientes de cAMP, tanto en las sinapsis corticales-amígdala lateral (Fourcaudot et al., 2008), como en las fibras musgosas hipocámpales (Pelkey et al., 2008). En este último caso, se ha señalado que la interacción entre RIM y el receptor mGlu7 limita la actuación de RIM, pero que la activación prolongada e internalización del receptor liberaría RIM, potenciando el desarrollo de la LTP dependiente de cAMP (Pelkey et al., 2008).

RIM1 α también es importante para los procesos de plasticidad en sinapsis inhibitorias (Kaesler et al., 2008a). Se ha demostrado que el receptor CB1 presente en hipocampo y amígdala basolateral, inhibe la formación de cAMP, evitando la LTP dependiente de RIM y dando lugar a procesos de LTD (Chevalleyre et al., 2007). Además, la vía cAMP/PKA potencia la liberación en neuronas gabaérgicas de cerebelo, de manera dependiente de RIM1 α (Lachamp et al., 2009).

3.2. Mecanismos de señalización mediados por diacilglicerol.

El diacilglicerol (DAG) es un lípido de membrana, formado por una molécula de glicerol con dos ácidos grasos unidos por enlaces éster a dos de sus grupos hidroxilos, que actúa como segundo mensajero, activando diversas proteínas y mecanismos de señalización. El DAG modula la neurotransmisión, principalmente por medio de la activación de la proteína quinasa C (PKC) y la proteína Munc13 (Fig. 1.5).

Munc13 y PKC son las proteínas activadas por DAG que modulan la neurotransmisión más ampliamente estudiadas, aunque existen otras proteínas con dominios C1 (Colón-Gonzalez y Kazenietz, 2006) que destacan por su alta afinidad por DAG, como son las proteínas quimerinas, PKD y RasGRPs (Brose y Rosenmund., 2002; Kazenietz, 2002). Sin embargo, no se ha descrito el papel de estas últimas en la modulación de la neurotransmisión, aunque sus acciones podrían tener alguna implicación indirecta sobre la misma.

El DAG se genera principalmente por la hidrólisis de fosfatidilinositoles (PIP₂) por la enzima fosfolipasa C (PLC, Fig. 1.7.A). También se puede producir DAG por otras rutas, como por la degradación del ácido fosfatídico (PA), obtenido en la hidrólisis de fosfatidilcolina por la fosfolipasa D (PLD). El DAG producido por esta ruta contiene ácidos grasos saturados/monoinsaturados, mientras que el DAG generado por PLC contiene ácidos grasos polinsaturados, y parece que participa en otros tipos de señalizaciones (Brose y Rosenmund., 2002).

Además el DAG se degrada por la acción de diferentes enzimas: la DAG quinasa, que produce ácido fosfatídico y tiene diversas funciones en el SNC (Ishisaka y Hara., 2014); la DAG lipasa que produce monoacilgliceroles como el 2-AG, que es uno de los principales agonistas endocannabinoides (Ohno-Shosaku y Kano, 2014); o la DAG acetil transferasa que forma triacilgliceroles (Fig. 1.7.A).

3.2.1. Fosfolipasa C.

La fosfolipasa C o PLC (EC 3.1.4.11) es una hidrolasa que cataliza la hidrólisis de PIP₂, dando lugar a inositol trifosfato, IP₃, y DAG. Estos segundos mensajeros, así como el

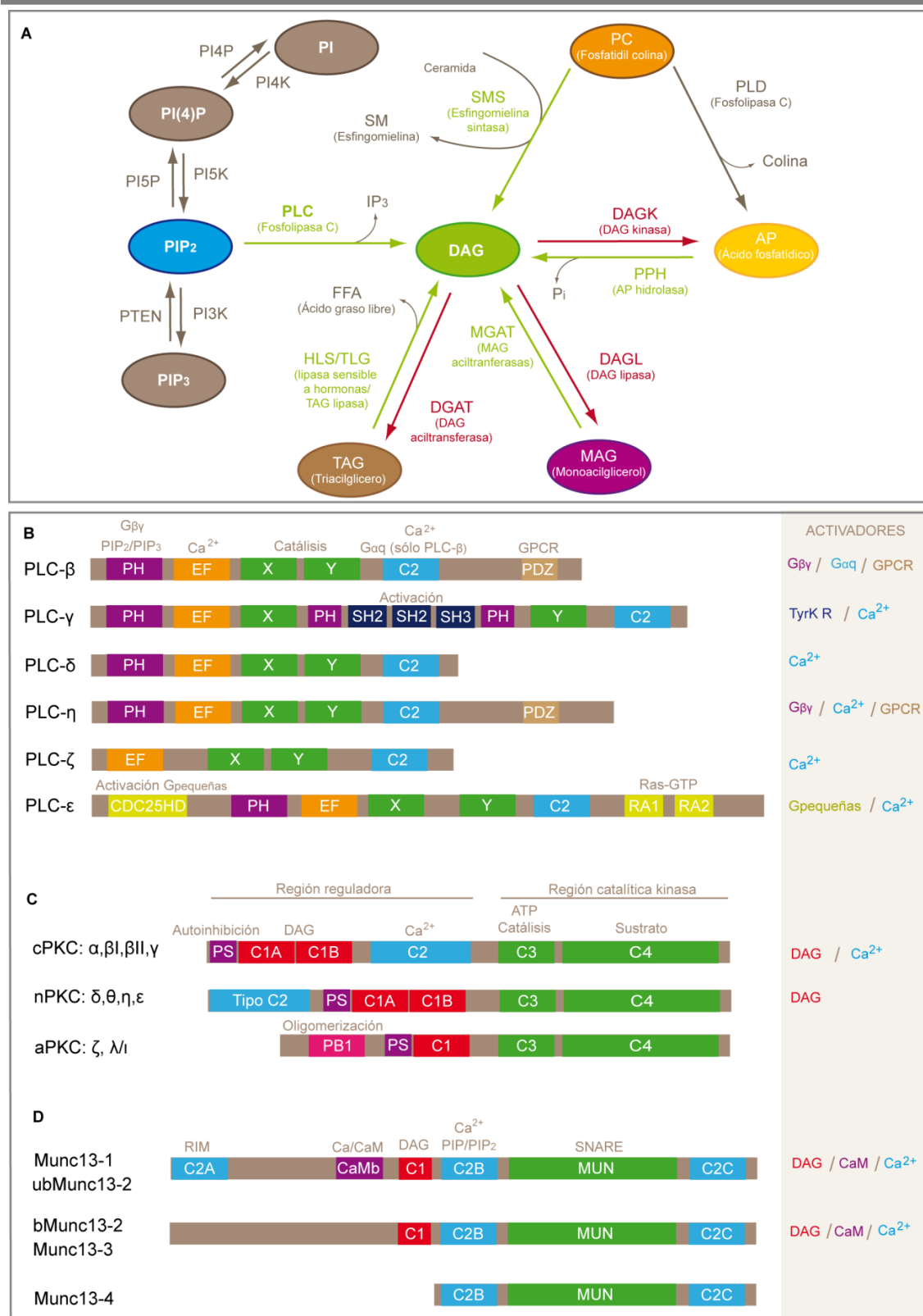


Fig 1.7. Proteínas implicadas en la vía de señalización por DAG y su metabolismo. (A) Metabolismo del diacilglicerol (DAG). Verde: síntesis; rojo: degradación. (B) Isoformas de la fosfolipasa C (PLC) y sus formas de activación. PH, dominio homólogo de plecstrinas; EF, dominio tipo mano EF; X e Y, dominios catalíticos; C2, dominio de unión a lípidos y calcio; SH2 y SH3, dominios homólogos de la proteína Src; PDZ, dominio de interacción presente en PSD-95,DlgA y zo-1; RA, dominio de asociación a Ras; CDC25HD/RasGEF, dominio de homología con CDC25 con actividad intercambiadora de nucleótidos de guanina para Ras. (C) Isoformas de la proteína quinasa C (PKC) y sus formas de activación. PS, dominio pseudosustrato; C1, dominios de activación por DAG; C2, dominio de unión a lípidos y calcio; C3, dominio unión ATP y fosfotransferasa; C4, dominio de unión a sustrato; PB1, dominio Pox y Bem1 de oligomerización. (D) Isoformas de la proteína Munc13 y sus formas de activación. C2, dominio de unión a lípidos y calcio; CaMb, motivo de unión a calmodulina; C1, dominios de activación por DAG; MUN, dominio funcional de Munc13 (adaptado de Suh et al., 2008, Steinberg et al., 2008 y Brose y Rosenmund, 2002).

PIP₂, modulan diferentes rutas de transducción de señales intracelulares (Fig.1.5.). Entre las funciones biológicas de estas vías de señalización se encuentra la modulación de la neurotransmisión.

Isoformas y localización.

Han sido identificadas 13 isoformas diferentes de esta enzima en mamíferos, que a su vez han sido clasificadas en 6 familias: β ($\beta_{1,2,3,4}$), γ ($\gamma_{1,2}$), δ ($\delta_{1,2,3}$), ϵ , ζ y η ($\eta_{1,2}$). Además, estas isoformas presentan variantes por procesamiento alternativo (Suh et al., 2008). Respecto a su expresión, se ha descrito que todas las familias, excepto la familia ζ , se expresan en el cerebro: la familia β presenta una alta expresión en el cerebro; la familia γ presenta una expresión ubicua, pero con altos niveles en cerebro, especialmente en neuronas, aunque regulada por el desarrollo; la familia δ también tiene una expresión ubicua, concentrándose en la astroglija a nivel cerebral; la familia ϵ también presenta una expresión ubicua, que incluye el cerebro; la familia η tiene una expresión predominante en el cerebro; mientras la familia ζ está solamente presente en los espermatozoides (Rebecchi y Pentya, 2000; Rhee et al., 2001; Suh et al., 2008).

Estructura y regulación.

Todas las isoformas de PLC tienen varios dominios comunes (Fig. 1.7.B): dos dominios catalíticos X e Y; cuatro dominios tipo manos EF; un dominio amino terminal homólogo a plecstrinas (dominio PH), relacionado con la unión a lípidos de membrana (PIP₂ y PIP₃), su localización en membrana y la interacción con las subunidades $\beta\gamma$ de las proteínas G (salvo la familia ζ que no presenta este dominio); y un dominio C2 de unión a Ca²⁺ cercano al carboxilo terminal. Además, existen otros dominios presentes sólo en algunas de las isoformas: la familia γ presenta dominios SH2 y SH3 (homólogos a la proteína Src), relacionados con su activación, así como dos dominios PH adicionales que flanquean los dominios SH; las familias β y η expresa regiones de unión a dominios PDZ relacionados con su asociación a GPCRs; y la familia ϵ tiene varios dominios adicionales implicados en su activación, concretamente dos dominios de unión a Ras-GTP (RA1/2) y un dominio de actividad intercambiadora de nucleótidos de guanina o GEF (CDC25HD; Rebecchi y Pentya, 2000; Rhee et al., 2001; Suh et al., 2008).

Se han descrito distintos mecanismos implicados en la activación de las familias de PLC, relacionados con los dominios presentes en la estructura de cada familia (Fig. 1.7.B). Además, se ha propuesto que la activación de estas proteínas puede estar relacionada con su translocación a la membrana plasmática, para tener acceso a su sustrato PIP₂ (Harden et al., 2011). Entre los moduladores de PLC cabe señalar:

1) Modulación por Ca²⁺ de todas las familias. Para la acción catalítica y la localización en membrana de la PLC es necesaria la unión de Ca²⁺ a los dominios

catalíticos (Williams et al., 1999). Además, la unión de Ca^{2+} en los dominios C2 potencia la acción catalítica de la enzima (Essen et al., 1996; Lomasney et al., 1999). Los dominios de manos EF también unen Ca^{2+} , aunque su delección reduce la actividad enzimática de manera independiente de Ca^{2+} (Nakashima et al., 1995).

Las PLC de las familias δ , η , ϵ y ζ presentan de 3 a 4 sitios de unión a Ca^{2+} en sus dominios C2, mostrando una mayor sensibilidad a este ión (Allen et al. 1997; Saunders et al., 2002; Hwang et al., 2005), mientras que la familia β tiene menos sensibilidad, habiéndose propuesto que no es activada por la unión de Ca^{2+} a su dominio C2 (Wang et al., 1999). Las familias δ y ζ , exhiben un alto control por Ca^{2+} , probablemente relacionado con la ausencia de otros mecanismos de regulación (Suh et al., 2009).

2) Modulación por **proteínas G triméricas** de las familias β , η . Las subunidades de la familia $\text{G}\alpha$ activan PLC β por medio de su dominio C2 (Wang et al., 1999), pero no PLC γ , η ó ϵ (Taylor et al., 1991; Smrcka et al., 1991). Además, esta subfamilia también es activada por la interacción de las subunidades $\text{G}\beta\gamma$ con su dominio PH (Wang et al., 2000). Así, se ha propuesto que diferentes tipos de GPCRs acoplados a proteínas G α activan PLC β (Rhee et al., 2001). Además, la familia PLC η también interacciona con $\text{G}\beta\gamma$ y puede ser modulada por los GPCRs (Suh et al., 2008). Ambas familias de fosfolipasas presentan dominios de interacción con proteínas con dominios PDZ, y se ha propuesto un papel como mediadoras de la acción de los GPCR (Kim et al., 2011). No ha sido demostrada la interacción directa de subunidades $\text{G}\alpha$ y $\beta\gamma$ con PLC ϵ o PLC γ , aunque podrían modularlas indirectamente (Suh et al., 2008; Smrcka et al., 2012).

3) Modulación por **proteínas G pequeñas** o monoméricas de la familia ϵ . La asociación de proteínas de la familia de las proteínas G pequeñas de la familia Ras (H-Ras, K-Ras, Rap1A, 2A, 2B) al dominio RA2 induce la actividad de esta clase de PLC. Además, se ha propuesto que el dominio de homología con CDC25 (CDC25HD o Ras-GEF) puede ejercer actividad GEF sobre las proteínas G pequeñas unidas, actuado como un bucle de retroactivación que prolonga la actividad de la PLC ϵ (Smrcka et al., 2012). En sistemas no neuronales se ha demostrado que los β -AR (Oestreich et al., 2007), por medio de la vía de señalización Epac/ Rap2B (Schmidt et al., 2001), pueden activar la PLC ϵ (Dzhura et al., 2011).

4) Modulación por **receptores tirosina quinasa** de la familia γ . Agonistas de estos receptores, como el factor de crecimiento epidérmico (EGFR), o el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR), activan las PLC γ (Kamat y Carpenter, 1997), induciendo su fosforilación (Sekiya et al., 2004). Se ha demostrado que estos factores pueden activar otras familias de PLC, pero se desconoce si su acción es directa (Suh et al., 2008; Smrcka et al., 2011). También se ha propuesto la activación de la familia PLC γ por otros GPCR sin actividad quinasa, pero probablemente estos mecanismos son indirectos, dependiendo de la activación de proteínas quinasas que fosforilan a estas enzimas (Suh et al., 2008).

Teniendo en cuenta estos mecanismos de activación, se ha propuesto que las señales extracelulares podrían activar inicialmente las familias de PLC β , η y γ (PLC primarias). Esta señalización primaria, podría provocar el incremento en la concentración de Ca^{2+} o la activación de Rap, activando PLC δ , ζ y ϵ (PLC secundarias), amplificando la señalización por PLC (Yang et al., 2013)

3.2.2. Funciones de PIP_2 e IP_3 en neurotransmisión.

El sustrato para la formación de DAG es el PIP_2 . La actividad de PLC, además de DAG, también produce IP_3 . Ambas moléculas desempeñan importantes funciones en la regulación de la neurotransmisión.

El PIP_2 se une a numerosas proteínas sinápticas, participando en su localización en membrana y modulando su función (Fig. 1.5.; Koch y Hold., 2012; Martín et al., 2014). Este es el caso de canales iónicos (VDCC y canales de K^+ tipo M), proteínas de la zona activa (Piccolo, RIM), proteínas implicadas en los procesos de fusión (Munc13, CAPS, sintaxina), sensores de la exocitosis (sinaptotagmina, Doc2b) o proteínas endocitóticas (proteínas adaptadoras AP, dinaminas). Por ello, el PIP_2 desarrolla un importante papel en la función sináptica. En primer lugar, destaca la modulación de los canales de K^+ de tipo M (canales KCNQ/Kv7). Estos canales necesitan PIP_2 para su activación e inhibición de la exocitosis, siendo por lo tanto regulados por la activación de PLC (Hernandez et al., 2008). Por otra, el PIP_2 es gran importancia para el reclutamiento de proteínas exocitóticas (Martín et al., 2014) y el acoplamiento entre exo- y endocitosis a través de la interacción con sinaptotagmina. Esta interacción es necesaria para el reabastecimiento de SVs (Koch y Hold., 2012) y para el proceso de preparación de las SVs dependiente de la proteína de la maquinaria exocitótica CAPS (Nguyen-Truong et al., 2014).

El IP_3 participa en la movilización de Ca^{2+} de compartimentos intracelulares, principalmente desde el retículo endoplasmático (RE), por medio de la activación de receptores de IP_3 (IP_3R , Fig. 1.5.). En el sistema nervioso, esta señalización afecta a multitud de procesos, como el desarrollo de las ondas de Ca^{2+} de dendritas a soma, dependientes del proceso de liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} (CICR); el establecimiento de la actividad marcapasos; la activación de la transcripción de diferentes proteínas; así como el desarrollo de mecanismos de plasticidad sináptica asociados a procesos de aprendizaje y memoria (Berridge et al., 1998; 2008). Existen evidencias, aunque no consenso, acerca del papel de la movilización de Ca^{2+} del RE en los terminales presinápticos, aunque ha sido mayoritariamente asociados al papel de los receptores de rianodina (RyR, Bouchard et al., 2003). Respecto al papel del IP_3 a nivel presináptico, su acción potenciadora de la exocitosis se ha descrito en distintos modelos, incluyendo sinaptosomas (Gandhi y Ross, 1987). Estos mecanismos han sido relacionado con

procesos de plasticidad a corto plazo (Caillard et al., 2000; Vargas et al., 2011) y la modulación de la liberación espontánea (Liou et al., 2006; Takahashi et al., 2007; Mathew y Hablitz, 2008).

3.2.3. Proteína quinasa C.

La proteína quinasa C (PKC) es una quinasa de serina/treonina, que es activada por DAG, entre otras moléculas. La señalización por esta quinasa participa en diferentes procesos, entre las que se encuentra la modulación de neurotransmisión a distintos niveles (Fig. 1.5).

Isoformas, estructura y activación

Se han descrito 12 isoformas de PKC en mamíferos, clasificadas en 3 familias según sus activadores y homología (Fig. 1.7.C). Las PKC clásicas (cPKC), que incluyen las isoformas α , β I, β II y γ , son activadas por DAG, Ca^{2+} , así como por otros activadores (fosfatidilserina, ácido araquidónico y ceramidas). Las PKC nuevas (nPKC), que engloban las isoformas δ , ϵ , ϵ' , η , θ y μ /PKD, que no requieren Ca^{2+} para su activación. Por último, las PKC atípicas (aPKC), con las isoformas ζ y λ I, son insensibles a Ca^{2+} y DAG (Newton et al., 2001; Sun y Alkon, 2006; Steinberg, 2008).

Las distintas isoformas presentan combinaciones diferentes de los siguientes dominios (Fig. 1.7.C). En la región reguladora amino terminal se localizan: un motivo pseudosustrato, que puede unirse de manera autoinhibitoria a la región catalítica; dos dominios C1A y C1B de activación por DAG; y un dominio C2 de activación por Ca^{2+} , que además une lípidos y proteínas. La región catalítica carboxilo terminal presenta un dominio C3 que contiene el sitio de unión a ATP y de actividad fosfotransferasa, así como un dominio C4 con el sitio de unión a sustrato (Newton et al., 2001; Sun y Alkon, 2006; Steinberg, 2008).

La activación de las PKC requiere diferentes pasos, que se dan de forma secuencial: 1) la fosforilación de 3 residuos de la proteína, por acción inicial de PDK-1; 2) el plegamiento funcional; 3) la localización subcelular, que varía de acuerdo con la isoforma, y está sujeta a fenómenos de translocación a la membrana por interacción con las proteínas RACK; y 4) la pérdida de la interacción autoinhibitoria como consecuencia de la interacción de la proteína con la membrana plasmática. La activación de PKC está modulada por la unión de diferentes moduladores alostéricos, principalmente DAG, pero también fosfatidilserina y Ca^{2+} (Newton et al., 2001).

Funciones en neurotransmisión.

La PKC tiene una abundante expresión en cerebro (Saito et al., 1988), donde lleva a cabo importantes funciones. Estas funciones comprenden la regulación de distintos procesos, como la liberación de neurotransmisores, la expresión en membrana de receptores y de otras proteínas, procesos de plasticidad postsináptica, sinaptogénesis, regeneración axonal y supervivencia neuronal. Además, su acción está implicada en patologías como la isquemia cerebral o la enfermedad de Alzheimer (Sun y Alkon., 2006).

La PKC puede facilitar la liberación de neurotransmisores por distintos mecanismos. La fosforilación de **canales de K⁺**, inhibiendo su actividad, y por lo tanto, incrementando la duración de los potenciales de acción y la activación de los VDCC (Gerber et al., 1991; Barrie et al., 1991; Fadool et al., 2000; Hu et al., 2003). PKC fosforila los **VDCC**, aumentando la entrada de Ca²⁺ (Yang y Tsien, 1993; Stea et al., 1995). Esta acción suprime la inhibición de los VDCC mediada por las subunidades Gβγ (Swartz, 1993; Zamponi et al., 1997; Herlitze et al., 2001). Por otra parte, se ha propuesto que PKC puede inhibir los VDCC de manera indirecta, por fosforilación de SNAP25, que modula estos canales (Pozzi et al., 2008).

PKC también modula la maquinaria exocitótica. Se ha demostrado que la activación de PKC por ésteres de forbol (análogos de DAG), aumenta el RRP (Ghirardi et al., 1992; Gillis et al., 1996; Smith et al., 1998; Silinsky y Searl, 2003) y mejora el acoplamiento entre la entrada de Ca²⁺ y la exocitosis (Korogod et al., 2007). Esta acción depende de la fosforilación de la proteína **Munc18**, que juega un papel muy importante en diversas fases de la exocitosis, como la preparación de las SVs para su fusión o la apertura del poro de fusión (apartado 1.4.; Dulubova et al., 1999; Verhage et al., 2000; Misura et al., 2000; de Vries et al., 2000; Barclay et al., 2003; Craig et al., 2003; Nili et al., 2006; Toonen et al., 2006; Wierda et al., 2007; Gen et al., 2014; Cijssouw et al., 2014). También se ha descrito que otros sustratos de PKC, como **sintaxina** (Jovanovic et al., 1996), **sinaptotagmina** (Nagi et al., 2006) y **SNAP25** (Shoji-Kasai et al., 2002; Houland et al., 2003; Tokuaka et al., 2006; Yang et al., 2007; Shu et al., 2008), aumentan el RRP. Sin embargo, otros estudios cuestionan la implicación de la fosforilación de SNAP25 en la potenciación por DAG (Finley et al., 2003). Recientes estudios han propuesto el papel de la fosforilación de la sinaptotagmina-1 por PKC en etapas posteriores a la preparación de las SVs (de Jong et al., 2016)

3.2.4. Proteínas Munc13.

Las proteínas Munc13 son esenciales en la preparación de las vesículas sinápticas para su liberación (Augustin et al., 1999a; Varoqueaux, et al 2002), y median mecanismos

de plasticidad dependientes de DAG (Betz et al., 1998; Rhee et al, 2002) y de Ca^{2+} -calmodulina (Junge et al, 2004; Lipstein et al, 2013).

Isoformas.

Las proteínas de la familia Munc13 (proteínas de mamífero análogas a unc13 de *C.elegans*) son codificadas por cuatro genes: Munc13-1, Munc13-2, Munc13-3 y Munc13-4. Estos genes codifican las proteínas Munc13-1; las variantes de procesamiento alternativo bMunc13-2 y ubMunc13-2, isoformas asociadas al cerebro y ubicua, respectivamente; Munc13-3; y Munc13-4, que se expresa sólo en células secretoras periféricas (Brose et al., 1995; Koch et al., 2000).

Localización cerebral.

Las isoformas presentes en el sistema nervioso central tienen patrones de expresión diferenciados pero solapantes, aunque en todos los casos asociados a neuronas. Munc13-1 se expresa en todo el cerebro, mostrando mayores niveles de expresión en bulbo olfatorio, estriado, corteza cerebral, hipocampo y cerebelo. Munc13-2 se expresa predominantemente en bulbo olfatorio, corteza cerebral e hipocampo, mientras que Munc13-3 se localiza principalmente en cerebelo, tronco encefálico y en el núcleo del puente del tronco encefálico (Augustin et al, 1999b).

A nivel subcelular las proteínas Munc13 están asociadas a la membrana plasmática de la zona activa ya que, a pesar de no poseer dominios transmembrana, su activación por unión a DAG promueve su translocación a la membrana (Betz et al., 1998; Rhee et al, 2002). Además, las proteínas Munc13 interactúan con fosfolípidos de membrana (Shin et al., 2010) y con proteínas de la zona activa (Fig. 1.2). Se ha demostrado que la interacción con RIM está relacionada con la localización de Munc13 en la membrana plasmática, ya que los ratones KO para distintas la proteína RIM muestran una reducción en los niveles de expresión (Schoch et al., 2002) o un aumento en la solubilidad de Munc13 (Schoch et al., 2002; 2006; Kaeser et al 2008a; Deng et al., 2011).

Estructura.

Las isoformas de Munc13 presentan una región carboxilo terminal, de alta homología, con los dominios funcionales, y una región amino terminal, de muy baja homología, con dominios moduladores (Fig. 1.7. D). Estas proteínas tienen tres dominios C2: C2B, que se une a Ca^{2+} y fosfolípidos de membrana, como PIP y PIP₂; y C2A y C2C, que no unen Ca^{2+} . Además, tienen un dominio C1 de unión a DAG, un dominio de unión a calmodulina (CaMb) y un dominio MUN que es responsable de la función de la proteína (Augustin et al., 1999).

Interacciones.

Munc13-1 forma complejos con diversas proteínas de la matriz de la zona activa por medio de la interacción con su extremo amino terminal: ELKs/CAST (Ohtsuka et al., 2002; Takao-Rikitsu et al., 2004; Wang et al., 2009), Basson y Piccolo (Wang et al., 2009); RIM1 por el dominio C2A (Betz et al., 2001; Duluvoba et al., 2005; Andrews-Zwilling et al., 2006; Wang et al., 2009; Deng et al., 2011) y los VDCC por medio de su dominio C2B (Colloway et al., 2015). Munc13-1 presenta una relación funcional con syntaxina-1 (Betz et al., 1997; Richmond et al., 2001; Basu et al., 2007; Ma et al. 2011), pero, aunque se ha propuesto la interacción directa con esta proteína por medio del dominio MUN (Brose et al., 2000; Stevens et al., 2005), existen controversias (Basu et al., 2005).

Funciones en neurotransmisión

Al igual que las proteínas unc-13/Dunc-13 (Aravamudan et al., 1999; Richmond et al., 1999), las proteínas Munc13 son esenciales para el proceso de neurotransmisión. Así, la ausencia de la proteína Munc13-1 provoca la pérdida de la liberación espontánea e inducida por despolarización en el 90% de las neuronas glutamatérgicas de cultivos autápticos de hipocampo (Augustin et al., 1999). Además, la ausencia combinada de Munc13-1 y Munc13-2 provoca la pérdida completa de estos fenómenos en todas las sinapsis (Varoqueaux et al., 2002). Se ha propuesto también su función como proteína de andamiaje de la zona activa (Wang et al., 2009), aunque su delección no afecta a la expresión de las proteínas de la misma (Varoqueaux et al., 2002).

Preparación de las vesículas sinápticas. Las proteínas Munc13-1 participan en el proceso de apertura de la syntaxina-1, estabilizando su conformación “abierta” (Richmond et al., 2001; Ma et al., 2007), para su participación en la formación del complejo SNARE, necesario para la fusión de las vesículas sinápticas (Fig. 1.3; apartado 1.4.). Además, para llevar a cabo este proceso, la proteína Munc13, por medio de su dominio C2A, debe formar un complejo triple con las proteínas RIM (Betz et al., 2001; Duluvoba et al., 2005; Lu et al., 2006; Deng et al., 2011) y Rab3 (Andrews-Zwilling et al., 2006). La interacción con RIM da lugar la ruptura del dímero autoinhibitorio de Munc13, permitiendo su acción en la preparación de las vesículas sinápticas (Deng et al., 2011).

Inicialmente, se describió la interacción del extremo carboxilo terminal de Munc13 con el amino terminal de syntaxina-1 (Betz et al., 1997), presumiblemente por medio de los dos fragmentos MHD1 y MHD2 del dominio MUN (Brose et al., 2002). Sin embargo, posteriormente se demostró que para llevar a cabo esta función es necesario el dominio MUN completo (Basu et al., 2005), aunque la interacción directa entre el dominio MUN y syntaxina-1 está discutida (Basu et al., 2005; Ma et al., 2007). Los dominios regulatorios de la proteína son también necesarios para su función, ya que el dominio MUN sólo rescata un 50% de la actividad de la proteína completa (Basu et al., 2005). Se ha propuesto que

para la función completa de la proteína es necesaria una región que contiene el dominio MUN y el dominio C2 carboxilo terminal (Stevens et al., 2005).

De acuerdo con su función, la ausencia de Munc13 da lugar a la pérdida del RRP (Augustin et al., 1999; Varoqueaux et al., 2002). Así mismo, los estudios ultraestructurales por fijación a alta presión muestran que la ausencia de las proteínas Munc13-1 y 2 da lugar a la disminución del número de vesículas sinápticas en contacto con la membrana de la zona activa (Siksou et al., 2007; Iming et al., 2014), aunque estos defectos no son apreciables con los métodos de fijación química convencionales (Augustin et al., 1999; Varoqueaux et al., 2002).

Por otra parte, se ha propuesto que Munc13-3 lleva a cabo también estas funciones, actuando de manera completaría a Munc13-1 en cerebelo (Augustin et al., 2001). Sin embargo, otros estudios proponen que Munc13-3 aumenta la eficacia del acoplamiento de la exocitosis a la entrada de Ca^{2+} , pero sin favorecer la preparación de las vesículas sinápticas (Ishiyama et al., 2014).

Plasticidad sináptica. La presencia de distintas isoformas de Munc13 da lugar a diferentes fenómenos de plasticidad a corto plazo (Rosenmund et al., 2002; Breustedt et al., 2010). Así, las sinapsis dependientes de Munc13-1, presentan fenómenos de depresión a corto plazo en respuesta a estimulaciones de alta frecuencia, mientras que las sinapsis dependientes de Munc13-2, en respuesta a los mismos estímulos, muestran fenómenos de potenciación a corto plazo (Breustedt y cols., 2010), que han sido asociados al aumento del RRP y de la probabilidad de liberación por acción de PLC (Rosenmund et al., 2002). Munc13-1 participa en fenómenos de plasticidad a largo plazo (LTP) en las fibras musgosas de hipocampo *in vivo* (Yang y Calakos, 2010).

Las proteínas Munc13 unen **DAG** por medio de su dominio C1 y esto promueve la translocación de la proteína a la membrana plasmática de la zona activa, para llevar a cabo su función. La acción de DAG sobre Munc13 controla el reabastecimiento de vesículas sinápticas para el mantenimiento del RRP (Rhee et al., 2002). Se ha propuesto que, además de preparar las vesículas, disminuye la energía necesaria para su fusión (Basu et al., 2007). Las estimulaciones de alta frecuencia activan las proteínas Munc13, por medio del DAG generado por la PLC, en respuesta a la elevación de Ca^{2+} (Rhee et al., 2002). Así mismo, se ha propuesto que receptores presinápticos pueden activar esta fosfolipasa para mediar mecanismos de potenciación dependientes de Munc13, como el receptor de histamina H_1 en células cromafines (Bauer et al., 2007), el receptor mGlu7 en sinaptosomas cerebrocorticales (Martín et al., 2010) o el receptor CRK-2 del neuropéptido NLP de la unión neuromuscular (Hu et al., 2015). La importancia de estos fenómenos se manifiesta en la letalidad de la mutación que evita la unión de DAG a Munc13 (Rhee et al., 2002).

Además, son muy importantes los fenómenos de plasticidad sináptica por **Ca/CaM** asociados a la modulación de las proteínas Munc13. Las proteínas Munc13-1 y ubMunc13-2 presentan un dominio CaMb, de unión a calmodulina, que permite la unión dependiente de Ca^{2+} de esta proteína (Dimova et al., 2006; 2009; Rodríguez-Castañeda et al., 2009). Esta unión regula el reabastecimiento del RRP dependiente de actividad sináptica y afecta a fenómenos de plasticidad a corto plazo en cultivos autápticos de hipocampo (Junge et al., 2004) y en el cáliz de Held (Lipstein et al., 2013). La interacción del complejo Munc13-Ca/CaM se da por medio de dos módulos independientes, existiendo una activación bifásica de la proteína Munc13. Por un lado, un estado de activación parcial, con 2 Ca^{2+} unidos al dominio carboxilo terminal de CaM e interaccionando con uno de los módulos de Munc13. Por otro lado, un estado de activación completa, con cuatro Ca^{2+} , dos Ca^{2+} en los dominios carboxilo y otros dos en los dominios amino terminal de CaM, e interaccionando con los dos módulos de Munc13 respectivamente. El complejo Munc13-Ca/CaM es un eficiente sensor de Ca^{2+} , ya que la concentración citosólica de este ión promueve el paso rápido de un estado a otro (Rodríguez-Castañeda et al., 2009). Además, se ha demostrado que las proteínas bMunc13-2 y Munc13-3 pueden unir calmodulina por medio de otras secuencias, para llevar a cabo funciones similares (Lipstein et al., 2012).

Por último, también se ha descrito la unión de **Ca^{2+} y fosfolípidos de membrana** (PIP y PIP_2) al dominio C2B de Munc13. Aunque esta unión no parece tener efectos en la liberación inducida, ni en la preparación basal de las vesículas sinápticas, sí afecta a fenómenos de plasticidad sináptica a corto plazo (Shin et al., 2010).

Por lo tanto, las proteínas Munc13 tiene un papel muy importante en los fenómenos de plasticidad a corto plazo, siendo reguladas por DAG, Ca/CaM, y Ca/fosfolípidos. Es posible que estos mecanismos integren conjuntamente la modulación de Munc13, ya que se ha demostrado que puede existir una oclusión entre los mismos (Shin et al., 2010). Estas tres formas de regulación son directa o indirectamente dependientes de Ca^{2+} , pudiendo ser moduladas, por tanto, por la actividad sináptica. Además, la actividad de PLC y generación de DAG, puede ser regulada por GPCR presinápticos, de acuerdo a la modulación de Munc13 propuesta para algunos de estos receptores (Bauer et al., 2007, Martín et al., 2010, Hu et al., 2015).

Modulación de los VDCC. Recientemente se ha descrito que la proteína Munc13 aumenta la entrada de Ca^{2+} por los VDCC, regulando las propiedades cinéticas de estos canales y permitiendo su recuperación después de trenes de estimulación de alta frecuencia (Collaway et al., 2015).

II. OBJETIVOS

Los receptores mGlu7 inhiben la liberación de glutamato por medio de la modulación de los VDCC (Millán et al., 2002). Sin embargo, se ha observado que la activación prolongada de los receptores mGlu7 induce también la potenciación de la liberación de glutamato en sinaptosomas de corteza cerebral. Esta vía de señalización implica la activación de PLC, para generar DAG y translocar la proteína Munc13-1 a la membrana de la zona activa (Martín et al., 2010). Por otra parte, los receptores mGlu7 también inhiben la generación de cAMP (Millán et al., 2002). Además, se ha propuesto que los receptores mGlu7 controlan mecanismos de potenciación de la liberación de glutamato dependientes de cAMP, por medio de su interacción con la proteína de la zona activa RIM1 α (Pelkey et al., 2008). Dado que Munc13-1 y RIM1 α son proteínas de la maquinaria excitotónica, que actúan conjuntamente en el proceso de preparación de las SVs para su liberación (Deng et al., 2011), es posible que los receptores mGlu7 puedan modular mecanismos de plasticidad presináptica relacionados con estas proteínas.

Por lo tanto, los objetivos concretos de esta Tesis Doctoral fueron:

1. Ampliar el estudio de la potenciación por los receptores mGlu7, obteniendo evidencias adicionales de la implicación de la proteína Munc13-1 y estudiando este mecanismo en cultivos primarios de neuronas.
2. Estudiar el desarrollo de la potenciación por los receptores mGlu7 en hipocampo y su relación con los terminales presinápticos que expresan VDCC de tipo N.
3. Conocer las vías de vías de señalización dependientes de cAMP que potencian la liberación de glutamato modulando la maquinaria excitotónica.
4. Determinar la relación de los receptores mGlu7 con las vías de señalización dependientes de cAMP que potencian la liberación de glutamato modulando la maquinaria excitotónica.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. MATERIALES

1.1. Material biológico

Las preparaciones de sinaptosomas y las rodajas de tejido cerebral se obtuvieron a partir de ratones (*Mus musculus*) adultos (2-5 meses aproximadamente) de ambos sexos indistintamente. Los cultivos primarios de neuronas corticales y los cultivos autópticos de neuronas hipocampales, así como los astrocitos corticales empleados para estos últimos, fueron obtenidos a partir de ratones recién nacidos (día 1 postnatal, P1) sin realizar distinción por sexos. Se utilizaron ratones de genotipo salvaje o WT (*wild type*) de la cepa C57BL/6N, así como ratones mutantes para la expresión de distintas proteínas con el fondo genético C57BL/6N: ratones carentes de la subunidad $\alpha 1B$ de los canales de calcio VDCC de tipo N (Ino *et al.*, 2001), cedidos por el Dr. Mori Y. (Instituto Nacional de las Ciencias Fisiológicas de Myodaiji, Okazaki, Japón); ratones carentes de la proteína RIM1 α (Schoch *et al.*, 2002), cedidos por la Dra. Schoch S. (Instituto de Neuropatología de la Universidad de Bonn, Alemania); y ratones mutantes para la unión a DAG a la proteína Munc13-1 (mutación H567K; Rhee *et al.*, 2002) cedidos por el Dr. Brose N. (Instituto Max Planck de Medicina Experimental, Gottingen, Alemania).

Los animales WT fueron criados en el animalario de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense a partir de parejas WT compradas a Harlan Sprague Dawley Inc. (Gannat, Francia), comprados al animalario de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid, o criados en el animalario del Instituto Max Planck de Medicina Experimental. Los ratones mutantes fueron criados en el animalario de la Facultad de Medicina o en el Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria de la Universidad Complutense a partir de parejas de ratones heterocigotos para el gen mutado. Estos ratones mutantes fueron identificados empleando chapas numeradas de oreja (*ear tags*) o chips intradérmicos, y genotipados a partir de muestras de tejido de la oreja.

El manejo de todos los animales empleados en la realización de este trabajo de investigación se llevó a cabo siguiendo las recomendaciones éticas para la experimentación con animales y las regulaciones establecidas por la directiva del consejo europeo (86/609/EEC), aprobadas por el comité ético de la Universidad Complutense de Madrid.

1.2. Reactivos y aparatos

Los reactivos (Tabla 3.1), fármacos (Tabla 3.2), anticuerpos (Tabla 3.3), medios (Tabla 3.4) y aparatos (Tabla 3.4) empleados en la realización de este trabajo figuran recogidos en las siguientes tablas.

Tabla 3.1. Reactivos y materiales

REACTIVO / MATERIAL	CASA COMERCIAL	REFERENCIA
Co-inmunoprecipitación		
Kit True Blot Conejo con IP <i>Beads</i>	Rockland	03988-1688-31
Proteína A-Agarosa	Sigma	P7786
DTT	Sigma	D0632
Cultivo bacteriano		
Ampicilina, sal de sodio	Sigma	A9518
Kit maxiprep: EndoFree Plasmid Maxi Kit (10)	Quiagen	12362
Kit miniprep: High Pure Plasmid Isolation Kit	Roche	1 754 785
Medio LB	Sigma	L3152
Cultivo celular		
Papain Dissociation System (Papaína, ovomucoide, DNAasa)	Worthington	LK003160
Neurobasal-A Medium (1X)	Gibco, Life Technologies	10888-022
B27 suplemento (50X)	Gibco, Life Technologies	17504-044
Antibiótico-antimicótico (100X)	Gibco, Life Technologies	15240-062
EBSS (Earle´s Balanced Salt Solution)	Sigma	E6267
GlutaMAX- I CTS (50X)	Gibco, Life Technologies	A12860-01
Poli-L-Lisina (MW 70k-150k)	Sigma	P4707
Amaxa Rat Nucleofector Kit (Nucleofector, cubetas)	Lonza	VPG-1003
Placas cultivo de tejido 6 pocillos	Falcon	353046
Filtros Acrodisc 32mm con membrana Supor 0.2µm	Pall Corporation	4642
Determinación de segundos mensajeros		
Kit IP-One kit - 1,000 tests	Cisbio	62P1APEB
Kit cAMP dynamic 2 kit - 1,000 tests	Cisbio	62AM4PEB
LiCl	Calbiochem	438002
Electroforesis e inmunotransferencia		
Acrilamida/Bisacrilamida 30%, 29:1	BioRad	161-0156
Reactivo Bradford	BioRad	500-0006
Membranas de nitrocelulosa 0.2µM poro, 7.0x8.5cm	BioRad	162-0146
Patrones Precision Plus Protein All Blue (250-10 kDa)	BioRad	161-0373
Patrones de BSA 2mg/ml	Pierce	23209
Kit inhibición proteasas 100X con EDTA 100X (0.5M)	Thermo-Scientific	78410
RIPA (Pierce)	Thermo-Scientific	89900
Odyssey Blocking Buffer	Li-Cor	927-40000
2-mercaptoetanol	BioRad	161-0710
Supersignal West Pico Sustrato Quimioluminiscencia	Pierce	11786416
Persulfato de amonio	BioRad	161-0700
TEMED	BioRad	161-0800
Glicina	Sigma	G7126
Azul de bromofenol	BioRad	161-0404
Genotipado		
Wizard SV Genomic Purification System	Promega	A2361
dNTPs (PCR Nucleotide Mix 10mM)	Promega	C1141
Go Taq G2 FlexiPol, 5u/ul, 500U	Promega	M780B

0849: 5´-CAGCCTGTTCTTCCCCTCTGTCTTG-3´	Sigma	-
1302: 5´-GTCCGAGACTCCCGCGTTACATAC-3´	Sigma	-
NP6: 5´-TGGCACCTTATGCCTTGACGGTGCCTGCG-3´	Sigma	-
NP8: 5´-GGTCGAGATGGCTTGCGGGACCGTTGGGA-3´	Sigma	-
AGN2: 5´-GCCTGCTTGCCGAATATCATGGTGAAAAAT-3´	Sigma	-
1774: 5´-GGGAGGCAGAGCATCATGAGAGACTG-3´	Sigma	-
1773: 5´-GCTTCACTTGCGGCT GCATATCTCAC-3´	Sigma	-
1808: 5´-CAACTGTGGCTGTGCACACTTGCCG-3´	Sigma	-
676: 5´-GAGCGCGCGCGGCGGAGTTGTTGAC-3´	Sigma	-
Patrones de 100kb Real Escala 2	Real Laboratory	RBMM2
SYBR Safe 10000X	Invitrogen	S33102
Agarosa	Sigma	A9539
Imagen con vGlut1-pHluorina		
Portaobjetos circulares d= 15 mm	Thermo-Scientific	15mm#1
Portaobjetos circulares d=25 mm	Thermo-Scientific	25mm#1
Inmunofluorescencia		
Prolong Gold Antifade con/sin DAPI	Invitrogen	P36935/P36934
Paraformaldehido	Sigma	158012-7
Tissue-Tek OCT	Sakura	4583
Suero cabra (NGS)	Jackson InmunoR	005-000-001
Suero burro (NDS)	Jackson InmunoR	017-000-121
Portaobjetos rectangulares 76x26x1mm	LíneaLab	-
Portaobjetos rectangulares polilisinados 75x25x1mm	Thermo-Scientific	J2800AMNZ
Heparina	Sigma	H3393
Liberación glutamato		
Ionomicina	Calbiochem	407942
Adenosina desaminasa (ADA)	Roche	10102105001
BSA (abúmina de suero bovino), libre de ácidos grasos	Sigma	A6003
Glutamato (ácido L-glutámico)	Sigma	G1626
EGTA	Sigma	E4378
Glutamato dehidrogenasa (GDH)	Sigma	G2626
NADP	Sigma/Calbiochem	05050M/481972
Microscopía electrónica		
Glutaraldehido 25% Grado I	Sigma	G5882
OsO ₄	Electron Microscopy Sci	19172
K ₃ Fe(CN) ₆	Merk	1049840100
Kit SPURR embedding (Low Viscosity Medium)	TAAB	S024/D
Preparación sinaptomasas		
Percoll	GE Healthcare	17-0891-02
EDTA	Merk	1.08418.0250

Tabla 3.2. Fármacos

FÁRMACO	CASA COMERCIAL	REFERENCIA	EFEECTO
Bloqueantes de canales iónicos			
ConoTx , ω -Conotoxina-GVIA	PeptaNova/Alomone	4161-V/C-300	Bloqueante canales calcio de tipo N
AgaTx , ω -Agatoxina-IVA	PeptaNova/Alomone	4256-S/RTA-500	Bloqueante canales calcio de tipo P/Q
TTx , Tetrodotoxina	Alomone/Abcam	T-500/120054	Bloqueante canales sodio
ZD7288	Tocris	1000	Bloqueante canales HCN
Agonistas y antagonistas receptores			
Isoproterenol , (-) hidrocloreuro	Sigma	I6504	Agonista receptores β -adrenérgicos
Propranolol , (S)-(-) hidrocloreuro	Sigma	P8688	Antagonista receptores β -adrenérgicos
L-AP4 , Ácido L-(+)-2-amino-4-fosfonobutírico	Tocris/Abcam	0103 / ab120002	Agonista receptores mGlu del grupo III
MPIP	Tocris	2963	Antagonista receptores mGlu7
Vía de señalización cAMP			
8-pCPT , 8-pCPT-2-O'-Me-cAMP-AM	Biolog	C041	Activador específico Epac
Sp-8CPT , Sp-8-pCPT-2-O'-Me-cAMP-AM,	Biolog	C052	Activador específico Epac no hidrolizable
Sp-8Br , Sp-8-Br-cAMPS	Biolog	B002	Análogo cAMP no específico de diana
N6-Bnz-cAMP	Biolog	B009	Activador específico PKA
Forscolina <i>Coleus forskohlii</i>	Calbiochem	344270	Activador adenilato ciclasa
IBMX , 3-isobutil-1-metilxantina	Calbiochem	410957	Inhibidor fosfodiesterasas de cAMP
Brefeldina A , (+)-, <i>Eupenicillium brefeldianum</i>	Calbiochem	293729	Inhibidor dominios GEF
ESI-05 , 4- Metilfenil- 2, 4, 6- trimetilfenilsulfona	Biolog	M092	Inhibidor específico Epac2
H-89	Calbiochem	371963	Inhibidor PKA
Vía de señalización diacilglicerol			
RHC80267	Sigma	R-2028	Inhibidor diacilglicerol lipasa
DAG quinasa inh II	Calbiochem	266788	Inhibidor diacilglicerol quinasa
Calfostina C	Calbiochem	208725	Inhibidor dominios unión a diacilglicerol
Bisindolilmaleimida I	Calbiochem	203291	Inhibidor dominio unión de ATP de PKC
U73122	Calbiochem	662035	Inhibidor fosfolipasa C
U73343	Calbiochem	662041	Análogo inactivo del U73122
PDBU , Forbol 12,13-dibutirato	Sigma	P1269	Análogo de diacilglicerol
Otros			
PTX , Toxina pertúsica <i>Bordetella pertussis</i>	Calbiochem	516561	Inhibidor proteínas G de tipo Gi/o
Bafilomicina A1	Abcam	120497	Inhibidor bomba de protones vacuolar
Calmidazolium	Calbiochem	208665	Inhibidor calmodulina

Tabla 3.3. Anticuerpos

ANTICUERPO	CASA COMERCIAL	REFERENCIA
α 1A VDCC tipo P/Q Cabra (D-20)	Santa Cruz	sc-16227
α 1B VDCC tipo N Cabra (C-19)	Santa Cruz	sc-32987
Alexa Fluor de burro 594 anti-Conejo	Invitrogen	A-21207
Alexa Fluor de burro 488 anti-Conejo	Invitrogen	A-21206
Alexa Fluor de burro 488 anti-Ratón	Invitrogen	A-21202
Alexa Fluor de burro 594 anti-Ratón	Invitrogen	A-21203
β ₁ -adrenoreceptor Cabra	Sigma	SAB2500034
β ₁ -adrenoreceptor Conejo (V-19)	Santa Cruz	sc-568
β -Tubulina Ratón	Sigma	T0198
cAMP-d2	Cisbio	62AM4PEB
cAMP-criptato	Cisbio	62AM4PEB
Flag Conejo	Sigma/GenScript	F7425/A00170-40
Flag Ratón	Sigma/GenScript	F3165/A00187-100
GAD65 Conejo	Synaptic Systems	198103
Ig de cabra anti-Conejo Ig(H+L) HRP	ThermoFisher	31460
Ig de cabra anti-Ratón Ig(H+L) HRP	ThermoFisher	31431
IP ₁ -d2	Cisbio	62P1APEB
IP ₁ -criptato	Cisbio	62P1APEB
IRDye680RD Ig (H+L) de Cabra anti-Ratón	Li-Cor	925-68070
IRDye800CW Ig (H+L) de Cabra anti-Conejo	Li-Cor	926-32211
mCherry Cabra	SicGen, Acris Ab	AB0040-20
mGlu7a Cobaya	Cedido por R.Shigemoto	
mGlu7a Conejo	Upstate, Millipore	07-239
Munc13-1 Conejo	Synaptic Systems	126103
Munc13-1 Ratón	Synaptic Systems	126111
Rab3a Ratón	Synaptic Systems	107111
RIM1 Conejo	Synaptic Systems	140003
Sinaptofisina Conejo	Synaptic Systems	101002
Sinaptofisina Ratón	Synaptic Systems	101011
True Blot anti-Conejo	Rockland	03988-1688-31

Tabla 3.4. Medios	
MEDIO	COMPOSICIÓN
Base+	NaCl 140mM, KCl 2.4mM, Hepes 10mM, D(+)-glucosa 10mM, CaCl ₂ 4mM, MgCl ₂ 4mM; pH 7.4; 320 mOsm.
Digestión tejido	Buffer lisis núcleos kit con EDTA 100mM, pH 8.0, RNAasa A 182µg/ml, Proteinasa K 1.46mg/ml.
Electroforesis	Tris 25 mM, glicina 1.5% (p/v), SDS 0.1% (p/v); pH 8.3.
Estimulación kit cAMP	Tampón fosfato 50 mM, BSA 0.2 % (p/v), NaN ₃ 0,02 % (p/v) ; pH 7,0..
Estimulación kit IP₁	HEPES 10 mM, CaCl ₂ 1mM, MgCl ₂ 0.5 mM, KCl 4.2 mM, NaCl 146 mM, D(+)-glucosa 5.5 mM, LiCl 50 mM; pH 7,4.
FBS	10% FBS inactivado por calor, 0.01% suero MITO, 0.2% penicilina/streptomcina en DMEM-GlutaMax.
HBM	NaCl 140 mM, KCl 5 mM, NaHCO ₃ 5 mM, NaH ₂ PO ₄ 1.2 mM, MgCl ₂ 1 mM, D(+)-glucosa 10 mM, HEPES 10 mM; pH 7.4.
HBM - NH₄Cl	NaCl 90 mM, KCl 5 mM, NaHCO ₃ 5 mM, NaH ₂ PO ₄ 1.2 mM, MgCl ₂ 1 mM, D(+)-glucosa 10 mM, HEPES 10 mM, NH ₄ Cl 50mM ; pH 7.4.
Hipo-osmótico	Tris-HCl 8.3 mM; pH 7.0, inhibidor de proteasas 1X.
HMB - BSA	HMB con BSA libre de ácidos grasos 16 µM.
Intracelular pipeta	KCl 136mM, Hepes 17.8mM, EGTA 1mM, ATP/GTP; pH 7.4; 320 mOsm.
Laemlli	SDS 2% (p/v), glicerol 10 % (v/v), Tris-HCl 62mM, β-mercaptoetanol 5%; azul de bromofenol 0.002% (p/v); pH 6,8
Lisis kit cAMP	HEPES 50 mM; KF 1 M, Triton X-100 1.25 % (v/v); pH 7,0.
Lisis kit IP₁	HEPES 50 mM; KF 0.8 M, BSA 0.2% (p/v), Triton X-100 1 % (v/v); pH 7,0.
Milloning	NaH ₂ PO ₄ 2.26% , NaOH 2.25 % (p/v), pH 7.3.
Ovomucoide-BSA	Ovomucide-BSA 1mg/ml, 64U/ml DNAasa, 2.4mM CaCl ₂ /MgCl ₂ en EBSS.
Papaína	12U/ml papaína, 72 U/ml DNAasa, 2.4mM CaCl ₂ /MgCl ₂ en EBSS.
PBS 1X	PO ₄ ³⁻ 0.1M , 137mM NaCl, 2.7mM NaCl ; pH 7.4).
Percoles	3, 10 y 23% en sacarosa 0,32 M, EDTA 1 mM y DTT 0,25 mM, pH 7,4.
Reactivo Biuret	CuSO ₄ 1,6 % (p/v), KNaC ₄ H ₄ O ₆ (tartrato de sodio y potasio) 6,0 % (p/v), NaOH 3,0 % (p/v).
Resina SPURR	ERLD 4221D 10g, DER 736 6g, NSA 26g, DMAE (S1) 0.4ml.
RIPA	Triton X-100 1%, desoxicolato sódico 0.5% , SDS 0.2 % , NaCl 100 mM, EDTA 1mM, Tris-HCl 50 mM, inh. proteasas 1X; pH 7,4.
Solución inactivación papaína	2.5mg/ml albúmina, 2.5mg/ml inactivador de papaína, 10% FBS inactivado por calor en DMEM.
Sustrato adherente	Ácido acético 10mM, colágeno 0.2mg/ ml, poli-D-lisina 0.1mg/ml.
TAE 1X	Tris 40mM, 20mM acetato, 1mM EDTA, pH 8.3.
Tail (digestión tejido)	SDS 0.1% (p/v), NaCl 200mM, Tris 20mM, EDTA 2.5, proteinasa K 1mg/ml, pH 8.
TBS	Tris-HCl 50 mM, NaCl 0.9 % (p/v), pH 7.4..
Transferencia	Tris 25 mM, glicina 1.5% (p/v), metanol 20%; pH 8.3.

Tabla 3.5. Equipos y aparatos	
EQUIPO	CASA COMERCIAL
Co-inmunoprecipitación	
Agitador orbital tipo noria (12rpm)	JP Selecta
Cultivo celular	
Amaza Nucleofector II	Amaza Biosystems
Centrifuga refrigerada CR4.12	Jouan
Fuente de luz fría Highlight 3100	Olympus
Lupa binocular SZ40	Olympus
Microscopio óptico B-180	Optika
Cabina de flujo laminar vertical PV-30/70	Telstar
Incubador HERAcell 150i	Thermo Fisher Scientific
Agitador orbital WY-100	Comecta
Baño de agua Precistern	JP Selecta
Cámara de Neubauer	Brand
Determinación segundos mensajeros	
Lector de placas FLUOStar Omega	BMG LabTech
Electrofisiología	
Microscopio invertido Axiovert135	Zeiss
Puller P-97	Sutter Instrument
Amplificador EPC9	HEKA
Interfaz TIB14S	HEKA
Sistema de perfusión rápido SF-77B	Warner Instruments
Electroforesis e inmunotransferencia	
Mini-Protean Tetra Cell	Bio-Rad
Odyssey	Li-Cor Biosciences
Sistema de imagen LAS-3000	Fujifilm Life Science
Agitador Gyrotwister	Labnet
Genotipado	
Sistema electroforesis geles agarosa Hoefer miniVe	Pharmacia Biotech
Termociclador Mastercycler personal	Eppendorf
Fuente alimentación EPS 601	Amersham Pharmacia
Ear tags (chapas numeradas de oreja)	Harvard Apparatus
Chips intradérmicos ID-100/162, Lector pocket LD560, Inyector IM-200	Trovan
Fluor S Multimager	BioRad
Imagen con vGlut1-pHuorina	
Plataforma PH5 termostatizada con anillo CR15 para cámara de perfusión RC20	Warner Instruments
Adaptador de pletina SA-NIK para cámara de perfusión RC20/RC21BRFS	Warner Instruments
Sistema de perfusión de válvulas para 6 canales VC6	Warner Instruments
Termostato para sistema de perfusión TC-344B	Warner Instruments
Cámara de perfusión RC20 para cubreobjetos de 15mm	Warner Instruments
Unidad de aislamiento ISU	Cibertec
Estimulador eléctrico CS-20	Cibertec
Objetivo inmersión Nikon CFI plan Apo VC 60x (apertura numérica de 1.4)	Nikon
Microscopio Nikon Eclipse TE-2000S con cámara CCD iXonEM+DU885	Nikon/Andor
Estufa Prebatem	JP Selecta

Cámara de perfusión RC-21BRFS con electrodos para cubreobjetos de 25mm	Warner Instruments
Plataforma PM2 termostatzada para cámara de perfusión RC-21BRFS	Warner Instruments
Monocromador con lámpara de xenon Monokromator 1	Kinetic Imaging
Inmunofluorescencia	
Microscópio Nikon Diaphot TE2000 con cámara CCD Hamamatsu C4880	Nikon/Hamamatsu Photonics
Lámpara de mercurio de alta presión HB-10101AF	Nikon
Objetivo de inmersión Nikon 100X	Nikon
Criostato CM1850	Leica
Microscopio confocal SP-2 AOBS con una cámara DFC 350 FX	Leica
Microscopio confocal Olympus FV 1200	Leica
Liberación de glutamato	
Fluorímetros LS-50B y LS-55	Perkin-Elmer
Baño termostatzado Digiterm 100	JP Selecta
Cubetas ST-9012	Starna
Microscopía electrónica	
Microscopio electrónico de transmisión JEM 1010	JEOL
Ultramicrotomo ultracut E	Leica
Preparación sinaptosomas	
Centrifuga preparativa RC-5B y RC-5C	Sorvall
Rotor SS-34	Sorvall
Rotor SM-24	Sorvall
Bomba peristáltica PumpDrive 5201	Heidolph
Homogeneizador Potter S	B. Braun
Bomba de succión A-3S	Eyela
Translocación de Munc13	
Ultracentrifuga L8-70M	Beckman
Rotor tipo 50.4	Beckman
Varios	
Microfuga Biofuge pico (r=8.5cm)	Heraeus
Espectrofotómetro Pharmacia Ultrospec III	Pegasus Scientific Inc.
Agitador magnético Agimatic-E	JP Selecta
Autoclave Autester ST Dry PV II	JP Selecta
pHmetro Basic20 con electrodo 5201	Crison
Equipos de agua destilada Elix y ultrapura Milli-Q A10	Millipore

2. MÉTODOS

2.1. PREPARACIÓN DE SINAPTOSOMAS.

Los sinaptosomas son botones presinápticos que resellan su membrana plasmática espontáneamente en el proceso de homogeneización del tejido cerebral, pudiendo ser purificados mediante gradientes de densidad (Dunkley et al., 1986). Al microscopio electrónico, los sinaptosomas son sáculos citoplásmicos esferoidales, de un diámetro aproximado de 0,5-1,5 μ m, que contienen una o más mitocondrias y gran cantidad de vesículas sinápticas (Fig. 3.1.B). Por lo tanto, los sinaptosomas permiten el estudio de fenómenos presinápticos minimizando las interferencias postsinápticas. Además, la maquinaria proteica de transducción de señales aislada en los sinaptosomas se corresponde con la presente en los terminales presinápticos nativos del tejido cerebral. En base a estas características, este modelo permite estudiar las vías de transducción de señales mediadas por los receptores presinápticos.

Los sinaptosomas pueden operar de forma autónoma, salvo en lo que se refiere al recambio de proteínas y componentes de la membrana. Esta autonomía funcional engloba aspectos energéticos, ya que contienen mitocondrias funcionales que permiten realizar la glucólisis aeróbica durante varias horas (Kauppinen y Nicholls, 1986), así como procesos presinápticos de neurotransmisión, pudiendo realizar la captación, síntesis, almacenamiento y exocitosis de neurotransmisores (Nicholls, 1989).

Los sinaptosomas se purificaron en gradientes discontinuos de Percoll de acuerdo con la técnica descrita por Dunkley *et al.*, 1986; y Wang *et al.*, 1989. Todas las centrifugaciones y los medios empleados se mantuvieron a 4°C, y los extractos biológicos que contenían los sinaptosomas fueron preservados en hielo en todas las etapas del proceso. Los ratones adultos (2-5 meses) fueron sacrificados por dislocación cervical y posterior decapitación. El cerebro fue extraído y lavado en sacarosa 0,32 M, pH 7.4, para, a continuación, realizar la disección de las cortezas cerebrales. Las cortezas diseccionadas se mantuvieron en sacarosa 0,32 M, pH 7.4, hasta completar la disección de todas las cortezas de los animales empleados para la preparación (de 3 a 5 ratones). A continuación, se homogenizaron todas las cortezas extraídas, realizando 7 pases completos a 700 rpm empleando un homogenizador modelo Potter con vástago de teflón. El homogeneizado resultante se centrifugó (2000g, 2min), recogiéndose el sobrenadante (S1a) y descartándose el precipitado (P1a) que contenía núcleos y restos celulares (Dunkley *et al.*, 2008). El precipitado se resuspendió de nuevo en sacarosa 0,32 M, pH 7,4, volviéndose a centrifugar (2000g, 2 min) para obtener de nuevo el sobrenadante (S1b) y

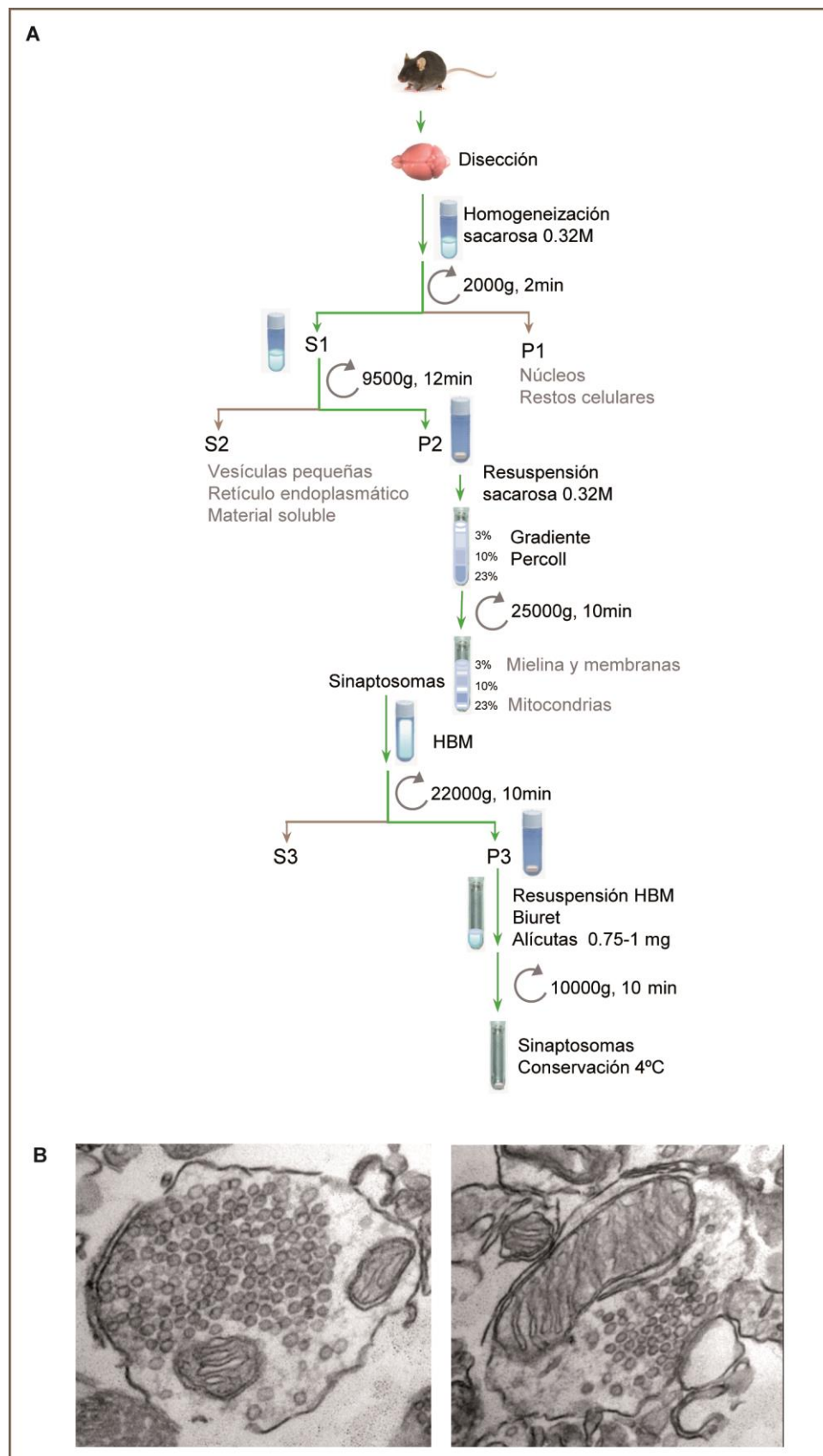


Figura 3.1. Preparación de sinaptosomas. (A) Esquema del proceso de preparación y purificación de los sinaptosomas. (B) Imágenes de microscopía electrónica de transmisión de sinaptosomas purificados siguiendo el protocolo descrito.

descartando el precipitado (P1b). A continuación, ambos sobrenadantes S1 se centrifugaron (9500g, 12min). Los precipitados resultantes (P2) fueron resuspendidos conjuntamente en sacarosa 0,32 M, pH 7,4 (aproximadamente 1-1.5 ml por cada par de cortezas cerebrales), descartándose los sobrenadantes (S2) que contenían vesículas de pequeño tamaño, material soluble y retículo endoplasmático (Dunkley *et al.*, 2008). Esta suspensión fue depositada sobre gradientes discontinuos de concentraciones crecientes de Percoll de 3, 10 y 23% (en sacarosa 0,32 M, EDTA 1 mM y DTT 0,25 mM, pH 7,4; aproximadamente 3ml de cada concentración de Percoll), formados empleando una bomba peristáltica. Se utilizó aproximadamente un gradiente por cada 2ml de suspensión de sinaptosomas. Los gradientes se centrifugaron (25000g, 10min), recogiendo a continuación los sinaptosomas purificados de la interfase formada entre las bandas de Percoll al 10 y al 23 %, y descartándose las suspensiones correspondientes a mielina, membranas plasmáticas, vesículas membranosas y mitocondrias extrasinaptosomales (Dunkley *et al.*, 2008). Los sinaptosomas purificados se diluyeron en HBM hasta un volumen final de 50ml, centrifugándolos (22000g, 10min) a continuación. El sobrenadante (S3) se descartó y el precipitado (P3) resultante se resuspendió en HBM (0.5-1ml). La concentración de proteínas de esta suspensión se determinó por el método de Biuret, empleando un estándar interno de BSA (0.4mg/ml). Las alícuotas correspondientes a 0.75-2mg de proteína se diluyeron con 2ml de HBM adicionales y se centrifugaron (10000g, 10min). El sobrenadante se decantó y los sinaptosomas obtenidos fueron mantenidos a 4°C hasta su uso posterior por un máximo de 4 horas. En ningún caso los sinaptosomas empleados para estudios funcionales fueron congelados ni almacenados. El protocolo de la preparación de sinaptosomas se muestra esquematizado en la Fig. 3.1.A.

2.2.LIBERACIÓN DE GLUTAMATO

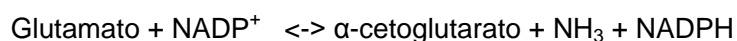
Los sinaptosomas poseen toda la maquinaria proteica necesaria para acoplar la despolarización de la membrana plasmática a la entrada de Ca^{2+} y a la subsiguiente liberación de neurotransmisores. Sin embargo, obviamente, los sinaptosomas no pueden recibir potenciales de acción a través del axón como lo terminales presinápticos de las neuronas, ni pueden ser estimulados por técnicas de electrofisiología debido a su pequeño tamaño. A pesar de ello, es posible recurrir a procedimientos químicos para inducir su despolarización.

Los sinaptosomas se despolarizan en respuesta al incremento de la concentración extracelular de K^+ (Scott y Nicholls, 1980), con la consiguiente apertura de los VDCC y la inducción de la liberación de neurotransmisores (Tibbs *et al.*, 1989). La despolarización con altas concentraciones de K^+ (30mM) sólo permite estudiar modulaciones de la liberación mediadas por los VDCC, pero no por los canales de Na^+ y K^+ dependientes de

voltaje, mientras que, en el caso de la despolarización por bajas concentraciones de K^+ (5-10mM), todos estos canales participan en la liberación de neurotransmisor. La despolarización prolongada con K^+ también induce la liberación de neurotransmisor independiente de Ca^{2+} y de ATP, debida a la reversión de los transportadores de glutamato acoplados al gradiente electroquímico de Na^+ , de carácter electrogénico (Nicholls et al., 1987; Sánchez-Prieto et al., 1987). Por lo tanto, es necesario distinguir esta liberación Ca^{2+} independiente, que ocurre igualmente en ausencia de Ca^{2+} , frente a la exocitosis vesicular inducida por despolarización dependiente de Ca^{2+} .

El ionóforo de calcio ionomicina también puede inducir la liberación de neurotransmisor. La ionomicina se inserta en la membrana plasmática formando poros, por los que el Ca^{2+} extracelular alcanza la maquinaria exocitótica, provocando así una liberación independiente de la actividad de los VDCC y, por lo tanto, de sus mecanismos de modulación (McMahon y Nicholls, 1991).

El glutamato liberado por los sinaptosomas se determinó según la técnica descrita por Nicholls et al., 1987, haciendo uso de la reacción catalizada por el enzima glutamato deshidrogenasa (GDH) en presencia de $NADP^+$:



De esta manera, se puede monitorizar el incremento de fluorescencia correspondiente a la generación de NADPH, de acuerdo a su excitación a 340 y correspondiente emisión a 460nm nm, y por medio de la adición de un estándar interno de glutamato, cuantificar la liberación de glutamato de los sinaptosomas (Fig.3.2.B).

Los sinaptosomas obtenidos de la corteza cerebral (apartado 2.1) de ratones adultos (0.75mg) se resuspendieron en HBM-BSA, 37°C (0.67 mg/ml). Los sinaptosomas se mantuvieron en agitación a 37°C durante una hora y se trataron con adenosina desaminasa (ADA, 1.7 U/mg, 30minutos), para eliminar la adenosina, convirtiéndola en inosina. La adenosina, procedente del metabolismo del ATP de las neuronas y de las células de glia, se genera en el medio extracelular en los procesos de obtención y manipulación de sinaptosomas. Se ha demostrado que la activación de receptores A1 por adenosina inhibe la liberación de neurotransmisores (Ladera et al., 2007). Por lo tanto, el tratamiento de los sinaptosomas con ADA asegura la ausencia de una inhibición tónica por acción de la adenosina presente en el medio extracelular. Además, durante la incubación se trataron los sinaptosomas con distintos fármacos, de acuerdo a los experimentos correspondientes (Figura 3.2.A). Después de la hora de incubación, los sinaptosomas se lavaron (16000g, 30s), retirando los fármacos del medio. A continuación, se resuspendieron en HBM-BSA, 37°C (0.67 mg/ml), trasvasando 0.67mg a una cubeta de plástico (1x1cm de base) con agitador magnético, que contenía $NADP^+$ 1mM y $CaCl_2$ 1.33mM. Para determinar la liberación de glutamato Ca^{2+} independiente inducida por la

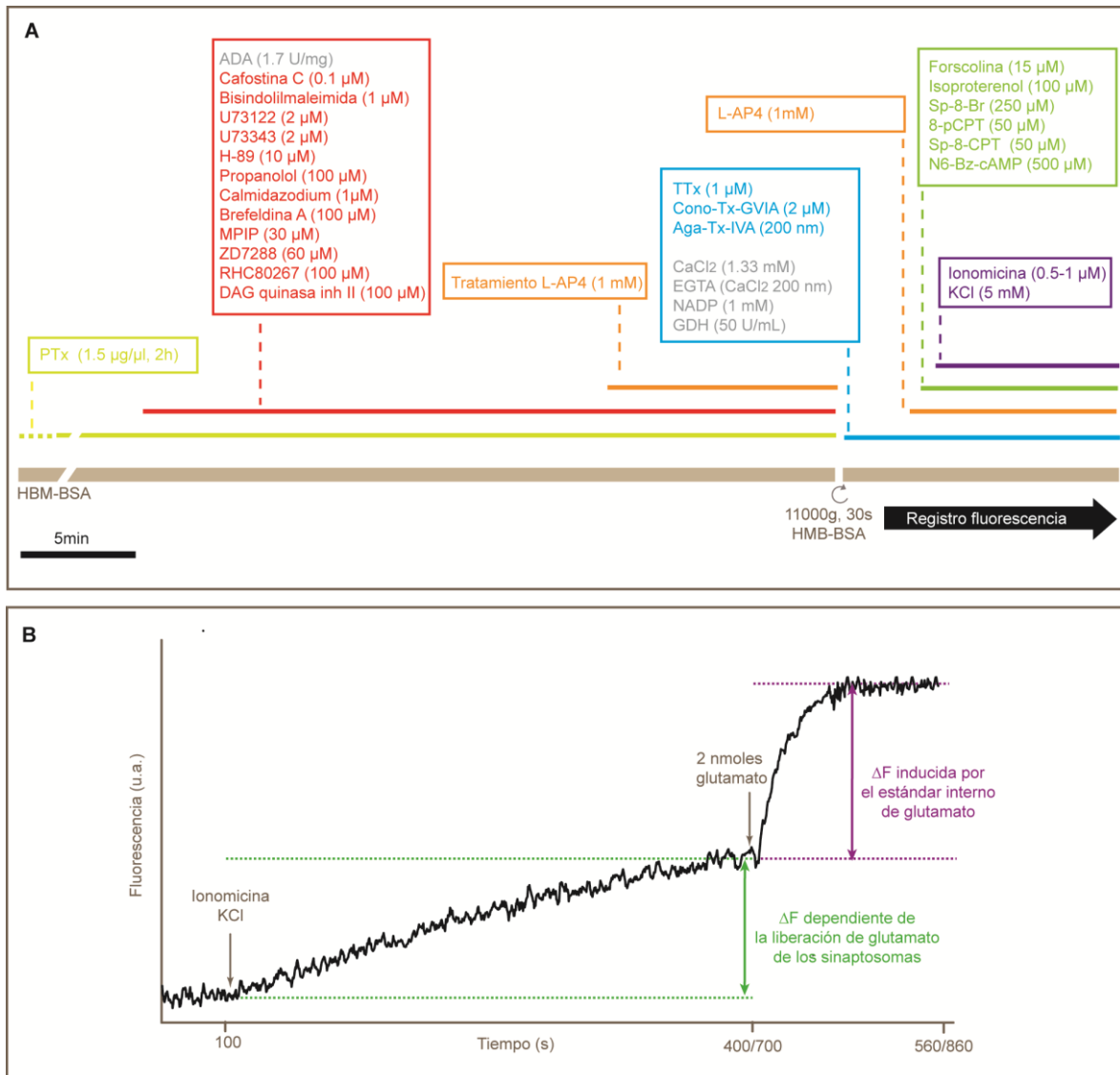


Figura 3.2. Liberación de glutamato. (A) Esquema de los distintos tratamientos farmacológicos empleados sobre los sinaptosomas antes y durante el registro de fluorescencia. (B) Ejemplo de registro de fluorescencia. La liberación de glutamato se induce por medio de la aplicación de KCl o ionomicina, que dan lugar a la entrada de Ca^{2+} en los sinaptosomas, disparando la exocitosis vesicular. Finalmente, es añadido un estándar interno para cuantificar el glutamato liberado por los sinaptosomas.

despolarización con K^+ , se sustituyó el CaCl_2 1.33mM por una mezcla 1:2 de $\text{CaCl}_2/\text{EGTA}$ (1.9mM/7.5mM), que da lugar a una concentración final de Ca^{2+} de 200nm. La cubeta con esta suspensión fue transferida a un fluorímetro Pelkin-Elmer LS50B o LS55 con un sistema de agitación y termostatación a 37°C , siendo adicionadas 50U de la enzima GDH. La suspensión se incubó en agitación durante 2 min para eliminar el glutamato extrasinaptosomal y el presente en la solución de la enzima. Además se incubó con tetrodotoxina, TTx, (1 μM , 2min previo al registro) en los experimentos para determinar la liberación espontánea. A continuación, se realizó el registro de fluorescencia a 37°C durante 560 o 860s empleando el programa FL WinLab en modo *Time Drive*, con la siguiente configuración parámetros: excitación $340\pm 3\text{nm}$ (filtro de emisión 390nm), emisión $460\pm 8.5\text{nm}$, intervalo de obtención de datos 0.8s, ancho de respuesta 4.8s. Además, se

realizó la adición de distintos fármacos de acuerdo al experimento correspondiente (Fig. 3.2.A). A los 100s de registro se indujo la entrada de Ca^{2+} y la subsiguiente liberación de neurotransmisores por medio de: la adición de KCl (5mM), que dio lugar a la despolarización y apertura de los VDCC, o la adición del ionóforo ionomicina (0.5-1 μM), que promovió la entrada de Ca^{2+} de manera independiente de los VDCC. Por otra parte, en el caso del estudio de la liberación espontánea de glutamato, no se añadió ningún fármaco que facilitase la entrada de Ca^{2+} . Finalmente, se adicionó un estándar interno de glutamato (2nmol), 160s antes del final del registro.

Empleando este estándar interno, se calculó la liberación de glutamato de los sinaptosomas (nmol/mg) correspondiente al incremento de fluorescencia durante 300 o 600s de registro (Figura 3.2.B), empleando para ello el programa Grafical. En el caso de la liberación inducida por KCl, se calculó la liberación dependiente de Ca^{2+} como la diferencia entre la liberación de glutamato en presencia de CaCl_2 1.33mM y la liberación en presencia de EGTA (CaCl_2 200nm). La liberación dependiente de Ca^{2+} inducida por los diferentes fármacos fue normalizada frente a la liberación dependiente de Ca^{2+} inducida por KCl en ausencia de tratamiento. Por otra parte, en los experimentos en los que se promovió la exocitosis empleando ionomicina, se restó a todos los ensayos correspondientes la liberación basal en ausencia de ionomicina. La liberación inducida por los diferentes fármacos fue normalizada respecto a la liberación inducida por ionomicina en ausencia de tratamiento. Por último, en los experimentos de liberación espontánea, las liberaciones obtenidas por los diferentes tratamientos farmacológicos fueron normalizadas respecto a la liberación basal en ausencia de fármacos. La representación gráfica de los registros y el tratamiento estadístico de los datos se llevó a cabo empleando el programa Origin 8.0. El esquema del desarrollo de estos ensayos con los fármacos empleados se muestra en la Fig. 3.2.

2.3.DETERMINACIÓN DE SEGUNDOS MENSAJEROS

2.3.1. Determinación de los niveles intracelulares de IP_1 como indicador de la actividad de PLC

La fosfolipasa C, PLC, produce la hidrólisis de PIP_2 , generando DAG e IP_3 . El IP_3 es defosforilado por la acción secuencial de fosfatasas, algunas de las cuales son sensibles a altas concentraciones de Li^+ . Así, este ion inhibe la enzima responsable de la defosforilación de IP_2 para dar lugar a $\text{IP}_{1(3)}$ e $\text{IP}_{1(4)}$, pero no inhibe la generación de $\text{IP}_{1(1)}$. Así mismo, el Li^+ inhibe la degradación de todas las formas de IP_1 . De esta manera, la acción de este catión promueve la acumulación de $\text{IP}_{1(1)}$. Por tanto, en estas condiciones,

la cuantificación de la acumulación de $IP_{1(1)}$, permite estudiar la modulación de la actividad de la PLC y la formación de DAG e IP_3 (Trinquet et al., 2006).

Para ello, se empleó el Kit comercial *IP-One HTRF* (fluorescencia de alta resolución temporal) *assay kit*, basado en la tecnología de FRET (transferencia de energía de resonancia). Este método se basa en la transferencia de energía entre un cromóforo donador, un anticuerpo anti- IP_1 conjugado con el fluoróforo criptato de europio, y un cromóforo aceptor, un análogo de IP_1 conjugado con el fluoróforo d2. Esta transferencia de energía es inversamente proporcional a la distancia entre donador y aceptor. De esta manera, la excitación a 337nm del donador produce su emisión a 620nm. Esta emisión coincide con la ventana de excitación del aceptor, que a su vez emite a 665nm. En este sistema, el anticuerpo anti- IP_1 -donador se une al análogo de IP_1 -aceptor, y la proximidad de los fluoróforos permite el proceso de FRET, y por tanto la emisión del aceptor a 665nm. Sin embargo, la aparición de IP_1 endógeno, acumulado en sistemas biológicos en presencia de Li^+ , desplaza la unión del análogo de IP_1 -aceptor con el anticuerpo anti- IP_1 -donador, en favor del IP_1 endógeno. Este proceso provoca el distanciamiento de los fluoróforos, la pérdida del fenómeno de FRET y, por tanto, de la emisión a 665nm. De esta manera, mayores niveles de acumulación fisiológica de IP_1 provocan una mayor disminución en la emisión a 665nm. Mediante el empleo de una serie de concentraciones conocidas de IP_1 , es posible cuantificar el IP_1 acumulado en sistemas biológicos, y por tanto, la actividad de PLC asociada a la generación de DAG e IP_3 . El fundamento de este ensayo se muestra esquematizado en la Fig 3.3.

Los sinaptosomas obtenidos de la corteza cerebral (apartado 2.1) de ratones adultos (1mg) fueron resuspendidos en HBM-BSA (0.91 mg/ml), se agitaron a 37°C durante una hora y se trataron con LiCl (50mM) durante 35 minutos. Los sinaptosomas se sometieron a los correspondientes tratamientos farmacológicos: isoproterenol (100 μ M, 10min), 8-pCPT (50 μ M, 10min), U73122 (2 μ M, 30min). En el caso de los estudios de activación conjunta con L-AP4 e isoproterenol/8-pCPT, los sinaptosomas se trataron con L-AP4 (1mM) durante 10 minutos, lavándose (16000g, 1min) a continuación para retirar el agonista del medio. Seguidamente, se resuspendieron en HBM-BSA (0.91 mg/ml) para llevar a cabo el tratamiento con isoproterenol (100 μ M) u 8-pCPT (50 μ M) durante otros 10 minutos. Al acabar los tratamientos, los sinaptosomas se lavaron (16000g, 1min) y se mantuvieron a 4°C.

Los sinaptosomas se lavaron (16000g, 1min) y se resuspendieron (14,28 mg/ml) en 70 μ l de tampón de estimulación proporcionado por el kit, que contiene LiCl 50mM. A continuación esta suspensión se transfirió a una placa de 96 pocillos. Además, se añadieron a la placa en otros pocillos 70 μ l de distintas concentraciones conocidas de IP_1 , preparadas de manera seriada para realizar la recta patrón. Por último, se añadieron a

otros dos pocillos 70 μ l de tampón de estimulación para determinar el blanco y el máximo de la señal. A todos los pocillos se añadieron 15 μ l del análogo de IP₁-d2 resuspendido en el tampón de lisis proporcionado por el Kit. Seguidamente, se añadieron 15 μ l del anticuerpo anti IP₁-criptato resuspendido en el tampón de lisis a todos los pocillos menos al correspondiente al blanco. Estas suspensiones se incubaron en oscuridad durante 1h a temperatura ambiente. Acabada esta incubación, se cuantificó la emisión de fluorescencia de las distintas muestras a 620 (donador) y 665nm (aceptor) tras la excitación a 337nm (50 μ s de intervalo), empleando un lector de placas FluoStar Omega. Con estos valores, se calculó la medida ratiométrica del valor de FRET (Fig. 3.3, EC 3.1). A continuación, se calculó el incremento específico de FRET (ΔF), teniendo en cuenta el valor obtenido del blanco (Fig. 3.3, EC 3.2). Estos valores pueden ser ajustados matemáticamente, teniendo en cuenta el valor del máximo, a una relación lineal entre la ΔF y la concentración de IP₁ (Fig. 3.3, EC 3.3). De esta manera, interpolando en la recta patrón de concentraciones conocidas, podemos calcular la concentración de IP₁ de las muestras estudiadas, expresándola en pmoles/mg. Los valores obtenidos se normalizaron respecto al control en ausencia de tratamiento.

2.3.2. Determinación de los niveles intracelulares de cAMP

El procedimiento de determinación de los niveles de cAMP es similar al empleado para la determinación del IP₁, salvo que en este caso se empleó el kit comercial *cAMP Dynamic*.

Los sinaptosomas obtenidos de la corteza cerebral (apartado 2.1) de ratones adultos (1mg) se resuspendieron en HBM-BSA (0.91 mg/ml), se agitaron a 37°C durante una hora, se trataron con el inhibidor de las PDEs de cAMP, IBMX (1mM), durante 30 minutos, y se sometieron a los correspondientes tratamientos farmacológicos: L-AP4 (1mM, 11min), isoproterenol (100 μ M, 10min), forskolina (15 μ M, 10min). En el caso de los experimentos con PTx, los sinaptosomas se incubaron 2h con esta toxina (1.5mg/ml, 2h), y con IBMX (1mM, 30min), así como con L-AP4 (1mM, 11min) e isoproterenol (100 μ M, 10min). Para los experimentos con pretratamiento con L-AP4, los sinaptosomas se incubaron con IBMX (1mM, 25min) y se trataron con L-AP4 (1mM, 10min). A continuación se lavaron (16000g, 1min), se resuspendieron en HBM-BSA (0.91 mg/ml), y se trataron otra vez con IBMX (1mM, 10min) e isoproterenol (100 μ M, 10min). En todos los casos, después de los correspondientes tratamientos farmacológicos, los sinaptosomas se lavaron (16000g, 1min) y se resuspendieron (20mg/ml) en 50 μ l de tampón de estimulación proporcionado por el Kit suplementado con IBMX (1mM). El procedimiento seguido fue análogo al de la determinación IP₁, salvo que se emplearon 25 μ l de las diluciones en

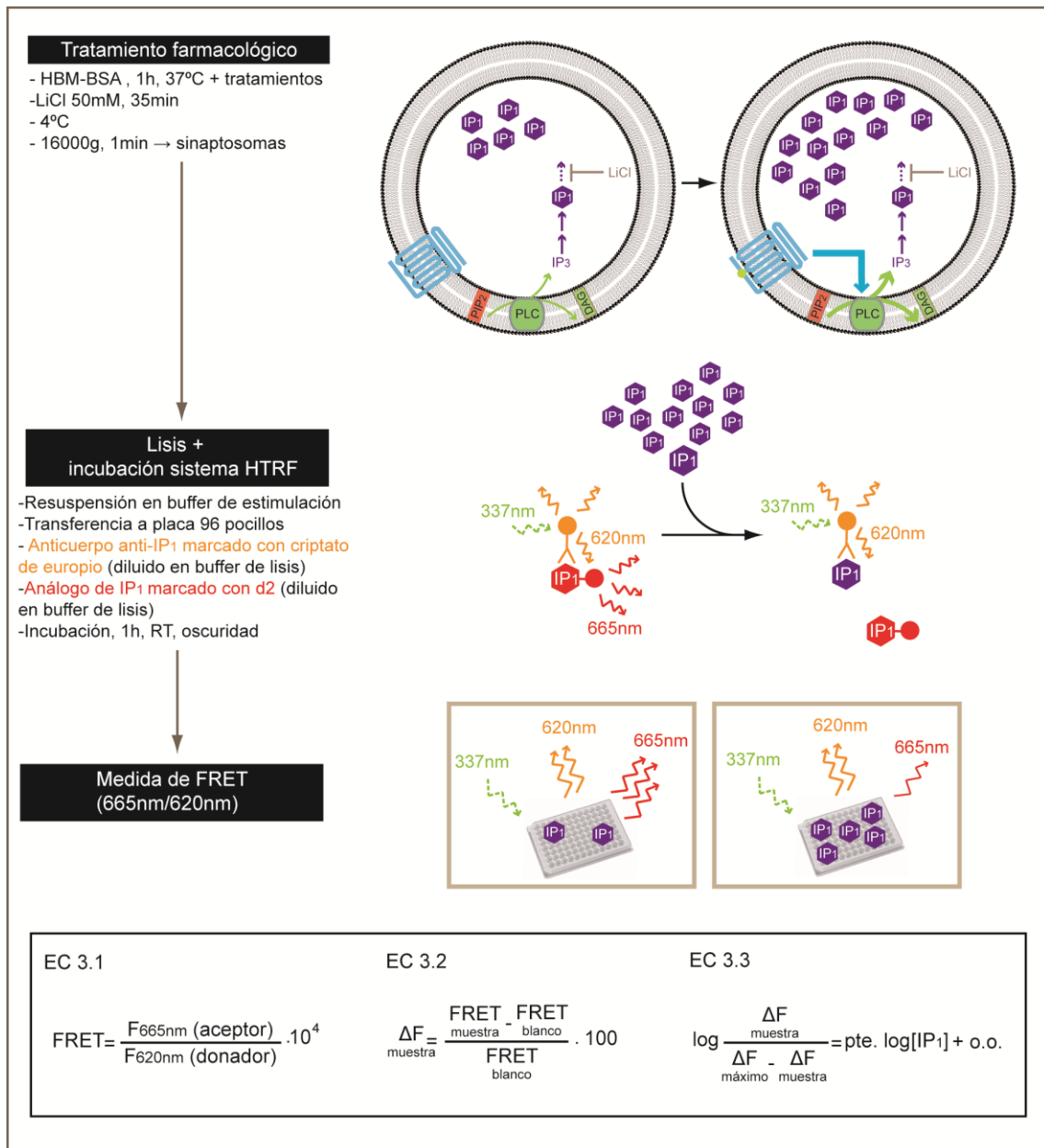


Figura 3.3. Determinación de los niveles intracelulares de IP₁. Esquema del protocolo y fundamento de la determinación de IP₁ en presencia de LiCl. La activación de los GPCRs acoplados a la fosfolipasa C, PLC, promueve la hidrólisis de PIP₂ para generar DAG e IP₃. El IP₃ se degrada hasta IP₁ en presencia de LiCl. El sistema basado en la transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET) permite determinar el IP₁ generado en los sinaptosomas, a partir del ajuste lineal a una recta patrón de acuerdo a las ecuaciones mostradas (EC 1.1-1.3; pte, pendiente; o.o, ordenada en el origen).

tampón de lisis del análogo de cAMP-d2 y del anticuerpo anti cAMP-criptato. La medida de las fluorescencias del donador y aceptor se realizó empleando un lector de placas FluoStar Omega, procediendo de la misma manera descrita para la determinación de IP₁, para calcular la acumulación de cAMP (pmol/mg). Los valores obtenidos fueron normalizados respecto al control en ausencia de tratamiento.

2.4. TRANSLOCACIÓN A MEMBRANA DE LA PROTEÍNA MUNC-13.

Las proteínas Munc13, en respuesta a su unión a DAG, se translocan a la membrana plasmática de la zona activa, para llevar a cabo su función en la preparación de las vesículas sinápticas para la exocitosis (Augustin et al., 1999; Rhee et al., 2002). Por lo tanto, la separación de la fracción soluble y de membrana de los sinaptosomas, permite determinar, mediante inmunotransferencia, los niveles de proteína Munc13 en su forma soluble (inactiva) o translocada a membrana (activa), así como conocer los efectos de los diferentes tratamientos farmacológicos en la translocación/activación de la proteína.

Los sinaptosomas obtenidos de la corteza cerebral (apartado 2.1) de ratones adultos (1mg) se resuspendieron en HBM-BSA (0.91 mg/ml), se mantuvieron en agitación a 37°C durante una hora y se sometieron a los correspondientes tratamientos: 8-pCPT (50µM, 10min), U73122 y U73343 (2µM, 30min), isoproterenol (100µM, 10min), L-AP4 (1mM, 10min), IBMX (1mM, 30min). En los estudios de activación conjunta con L-AP4 e isoproterenol/8-pCPT, los sinaptosomas se trataron con L-AP4 (1mM) durante 10 minutos, y se lavaron (16000g, 1min), para retirar el agonista del medio. Seguidamente, se resuspendieron en HBM-BSA (0.91 mg/ml) y se trataron con isoproterenol (100µM) o 8-pCPT (50µM) durante otros 10 minutos. A continuación, los sinaptosomas se lavaron (16000g, 1min) y se mantuvieron a 4°C. Las muestras de sinaptosomas fueron sometidas a un choque hipo-osmótico, por parejas sometidas al mismo tratamiento (2mg), en Tris-HCl 8.3mM, pH 7 (3.33 mg/ml) suplementado con inhibidores de proteasas y EDTA, en agitación a 4°C durante 30min. Estas suspensiones se centrifugaron a 40000g durante 10 minutos y se recogió el sobrenadante, que corresponde a la fracción soluble de los sinaptosomas. Por otra parte, el sedimento obtenido se resuspendió en tampón RIPA suplementado con inhibidores de proteasas y EDTA (1.33mg/ml, respecto a los 2mg iniciales), obteniendo el extracto correspondiente a la fracción particulada o de membrana. A continuación, se determinó la concentración de proteínas de ambas fracciones por el método de Bradford. El volumen correspondiente a 3µg de cada fracción y tratamiento se diluyó en tampón de muestras de electroforesis PAGE-SDS con β-mercaptoetanol al 5%.

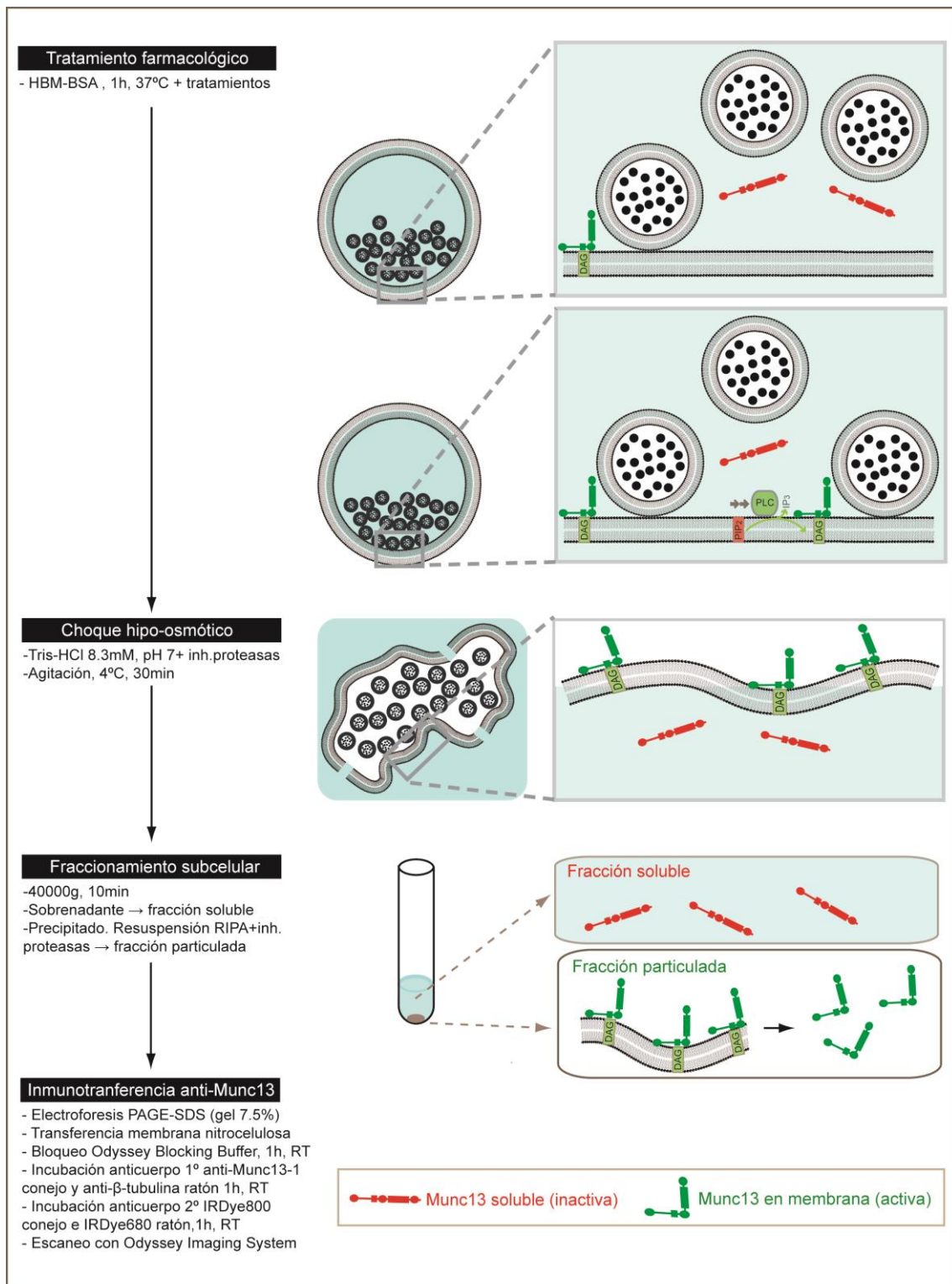


Figura 3.4. Translocación a membrana de la proteína Munc13. Esquema del protocolo y fundamento de la técnica. La proteína Munc13 se transloca a la membrana plasmática de la zona activa como consecuencia de su activación por unión a DAG. Después de someter a los sinaptosomas a un choque hipo-osmótico es posible separar las fracciones soluble y de membrana, para, mediante inmunotransferencia, determinar la cantidad de Munc13 que se localiza en membrana (activa) o soluble (inactiva).

Las muestras se trataron a 90°C durante 10min y se realizó la electroforesis PAGE-SDS (70V/160V, 2h; geles separadores al 7.5% acrilamida/bisacrilamida). A continuación, se realizó la transferencia de las proteínas a membranas de nitrocelulosa (90mA, 12h, 4°C). Las membranas se lavaron con PBS y bloquearon durante 1 hora empleando *Odyssey Blocking Buffer*. Posteriormente, se incubaron con los anticuerpo primarios anti-Munc13-1 de conejo (1:1000) y anti- β -tubulina de ratón (1:4000) como control de carga, diluidos ambos en *Odyssey Blocking Buffer* con Tween20 0.1%. Seguidamente, se realizaron lavados seriados con PBS-Tween0.1% y las membranas se incubaron con los anticuerpos secundarios *IRDye800* anti-conejo y *IRDye680* anti-ratón (1:15000) diluidos en *Odyssey Blocking Buffer* con Tween20 0.1% y SDS 0.01%. Después, se realizaron lavados seriados con PBS-Tween20 0.1% y un lavado final con PBS. Las membranas fueron escaneadas empleando el sistema de imagen infrarrojo Odyssey. Los valores de la intensidad integrada de las bandas obtenidas en la inmunodetección fueron calculados con programa Odyssey 2.0. Los valores se normalizaron de acuerdo con la intensidad integrada de las bandas de β -tubulina, de manera independiente para los valores de la fracción soluble y particulada. Los valores obtenidos fueron procesados empleando el programa Origin 8.0., y se expresaron como porcentaje de la proteína Munc13-1 en cada fracción, respecto a la proteína total (suma de las intensidades de las dos fracciones para cada condición). Además, se expresaron estos valores como la relación entre el porcentaje de la proteína en la fracción soluble y particulada. El protocolo del desarrollo de esta técnica se muestra en el esquema de la Fig. 3.4.

2.5. CO-INMUNOPRECIPITACIÓN.

La co-inmunoprecipitación es una técnica que permite estudiar la interacción entre proteínas. Se basa en la formación de un complejo proteína-anticuerpo específico, y en su separación del resto de proteínas empleando una resina. Además de la proteína reconocida por el anticuerpo, son capturadas otras proteínas que interaccionan o forman complejos con la misma. El análisis de los extractos inmunoprecipitados por inmunotransferencia, permite detectar las posibles proteínas co-inmunoprecipitadas. El fundamento de esta técnica se muestra esquematizado en la Fig. 3.5.

Los sinaptosomas obtenidos de la corteza cerebral de ratones adultos (apartado 2.1) se resuspendieron y homogeneizaron en tampón RIPA suplementado con inhibidores de proteasas y EDTA (2.66mg/ml). En los ensayos se emplearon 4mg por condición de inmunoprecipitación. Sin embargo, en los ensayos de cuantificación de cambios en los niveles de co-inmunoprecipitación por tratamientos farmacológicos, se resuspendió sólo 1mg de sinaptosomas en HBM-BSA (0.9 mg/ml), juntándose cuatro tratamientos iguales

(4mg) en etapas posteriores. En estos casos, los sinaptosomas se mantuvieron en agitación a 37°C durante una hora, y se sometieron a los siguientes tratamientos: 8-pCPT (50µM, 10min), U73122 y U73343 (2µM, 30min), isoproterenol (100µM, 10min) y LAP4 (1mM, 10min). A continuación, se lavaron (16000g, 1min), se resuspendieron (2.66mg/ml) y se homogeneizaron en RIPA con inhibidores de proteasas. En algunos casos, después del lavado, los precipitados de sinaptosomas se mantuvieron a -80°C hasta su resuspensión. Las suspensiones de los sinaptosomas en tampón RIPA se mantuvieron 30 min a 4°C, se centrifugaron (1h, 16000g) y se recogieron los sobrenadantes. Se juntaron cuatro de estos sobrenadantes, correspondientes al mismo tratamiento farmacológico (4 mg por tratamiento). Se separaron volúmenes correspondientes a 1.46mg (550µL) por condición de inmunoprecipitación y 0.53mg (200µL) para los extractos control que no fueron inmunoprecipitados (crudos). A los crudos se les añadió 1ml de acetona y se mantuvieron a -20°C. A las muestras para inmunoprecipitación se les añadió 200µL de RIPA con inhibidores de proteasas y EDTA (750µL de volumen total), y el volumen correspondiente de los correspondientes anticuerpos usados para inmunoprecipitar (Tabla 3.6). Como control negativo se realizaron inmunoprecipitaciones con un anticuerpo que reconoce un epítipo que no está presente en ninguna proteína natural (*anti-Flag*), empleando la misma cantidad de este anticuerpo que la usada para las inmunoprecipitaciones. Estas soluciones se mantuvieron en rotación continua con un agitador tipo noria (12 rpm, 12 horas, 4°C). A las muestras inmunoprecipitadas se les añadió 100µL de resina preequilibrada (50µL de resina pura) para retener los inmunocomplejos formados. La resina fue preequilibrada lavándola (2200g, 1min) varias veces con RIPA, diluyéndola finalmente (1:1) con RIPA con inhibidores de proteasas y EDTA. Estas soluciones se mantuvieron en rotación continua en un agitador tipo noria (12 rpm, 2 horas, 4°C). Se emplearon resinas de proteína A agarosa o del sistema TrueBlot, dependiendo de que los anticuerpos para inmunoprecipitar y para la inmunodetección hubiesen sido generados en distinta o en la misma especie, respectivamente. A continuación, se lavó (2200g, 1min) la resina con los inmunocomplejos retenidos de forma seriada con RIPA, RIPA 0.1% en TBS y TBS. Después del último lavado se añadieron 25µL de tampón de muestras de electroforesis PAGE-SDS con DTT 50mM. Los crudos mezclados con acetona se lavaron (1100g, 30min) y se resuspendieron en tampón de muestras de electroforesis PAGE-SDS con DTT 50mM. Las muestras y los crudos se calentaron a 90°C durante 10min y se recuperó el tampón de carga con los inmunocomplejos liberados para realizar la electroforesis PAGE-SDS (70V/160V, 2h; la concentración de poliacrilamida de los geles separadores se detalla en Tabla 3.6.). Seguidamente, se realizó la transferencia de las proteínas a membranas de nitrocelulosa (90mA, 12h, 4°C). Las membranas se lavaron con PBS y se bloquearon con leche

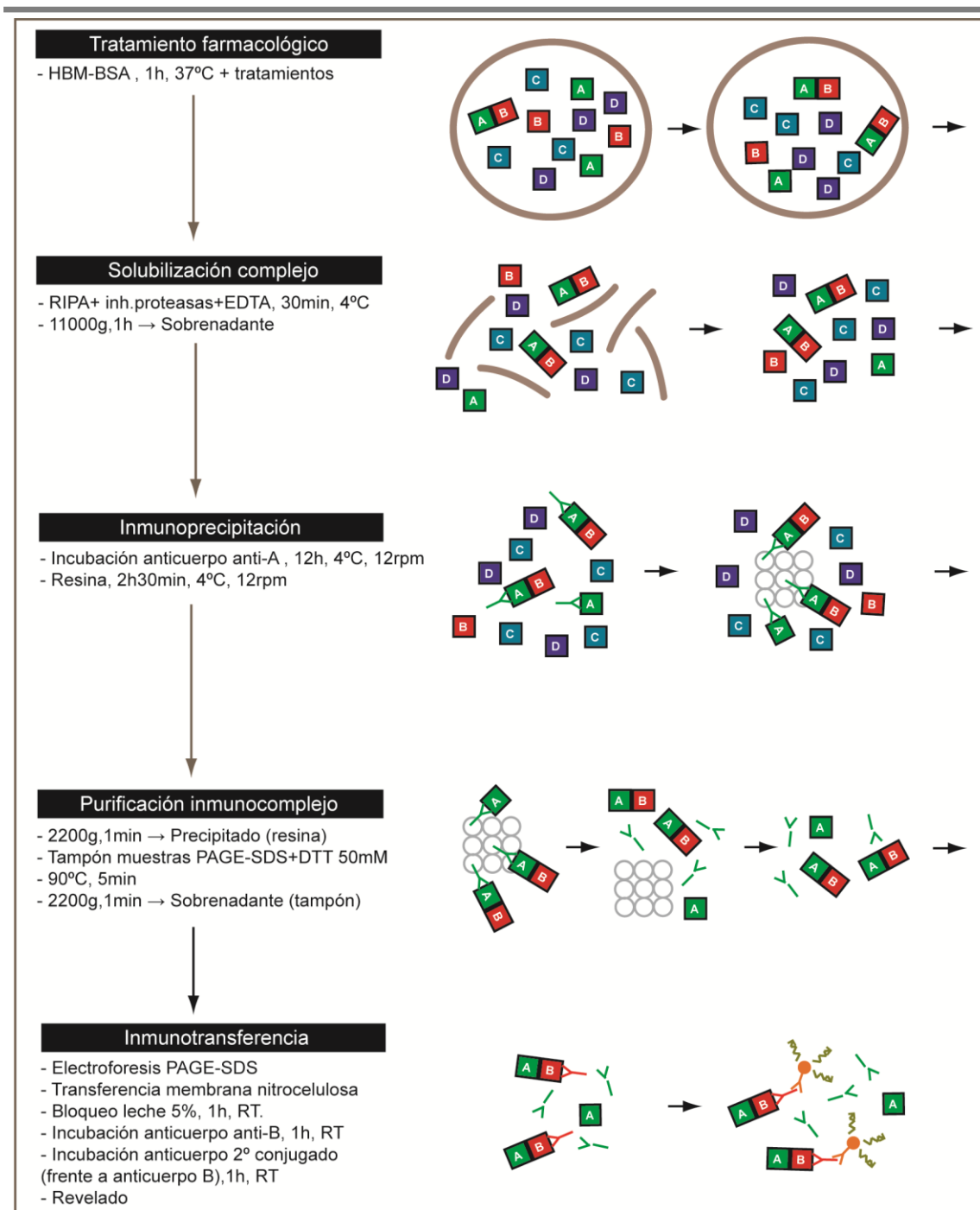


Figura 3.5. Co-immunoprecipitación. Esquema del protocolo y fundamento de la técnica. La unión de anticuerpos específicos a una proteína permite purificarla. Mediante inmunotransferencia es posible detectar en los extractos purificados otras proteínas que formen complejos (proteínas co-immunoprecipitada) con la proteína purificada, permitiendo estudiar, por tanto, interacciones entre proteínas.

Anticuerpo	mg/ml	µg co-IP	%gel acrilamida	Dilución inmunodetección
Anti-Flag	0.9	variable	-	-
Anti- Rab3a	1.0	4	12	1:1000
Anti-RIM1α	1.0	3.5-4	7.5	1:1000
Anti- β ₁ -AR	0.2	3.5	10	1:200
Anti- mGlu7a	0.9	3.5	10	1:200
Anti- Munc13-1	1.0	4	7.5	1:1000

Tabla 3.6. Anticuerpos primarios empleados en los ensayos de co-immunoprecipitación.

desnatada 5% (en PBS-Tween0.1%) o con *Odyssey Blocking Buffer* durante 1 hora. Posteriormente, se incubaron con el correspondiente anticuerpo primario diluido en leche desnatada 5% (en PBS-Tween0.1%) o en *Odyssey Blocking Buffer* con Tween20 0.1%, para detectar las proteínas co-inmunoprecipitadas (Tabla 3.6). A continuación, se realizaron lavados seriados con PBS-Tween0.1% y se incubaron las membranas con el anticuerpo secundario. Cuando los anticuerpos para inmunoprecipitar y para la inmunodetección fueran generados en especies distintas, se emplearon anticuerpos secundarios conjugados con HRP, anti-Ig de conejo o anti-Ig de ratón, diluido en leche desnatada 5% (en PBS-Tween0.1%) o con anticuerpos secundarios *IRDye800* anti-conejo (1:15000) diluidos en *Odyssey Blocking Buffer* con Tween20 0.1% y SDS 0.01%. Cuando los anticuerpos fueron generados de la misma especie, se usaron anticuerpos secundarios anti-Ig conejo del sistema TrueBlot, ya que estos anticuerpos se unen sólo a los anticuerpos primarios usados en la inmunodetección y no a los empleados en la inmunoprecipitación, que han sido desnaturizados. A continuación, se realizaron lavados seriados con PBS-Tween0.1% y un lavado final con PBS. Las membranas se revelaron, de acuerdo a los anticuerpos secundarios usados, empleando el sistema Odyssey o el sustrato quimioluminiscente *Supersignal West Pico* y el equipo de imagen Fluor-S MultImager o LAS-3000. En la modulación farmacológica de la co-inmunoprecipitación, se calcularon los valores de la intensidad integrada de las bandas con los programas Odyssey 2.0 o ImageJ. Los valores obtenidos para las diferentes coimmunoprecipitaciones se expresaron en función de los valores obtenidos para las proteínas inmunoprecipitadas, para evitar que la posible variación de la cantidad de proteína inmunoprecipitada causada por los tratamientos farmacológicos influyese en los niveles de coimmunoprecipitación. Finalmente, los datos se normalizaron frente al control en ausencia de tratamiento farmacológico. Para el procesamiento, y el tratamiento estadístico de los datos se utilizó el programa Origin 8.0. El protocolo del desarrollo de esta técnica se muestra en el esquema de la Fig. 3.5.

2.6. CULTIVOS CELULARES PRIMARIOS

2.6.1. Cultivo celular y transfección de neuronas corticales

El cultivo primario de neuronas corticales se realizó empleando el kit comercial *Papain Dissociation System* basado en el método descrito por Huettner y Baughman, 1986 (Fig. 3.6). Los ratones recién nacidos (primer día postnatal, P1) se desinfectaron con etanol 70% y se sacrificaron por decapitación. Los ratones carentes de la proteína RIM1 α y mutantes para el dominio de unión a DAG de Munc13-1 fueron genotipados previamente,

tal como se detalla en el apartado 2.11., realizando cultivos de los ratones que presentaban el mismo genotipo. Los cerebros completos fueron extraídos y las cortezas cerebrales se diseccionaron empleando una lupa binocular, manteniendo el tejido en EBSS frío. Se obtuvieron un máximo de 4-5 pares de cortezas, realizando varias series para un cultivo de mayor número de animales. A continuación, se trituró exhaustivamente el tejido en aproximadamente 2ml de una solución de EBSS con 12 U/ml de papaína, 72U/ml de DNAasa y 2.4mM $\text{CaCl}_2/\text{MgCl}_2$ atemperada a 37°C. Las cortezas trituradas fueron trasvasadas a un volumen mayor (8.32ml de volumen total) de la misma solución de papaína, realizando la digestión enzimática del tejido durante 45-60min en un agitador orbital (250 rpm) a 37°C. Pasado ese tiempo, la solución de digestión se resuspendió suavemente y se centrifugó (110g, 5min, a temperatura ambiente). El sobrenadante se retiró y el sedimento, en el que se encuentran las células disociadas, se resuspendió en 6,215ml de EBSS con 1mg/ml ovomucoide-BSA, 64U/ml de DNAasa y 2.4mM $\text{CaCl}_2/\text{MgCl}_2$ para inactivar la papaína. Esta solución se depositó sobre un gradiente discontinuo de EBSS con 10mg/ml de ovomucoide-BSA (3ml de ovomucoide/3ml de solución de células). La suspensión se centrifugó (133g, 5min), descartándose el sobrenadante, que contenía restos de membranas celulares en la interfase del gradiente, mientras que el sedimento se resuspendió en 1.5-2ml de medio neurobasal, NB con el suplemento B27, antibiótico/antimicótico y glutamax como fuente de glutamina. Cuando se hicieron varias series en el cultivo, las células obtenidas fueron mezcladas. A continuación, se procedió al conteo de las células obtenidas con una cámara de Neubauer y azul tripán.

Transfección. Las neuronas obtenidas se transfectaron con plásmidos que codifican distintas proteínas con el sistema de electroporación Amaxa Nucleofector II empleando sus correspondientes soluciones y material de transfección. Para cada transfección, el volumen equivalente a 10×10^6 células se incubó durante 10min a 37°C (5% CO_2). Seguidamente, las células se centrifugaron (380g, 2min, T^a ambiente), descartandose el sobrenadante y resuspendiendo el precipitado en 100µL de la solución Neuron Nucleofector. A esta solución se le añadió el volumen equivalente a 2µg de cada plásmido. Esta mezcla de transfección se incubó 10min a temperatura ambiente, y a continuación se trasvasó a una cubeta de electroporación para realizar la transfección con el sistema Amaxa Nucleofector II (programa O-003). Inmediatamente después, se añadieron a la cubeta 500µL de NB y se incubó la solución 10min a 37°C (5% CO_2). Previamente, se añadió 1.5 ml de NB a 37°C a las placas de 6 pocillos (9.6cm²) con tres cubreobjetos de 15mm o uno de 25mm, tratados con poli-L-lisina, en cada pocillo. Seguidamente, las células se sembraron sobre estos cubreobjetos, empleando las células de una transfección para sembrar 8 pocillos (1.25 $\cdot 10^6$ células/pocillo). Transcurridas 2 horas de la siembra de las células transfectadas, se añadió 1ml adicional de medio NB a cada pocillo para obtener un volumen final de aproximadamente 3ml de NB por pocillo. Las

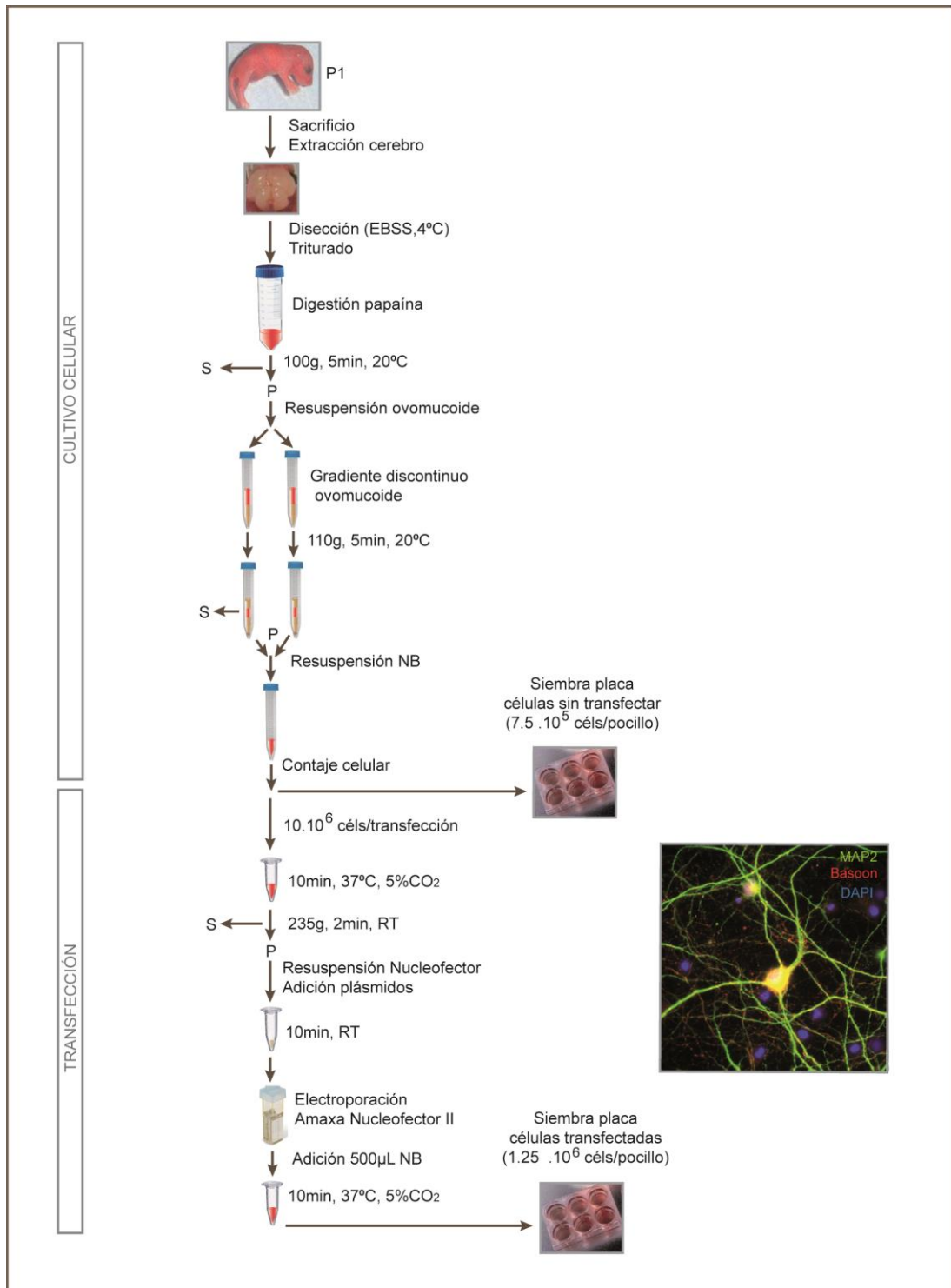


Figura 3.6. Cultivo primario y transfección de neuronas corticales. Esquema del protocolo del cultivo primario de neuronas corticales. Las cortezas de ratones P1 diseccionadas se digirieron con papaína. Las neuronas purificadas son transfectadas por electroporación con los correspondientes plásmidos antes de su siembra sobre cubre objetos circulares tratados con poli-lisisna.

células se mantuvieron en cultivo 14- 20días *in vitro* (DIV) a 37°C (5% CO₂), cambiando 1.5ml del medio NB cada 3-4 días. El proceso de cultivo celular y transfección se muestra esquematizado en la Fig. 3.6.

2.6.2. Cultivos autápticos hipocampales.

Los cultivos autápticos (Bekkers y Stevens, 1991) son cultivos de una única neurona aislada sobre una isla de astrocitos. Para ello, los astrocitos crecen sobre un sustrato limitado a regiones de 200x200 μm^2 , dando lugar a estas islas de astrocitos. A continuación, se realiza un co-cultivo de neuronas hipocampales sembradas a baja densidad, que crecen sobre estas islas de astrocitos. En estas condiciones, en algunas islas de astrocitos, se pueden obtener una única neurona aislada. Estas neuronas aisladas forman un gran número de sinapsis con ella misma, por lo que son denominadas autapsis. Esta técnica permite realizar estudios de electrofisiología estimulando y registrando las respuestas en la misma neurona (Bekkers y Stevens, 1991; Pyott y Rosenmund, 2002). Este modelo ha sido ampliamente utilizado para el estudio de mecanismos de neurotransmisión, como por ejemplo el estudio de la función de proteínas presinápticas de la maquinaria exocitótica (Rhee et al., 2002; Jockush et al., 2007)

El protocolo empleado para realizar los cultivos autápticos figura detallado en Burgalossi et al., 2012. Este cultivo consta de tres pasos: la preparación de las microrregiones con el sustrato para el crecimiento de los astrocitos, el cultivo de microislas de astrocitos de corteza cerebral y el co-cultivo de neuronas hipocampales sobre estos astrocitos.

Preparación de las microrregiones. Los cubreobjetos de 32mm de diámetro se trataron durante 12h con HCl 1M, en agitación. A continuación, se lavaron mediante tres inmersiones en agua destilada y dos inmersiones en etanol 70%. Después del lavado, los cubreobjetos se almacenaron en etanol 100% a temperatura ambiente hasta una semana. Los cubreobjetos se flamearon brevemente para eliminar el etanol y se transfirieron a placas multipocillo de 6 pocillos. Seguidamente a cada pocillo se adicionó 2ml de agarosa 0.15% (dejada enfriar hasta los 40-50°C) para cubrir los cubreobjetos. A los 30 segundos, se retiró el exceso de agarosa por aspiración, con el fin de formar una fina película de la misma. A continuación, las placas se esterilizaron por tratamiento con luz ultravioleta 1h, se dejaron secar 1 día en condiciones de esterilidad. Estas placas cerradas se almacenaron a temperatura ambiente hasta 1-4 semanas. El siguiente paso consistió en el estampado de las microrregiones de 200x200 μm^2 con sustrato adherente polilisina-colágeno, constituido por ácido acético 10mM, 0.2mg/ml colágeno, 0.1mg/ml poli-D-lisina, en los cubreobjetos cubiertos por agarosa. Para ello, se empleó un sello de 30mm de

diámetro con micro protuberancias de $200 \times 200 \mu\text{m}^2$ separadas entre sí $200 \mu\text{m}$, según se muestra en la Fig. 3.7. Entre cada aplicación el sello se mojó en una placa de 6cm de diámetro con dos hojas de papel de filtro empapadas con el sustrato adherente (aproximadamente 1.5ml del sustrato al inicio, adicionándose aproximadamente $150 \mu\text{L}$ cada 3 aplicaciones). En el estampado se evitó la formación de gotas, ya que dan lugar a microrregiones irregulares y de gran tamaño, así como el secado excesivo del sello, ya que una cantidad insuficiente de sustrato provoca una mala adhesión de los astrocitos. Las placas estampadas se expusieron a luz ultravioleta 30min y se almacenaron a temperatura ambiente. Antes de su uso se esterizaron durante 60min con luz UV.

Cultivo de microislas de astrocitos. Se sacrificó un ratón C57BL/6N (1ratón/15 placas) recién nacido (P1), se extrajo el cerebro y se diseccionaron las cortezas cerebrales en HBSS-Ca/Mg sobre hielo, con un estereomicroscopio Stemi2000 y una fuente de luz KL1500 LCD. Cada corteza fue transferida a un tubo de 1.5ml con 1ml de tripsina-EDTA 0.05%, 37°C e incubada 15min a 37°C en agitación (450rpm). A continuación, para desactivar la tripsina se descartó cuidadosamente el sobrenadante y se lavaron las corteza dos veces con $500 \mu\text{L}$ de FBS, 37°C , constituido por 10% FBS inactivado por calor, 0.01% suero MITO, 0.2% penicilina/streptomina en DMEM-GlutaMax, preequilibrado en un incubador a 37°C con 5% CO_2 , añadiendo finalmente $300 \mu\text{L}$ de FBS por tubo. Las cortezas fueron trituradas mecánicamente con 30 pases con una pipeta P1000, evitando la formación de burbujas y transfiriendo el par de cortezas a una botella de 75 cm^2 con 13 ml de FBS, incubándola a 37°C , 5% CO_2 . El medio de los astrocitos se cambió dos días después por otros 13 ml de FBS a 37°C y las células se cultivaron hasta que alcanzaron un 60-70% de confluencia. Para ello se monitorizó el cultivo cada día, alcanzándose este estado normalmente entre 5-9 DIV. Llegado a este punto, las botellas se agitaron fuertemente con un agitador vórtex a máxima velocidad durante 30s. El sobrenadante, que contenía cuerpos esferoidales adheridos débilmente a la monocapa de astrocitos, se aspiró y esta monocapa se lavó rápidamente dos veces con PBS, 37°C . Se añadieron 5ml de tripsina-EDTA 0.05% cubriendo la superficie de la botella, aspirándolos a los 30s e incubando después la botella a 37°C , 5% CO_2 , durante 5min. Después de esta incubación, la monocapa de astrocitos se despegó parcialmente de la superficie de la botella, y se lavó con 10 ml FBS, 37°C , redistribuyendo el medio de la parte inferior a la parte superior 5 veces con una pipeta, para despegarla completamente. La solución con los astrocitos fue transferida a un tubo cónico de 50ml, y las células fueron disociadas por medio de 10 pases con una pipeta Pasteur esterilizada, hasta obtener una suspensión homogénea. El conteo celular se realizó en una cámara de Neubauer con azul tripán, sembrando los astrocitos (25000 céls/pocillo) sobre FBS (2ml/pocillo), 37°C (preequilibrado con 5% CO_2), y agitando las placas para una homogénea distribución. El rendimiento habitual de este

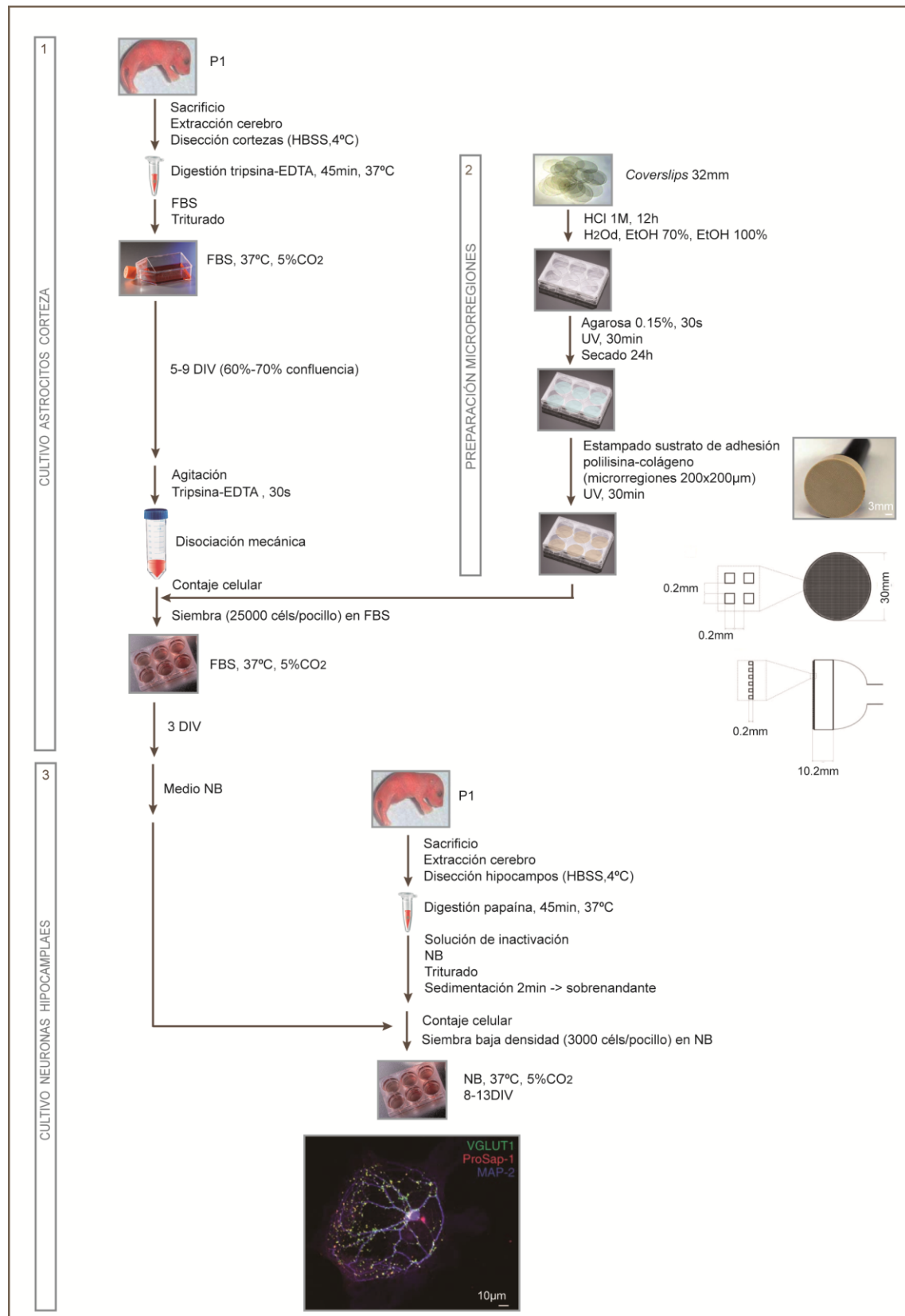


Figura 3.7. Cultivo autóptico de neuronas hipocámpales sobre islas de astrocitos. Esquema del protocolo de preparación de cubreobjetos con microrregiones de sustrato de adhesión, del cultivo de astrocitos de corteza y del cultivo de neuronas de hipocampo. Las neuronas de hipocampo son cultivadas sobre islas de astrocitos, de manera que una única neurona aislada en una isla de astrocitos establece sinapsis consigo misma (autapsis). El esquema y la imagen del sello empleado, así como la imagen de inmunofluorescencia han sido reproducidas Buralgossi et al., 2012.

proceso es de aproximadamente 15placas/par de cortezas. Las microislas de astrocitos se incubaron dos días antes de ser usadas para los cultivos autópticos de neuronas.

Cultivos autópticos de neuronas hipocampales. Un ratón C57BL/6N recién nacido (P1) se sacrificó, extrayendo el cerebro y diseccionando los hipocampos en HBSS-Ca/Mg sobre hielo, con un esterereomicroscopio Stemi2000 y una fuente de luz KL1500 LCD. Los dos hipocampos se transfirieron a un tubo de 1.5ml con 0.5ml de la solución de papaína (25U/ml de papaína a 37°C en una solución 1mM CaCl₂, 0.5mM EDTA y 1.65mM L-cisteína, burbujeadada 10-20min con carbógeno 95% O₂/5%CO₂) hasta su solubilización y se incubaron durante 45min a 37°C en agitación (450rpm). El medio FBS de las placas con las microislas de astrocitos fue sustituido por medio NB, 37°C (medio neurobasal con 2% del suplemento B27, 1% de Gutamax y 0.2% de penicilina/estreptomycin). Acabada la incubación, la papaína se desactivó descartando cuidadosamente el sobrenadante, y se añadieron 500µL de la solución de inactivación a 37°C (2.5mg/ml albúmina, 2.5mg/ml inactivador de papaína, 10% FBS inactivado por calor en DMEM) durante 15min a 37°C y 450rpm. El sobrenadante se descartó y, tras añadir 200µL de medio NB, los hipocampos se trituraron mecánicamente con 10 pases con una pipeta P200, evitando la formación de burbujas. Los restos no triturados del hipocampo se dejaron sedimentar en el fondo del tubo durante 2min. Estos restos se separaron, trasvasando cuidadosamente los sobrenadantes a tubos de 1.5ml con 1ml NB, 37°C. Las células fueron mezcladas cuidadosamente por inversión, realizándose a continuación el contaje celular en una cámara de Neubauer con azul tripán. Las neuronas se sembraron (3000 céls/pocillo) sobre las placas con las microislas de astrocitos con NB, agitándolas para dar lugar a una buena distribución. La trituración mecánica de los restos de hipocampo y los pasos posteriores pueden ser repetidos para obtener más células. Las neuronas se mantuvieron en cultivo, sin cambios de medio adicionales, durante 8-17 DIV. El proceso de obtención de los cultivos autópticos de neuronas hipocampales se muestra esquematizado en la Fig. 3.7.

2.7. INMUNOFUORESCENCIA

2.7.1. Inmunofluorescencia en sinaptosomas.

Los sinaptosomas obtenidos de la corteza cerebral (apartado 2.1) de ratones adultos (0.75mg) se resuspendieron en sacarosa 0.32M a 37°C (0.67mg/ml). A continuación, se añadieron 54 µg de la suspensión de sinaptosomas sobre cubreobjetos circulares de 15mm de diámetro tratados con poli-L-lisina. Todo el proceso se realizó a temperatura ambiente, salvo en las etapas en las que se especifica lo contrario. Tras 45min de fijación, se decantó el exceso de suspensión y los sinaptosomas adheridos a la

poli-L-lisina se fijaron con PFA 4% en PB 0.1M, pH 7.4, 4min. A continuación, los sinaptosomas se lavaron dos veces en PB 0.1M, pH 7.4, 5min y una vez en TBS 50mM, 10min. Seguidamente, se procedió al bloqueo con una solución con suero 10% en TBS-TX100 0.2%, durante 45min. A continuación, los sinaptosomas se incubaron con los correspondientes anticuerpos primarios diluidos en una solución con 5% suero en TBS-TX100 0.2%, durante 12h. Los anticuerpos primarios empleados fueron anti-sinaptofisina de conejo (1:100), anti-VDCC tipo N de cabra (1:500), anti-VDCC tipo P/Q de cabra (1:300), anti- mGlu7a de cobaya (1:300) y anti- β_1 AR de cabra (1:100). Como controles negativos de los anticuerpos secundarios, se incubaron muestras únicamente con la solución de dilución de los anticuerpos primarios. Seguidamente, los sinaptosomas se lavaron 3 veces en TBS 50mM durante 10min, y se incubaron con los correspondientes anticuerpos secundarios, Alexa fluor 488 y 594 de conejo y ratón, diluidos (1:200) en una solución con suero 1% en TBS 50mM durante 1h y 20min, en oscuridad. Tras 3 lavados en TBS 50mM, 10min, los cubreobjetos con los sinaptosomas fueron montados sobre portaobjetos empleando la solución de montaje ProLong Antifade (sin DAPI). Los portaobjetos montados se dejaron secar en oscuridad, 1h y se almacenaron posteriormente a 4°C.

La adquisición de imágenes se realizó secuencialmente para cada canal en un microscopio Nikon Diaphot TE2000 con cámara CCD Hamamatsu C4880 con un objetivo 100X Nikon. Las imágenes obtenidas fueron procesadas empleando ImageJ. Después de ajustar los valores de brillo y contraste de acuerdo a los valores en los que no se observa fluorescencia en los correspondientes controles negativos, fue sustraído el fondo de las imágenes empleando el método de *rolling ball* (8píxeles de radio). Las imágenes del marcaje de la proteína de referencia, generalmente sinaptofisina como marcador de terminales presinápticos, fueron convertidas en imágenes binarias, creando una máscara con la herramienta *Analyze particles*, que comprendía el área de regiones de interés de (ROIs) de tamaño mayor de 3 píxeles. Esta máscara se empleó para medir la fluorescencia (*mean gray values*) en el área de los ROIs en las imágenes con el marcaje de otra proteína cuya colocalización con la proteína de referencia se deseaba estudiar. Los valores de 0 se consideraron colocalización negativa, mientras que los valores 1 a 255 se consideraron colocalización positiva. De esta manera, se determinó el porcentaje de sinaptosomas que mostraban marcaje para una proteína en función del total de sinaptosomas marcados para la proteína de referencia. Los datos fueron procesados empleando OriginPro y el montaje de las imágenes se realizó con Adobe Illustrator.

2.7.2. Inmuncitofluorescencia

Las neuronas corticales (14-20 DIV; apartado 2.6.1) transfectadas con mCherry

bajo el promotor de la CaMKII α y vGlut1-pHluorina, y cultivadas sobre cubreobjetos de 15mm de diámetro ($1.3 \cdot 10^5$ céls/cm²), se incubaron en HBM 10min, 37°C. A continuación, se lavaron con PBS 0.1M, pH 7.4, 37°C y se fijaron con PFA 4% en PBS 0.1M, 4°C, 20min. Todas las etapas posteriores se realizaron a temperatura ambiente, salvo cuando se especifica lo contrario. Seguidamente, las células se lavaron 3 veces en PBS 0.1M, pH 7.4, durante 5min, y se permeabilizaron en PBS-TX100 0.2%, 5min. Las células se lavaron por inmersión en PBS 0.1M, pH 7.4 y se procedió al bloqueo empleando una solución con suero 10% en PBS-TX100 0.05%, durante 1h. A continuación, las células se lavaron por inmersión en PBS 0.1M, pH 7.4 y se incubaron con los correspondientes anticuerpos primarios diluidos en una solución con suero 5% en PBS-TX100 0.1%, durante 12h a 4°C. Se emplearon anticuerpos primarios anti-vGlut1 de conejo (1:1000), anti-GAD65 de conejo (1:1000), anti-GFP (1:1000) y anti-mCherry (1:1000). Seguidamente, las células se lavaron 3 veces en PBS-TX100 0.1%, durante 5min, y 2 veces en PBS 0.1M, pH 7.4, durante 5min. Después, se incubaron las células con el anticuerpo secundario Alexa488 y Alexa594 (1:500), diluidos en PBS 0.1M, pH 7.4 durante 1h en oscuridad. Seguidamente, los cubreobjetos con las células se lavaron 3 veces en PBS 0.1M, pH 7.4, 5min y, tras otro lavado por inmersión en agua ultrapura, se montaron sobre portaobjetos empleando la solución de montaje ProLong Antifade con DAPI. Los portaobjetos montados se dejaron secar en oscuridad durante 12h y se almacenaron posteriormente a 4°C.

La adquisición de imágenes se realizó secuencialmente para cada canal en un microscopio Nikon Eclipse TE-2000S equipado con un objetivo de inmersión en aceite Nikon CFI plan Apo VC 60x y una cámara CCD modelo iXonEM+DU885. Las imágenes se procesaron empleando ImageJ y se montaron con Adobe Illustrator. Los estudios de colocalización se realizaron de manera análoga a la explicada en el apartado 2.7.1.

2.7.3. Inmunohistofluorescencia

Los ratones adultos (2-5meses) de genotipo silvestre o WT se anestesiaron con un inyección intraperitoneal de ketamina (40mg/kg)/xilacina (5mg/kg), y se sometieron a perfusión cardiaca con PBS 0.1M, pH 7.4 conteniendo heparina (5.5 mg/L), seguido de paraformaldehido (PFA) 4% en PBS 0.1M, pH 7.4. A continuación, se extrajo el encéfalo completo y se realizó la postfijación en PFA 4% en PBS 0.1M, pH 7.4 durante 12h a 4°C. Los órganos fijados fueron crioprotectados por medio de su inmersión en sacarosa 30% (p/v) a 4°C. Los encéfalos crioprotectados se cortaron en sentido coronal, fijándolos con *Tissue-Tek OCT*, en un criostato Leica CM1850 a -20°C. Se obtuvieron secciones de la corteza cerebral de 30 μ m de espesor, que se recogieron sobre portaobjetos polilisinados, dejándolas secar a temperatura ambiente durante 12h, para almacenarlas después a -80°C. Todas las etapas posteriores se realizaron a temperatura ambiente, salvo cuando se

especifique lo contrario. En el momento de empezar el proceso de inmunohistofluorescencia las secciones se lavaron por inmersión en PBS 0.1M, pH 7.4 y se bloquearon con una solución con suero de burro 5%, BSA 1% en PBS-TX100 0.25% durante 1h. Seguidamente, se realizó la incubación con los anticuerpos primarios diluidos en una solución con suero 5% en PBS-TX100 0.25%, 12h a 4°C. Se emplearon anticuerpos primarios anti-mGluR7a de conejo (1:50), anti-βAR1 de cabra (1:75) y sinaptofisina de ratón (1:400). A continuación, las secciones se lavaron en cubetas de tinción con PBS-TX100 0.25%, con un lavado por inmersión seguido de 2 lavados de 20min, y a continuación se incubaron con los anticuerpos secundarios diluidos en una solución con suero 5% en PBS-TX100 0.25%, durante 1h. Se utilizaron los anticuerpos secundarios Alexa488 de ratón y Alexa594 de conejo en los marcajes dobles; y Alexa488 de ratón, Alexa594 de cabra y Alexa647 de conejo en los marcajes triples (1:200). Posteriormente, los cortes fueron lavados en cubetas de tinción con PBS TX100 0.25% con un lavado por inmersión seguido de 2 lavados de 20min, realizando un último lavado con PBS 0.1M, pH7.4, durante 10min. Finalmente, se realizó el montaje con cubreobjetos rectangulares, empleando la solución de montaje ProLong Antifade con DAPI. Las secciones montadas se dejaron secar en oscuridad durante 12h y se almacenaron posteriormente a 4°C.

La adquisición de imágenes se realizó secuencialmente para cada canal en un microscopio confocal Olympus FV 1200. Las imágenes confocales fueron procesadas empleando ImageJ y montadas con Adobe Illustrator.

2.8. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN

La microscopía electrónica se basa en la emisión de un haz de electrones sobre la muestra, incrementando la capacidad de amplificación de un microscopio óptico o de fluorescencia convencional, limitadas a la longitud de onda de la luz. Existen diferentes técnicas de microscopía electrónica aplicables a muestras biológicas que permiten estudiar la ultraestructura de la sinápsis (Sikso et al., 2009), pero la más comúnmente empleada es la fijación química combinada con la microscopía electrónica de transmisión.

En esta técnica, las muestras biológicas son fijadas empleando fijadores químicos para su preservación y posteriormente deshidratadas. Además, debido al bajo poder de penetración de los electrones, las muestras deben ser preparadas en secciones ultrafinas, para lo que deben ser incluidas en una resina. Dado que de forma natural las muestras biológicas no interaccionan con el haz de electrones, estas deben ser tratadas con metales pesados que se concentran en ciertas estructuras celulares, fundamentalmente membranas y complejos macromoleculares. Los electrones que chocan con estos metales

rebotarán y no cruzarán el tejido, mientras que los electrones transmitidos inciden sobre una pantalla fluorescente, creando la imagen de las muestras.

2.8.1. Microscopía electrónica de sinaptosomas

Los sinaptosomas obtenidos de la corteza cerebral (apartado 2.1) de ratones adultos (1mg) se resuspendieron en HBM-BSA (0.91 mg/ml), y se mantuvieron en agitación a 37°C durante una hora, bajo los correspondientes tratamientos farmacológicos: isoproterenol (100µM, 10min), 8-pCPT (50µM, 10min), L-AP4 (1mM, 10min). Al acabar los tratamientos, los sinaptosomas se lavaron (16000g, 1min) y se resuspendieron (0.91mg/ml) en tampón fosfato Millonig 0.1M, pH 7.3, 37 °C, y se lavaron de nuevo (16000g, 1min) y se resuspendieron (1.82 mg/ml) en la solución fijadora con 4% paraformadehído y 2.5% glutaraldehído en Millonig 0.1M, pH 7.3, 4°C durante 2horas en agitación. Se juntaron varios tratamientos iguales para disponer al menos de 2mg de sinaptosomas en cada muestra. Acabada la fijación, los sinaptosomas se lavaron (2400g, 1min) y se resuspendieron en tampón fosfato Millonig 0.1M, pH 7.3, 4 °C. Este lavado se repitió tres veces. Los sinaptosomas se mantuvieron durante 12h en tampón fosfato Millonig 0.1M, pH 7.3 a 4°C. Para los pasos posteriores, los sinaptosomas sólo se centrifugaron (850g, 1-3min), cuando fue necesario para mantenerlos sedimentados. Las muestras se postfijaron en una solución de 1% OsO₄ con 1.5% K₃Fe(CN)₆ durante 1h a temperatura ambiente. A continuación, se deshidrataron en soluciones de acetona de concentración creciente (30,50,70,80,90,95,100% dos veces) durante 15min cada una. Los sinaptosomas se incluyeron en resina SPURR (*SPURR embedding kit*), incubándolos a temperatura ambiente con mezclas de acetona:resina, 3:1 durante una hora, 1:1 durante una hora, 1:3 durante 2 horas y en resina pura durante 12h. Las muestras se cambiaron nuevamente a resina pura y se polimerizaron a 70°C durante al menos 12h. Los bloques de resina polimerizados se cortaron en un ultramicrotomo Leica Ultracut E en secciones de 70nm y se tiñeron con acetato de uranilo y citrato de plomo. Se tomaron imágenes aleatorias de los sinaptosomas a 80000 aumentos con un microscopio electrónico de transmisión Jeol 1010. Las imágenes se analizaron con el programa Image J y los datos se procesaron usando Origin 8.0. Se midió la distancia desde el exterior de la membrana de cada SVs al interior de la membrana de la zona activa en la zona más cercana a la SV estudiada (0.72 nm/px a 80000 aumentos). Las zonas activas se identificaron por la distribución de las SVs y por la presencia de restos de membrana postsináptica y la densidad postsináptica. La distribución de las SVs se determinó según su distancia a la zona activa, cuantificando el porcentaje de SVs en cada intervalo de 10nm. Además, se determinó el número de SVs por cada zona activa.

2.8.2. Inmunomicroscopía electrónica con partículas de oro en rodajas de corteza cerebral

El marcaje con partículas de oro de rodajas de tejido cerebral se realizó con el método de *pre-embedding* descrito por Luján et al., 1996. Para ello, se anestesiaron tres ratones adultos (P60) y se sometieron a perfusión cardiaca con una solución de fijación con 4% de paraformaldehído, 0.05% de glutaraldehído y 15% (v/v) de ácido pícrico en PB 0.1M, pH 7.4. Después de la perfusión, se extrajeron los cerebros y se lavaron en PB 0.1M, obteniendo los cortes coronales con un vibratomo Leica V1000. Las secciones se incubaron en flotación en TBS con 10% (v/v) de suero de cabra (NGS), y a continuación, con el anticuerpo de cabra anti-receptores β_1 -adrenérgicos (3-5 $\mu\text{g/ml}$) diluido en TBS con 1% NGS. Después de varios lavados con TBS, las secciones se incubaron con el anticuerpo secundario de conejo anti-cabra conjugado con partículas de oro de 1.4 nm. Seguidamente, las secciones se sometieron a post-fijación con una solución con 1% de glutaraldehído y se lavaron con agua destilada. Se recubrieron las partículas de oro con plata con el fin de aumentar su tamaño, para lo que se utilizó el kit HQ Silver. Las secciones se trataron con OsO_4 1% en PB 0.1M, se tiñeron con acetato de uranilo y se deshidrataron en concentraciones crecientes de EtOH, para ser incluidas en resina Durpupan. Las regiones de interés se cortaron en secciones de 70-90nm con un ultramicrotomo Reichert Ultracut, se recogieron sobre rejillas de cobre recubiertas de pioloform, y se tiñeron con acetato de uranilo 1% y citrato de plomo de Reynolds. Su ultraestructura se analizó con un microscopio electrónico de transmisión Jeol 1010.

El procedimiento de cuantificación de la abundancia de receptores β_1 -adrenérgicos fue similar al empleado en Luján et al., 1996. Se eligieron áreas aleatoriamente de la capa III-V de la corteza cerebral de aproximadamente $1500\mu\text{m}^2$ a 45000 aumentos, que presentaban un buen marcaje con partículas de oro, todas ellas a una similar distancia de la superficie del bloque y cercanas a la superficie, para minimizar falsos negativos. Sólo se cuantificaron las partículas de oro situadas en la membrana de los terminales axónicos que contactaban con dendritas. Se estudiaron un total de 811 terminales axónicos. De estos, sólo 155 terminales axónicos fueron inmunopositivos para los receptores β_1 -adrenérgicos, mostrando un total de 318 partículas de oro. Además, estas partículas se cuantificaron para determinar el porcentaje de receptores β_1 -adrenérgicos en la zona activa y en sitios extrasinápticos.

2.9.ELECTROFISIOLOGÍA

Las técnicas de electrofisiología de *patch-clamp* permiten estudiar la corriente generada por el flujo de iones en una única célula, a través de la inserción de un electrodo

en la membrana plasmática de la misma. La aplicación de estas técnicas en neuronas permite no sólo despolarizar las neuronas presinápticas, para inducir la liberación de neurotransmisores, sino también registrar la señal eléctrica provocada por el flujo de iones en la neurona postsináptica. Esto hace que estas técnicas constituyan uno de los procedimientos más ampliamente utilizados para el estudio funcional de la neurotransmisión en células vivas.

Para los estudios de electrofisiología se emplearon cultivos hipocampales autápticos (apartado 3.6.2), crecidos sobre islas de astrocitos (8-17DIV). Estos cultivos permiten estimular y registrar la respuesta en la misma neurona. Las neuronas autápticas se identificaron empleando un microscopio invertido Axiovert135. Estas neuronas se perfundieron en medio Base+ a temperatura ambiente (NaCl 140mM, KCl 2.4mM, Hepes 10mM, D(+)-glucosa 10mM, CaCl₂ 4mM, MgCl₂ 4mM; pH 7.4; 320 mOsm) y se mantuvieron en fijación de voltaje en configuración de célula completa (*voltaje clamp, whole-cell*) a -70mV con un amplificador HEKA EPC9 y una interfaz HEKA TIB14S, controlado por el programa PatchMaster v2. Se utilizaron micropipetas de borosilicato con una resistencia de 2.5-3.5 MΩ. La composición de la solución intracelular fue KCl 136mM, Hepes 17.8mM, EGTA 1mM, ATP/GTP; pH 7.4; 320 mOsm. Las distintas soluciones con fármacos se prepararon en medio Base+ y se perfundieron a temperatura ambiente, con un sistema perfusión rápida con micropipetas de 6 canales, controlado por el programa PatchMaster v2 a través del controlador de apertura VC-6 y de posición SF-77B.

La liberación inducida por despolarización, correspondiente a los EPSC/IPSC, se determinó despolarizando de -70 a 0mV durante 2ms, cada 5s. La presencia de los receptores metabotrópicos de tipo III en las células estudiadas se determinó, aplicando el agonista L-AP4 200μM durante un minuto, y esta se manifestó en algunas células como una rápida disminución de la amplitud de los EPSC/IPSC, que se revirtió rápidamente tras el lavado del fármaco. Las neuronas que no mostraron respuesta a L-AP4 fueron descartadas, de manera que todos los estudios realizados corresponden sólo a neuronas que muestran sensibilidad a la inhibición por L-AP4.

La variación en los EPSC por la acción prolongada de L-AP4 se estudió aplicando despolarizaciones a 0mV durante 2ms cada 5s, y registrando 5min para la estabilización de la línea base y 15min en presencia de L-AP4.

La liberación espontánea se determinó en presencia del bloqueante de los canales de Na⁺, tetrodotoxina (TTx, 300nM), para evitar la generación de potenciales de acción, así como del bloqueante de los VDCC, cadmio (CdCl₂, 100μM), para evitar la posible participación y modulaciones de estos canales. Se hicieron registros consecutivos de 100s de duración de la actividad espontánea basal (11min y 40s), la actividad durante la

aplicación de L-AP4 200 μ M (11min y 40s) y la actividad después del lavado del fármaco (23min y 20s).

El número de vesículas preparadas para la fusión (RRP) se determinó mediante la perfusión de una solución de sacarosa 0.5M en medio Base+. La sacarosa se aplicó antes de la aplicación de L-AP4 y tras los 23min después del lavado de fármaco.

Se estudió tanto la transmisión glutamérgica como la GABAérgica, diferenciándolas por el tiempo de caída de los EPSC/IPSC (*decay time*). Todos los estudios de electrofisiología fueron realizados a temperatura ambiente.

Los registros obtenidos se transformaron a formato .abf empleando los programas IgorPro y ABFutilities, y se procesaron con el programa Axograph4.1. La amplitud de los EPSC/IPSC se midió ajustando la línea base antes de la despolarización y determinando el mínimo del evento. En las medidas de la variación de los EPSC por aplicación de L-AP4, se corrigió la caída de la amplitud inherente (*run-down*) a partir del ajuste lineal de esta caída. Las amplitudes se normalizaron al valor medio de los EPSC registrados durante los 60s antes de empezar la aplicación del agonista.

Las medidas de la liberación espontánea se estudiaron en registros de 100s. Los eventos espontáneos se filtraron, descartando las señales fuera del rango 0.5-1000Hz, y se detectaron automáticamente a partir de la función modelo $f(t) = \exp(-t/\text{tiempo de subida}) - \exp(-t/\text{tiempo de caída})$, ajustada a los parámetros de línea base 5ms, longitud 20ms, amplitud -20/-40pA, tiempo de subida 0.5/1ms y tiempo de caída 3/10ms, para neuronas glutamatérgicas/GABAérgicas, respectivamente. Se detectaron eventos espontáneos separados al menos por 1ms, con una línea base de 5ms, una longitud de 30ms y con un umbral correspondiente a la desviación estándar del ruido $\times -3.5$. De estos, se seleccionaron sólo los de amplitudes mayores de 8-15 pA, mediante el examen visual de los eventos para cada célula, y tiempo de subida (20-80%) entre 0.2 y 1.5ms. La frecuencia de la liberación espontánea (Hz) se calculó a partir del número de eventos detectados en los 100s de registro. Los eventos detectados fueron promediados para calcular la amplitud media de los mismos, procediendo igual que con los EPSC.

En los registros en los que la transmisión sináptica se indujo con sacarosa, se determinó el área de la curva, ajustando la línea base después de la despolarización. El RRP se puede calcular por la relación entre un EPSC y la despolarización inducida por sacarosa. Sin embargo, dado que la presencia de Cd²⁺ bloquea la generación de EPSCs, la variación del RRP por el tratamiento con L-AP4, se estimó como la relación entre el área de la despolarización inducida por sacarosa antes de la aplicación del fármaco y 20 minutos después de su lavado.

2.10. IMAGEN EN CULTIVOS PRIMARIOS CON vGlut1-pHluorina.

Las sinapto-pHluorinas son proteínas de la membrana de las vesículas sinápticas, en las que sus dominios intraluminales han sido modificados por la unión a proteínas verdes fluorescentes (del inglés *green fluorescence proteins*, GFPs; $\lambda_{ex/em}=475/509\text{nm}$) sensibles al pH, es decir, que su fluorescencia se apaga a pHs ácidos (pHluorinas eclípticas). El lumen de las vesículas sinápticas presenta cambios de pH asociados a las diferentes etapas del ciclo vesicular. El almacenamiento de neurotransmisores en las vesículas sinápticas implica un co-transporte de protones, de manera que el interior de las vesículas sinápticas en reposo y cargadas con neurotransmisores está acidificado. La exocitosis implica la apertura del lumen vesicular al medio extracelular, de modo que el pH de la vesícula sináptica pasa a ser neutro. La posterior endocitosis y relleno de las vesículas con neurotransmisor supone la reacidificación del lumen vesicular. De esta manera, las sinapto-pHluorinas no emiten fluorescencia en el interior de las vesículas sinápticas en reposo, fluorescen en el proceso de exocitosis y pierden su fluorescencia como consecuencia de la reacidificación que sigue a la endocitosis (Fig. 3.8). Por lo tanto, los cambios en fluorescencia de estas proteínas permiten estudiar los procesos de exocitosis y reciclamiento de las vesículas sinápticas en sinapsis individuales. Además, el empleo de NH_4Cl , que puede neutralizar el lumen de todas las vesículas sinápticas presentes en un terminal sináptico de manera independiente de la exocitosis (Figura 3.8), permite determinar la fluorescencia correspondiente a todas las vesículas sinápticas del terminal, y por tanto, estimar la fracción de vesículas sinápticas movilizadas durante la exocitosis (Miessenbock et al., 1998; Sankaranarayanan y Ryan, 2000; Burrone et al., 2006).

La vGlut1-pHluorina es uno de los tipos de sinapto-pHluorinas empleadas para monitorizar los procesos de exocitosis y reacidificación asociada a la endocitosis en sinápsis glutamatérgicas. Esta proteína tiene una pHluorina supereclíptica (denominada así por ser una EGFP o *enhanced GFP*), unida a la proteína vGlut1 (transportador vesicular de glutamato de tipo 1), entre los bucles 1 y 2 transmembrana orientados hacia la cara luminal de las vesículas sinápticas (Voglmaier et al., 2006).

La Bafilomicina A1 es un inhibidor de la ATPasa vacuolar de protones que se utiliza como herramienta para evitar la reacidificación de las vesículas sinápticas después del proceso de exocitosis (Fig. 3.8). Así, la adición de Bafilomicina A1 evita el apagado de la fluorescencia de las sinapto-pHluorinas después de la exocitosis, y por tanto, produce una señal de fluorescencia indicativa de la magnitud de la exocitosis en ausencia de la endocitosis (Burrone et al., 2006).

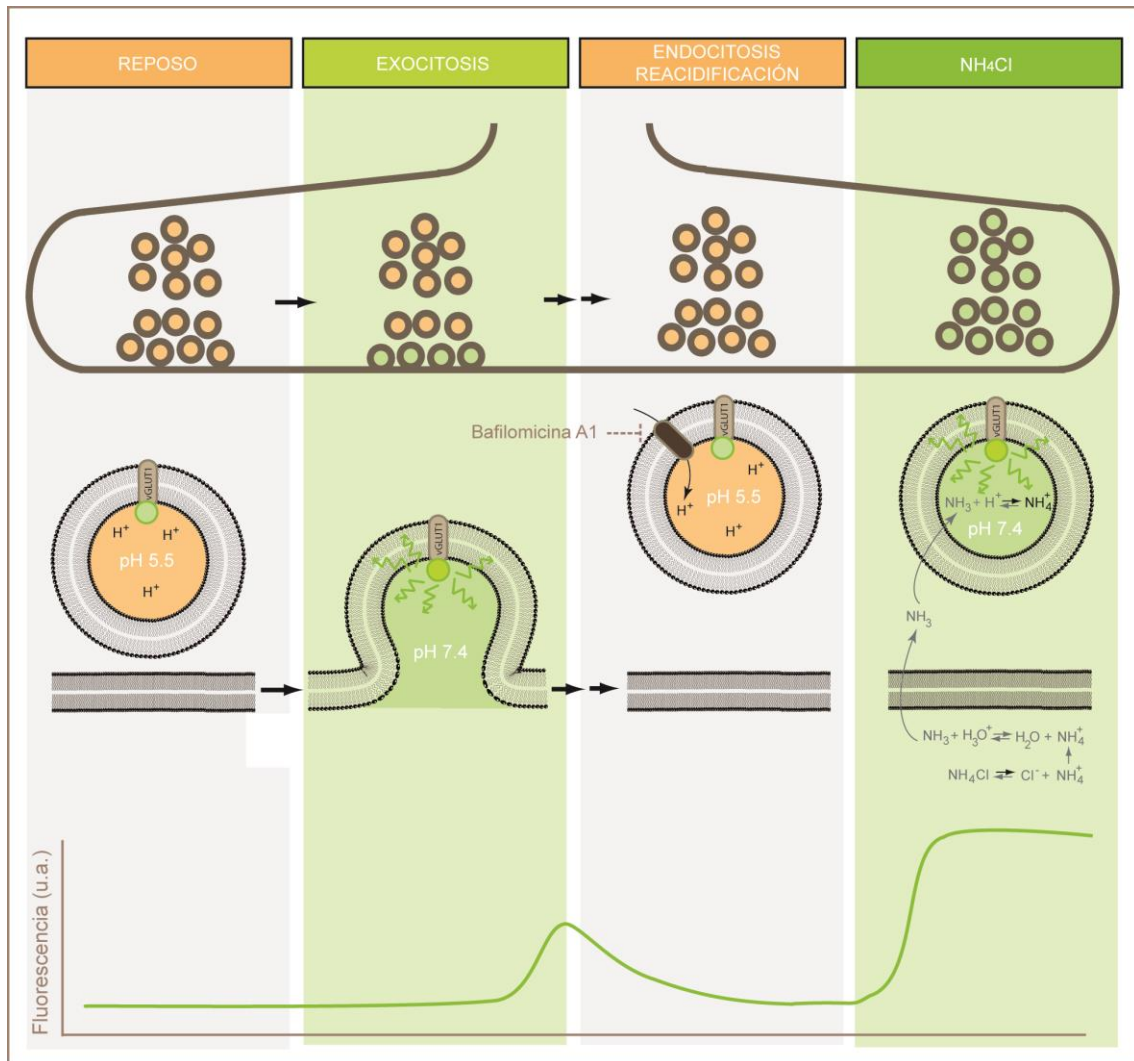


Figura 3.8. vGlut1-pHluorina. Esquema que representa los cambios de fluorescencia de la vGlut1-pHluorina durante la exocitosis y el reciclamiento vesicular. La aplicación de NH_4Cl permite neutralizar el lumen de todas las SVs de manera independiente de la exocitosis. La bafilomicina A1 es un inhibidor ATPasa vacuolar de las SVs, que evita la reacidificación de las mismas, y por tanto, el apagado de la fluorescencia de la pHluorina.

2.10.1. Estudio de la liberación espontánea

La liberación espontánea en terminales glutamatérgicos se estudió con vGlut1-pHluorina, según el método descrito por Hua et al., 2011. Este procedimiento se basa en determinar la acumulación de fluorescencia en presencia de Bafilomicina A1, en condiciones de bloqueo de la generación espontánea de potenciales de acción con el bloqueante de los canales de Na^+ , TTx. De esta manera, el incremento de fluorescencia observado representa las vesículas sinápticas que se han fusionado de manera espontánea (Fig. 3.9.A).

Las neuronas corticales (14-20DIV, apartado 2.6.1) transfectadas con los plásmidos que codifican las proteínas vGlut1-pHluorina y mCherry bajo el promotor de la CaMKII α , y sembradas sobre cubreobjetos de 15mm, se incubaron en medio HBM-Ca (HBM suplementado con CaCl₂ 1.33mM) 10min a 37°C. Seguidamente, el cubreobjetos se montó en una cámara de perfusión RC20 sobre una plataforma PH5 termostatzada acoplada a un adaptador de pletina SA-NIK. El sistema de flujo laminar se selló colocando otro cubreobjeto de 15mm sobre el cubreobjetos con las células adheridas, asegurándolo con un anillo CR15 (volumen de la cámara 36 μ L). La cámara de perfusión se montó en un microscopio Nikon Eclipse TE-2000S equipado con un objetivo inmersión en aceite Nikon CFI plan Apo VC 60x y una cámara CCD modelo iXonEM+DU885, operada con el programa Andor IQ. Las células se mantuvieron en perfusión continua de HBM-Ca atemperado a 37°C (1ml/min). Las neuronas se identificaron por la fluorescencia de mCherry ($\lambda_{ex/em}$ =587/610nm), comprobándose la presencia de vGlut1-pHluorina en compartimentos acidificados por la perfusión de HBM-NH₄Cl, durante 5s. Las células se mantuvieron otros 5min en perfusión de HBM-Ca antes de comenzar el experimento detallado en la Fig. 3.9.A. Las neuronas se perfundieron con TTx (1 μ M) en HBM-Ca un minuto antes de comenzar el registro de fluorescencia, tomándose una imagen cada 15s (parámetros detallados en la Fig. 3.9.E). Después del registro de fluorescencia en presencia de TTx durante 5min, las células se trataron con Bafilomicina A1(500nm) y TTx(1 μ M) en HBM-Ca durante 5min y 30s. A continuación, se perfundió TTx(1 μ M) en HBM-Ca durante 30s más y, finalmente, las células se expusieron a HBM-NH₄Cl, durante 2 minutos. En el caso de los tratamientos farmacológicos con isoproterenol (100 μ M) u 8-pCPT (50 μ M), se procedió tal como se muestra en la Fig. 3.9.A. Las células se trataron en perfusión antes de comenzar el registro de fluorescencia con TTx(1 μ M) en HBM-Ca durante 30s, continuando la perfusión de los medios con el fármaco de manera análoga a los controles.

La secuencia de imágenes de estos experimentos se procesó con el programa ImageJ para alinear las imágenes (*plugging Stack reg*) y corregir el fondo (*plugging Background substration from ROI*). A continuación se empleó la rutina SARFIA (método *Response*) del programa IgorPro para seleccionar de manera automática los ROIs mayores de 5pixels que mostraron una respuesta de aumento de fluorescencia a la perfusión de NH₄Cl. Esta selección de ROIs se transformó en una máscara en ImageJ, ajustando el *Threshold* entre 1-255, y usando la herramienta *Analyze particles* sin restricción de tamaño, determinándose los valores de fluorescencia (*mean gray value*) de los distintos ROIs en todas las imágenes del experimento. Los registros de florescencia obtenidos se ajustaron a la línea base y se normalizaron frente al máximo de fluorescencia obtenido por la perfusión de NH₄Cl. Se seleccionaron sólo los registros de ROIs positivos para mCherry, cuya florescencia fuera mayor que el 15% de la media de la florescencia de

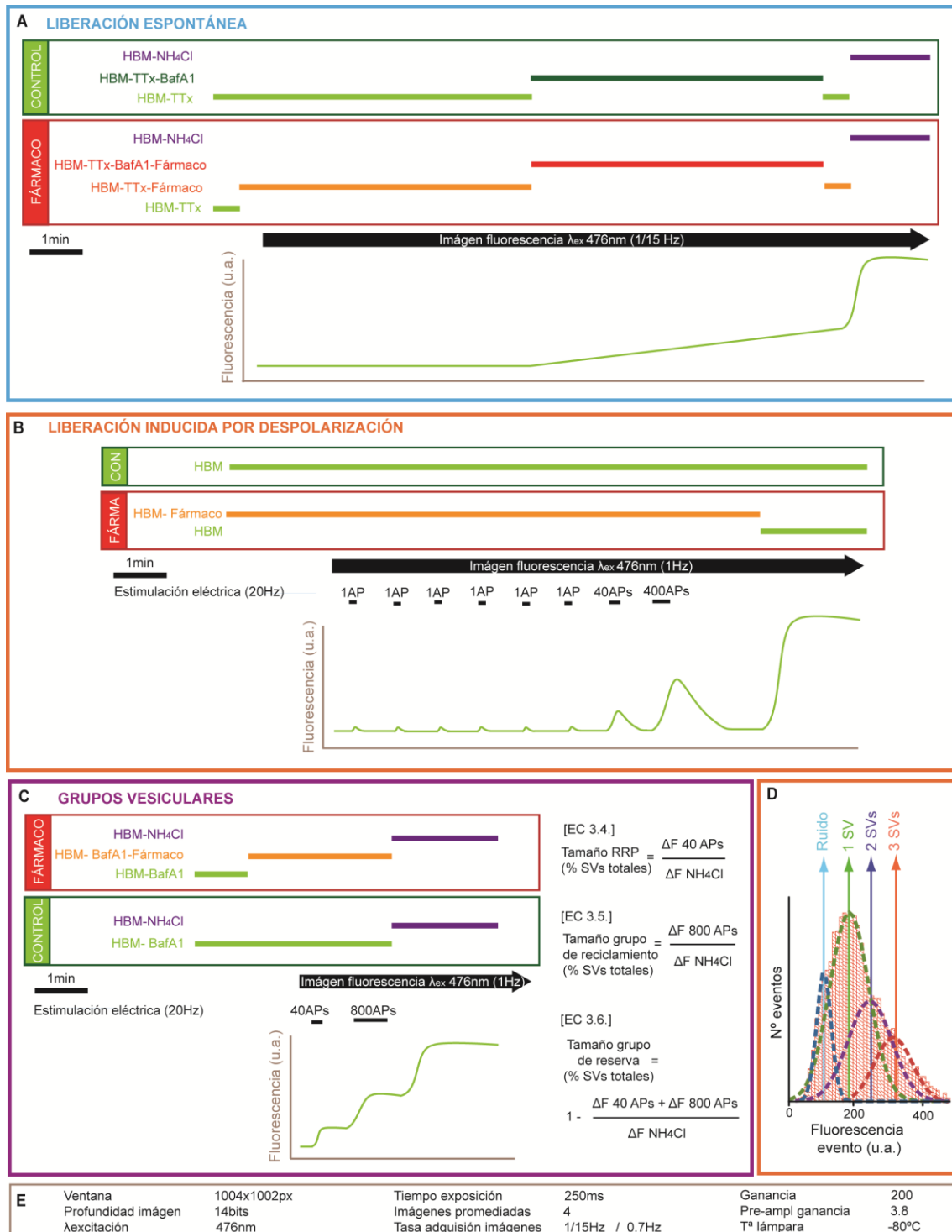


Figura 3.9. Protocolos de perfusión de fármacos, de estimulación eléctrica y registros de fluorescencia esquematizados de los experimentos con vGlut1-pHluorina. (A) Estudio de la liberación espontánea en presencia de TTx. La perfusión de bafilomicina A1 permite determinar la tasa de liberación espontánea a partir de la acumulación de fluorescencia de la vGlut1-pHluorina correspondiente a la fusión espontánea de SVs. (B) Estudio de la liberación inducida. Por medio de la estimulación eléctrica de campo es posible determinar la liberación de una única SV, así como liberaciones submáximas (40 y 400APs) que permiten analizar parámetros de exocitosis y endocitosis. (C) Estudios de los grupos vesiculares. Es posible analizar el tamaño de los grupos o *pools* en los que se dividen las SVs del terminal presináptico por medio de la perfusión de bafilomicina A1 y la estimulación eléctrica de campo. Estímulos de 40APs se asocian con el RRP, mientras que el grupo de reciclamiento se corresponde con estímulos máximos (800APs). En todos los casos, la perfusión de NH₄Cl induce valores máximos de fluorescencia, correspondiéndose con la emisión de toda la vGlut1-pHluorin localizada en las SVs. (D) Ajuste a múltiples gaussianas de las respuestas a estimulaciones de un AP empleado para determinar la tasa de acierto. (E) Parámetros de adquisición de imágenes.

todos los ROIs del campo. Los registros se filtraron manualmente usando el programa Origin 8.0., eliminando los registros con perfiles anómalos. Los registros correspondientes a la línea base sin Bafilomicina A1 (0-300s) y al incremento de fluorescencia con Bafilomicina A1 (330-630s), fueron normalizados a la fluorescencia máxima por perfusión del NH_4Cl ($\Delta F/F_{\text{int}}$), y ajustados de manera independiente a una línea recta obteniendo como dato el valor de la pendiente (s^{-1}). Las pendientes individuales de los botones fueron representadas como histogramas de frecuencias para cada una de estas fases, calculando la pendiente media como el valor central de la distribución gaussiana de ajuste de los datos. Finalmente, la tasa de liberación espontánea se calculó como la diferencia entre la pendiente media del tratamiento con Bafilomicina A1 y la pendiente sin tratar con este fármaco.

2.10.2. Estudio de la liberación inducida por despolarización.

Los cambios en la señal de fluorescencia de vGlut1-pHluorina permitieron estudiar la liberación inducida por despolarización con la ayuda de un estimulador eléctrico de campo (Fig. 3.8.B). Así, es posible determinar cómo afectan los tratamientos farmacológicos a estímulos eléctricos de magnitud variable, de acuerdo al número de potenciales de acción (APs) aplicados (Burrone et al., 2006). Además, se estimó la probabilidad de liberación determinando el número de respuestas exocitóticas a estímulos de un único AP (Balaji y Ryan, 2007).

Las neuronas corticales (14-20DIV, apartado 2.6.1), transfectadas con los plásmidos que codifican la expresión de las proteínas vGlut1-pHluorina y mCherry bajo el promotor de la CaMKII α , y sembradas sobre cubreobjetos de 25mm, fueron incubadas en medio HBM-Ca (HBM suplementado con CaCl_2 1.33mM) durante 10min a 37°C. Seguidamente, el cubreobjetos con las neuronas adheridas se montó en una cámara de perfusión RC-21BRFS provista de electrodos, sobre una plataforma PM2 termostatizada, acoplada a un adaptador de pletina SA-NIK. El sistema de flujo laminar se selló colocando otro cubreobjeto de 25mm sobre el cubreobjetos con las células adheridas, asegurándolo con una placa imantada perteneciente a la plataforma (volumen de la cámara 263 μL). La cámara de perfusión se conectó a un estimulador eléctrico Cibertec CS-20 y se montó en un microscopio Nikon Eclipse TE-2000S equipado con un objetivo inmersión en aceite Nikon CFI plan Apo VC 60x y una cámara CCD modelo iXonEM+DU885, operada con el programa Andor IQ. Las neuronas se sometieron a estimulación de campo, aplicando distinto número de AP a 20Hz de 1ms de duración (intervalo 49ms) y 10V/cm (35mA en el sistema empleado). Las células, mantenidas en perfusión continua de HBM-Ca atemperado a 37°C (1ml/min), se identificaron por la fluorescencia de mCherry, comprobándose la presencia de vGlut1-pHluorina en compartimentos acidificados por

medio de la estimulación eléctrica por 100APs a 20Hz. Las células se mantuvieron otros 5min en perfusión de HBM-Ca antes de comenzar el experimento detallado en la Fig. 3.8. B. El registro de fluorescencia se realizó captando imágenes cada 1.4s (parámetros detallados en la Fig. 3.8. E). Las células se sometieron a 6 estímulos de 1AP a 20Hz (a tiempos 0:20, 1:10, 2:00, 2:50, 3:40, 4:30min), siendo estimuladas a continuación con 40APs a 20Hz (5:20min) y 400APs a 20Hz (6:10min), perfundiendo finalmente NH₄Cl a los 8:30min. En el caso de los tratamientos farmacológicos, las neuronas se trataron un minuto antes de comenzar el registro de fluorescencia con el correspondiente fármaco en HBM-Ca, manteniendo la perfusión de este medio hasta la perfusión del NH₄Cl.

Los registros de fluorescencia se obtuvieron tal como se detalla en el apartado anterior. Las liberaciones inducidas por despolarización se normalizaron respecto al total de vesículas sinápticas, correspondiente a la fluorescencia obtenida con NH₄Cl para cada botón individual. Las cinéticas de exo- y endocitosis fueron calculadas normalizando las respectivas respuestas respecto a su máximo, y ajustando los registros a una ecuación exponencial $y=y_0+A.e^{-X/\tau}$ para la endocitosis, y $y=y_0-A.e^{-X/\tau}$ para la exocitosis, donde τ es la constante de exo-/endocitosis. La fluorescencia correspondiente a la exocitosis de una única vesícula sináptica se calculó ajustando el histograma de frecuencias de las respuestas a 1AP de todos los botones del campo a cuatro curvas gaussianas empleando el Origin 8.0 (herramienta *Fit Multi-peaks*). Se estimó que el máximo de las distintas curvas corresponde, de menor a mayor fluorescencia, a la señal del ruido y la liberación de 1, 2 o 3 SVs (Fig. 3.9. D; Balaji y Ryan, 2007). Se consideró como respuesta positiva aquella que sobrepasaba el umbral de fluorescencia, determinado para cada experimento, como el valor medio entre la fluorescencia de una SVs y del ruido. El valor de la tasa de aciertos fue estimado como la relación de respuestas respecto al número de estímulos.

2.10.3. Estudio del tamaño de los grupos de vesículas sinápticas.

Las SVs del terminal presináptico se dividen en distintos grupos funcionales (*Introducción 1.3*). El tratamiento con Bafilomicina A1 permite estudiar el tamaño de los grupos de vesículas sinápticas, de acuerdo al método descrito por Burrone et al., 2006. Así, los estímulos eléctricos de poca intensidad (40APs a 20Hz, para neuronas corticales) dan lugar a la liberación del grupo de vesículas sinápticas preparadas para liberarse (RRP), mientras que estímulos máximos (800APs a 20Hz, para neuronas corticales) liberan todas las vesículas susceptibles de participar en el proceso de exocitosis (grupo de reciclamiento). En presencia de Bafilomicina A1, que impide la reacidificación de las SVs, estos estímulos dan lugar a un máximo estable de fluorescencia (Fig. 3.8.C), que

comparado con la señal del NH_4Cl , correspondiente a la totalidad de SVs, permite estimar el tamaño de los correspondientes grupos o *pools* vesiculares.

Las neuronas corticales (14-20DIV; apartado 2.6.1.), transfectadas con los plásmidos que codifican la expresión de las proteínas vGlut1-pHluorina y mCherry bajo el promotor de la $\text{CaCMKII}\alpha$, y sembradas sobre cubreobjetos de 25mm, se prepararon para el experimento de la manera descrita en el apartado anterior. Las neuronas se sometieron a estimulación de campo, aplicando distinto número de AP a 20Hz de 1ms de duración (intervalo 49ms) y 10V/cm (35mA en el sistema empleado). Las neuronas se trataron con Bafilomicina A1 en HBM-Ca 2min antes de empezar el registro de fluorescencia. A continuación, se estimularon con 40APs a 20Hz (0:20min) y 800APs a 20Hz (0:40min), perfundiendo finalmente (1:30min) HBM- NH_4Cl durante un minuto y medio. En el caso de los tratamientos farmacológicos, las neuronas se trataron con Bafilomicina A1 en HBM-Ca 2min antes de comenzar el registro de fluorescencia durante 1minuto. A continuación, se perfundió con fármaco/Bafilomicina A1 en HBM-Ca durante un minuto, y se mantuvo el tratamiento hasta la perfusión de HBM- NH_4Cl (Fig. 3.8.C).

Los registros de fluorescencia se obtuvieron tal como se detalla en los apartados anteriores. El tamaño de los grupos vesiculares se calculó de acuerdo a la fluorescencia obtenida por los correspondientes estímulos eléctricos, 40 APs para el RRP y 800APs para el grupo de reciclamiento. El tamaño porcentual de cada grupo fue calculado respecto al total de SVs, correspondiente a la señal de fluorescencia del NH_4Cl . Además, se estimó el tamaño del grupo de reserva o RtP como la diferencia entre el incremento de fluorescencia por estos dos estímulos y la fluorescencia de todas las SVs por perfusión del NH_4Cl (Fig. 3.8.C; EC. 3.4, 3.5 y 3.6).

2.11. GENOTIPADO

El DNA procedente de los ratones carentes de la subunidad α_{1B} de los VDCC tipo N, carentes de la proteína RIM1 α y con la mutación H567K de Munc13-1 se aisló con el kit comercial *Wizard SV Genomics DNA Purification System*. Los ratones se marcaron para su identificación en el momento del destete (P21) empleando chapas numeradas de oreja (*ear tags*) o chips intradérmicos ID-100/162. En el momento del destete además se obtuvieron muestras de tejido de oreja (aproximadamente 3x2mm). Estas muestras de tejido fueron digeridas en 275 μL del tampón de lisis, suplementado con EDTA 100mM, pH 8.0, RNAasa A 182 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Proteinasa K 1.46 mg/ml , durante 16-18h a 55°C, y 300rpm. La purificación de DNA se realizó a temperatura ambiente. A continuación, las soluciones digeridas se centrifugaron (6000g, 5min), descartando el precipitado correspondiente a

restos de tejido, y añadiendo al sobrenadante 250µL de tampón de lisis. Esta solución se transvasó a minicolumnas de afinidad de sílice, que retuvieron el DNA tras su centrifugación (16000g, 5min). Las columnas se centrifugaron de nuevo (16000g, 1min) tras añadirles 650µL de la solución de lavado con etanol al 60%, repitiendo el proceso 4 veces, y realizando a continuación otra centrifugación (16000g, 1min) sin añadir ninguna solución a la columna. Finalmente, se eluyó el DNA purificado por medio de la adición de 250µL agua estéril libre de DNAasas a 55°C, que fue mantenida en la columna 2min y posteriormente centrifugada (16000g, 1min). Para aumentar el rendimiento, se transvasó de nuevo el agua eluída a la columna, esperando 2min antes de centrifugar (16000g, 1min), obteniendo finalmente el DNA purificado. El proceso de la extracción de DNA descrito se muestra en la Fig.3.10.

Cuando se necesitó genotipar ratones P1, para cultivos celulares, los ratones se marcaron con rotulador y se obtuvieron muestras de tejido de la cola (aproximadamente 2-3mm). El tejido se mantuvo a -80°C durante 15min y el DNA fue extraído, empleando el kit comercial, pero realizando la digestión durante una hora a 1300rpm, o por medio de la precipitación del DNA. En estos casos, el tejido fue digerido en 500µL tampón tail, compuesto por SDS 0.1% (p/v), NaCl 200mM, Tris 20mM, EDTA 2.5, proteinasa K 1mg/ml, a pH 8, durante una hora a 56°C y 1300rpm. Las soluciones digeridas se

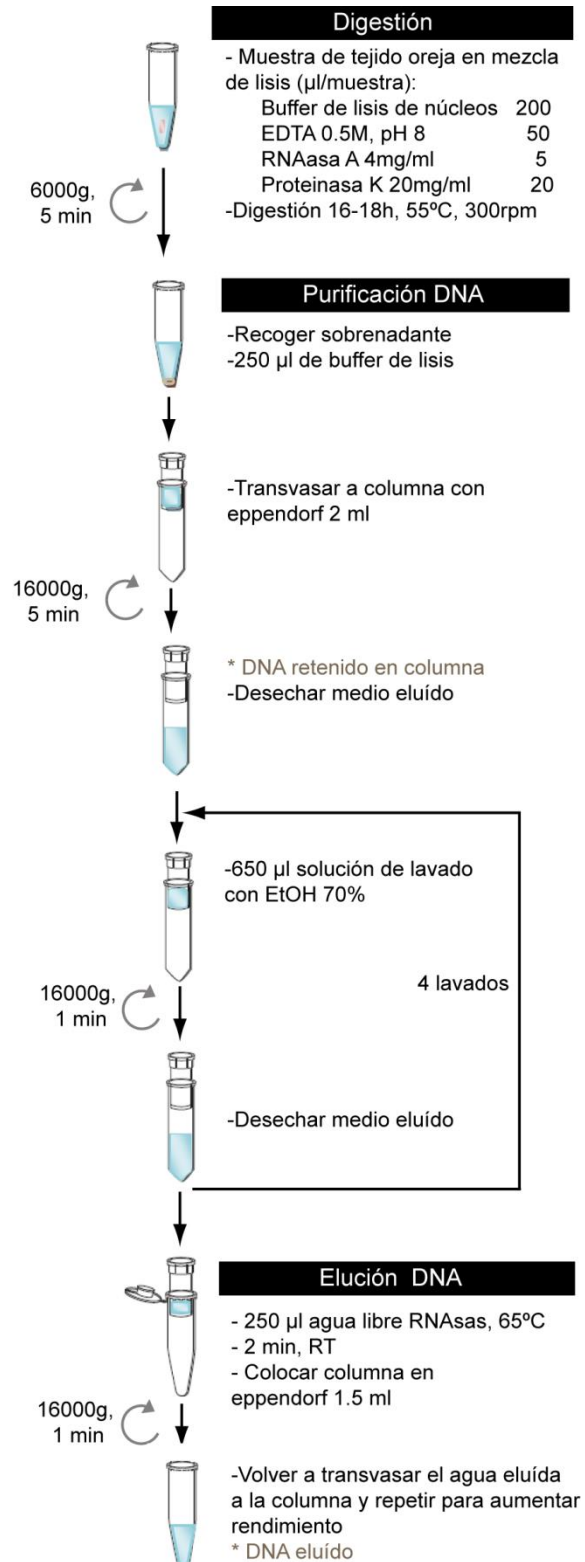


Figura 3.10. Genotipado. Protocolo de extracción del DNA a partir de tejido empleando el kit comercial Wizard SV Genomics DNA Purification System.

centrifugaron (16000g, 10min), descartando el sedimento correspondiente a restos de tejidos, y mezclando el sobrenadante con 0.7 volúmenes de isopropanol para precipitar el DNA. La mezcla se centrifugó (16000g, 5min), y los sedimentos de DNA se lavaron con 0.6 volúmenes de etanol 70%. La suspensión se centrifugó (16000g, 5min), retirado el sobrenadante y dejándolo secar (5-10min). Finalmente, el precipitado de DNA se resuspendió en 20µL de agua estéril libre de DNAsas a 55°C.

Las muestras con DNA se almacenaron a -80°C. Las secuencias correspondientes de DNA para identificar los alelos mutados se amplificaron por PCR de acuerdo a las condiciones detalladas en la Tabla 3.7. Las secuencias de DNA amplificadas se resolvieron en geles de agarosa 2% en tampón TAE con SYBR Safe y se revelaron empleando el equipo de imagen Fluor-S Multimager.

	KO $\alpha 1B$ VDCC tipo N	KO RIM1 α	Munc13-1 H567K
Referencia	Ino et al., 2001	Schoch et al., 2002	Rhee et al., 2002
Oligos	NP6: 5'-TGGCACCTTATGCCTTGACGGTGCCTGGC-3' NP8: 5'-GGTCGAGATGCTTGGGGACCCGTTGGGA-3' AGN2: 5'-GCCTGCTTGGCGAATATCATGTGGTGAAT-3'	1774: 5'-GGGAGGCAGAGCATCATGAGAGACTG-3' 1773: 5'-GCTTCACTTGGCGCTGCATATCTCAC-3' 1808: 5'-CAACTGTGGCTGTGCACTTGGCG-3' 676: 5'-GAGCCGCGCGGGAGTTGTTGAC-3'	0849: 5'-CAGCCTGTTCTCCCTCTGTCTTG-3' 1302: 5'-GTCCGAGACTCCCGGTTACATAC-3'
Secuencias	$\alpha 1B$ (-) 600pb $\alpha 1B$ (+) 500pb	RIM1 α (-) 300pb RIM1 α (+) 700pb	WT 383pb H567K 460pb
Mezcla PCR	[µL/muestra]	[µL/muestra]	[µL/muestra]
H ₂ O estéril	11.1	10.3	9.5
5X GoTaq buffer	4.0	4.0	4.0
MgCl ₂ 25mM	1.2	1.2	2.0
dNTPs 10mM	0.4	0.4	0.4
Oligos 10µM	0.4	0.5	1.0
5µM			0.1
GoTaq Pol (5U/µL)	0.1	0.1	0.1
DNA genómico	2.0	2.0	2.0
Programa PCR	94°C, 5min 94°C, 1min 62°C, 1min 72°C, 1min 72°C, 7min 4°C, hold 30 ciclos	94°C, 5min 94°C, 1min 62°C, 1min 72°C, 1min 72°C, 7min 4°C, hold 30 ciclos	94°C, 3min 94°C, 30s 62°C, 30s 72°C, 1min 72°C, 7min 4°C, hold 34 ciclos

Tabla 3.7. Programas y mezclas de PCR para el genotipado de los ratones mutantes empleados.

IV. RESULTADOS

1. POTENCIACIÓN DE LA LIBERACIÓN DE GLUTAMATO POR RECEPTORES mGLU7

1.1.POTENCIACIÓN DE LA LIBERACION DE GLUTAMATO POR RECEPTORES mGlu7 EN SINAPTOSOMAS DE CORTEZA CEREBRAL.

Los receptores mGlu7 (*Introducción: 2.2.1.*) se localizan en la zona activa presináptica de las sinapsis glutamatérgicas, donde actúan como autoreceptores. Estos receptores reducen la liberación de glutamato por un mecanismo que implica la inhibición de los VDCC por medio de proteínas G triméricas Gi/o sensibles a PTx (Herlitze et al., 1996; Takahashi et al., 1996, Millán et al., 2002). Sin embargo, la activación prolongada de los receptores mGlu7 da lugar a la pérdida de la inhibición de la liberación de neurotransmisor (Pelkey et al., 2005; Martín et al., 2010). Aunque otros autores han propuesto que este fenómeno es debido únicamente a la pérdida de función de estos receptores como consecuencia de la internalización (Pelkey et al., 2005), nuestro grupo de investigación ha demostrado, en sinaptosomas cerebrocorticales, que la pérdida de la inhibición se debe al desarrollo de un mecanismo de potenciación de la liberación de glutamato que compensa el mecanismo inhibitorio (Martín et al., 2010). De esta manera, la incubación prolongada de los sinaptosomas con el agonista L-AP4, en condiciones en las que la liberación de glutamato es independiente de la modulación de los VDCC, produce una potenciación neta de la liberación de neurotransmisor. Este fenómeno depende de la activación de PLC, mediante una vía de señalización resistente a la toxina pertúsica y por tanto, que no implica a proteínas Gi/o. El DAG generado activa proteínas con dominios de unión a este segundo mensajero, distintas de PKC, como las proteínas Munc13. Además, el tratamiento de los sinaptosomas con L-AP4 promueve la translocación de Munc13 a la membrana de los terminales presinápticos, proceso que está relacionado con su activación (Martín et al., 2010).

Uno de los objetivos de este trabajo de investigación fue profundizar en el estudio de esta nueva vía de señalización del receptor mGlu7.

1.1.1. Los inhibidores del metabolismo de DAG reducen el tiempo necesario para el desarrollo de la potenciación por receptores mGlu7.

El mecanismo de potenciación de la liberación de glutamato por receptores mGlu7 necesita tiempos prolongados de incubación con el agonista L-AP4 para alcanzar su magnitud de desarrollo máxima (Martín et al., 2010), lo que sugiere que los receptores mGlu7 están débilmente acoplados a la vía de PLC que participa en esta respuesta.

El agonista ortostérico L-AP4 activa todos los receptores metabotrópicos de tipo III. Sin embargo, en sinaptosomas cerebrocorticales de ratones adultos, el único receptor

metabotrópico de tipo III que se expresa y modula la liberación de glutamato, es el receptor mGlu7 (Ladera et al., 2009; Martín et al., 2010). Por lo tanto, la modulación de la liberación observada por la aplicación de altas concentraciones de L-AP4 (1mM), en sinaptosomas cerebrocorticales de ratones adultos, se debe exclusivamente a la activación de los receptores mGlu7.

La vía canónica por la que los receptores mGlu7 inhiben la liberación de glutamato es la reducción de la actividad de los VDCC (Herlitze et al., 1996; Takahashi et al., 1996, Millán et al., 2002). Para poder estudiar el efecto neto de estos receptores en la potenciación de la liberación, sin la participación de los mecanismos de inhibición, determinamos la liberación de glutamato en condiciones en las que no participen los VDCC. Para ello, empleamos el ionoforo de Ca^{2+} ionomicina, que se inserta en la membrana plasmática, provocando la entrada de Ca^{2+} (McMahon y Nicholls, 1991). Así, el uso de bajas concentraciones de ionomicina (0-5-1 μM) da lugar a un aumento en la concentración de Ca^{2+} en los terminales presinápticos, que dispara la exocitosis de neurotransmisores modulando la maquinaria exocitótica. De esta manera, la exocitosis inducida por ionomicina es independiente de los VDCC, y por tanto, de la inhibición ejercida por los mGlu7 (Martín et al., 2010).

La aplicación de L-AP4 durante 30s, en los sinaptosomas cerebrocorticales, no potencia la liberación de glutamato inducida por ionomicina ($101\pm 3\%$ sobre el control, $n=6$, $p>0.05$; Fig. 4.1. A y B; control: $0.57\pm 0.02\text{nmol glu/mg}$ de proteína, $n=28$). Sin embargo, el tratamiento con el agonista por tiempos más largos provoca una potenciación progresiva que alcanza su máximo a los 10 minutos de tratamiento con L-AP4 ($198\pm 7\%$, $n=6$, $p<0.001$; Fig. 4.1. C, D e I).

El hecho de que el fenómeno de potenciación se desarrolle lentamente podría deberse a diversas causas. En primer lugar, podría existir un mal acoplamiento entre los receptores mGlu7 y la señalización no canónica sobre la vía dependiente de PLC. Otra posibilidad podría ser que otras proteínas o mecanismos implicados, localizadas después de la PLC en la cascada de señalización, requieran tiempos prolongados para desarrollar su función. También podría ser que la generación de DAG sea rápida, pero que este segundo mensajero sea degradado rápidamente, retrasando la consecución de concentraciones suficientes para activar la vía de potenciación. Existen varios mecanismos de degradación de DAG (Fig. 1.7.A), entre los que se encuentra la reacción catalizada por la DAG quinasa. Por lo que para inhibir esta vía de degradación se trataron los sinaptosomas con el inhibidor de la DAG quinasa II (inh DAG quinasa II, Jiang et al., 2000).

La incubación con el inhibidor de la DAG quinasa II (100 μM , 45min) permitió que una aplicación de L-AP4 breve, de tan sólo 30s, indujese ya una potenciación significativa de la liberación de glutamato ($157\pm 4\%$, $n=4$, $p<0.001$; Fig. 4.1. E y F). Sin embargo, este

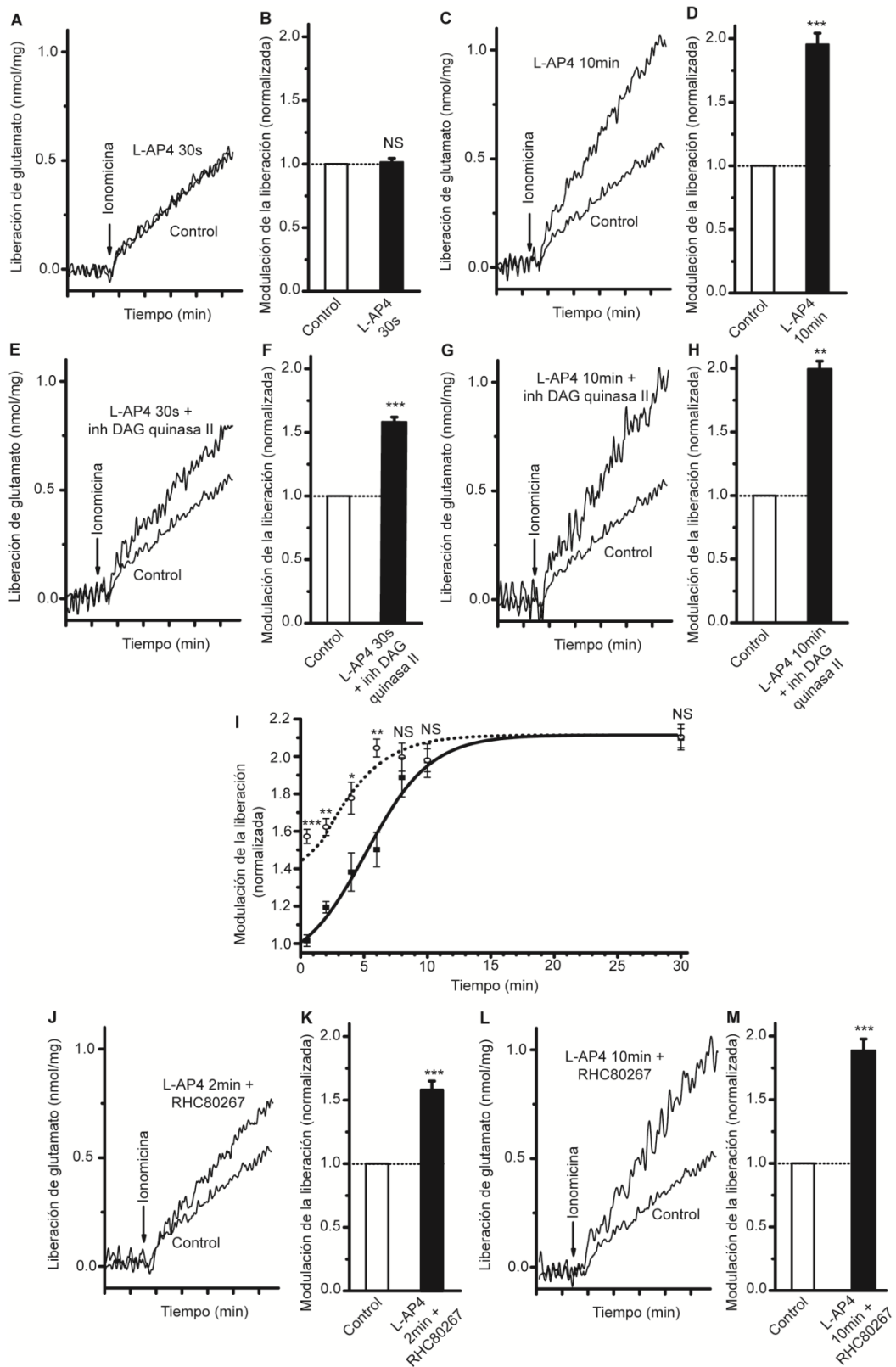


Figura 4.1. Los inhibidores del metabolismo del DAG reducen el tiempo necesario para el desarrollo de la potenciación de la liberación de glutamato por el receptor mGlu7. Los sinaptosomas se incubaron con el agonista de los receptores mGlu7 (1mM, 30s-10min) en (A-D) ausencia y en presencia (E-M) de los inhibidores del metabolismo de DAG: (E-I) inhibidor de la DAG quinasa II (100µM, 45min) y (J-M) inhibidor de la DAG lipasa, RHC80267 (100µM, 45min). Después del tratamiento, los sinaptosomas se centrifugaron y resuspendieron para eliminar el agonista. La liberación de glutamato acumulada durante 5min (A,C,G,E,J,M) representa la diferencia entre la liberación inducida por el ionóforo de Ca²⁺, ionomicina (2.5µM), y la liberación basal en ausencia de ionomicina. Los sinaptosomas control no se trataron con L-AP4. La modulación de la liberación (B,D,F,H,I,K,M) se normalizó respecto a la liberación inducida por ionomicina. (I) Los círculos abiertos o rellenos representan la modulación de liberación por el tratamiento con L-AP4 en presencia y en ausencia del inhibidor de la DAG quinasa II, respectivamente. Los datos se expresaron como la media ± SEM. NS, p>0.05; * <0.05; **, p<0.01; ***, p<0.001 (test de t de Student).

inhibidor no alteró los valores de potenciación máximos obtenidos a los 10min de tratamiento (Fig. 4.1. G y H). Por tanto, el inhibidor de la DAG quinasa II permite alcanzar el máximo de la potenciación a partir de los 6min, sin efecto adicional sobre la potenciación a partir de los 8 min ($p>0.05$) y 10 min ($p>0.05$; Fig. 4.1. I).

Otra enzima que participa en la degradación del DAG es la DAG lipasa (Fig. 1.7.A). Para inhibir esta vía de degradación del DAG, se incubaron los sinaptosomas con el inhibidor de esta enzima, el RHC80267 (Sutherland y Amin, 1982).

El tratamiento de los sinaptosomas con RHC80267 ($100\mu\text{M}$, 45min) incrementó la liberación inducida por la aplicación de L-AP4 durante 2minutos ($159\pm 7\%$, $n=5$, $p<0.001$; Fig. 4.1. J y K, frente a $119.0\pm 3\%$, $n=8$ sin inhibidor), mientras que no afectó a la potenciación por aplicación del agonista durante 10min ($194\pm 9\%$, $n=5$, $p<0.001$; Fig. 4.1. L y M frente a $198\pm 9\%$, $n=7$ sin inhibidor). Por lo tanto, estos resultados demuestran que la inhibición de la degradación del DAG, por medio de la inhibición de la DAG quinasa y la DAG lipasa, reducen el tiempo necesario para desarrollar el efecto de potenciación de la liberación de glutamato por los receptores mGlu7. Esto indica que desde los primeros minutos de la activación del receptor se genera DAG, aunque este podría no ser suficiente para activar la vía de señalización que induce la potenciación de la liberación, ya que la acumulación de DAG está altamente controlada por las enzimas que regulan metabolización de este segundo mensajero. Por ello, es posible que las enzimas que degradan el DAG puedan jugar un papel en el desarrollo y control temporal de los mecanismos de potenciación de la liberación dependientes de DAG. Además, el hecho de que en presencia de inhibidores de la degradación de DAG se obtenga la misma potenciación máxima sugiere que existe un factor limitante que actúa después de la generación de DAG en la vía de señalización.

1.1.2. La activación prolongada de los receptores mGlu7 aumenta la interacción entre las proteínas Munc13 y RIM.

La proteína Munc13 (*Introducción: 3.2.4.*), es esencial para el proceso de liberación de neurotransmisores, preparando las SVs para la fusión (Augustin et al., 1999; Rhee et al., 2002). Para desempeñar esta función, Munc13 se transloca a la membrana de la zona activa por su unión a DAG y forma un complejo triple con las proteínas RIM y Rab3a (Duluvoba et al., 2005; Adrew-Zwilling et al., 2006). La interacción de Munc13 con la proteína de la zona activa RIM (*Introducción: 3.1.3.*) es necesaria para la activación de Munc13, ya que evita la formación de dímeros autoinhibitorios de Munc13 (Deng et al., 2011).

La activación prolongada del receptor mGlu7 genera DAG, que transloca la proteína Munc13-1 a la membrana, activándola (Martín et al., 2010), lo que sugiere la participación de esta proteína en el mecanismo de potenciación de la liberación de neurotransmisor dependiente del receptor mGlu7. La translocación y activación de Munc13 debería estar asociada también a un aumento en la interacción entre Munc13 y RIM. Así, analizamos la posible modulación de la interacción entre Munc13 y RIM por el tratamiento prolongado con L-AP4 en sinaptosomas, mediante experimentos de co-inmunoprecipitación.

La incubación de los sinaptosomas con anticuerpos anti-Munc13-1, seguida de la inmunodetección de esta proteína Munc13-1, mostró que el tratamiento prolongado con L-AP4 no alteró aparentemente la cantidad de Munc13 inmunoprecipitada, detectada como una banda de aproximadamente 250kDa (Fig. 4.2. A.). La co-inmunoprecipitación con anticuerpos anti-RIM1, seguida del revelado con anticuerpos anti-Munc13, mostró una banda que aparentemente también corresponde a la proteína Munc13-1 (Fig. 4.2.A). Ese hecho indica que las proteínas Munc13-1 y RIM1 pueden formar parte de complejos proteicos en los botones sinápticos de la corteza cerebral, que se mantienen en las condiciones de solubilización y co-inmunoprecipitación empleadas. Además, se incluyeron controles negativos, realizando la inmunoprecipitación con la misma cantidad de anticuerpos irrelevantes que no reconocen ningún epítipo fisiológico (IgG), para asegurar que la co-inmunoprecipitación es específica. La cuantificación de la proteína Munc13-1 co-inmunoprecipitada por anticuerpos anti-RIM1 fue normalizada respecto a la proteína inmunoprecipitada por anticuerpos anti-Munc13-1, de manera que posibles cambios en la cantidad de Munc13-1 inmunoprecipitada no influyesen en la cuantificación de la proteína co-inmunoprecipitada. Así, se observó un aumento en la cantidad de proteína Munc13 co-inmunoprecipitada por el tratamiento con L-AP4 ($140 \pm 6\%$, $n=3$, $p<0.01$; Fig 4.2.B). Por lo tanto, este resultado apoya la participación de Munc13 en el mecanismo de potenciación de la liberación de glutamato dependiente de los receptores mGlu7.

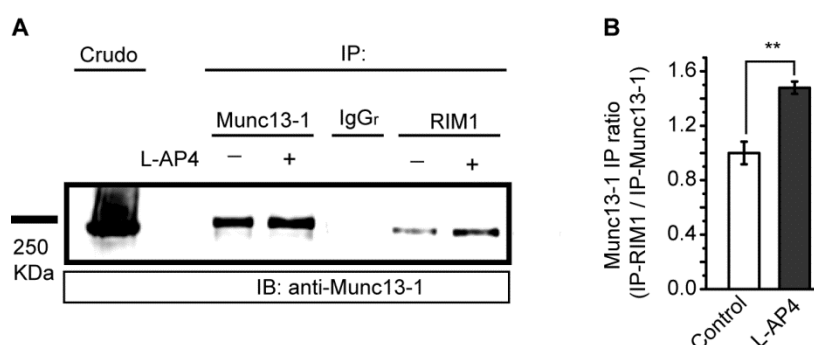


Figura 4.2. La activación prolongada del receptor mGlu7 aumenta la interacción entre las proteínas Munc13-1 y RIM1. Los sinaptosomas se trataron con el agonista de los receptores mGlu7, L-AP4 (1mM, 10min), se solubilizaron e inmunoprecipitaron con anticuerpos anti-Flag (control negativo con epítipo no fisiológico; 3.5 µg; IP: IgGr), anti-Munc13-1 (3.5 µg; IP: Munc13-1) o anti-RIM1 (3.5 µg; IP: RIM1). (A) Los extractos inmunoprecipitados (IP) y los crudos (muestra sin inmunoprecipitar) se analizaron por inmunotransferencia (IB) empleando anticuerpos anti-Munc13-1 de ratón. (B) Cuantificación de la co-inmunoprecipitación de Munc13 (Munc13 IP) con anticuerpos anti-RIM1, expresada como relación frente a la inmunoprecipitación de Munc13-1 y normalizada al valor de intensidad integrada de los controles sin tratar. Los datos se expresaron como la media \pm SEM de tres experimentos diferentes. **, $p<0.01$ (test de t de Student).

1.1.3. La activación prolongada de los receptores mGlu7 incrementa el número de SVs cercanas a la zona activa

La proteína Munc13 participa en el proceso de preparación de las SVs para su liberación (Augustin et al., 1999; Rhee et al., 2002), asociado a la colocación de las vesículas muy cerca de la membrana de la zona activa (Imig et al., 2014). Por esta razón, analizamos si la activación prolongada de los receptores mGlu7 aproxima las SVs sinápticas a la zona activa presináptica. Para estudiar estos fenómenos, analizamos la distribución de las SVs en los sinaptosomas, por medio de microscopía electrónica de transmisión, midiendo la distancia de la membrana de las SVs a la membrana de la zona activa.

El tratamiento prolongado de los sinaptosomas con L-AP4 incrementó el porcentaje de SVs situadas a menos de 10nm de la membrana de la zona activa ($8.8\pm 0.6\%$; $n=101$, Fig. 4.3. B y E) frente a los sinaptosomas control ($3.0\pm 0.4\%$; $n=106$; Fig. 4.3. A y E), aunque no indujo cambios en el número total de SVs de los terminales en el plano analizado (control: $29.7\pm 2.0\%$; L-AP4: $31.6\pm 1.9\%$; Fig. 4.3.C). Además, el

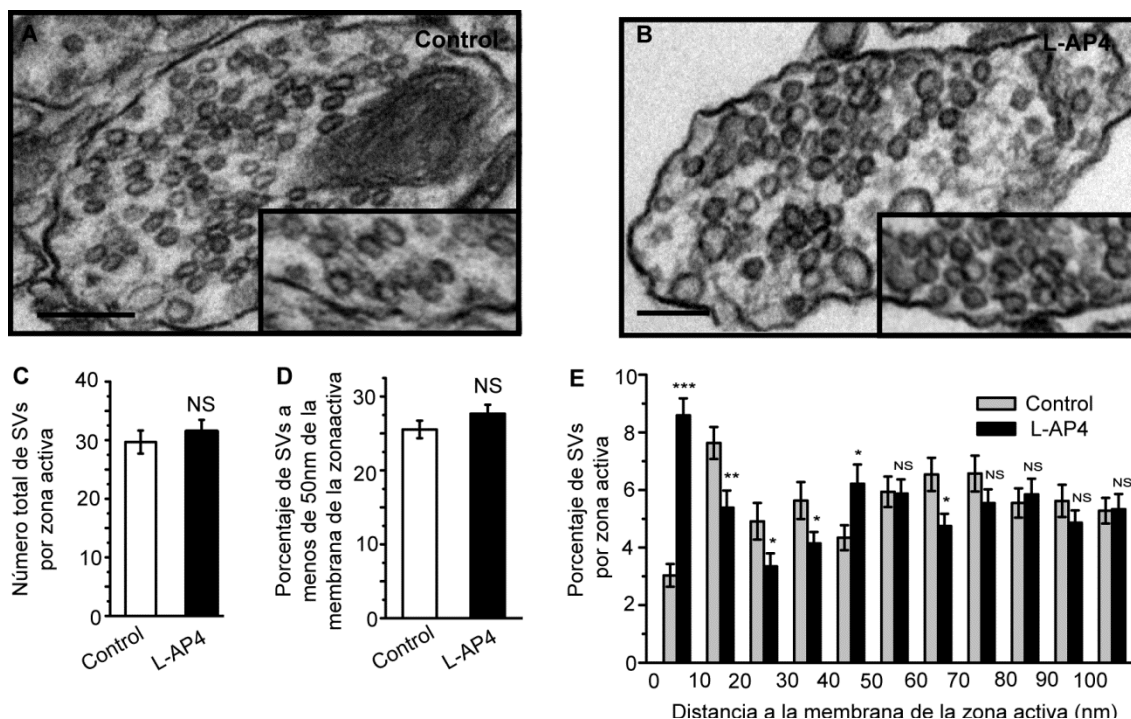


Figura 4.3. La activación prolongada del receptor mGlu7 incrementa el número de SVs próximas a la membrana de la zona activa. Micrografías electrónicas de (A) sinaptosomas control y (B) de sinaptosomas tratados 10min con L-AP4 (1mM) con ampliificaciones de las zonas activas insertadas. Barra de escala 150nm. Cuantificación de: (C) el número total de SVs por zona activa, (D) el porcentaje de SVs a menos de 50nm de la membrana de la zona activa, (E) el porcentaje de SVs en relación a su distancia a la zona activa (distribuidas en intervalos de 10nm). Los datos se expresaron como la media \pm SEM. NS, $p>0.05$; * <0.05 ; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$ (test de t de Student), comparados con el correspondiente valor de los controles. n representa el número de zonas activas estudiadas de dos preparaciones de sinaptosomas diferentes.

tratamiento con L-AP4 no modificó el porcentaje de SVs a menos de 50nm (control: $25.6 \pm 1.2\%$ frente a L-AP4: $27.7 \pm 1.2\%$; Fig. 4.3.D), sugiriendo que el incremento en la proporción de SVs a menos de 10nm de la zona activa es debido a la redistribución y acercamiento de las SVs próximas a la membrana de la misma. Por lo tanto, estos resultados apoyan la participación de mecanismos que promueven la preparación de las SVs para la fusión, en los que podría participar la proteína Munc13, en la potenciación de la liberación de glutamato por la activación prolongada de los receptores mGlu7.

1.1.4. Potenciación de la liberación de glutamato por receptores mGlu7 en terminales con canales de calcio de tipo N y P/Q

La liberación del neurotransmisor glutamato depende principalmente de la acción de los VDCC de tipo P/Q ($\alpha 1$ Cav2.1) y N ($\alpha 1$ Cav2.2; Olivera et al., 1994; Dunlap et al., 1995; Turner y Dunlap, 1995; Vázquez y Sánchez-Prieto, 1997). Aunque se ha propuesto que en las sinápsis maduras la dependencia de los canales P/Q es de mayor importancia (Wu et al., 1999; Millán et al., 2002b; Fedchyshyn y Wang, 2005; Gonzalez-Inchauspe et al., 2007), también se ha descrito la permanencia de un componente dependiente de los canales N en sinápsis maduras de la corteza cerebral (Iwasaki et al., 2000; Vázquez y Sánchez-Prieto, 1997; Millán et al., 2002a, 2003). Por otra parte, a pesar de que los canales N y P/Q muestran una distribución heterogénea en terminales presinápticos inmaduros, en sinaptosomas de corteza cerebral, se ha descrito la segregación de estos VDCC en distintas subpoblaciones de terminales presinápticos (Millán et al., 2002a, 2003). Además, se ha demostrado que en sinaptosomas cerebrocorticales los canales de tipo N están acoplados de manera menos eficiente a la exocitosis de glutamato que los canales P/Q (Millán et al., 2003; Ladera et al., 2009).

En sinaptosomas cerebrocorticales de rata adulta, la expresión de los receptores mGlu7, así como su acción de inhibición de la liberación de glutamato, están restringidas a terminales con canales de tipo N (Millán et al., 2002a, 2003). Por lo tanto, es posible que también exista una asociación de la potenciación de la liberación de glutamato dependiente de los receptores mGlu7 a la subpoblación de terminales que expresan canales N, que podrían constituir un mecanismo compensatorio del peor acoplamiento de estos canales a la exocitosis. Sin embargo, en sinaptosomas de hipocampo el receptor mGlu7 inhibe la liberación de glutamato, tanto en terminales que expresan canales N, como en botones presinápticos que expresan canales P/Q (Martín et al., 2008). Por lo tanto, el estudio de la potenciación de la liberación por receptores mGlu7 en sinaptosomas de hipocampo nos permitirá conocer si esta acción del receptor está restringida según el tipo de VDCC del botón sináptico. Por otro lado, si la potenciación se desarrolla tanto en

terminales sinápticos con VDCC de tipo N, como del tipo P/Q, podría sugerir una mayor relevancia fisiológica de esta respuesta del receptor mGlu7 en hipocampo.

1.1.4.1. La potenciación de la liberación de glutamato por el pretratamiento con L-AP4 es específica de la activación de los receptores mGlu7 e independiente de los VDCC.

Para estudiar la potenciación de la liberación de glutamato dependiente de los receptores mGlu7, sin la participación de los mecanismos inhibidores descritos para este receptor, empleamos el ionóforo de Ca^{2+} ionomicina (Martín et al., 2010; apartado 1.1.1). Para confirmar que la potenciación por el tratamiento prolongado con el agonista L-AP4 no implica la modulación de los VDCC, empleamos los bloqueantes respectivos de los canales de tipo P/Q y N, ω -conotoxina-GVIA y ω -agatoxina-IVA. Así, observamos que el tratamiento simultáneo de los sinaptosomas con ω -conotoxina-GVIA (2 μ M) y ω -agatoxina-IVA (200nm) no afectó ($p > 0.05$) al desarrollo de la potenciación de la liberación tras el tratamiento con L-AP4 (1mM, 10min) (179.1 \pm 5.0%, $n=10$, $p < 0.001$ frente a 196.5 \pm 10.4%, $n=6$, $p < 0.001$ en ausencia de las toxinas; Fig. 4.4. A, B y C). Este resultado indica que la entrada de Ca^{2+} inducida por la ionomicina provoca una liberación de glutamato independiente de los VDCC de tipo N y P/Q y de su modulación.

El agonista ortostérico L-AP4 activa todos los receptores metabotrópicos de grupo III. Dado que los sinaptosomas cerebrocorticales de ratones adultos sólo expresan los receptores mGlu7 (Ladera et al., 2009; Martín et al., 2010), la acción de este fármaco en esta preparación sólo activa los receptores mGlu7. Para asegurarnos de que la

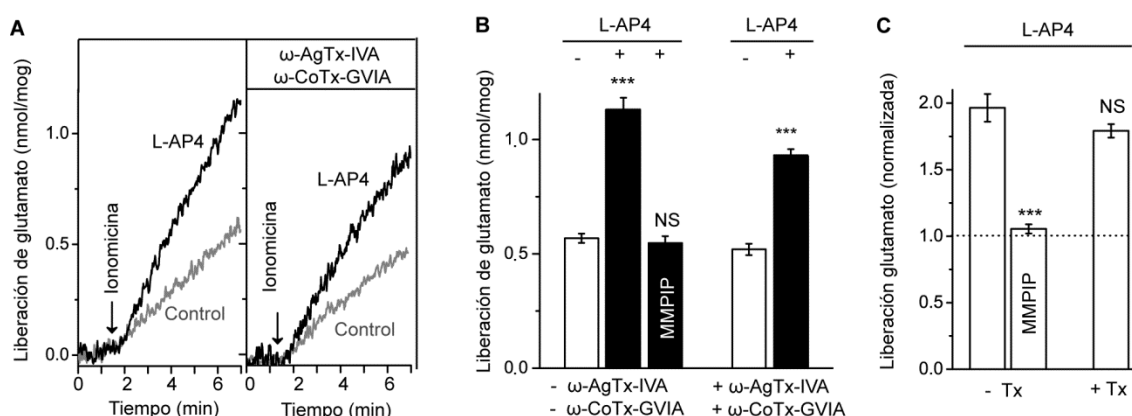


Figura 4.4. La potenciación de la liberación de glutamato por receptores los mGlu7 es independiente de la actividad de los VDCC de tipo N y P/Q. (A) La liberación de glutamato inducida por ionomicina (2 μ M) se determinó en sinaptosomas control y tratados con L-AP4 (1mM, 10min). Después del tratamiento, los sinaptosomas se centrifugaron y resuspendieron para eliminar el agonista. Los sinaptosomas control no se trataron con el agonista. Las toxinas bloqueantes de los VDCC, ω -Aga-IVA (200nm) y ω -CoT-GVIA (2 μ M), se añadieron dos minutos antes de la aplicación de la ionomicina. (B) Diagramas de la liberación de glutamato inducida por ionomicina. El inhibidor MMPIP (30 μ M) se añadió 20 minutos antes del tratamiento con L-AP4. (C) Efecto del L-AP4 sobre la liberación de glutamato, normalizada frente a la liberación inducida por ionomicina en ausencia del agonista. Los datos se expresaron como la media \pm SEM. NS, $p > 0.05$; $p < 0.001$ (test de t de Student), frente a los respectivos controles.

potenciación de la liberación observada depende de la activación de los receptores mGlu7, empleamos el inhibidor específico de estos receptores, MMPIP (Suzuki et al., 2007). El tratamiento de los sinaptosomas con MMPIP (30 μ M, 30min) anuló la potenciación inducida por el tratamiento con L-AP4 (105 \pm 5%, n=5, p>0.05; Fig. 4.4. B y C), demostrando que este mecanismo es dependiente de la activación específica de los receptores mGlu7.

1.1.4.2. En el hipocampo, la potenciación dependiente de mGlu7 se observa tanto en botones sinápticos con canales tipo N, como en botones con canales tipo P/Q.

Dado que en sinaptosomas de hipocampo el receptor mGlu7 inhibe la liberación de glutamato en terminales con canales P/Q (Martín et al., 2008), quisimos determinar si estos mismos botones sinápticos desarrollan también la respuesta potenciadora de este receptor.

El tratamiento con L-AP4 (1mM, 10min) de los sinaptosomas de hipocampo a concentraciones de Ca²⁺ fisiológicas (1.33mM) provocó un aumento en la liberación de glutamato inducida por ionomicina (196.5 \pm 9.6%, n=4, p<0.01; Fig. 4.5. A, B y C).

Los ésteres de forbol son análogos del DAG que potencian la liberación de glutamato en sinaptosomas. Esta potenciación muestra una dependencia de la concentración extracelular de Ca²⁺, que se relaciona con la expresión de canales de N o P/Q en distintas subpoblaciones de terminales presinápticos (Martín et al., 2011). Puesto que el mecanismo implicado en la potenciación de la liberación de glutamato por receptores mGlu7 es similar a la potenciación por ésteres de forbol (Martín et al., 2011), decidimos estudiar si la potenciación por este receptor es también dependiente de la concentración de Ca²⁺ extracelular.

El tratamiento con L-AP4 de los sinaptosomas de hipocampo a bajas concentraciones de Ca²⁺ extracelular, [Ca²⁺]_e, (0,1mM), potenció la liberación de glutamato (173.9 \pm 11.4%, n=10, p>0.001; Fig. 4.5. B y C), mientras que a concentraciones intermedias de este ión (0.5mM), no se observó la potenciación (107.3 \pm 7.6%, n=4, p>0.05; Fig. 4.5. B y C). Teniendo en cuenta el mejor acoplamiento a la exocitosis de los canales de tipo P/Q, en comparación con los canales de tipo N, la potenciación que se observa a 1.33mM y 0.1mM Ca²⁺, podría estar asociada a botones sinápticos con canales de tipo N y P/Q, respectivamente.

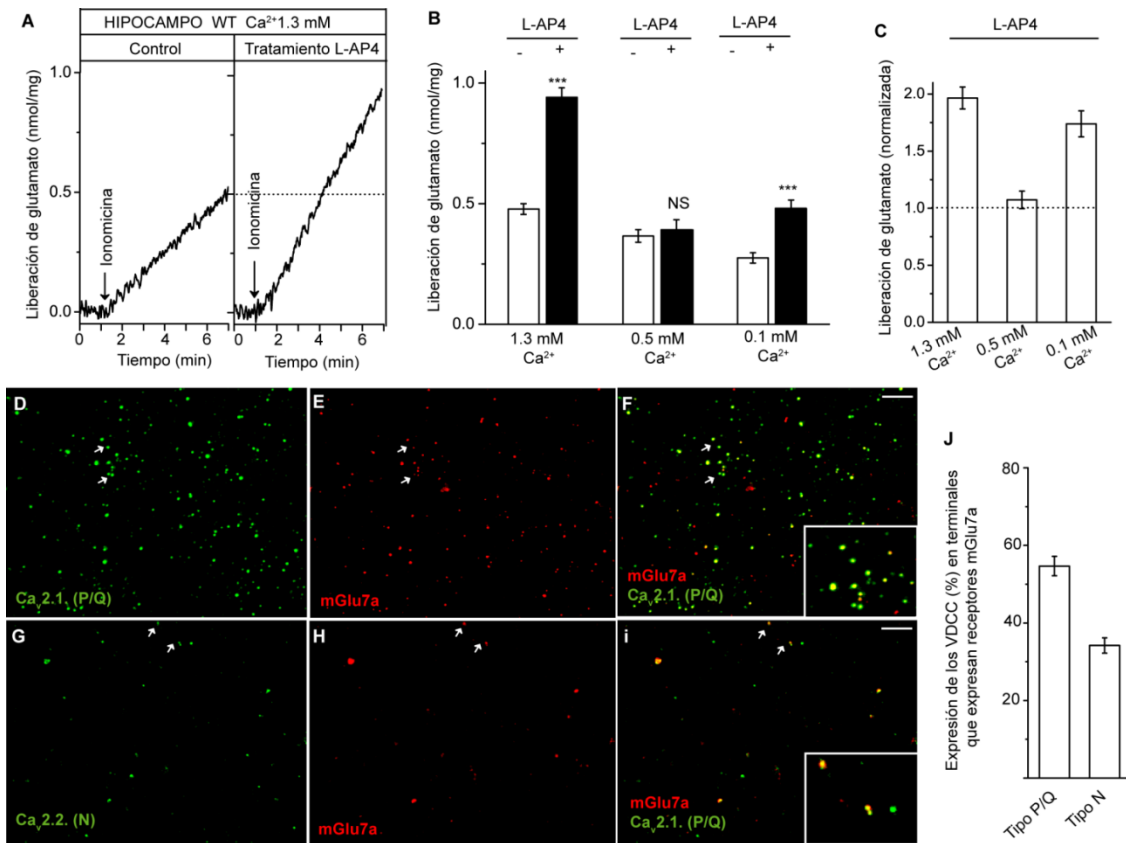


Figura 4.5. Los receptores mGlu7 co-localizan con los canales de tipo N y P/Q en hipocampo y potencian la liberación a $[Ca^{2+}]_e$ de 1.33 y 0.1mM. (A) Liberación de glutamato inducida por ionomicina ($2\mu M$) a la concentración extracelular de Ca^{2+} 1.33mM, en sinaptosomas control y tratados con L-AP4 (1mM,10min). Después del tratamiento, los sinaptosomas se centrifugaron y resuspendieron para eliminar el agonista. Los sinaptosomas control no se trataron con el agonista (B) Diagramas de la liberación de glutamato inducida por ionomicina a distintas concentraciones de Ca^{2+} extracelular. (C) Efecto del L-AP4 sobre la liberación de glutamato, normalizada frente a la liberación inducida por ionomicina en ausencia del agonista. Los datos se expresaron como la media \pm SEM. NS, $p > 0.05$; ***, $p < 0.001$ (test de t de Student), frente a los respectivos controles. (D-I) Dobles marcajes de los sinaptosomas con anticuerpos contra los receptores mGlu7a y canales Cav2.1. (VDCC tipo P/Q) o Cav2.2. (tipo N). Los detalles muestran las regiones señaladas con flechas a mayor aumento. Barra de escala 10nm. (J) Diagrama del porcentaje de co-localización de los VDCC con los receptores mGlu7a.

Para abordar esta hipótesis, empezamos estudiando la expresión de los receptores mGlu7 en terminales sinápticos de hipocampo con canales de tipo P/Q, o con canales tipo N, mediante el marcaje por inmunofluorescencia de estas proteínas. En experimentos de marcaje doble con anticuerpos contra mGlu7 y contra los respectivos VDCC (α_1A Cav2.1 y α_1B Cav2.2, para los canales de tipo P/Q y N, respectivamente), encontramos que el $52.4 \pm 2.4\%$ de los sinaptosomas que expresan los receptores mGlu7 co-expresan canales de tipo P/Q (3004 sinaptosomas de 36 campos; Fig. 4.5. D, E, F, J), mientras que sólo un $32.7 \pm 1.9\%$ de los botones que expresan estos receptores, expresan también canales de tipo N (2396 sinaptosomas de 36 campos; Fig. 4.5. G, H, I, J). Por tanto, en la preparación de hipocampo, los receptores mGlu7 se expresan tanto en terminales sinápticos con canales de tipo P/Q, como en botones sinápticos con canales de N.

Para determinar si la dependencia de la $[Ca^{2+}]_e$ de la potenciación por mGlu7 se corresponde con la co-expresión de los mGlu7 con los distintos VDCC, empleamos el

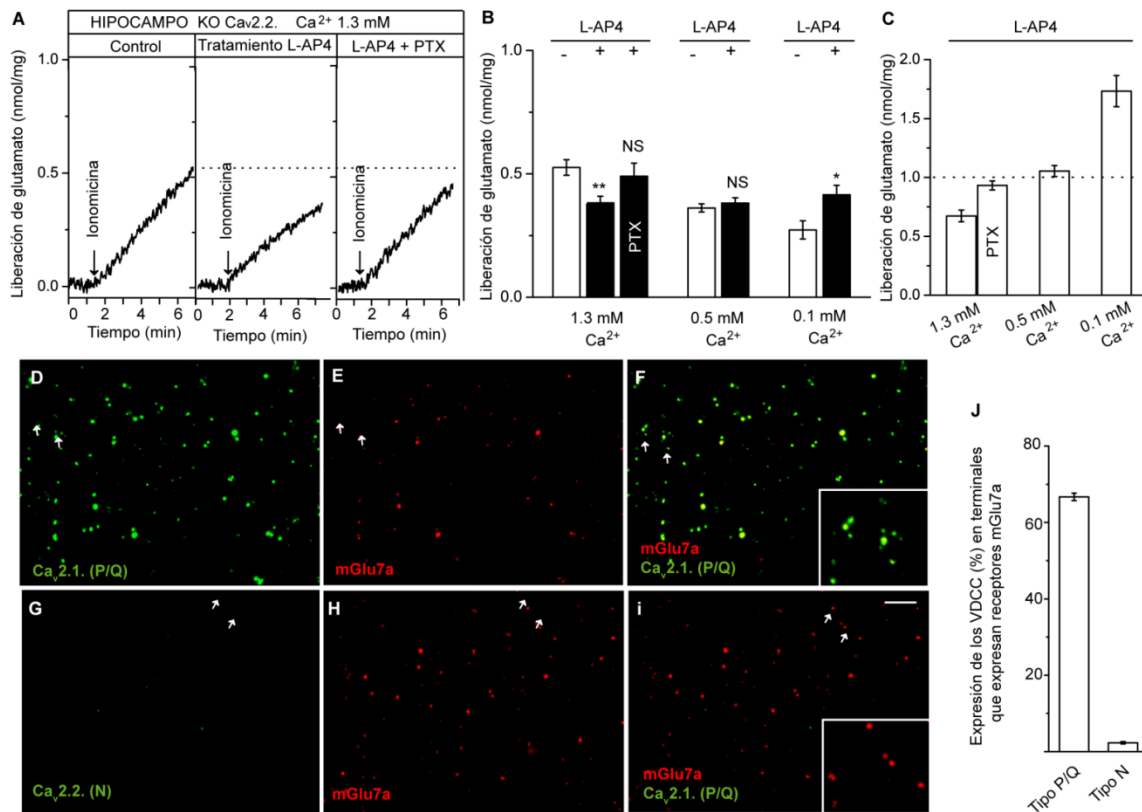


Figura 4.6. Los receptores mGlu7 co-localizan con los canales de tipo P/Q en hipocampo del ratón KO para los canales de tipo N y sólo potencian la liberación a bajas $[Ca^{2+}]_e$ (0.1mM). (A) Liberación de glutamato inducida por ionomicina ($2\mu M$) a la concentración extracelular de Ca^{2+} de 1.33mM, en sinaptosomas control y tratados con L-AP4 (1mM,10min), en presencia y en ausencia de toxina pertúsica (PTX, $1.5\mu g/mL$ durante 2h). Después del tratamiento, los sinaptosomas se centrifugaron y se resuspendieron para eliminar el agonista. Los sinaptosomas control no se trataron con el agonista. (B) Diagramas de la liberación de glutamato inducida por ionomicina a distintas concentraciones de Ca^{2+} extracelular. (C) Efecto del L-AP4 sobre la liberación de glutamato, normalizado frente a la liberación inducida por ionomicina en ausencia del agonista. Los datos se expresaron como la media \pm SEM. NS, $p > 0.05$; *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$ (test de t de Student), frente a los respectivos controles. (D-I) Dobles marcajes de los sinaptosomas con anticuerpos contra los receptores mGlu7a y canales Cav2.1. (VDCC tipo P/Q) o Cav2.2. (tipo N). Los detalles muestran las regiones señaladas con flechas a mayor aumento. Barra de escala 10nm. (J) Diagrama del porcentaje de co-localización de los VDCC con los receptores mGlu7a.

ratón carente de los canales de tipo N ($Ca_v2.2$ KO, Ino et al., 2001), en el que la liberación de glutamato depende enteramente de los canales de tipo P/Q (Martín et al., 2008; Ladera et al., 2009). En sinaptosomas de hipocampo de estos ratones, a concentraciones fisiológicas de Ca^{2+} de 1.33mM, la aplicación prolongada de L-AP4 (1mM, 10min), no potenció la liberación de glutamato, sino que se observó una inhibición ($67.3 \pm 4.9\%$, $n=10$, $p < 0.001$; Fig. 4.6. A, B y C). Esta inhibición se anuló tras la incubación con toxina pertúsica, PTx, ($93.2 \pm 4.7\%$, $n=6$, $p > 0.05$; Fig. 4.5. A, B y C) por lo que este mecanismo de inhibición es dependiente de proteínas Gi/o. Sin embargo, a concentraciones bajas de $[Ca^{2+}]_e$ (0.1mM), sí se observa la potenciación de la liberación por el tratamiento con L-AP4 ($173.3 \pm 13.2\%$, $n=8$, $p < 0.05$; Fig. 4.6. B y C). Por último, a concentraciones de Ca^{2+} intermedias (0.5mM) tampoco se desarrolló la potenciación ($105.2 \pm 4.7\%$, $n=6$, $p > 0.05$; Fig. 4.5. B y C). El estudio de la expresión de los receptores mGlu7 en los sinaptosomas de hipocampo del Cav2.2 KO, mostró que el $66.7 \pm 1.0\%$ de los terminales que expresan

receptores mGlu7 co-expresan canales de tipo P/Q (2075 sinaptosomas de 38 campos; Fig 4.6.D, E, F y J). Como era esperable, sólo un $2.2\pm 0.3\%$ de los botones mostraron marcaje, probablemente inespecífico, de los canales de calcio del tipo N y de los receptores mGlu7 (2453 sinaptosomas de 35 campos; Fig 4.6.G, H, I y J).

Por lo tanto, es probable que la concentración de Ca^{2+} fisiológica ocluya la potenciación por receptores mGlu7 en los botones sinápticos hipocampales con canales de calcio de tipo P/Q, y que la potenciación observada a bajas $[\text{Ca}^{2+}]_e$ probablemente refleje el mejor acoplamiento de estos canales P/Q a la exocitosis (Millán et al., 2003; Ladera et al., 2009).

Siguiendo este razonamiento, la potenciación observada a 1.33mM de $[\text{Ca}^{2+}]_e$ en los sinaptosomas de ratones de genotipo silvestre o *wild type*, que se pierde en los sinaptosomas procedentes de ratón KO para $\text{Ca}_v2.2$, probablemente se corresponda con la potenciación por mGlu7 en botones sinápticos con canales de tipo N. Dado que estos canales están peor acoplados a la exocitosis (Millán et al., 2003; Ladera et al., 2009), cuando la $[\text{Ca}^{2+}]_e$ es inferior a la fisiológica, la entrada de Ca^{2+} por estos canales podría no ser suficiente para activar la maquinaria exocitótica y disparar el proceso de fusión vesicular.

El hecho de que la magnitud de la potenciación por receptores mGlu7 sea similar a $[\text{Ca}^{2+}]_e$ de 1.33mM y 0.1mM, probablemente refleja que no se producen simultáneamente la contribución a la liberación de las subpoblaciones de terminales sinápticos con canales P/Q y N. Es posible que la sensibilidad al Ca^{2+} de las proteínas implicadas en el mecanismo de potenciación sea distinta entre terminales con canales N y P/Q, de manera que a 1.33mM de $[\text{Ca}^{2+}]_e$ la vía de potenciación por mGlu7 esté ocluida en terminales que expresan canales P/Q.

Para comprobar esta hipótesis, estudiamos el efecto del inhibidor de proteínas que unen DAG, Calfostina C, que inhibe totalmente la potenciación por mGlu7 (Martín et al., 2010) y por análogos de DAG (Martín et al., 2011). En estos experimentos encontramos que la Calfostina C (0.1 μ M, 30min) redujo la liberación control ($p < 0.01$), en ausencia del tratamiento con L-AP4 a concentraciones de Ca^{2+} extracelular de 0.5mM (0.39 ± 0.02 nmol glu/mg; $n=8$ frente a 0.27 ± 0.02 nmol glu/mg; $n=8$ en presencia de Calfostina C), mientras que a concentraciones de 0.1mM no tuvo efecto ($p > 0.05$; 0.26 ± 0.02 nmol glu/mg; $n=5$ frente a 0.27 ± 0.01 nmol glu/mg; $n=4$ en presencia de Calfostina C). Estos resultados sugieren que, en los terminales sinápticos con canales P/Q, concentraciones de Ca^{2+} iguales o superiores a 0.5mM, potencian tónicamente la liberación, y esto ocluye una potenciación adicional por mGlu7, mientras que a 0.1mM de $[\text{Ca}^{2+}]_e$ no se observa esta potenciación tónica por Ca^{2+} y, por tanto, no hay oclusión, permitiendo el desarrollo de la potenciación por mGlu7.

1.1.4.3. En la corteza cerebral, la potenciación dependiente de mGlu7 sólo se observa en botones sinápticos con canales de tipo N.

En sinaptosomas de corteza cerebral, el pretratamiento con L-AP4 (1mM, 10min) incrementó la liberación de glutamato a $[Ca^{2+}]_e$ de 1.33 mM ($196.5 \pm 10.0\%$, $n=6$, $p < 0.001$; Fig. 4.7. A, B y C). Sin embargo, no se observó efecto alguno ni a $[Ca^{2+}]_e$ de 0.5mM ($104.5 \pm 5.7\%$, $n=7$, $p > 0.05$; Fig. 4.6. B y C) ni a 0.1mM ($104.1 \pm 7.0\%$, $n=10$, $p > 0.05$; Fig. 4.7. B y C).

El marcaje por inmunofluorescencia de los sinaptosomas con anticuerpos contra el receptor mGlu7 y contra los VDCC de tipo N y P/Q, mostró que los receptores mGlu7 se expresan mayoritariamente ($69.6 \pm 1.8\%$) en los terminales de corteza cerebral que co-expresan los canales de tipo N (1855 sinaptosomas de 39 campos; Fig 4.7.G, H, I y J), mientras que estos receptores sólo se expresan en un $6.9 \pm 0.9\%$ de los terminales que co-expresan canales de tipo P/Q (2441 sinaptosomas de 38 campos; Fig 4.7.D, E, F y J). Por

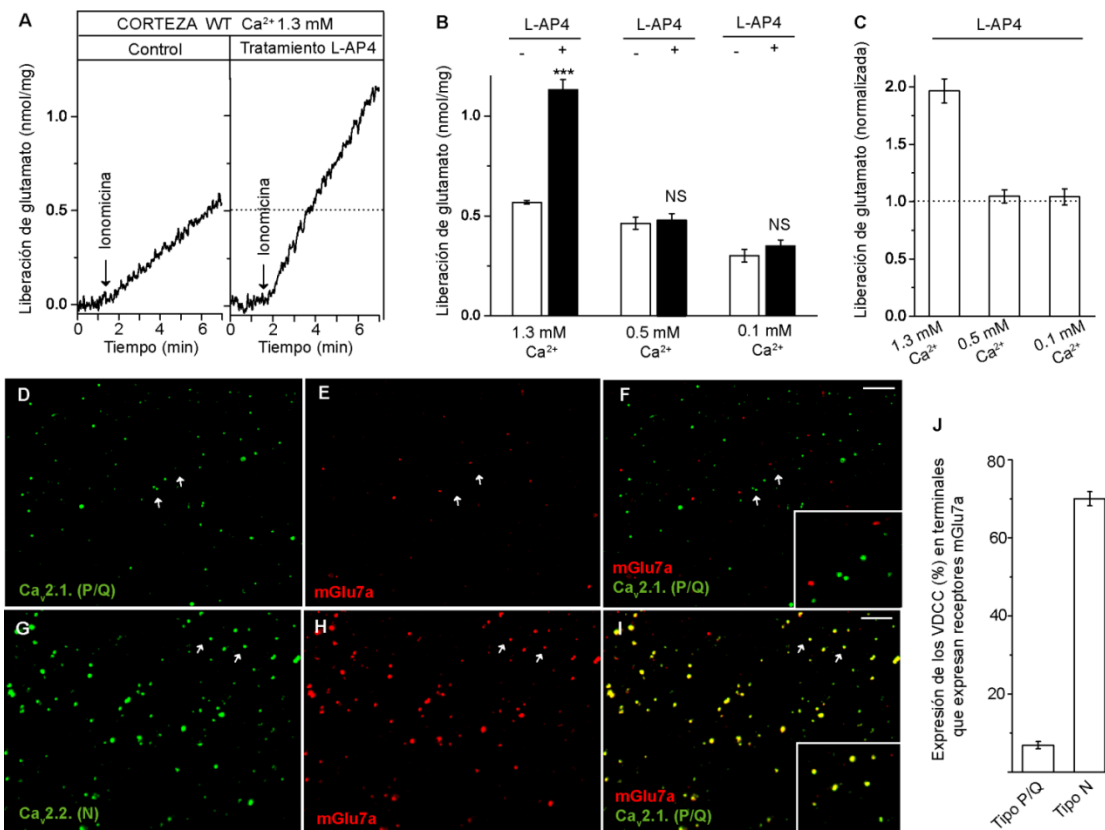


Figura 4.7. Los receptores mGlu7 co-localizan con los canales de tipo N en la corteza cerebral y potencian la liberación a $[Ca^{2+}]_e$ de 1.33 mM. (A) Liberación de glutamato inducida por ionomicina ($2\mu M$) a la concentración extracelular de Ca^{2+} de 1.33mM, en sinaptosomas control y tratados con L-AP4 (1mM, 10min). Después del tratamiento, los sinaptosomas se centrifugaron y se resuspendieron para eliminar el agonista. Los sinaptosomas control no se trataron con el agonista (B) Diagramas de la liberación de glutamato inducida por ionomicina a distintas concentraciones de Ca^{2+} extracelular. (C) Efecto del L-AP4 sobre la liberación de glutamato, normalizado frente a la liberación inducida por ionomicina en ausencia del agonista. Los datos se expresaron como la media \pm SEM. NS, $p > 0.05$; ***, $p < 0.001$ (test de t de Student), frente a los respectivos controles. (D-I) Dobles marcajes de los sinaptosomas con anticuerpos contra los receptores mGlu7a y canales Cav2.1. (VDCC tipo P/Q) o Cav2.2. (tipo N). Los detalles muestran las regiones señaladas con flechas a mayor aumento. Barra de escala 10nm. (J) Diagrama del porcentaje de co-localización de los VDCC con los receptores mGlu7a.

lo tanto, la potenciación de la liberación de glutamato por mGlu7 es debida probablemente a los terminales sinápticos con canales de tipo N, que es la subpoblación de botones que expresan mayoritariamente estos receptores.

Para corroborar estos resultados, estudiamos la función y expresión de mGlu7 en sinaptosomas de corteza cerebral del ratón KO de $Ca_v2.2$ (Ino et al., 2001). En este caso, no se observó potenciación por L-AP4 (1mM, 10min), ni a $[Ca^{2+}]_e$ de 1.33mM ($101.3 \pm 3.0\%$, $n=8$, $p>0.05$; Fig. 4.8. A, B y C), ni a 0.5mM ($108.9 \pm 6.1\%$, $n=6$, $p>0.05$; Fig. 4.8. B y C), ni a 0.1mM ($98.5 \pm 4.6\%$, $n=12$, $p>0.05$; Fig. 4.8. B y C).

En experimentos de inmunofluorescencia se observó que los receptores mGlu7 se expresan en un $69.3 \pm 1.3\%$ de los terminales que co-expresan canales de tipo P/Q (2483 sinaptosomas de 38 campos; Fig 4.8.D, E, F y J), mientras que estos receptores no co-existen ($1.7 \pm 0.4\%$) con VDCC de tipo N (2793 sinaptosomas de 39 campos; Fig 4.8. G, H,

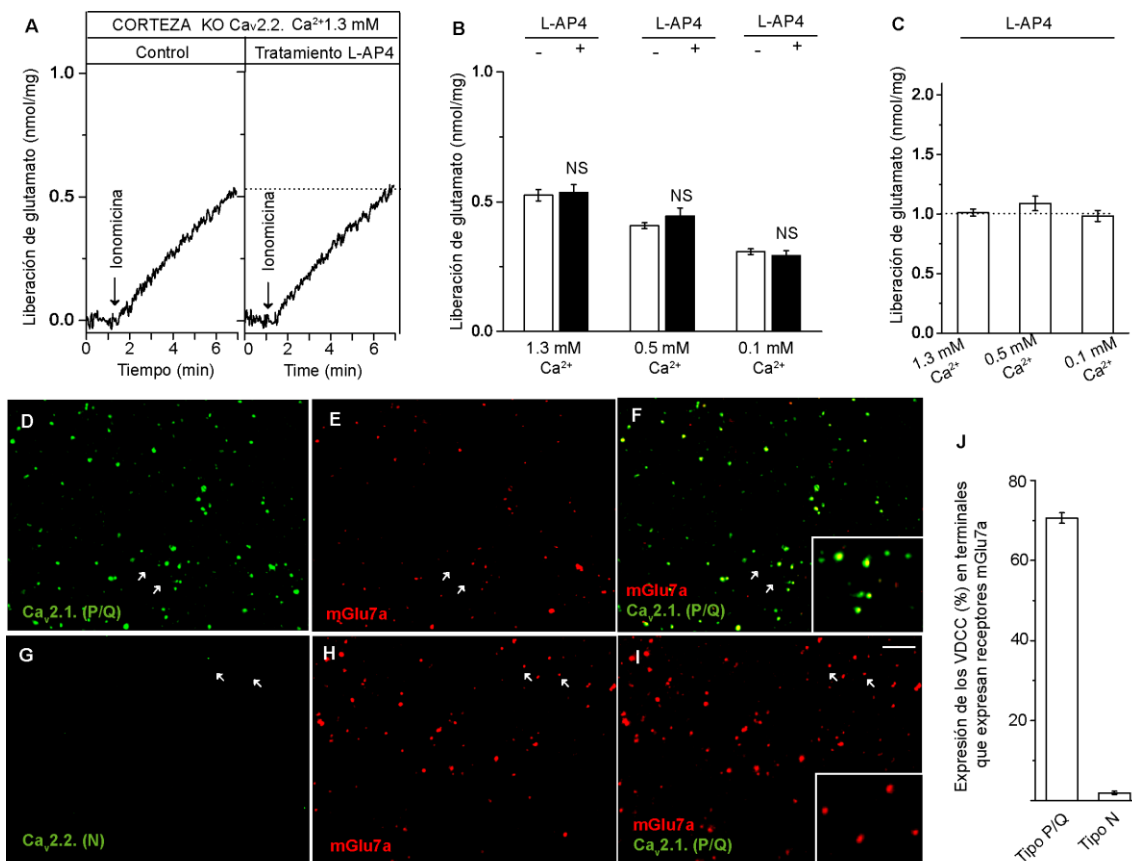


Figura 4.8. Los receptores mGlu7 co-localizan con los canales de tipo P/Q en la corteza cerebral del ratón KO para los canales de tipo N, pero no potencian la liberación. (A) Liberación de glutamato inducida por ionomicina ($2\mu M$) a la concentración extracelular de Ca^{2+} de 1.33mM, en sinaptosomas control y tratados con L-AP4 (1mM,10min). Después del tratamiento, los sinaptosomas se centrifugaron y se resuspendieron para eliminar el agonista. Los sinaptosomas control no se trataron con el agonista (B) Diagramas de la liberación de glutamato inducida por ionomicina a distintas concentraciones de Ca^{2+} extracelular. (C) Efecto del L-AP4 sobre la liberación de glutamato, normalizado frente a la liberación inducida por ionomicina en ausencia del agonista. Los datos se expresaron como la media \pm SEM. NS, $p>0.05$ (test de t de Student), frente a los respectivos controles. (D-I) Dobles marcajes de los sinaptosomas con anticuerpos contra los receptores mGlu7a y canales $Ca_v2.1$ (P/Q) o $Ca_v2.2$ (tipo N). Los detalles muestran las regiones señaladas con flechas a mayor ampliación. Barra de escala 10nm. (J) Diagrama del porcentaje de co-localización de los VDCC con los receptores mGlu7a.

I y J). Por lo tanto, aunque en los sinaptosomas de corteza del KO para los canales Cav2.2 los receptores mGlu7 se expresan en botones con canales de tipo P/Q, la activación prolongada del receptor no da lugar al desarrollo de mecanismos de potenciación. Dado que estos mecanismos de potenciación no dependen de la modulación de los VDCC (Fig. 4.4), el hecho de que se desarrollen solamente en una subpoblación de terminales con canales de tipo N, probablemente se deba a otras características de los terminales que expresan este tipo de canales de calcio.

Por lo tanto, los resultados obtenidos demuestran que en sinaptosomas de corteza cerebral, los mecanismos de potenciación dependientes mGlu7 sólo se desarrollan en terminales que expresan canales de tipo N, no sólo porque son los únicos en los que se expresa el receptor, sino probablemente por las características intrínsecas de esa subpoblación de terminales presinápticos.

1.2. ESTUDIOS DE ELECTROFISIOLOGÍA DE LA POTENCIACIÓN DE LA LIBERACIÓN DE GLUTAMATO POR RECEPTORES METABOTRÓPICOS DE TIPO III EN CULTIVOS AUTÁPTICOS DE NEURONAS HIPOCAMPALES.

El mecanismo de potenciación de la liberación de neurotransmisores por la activación prolongada de los receptores mGlu7 sólo ha sido estudiado en sinaptosomas de corteza cerebral determinando la liberación de glutamato (Martín et al., 2010). Por lo tanto, quisimos estudiar estos mecanismos en neuronas, empleando para ello cultivos autápticos de neuronas de hipocampo. En este tipo de cultivo, una única neurona aislada crece sobre una isla de astrocitos. En estas condiciones, la neurona aislada establece sinapsis consigo misma (denominadas autapsis), de manera que las técnicas de electrofisiología permiten estimular y registrar la respuesta en la misma neurona. Este modelo ha sido ampliamente usado para estudiar la función de proteínas presinápticas de la maquinaria excitotóxica, como Munc13 (Rhee et al., 2002), por lo que supone un interesante sistema para estudiar la potenciación de la liberación de glutamato por receptores mGlu7, que posiblemente dependa de la modulación de esta proteína. Estos experimentos se realizaron en cultivos autápticos hipocampales (13-17DIV), manteniendo las neuronas en fijación de voltaje en configuración de célula completa (*voltaje clamp, whole-cell*) a -70mV.

1.2.1. Reversión de la inhibición de la liberación inducida por despolarización por la activación prolongada de los receptores metabotrópicos de tipo III.

Los receptores metabotrópicos del grupo III se expresan en el hipocampo (Oishi et al., 1995; Shigemoto et al., 1997a; Kinoshita *et al.* 1998; Malherbe et al., 1999; Corti et al.,

2002), donde ha sido ampliamente estudiada su acción presináptica de inhibición de la liberación de neurotransmisores, tanto en neuronas glutamatérgicas (White et al., 1979; Harris y Cotman, 1983; Basky et al., 1991; Bushell et al., 1996; Dietrich et al. 1997; Macek et al., 1996; Zhai et al., 2002; Capogna 2004; Pelkey et al., 2005), como en neuronas GABAérgicas (Semyanov y Kullman, 2000; Kogo et al., 2004; Rusakov et al., 2004; Klar et al., 2015).

Dado que en los cultivos primarios de neuronas, obtenidos por la disgregación del hipocampo, no es posible identificar los tipos de neuronas en los que ha sido descrita previamente la expresión de estos receptores, determinamos en primer lugar la presencia de estos receptores mediante la perfusión del agonista, L-AP4 (200 μ M). Se usaron altas concentraciones del agonista, con el fin de activar los receptores mGlu7, que exhiben baja afinidad por este agonista (Schoepp et al, 1999). Se estudió el efecto de L-AP4 sobre la liberación de neurotransmisor inducida la despolarización de la membrana plasmática de -70 a 0mV durante 2ms, tanto en neuronas glutamatérgicas (EPSC), como neuronas GABAérgicas (IPSC), diferenciándolas por el tiempo de caída (*decay time*) de las correspondientes respuestas, claramente muy superior en el caso de las neuronas GABAérgicas (Fig. 4.9.A frente a Fig.4.10.A).

Así, encontramos que un 54.1% (n=112 de 207 neuronas glutamatérgicas; Fig. 4.9.D) de las neuronas glutamatérgicas estudiadas no mostraron ningún efecto de modulación de la amplitud de los EPSCs por la aplicación de L-AP4 (0.95 ± 0.03 , normalizada frente los EPSCs basales en ausencia del fármaco; $p > 0.05$; Fig. 4.7. A ,B y C). Sin embargo, un 45.9% (n=95) de las neuronas glutamatérgicas estudiadas muestran una disminución en la amplitud de los EPSC (0.56 ± 0.02 ; $p < 0.001$; Fig. 4.9. C, F y G) durante la perfusión de L-AP4, que fue revertida rápidamente por el lavado del fármaco (0.90 ± 0.03 ; $p < 0.05$; Fig. 4.9. F y G). Por lo tanto, los receptores metabotrópicos de tipo III se expresan en una subpoblación de neuronas glutamatérgicas en los cultivos autápticos hipocámpales. Cabe destacar que la inhibición de los EPSC por la aplicación de L-AP4 es muy variable (Fig. 4.9.C), indicando que la acción de los receptores mGluIII varía enormemente entre los distintos tipos de neuronas glutamatérgicas de los cultivos autápticos de hipocampo. Además, encontramos que la amplitud basal de los EPSC antes de aplicar el L-AP4, es significativamente menor ($p < 0.001$) en la neuronas sensibles al fármaco (2.41 ± 0.11 nA; Fig. 4.9.E) en comparación con las que no responden al mismo (3.08 ± 0.16 nA; Fig. 4.9.E). Por lo tanto, las neuronas que desarrollan la inhibición por acción de receptores mGlu7 presentan menos liberación inducida por despolarización que las que no expresan estos receptores.

Dado que nuestro objetivo fue estudiar los mecanismos de potenciación asociados a estos receptores, y que estos fenómenos se desarrollan progresivamente por la activación prolongada del receptor (Fig. 4.1), quisimos estudiar el efecto en la

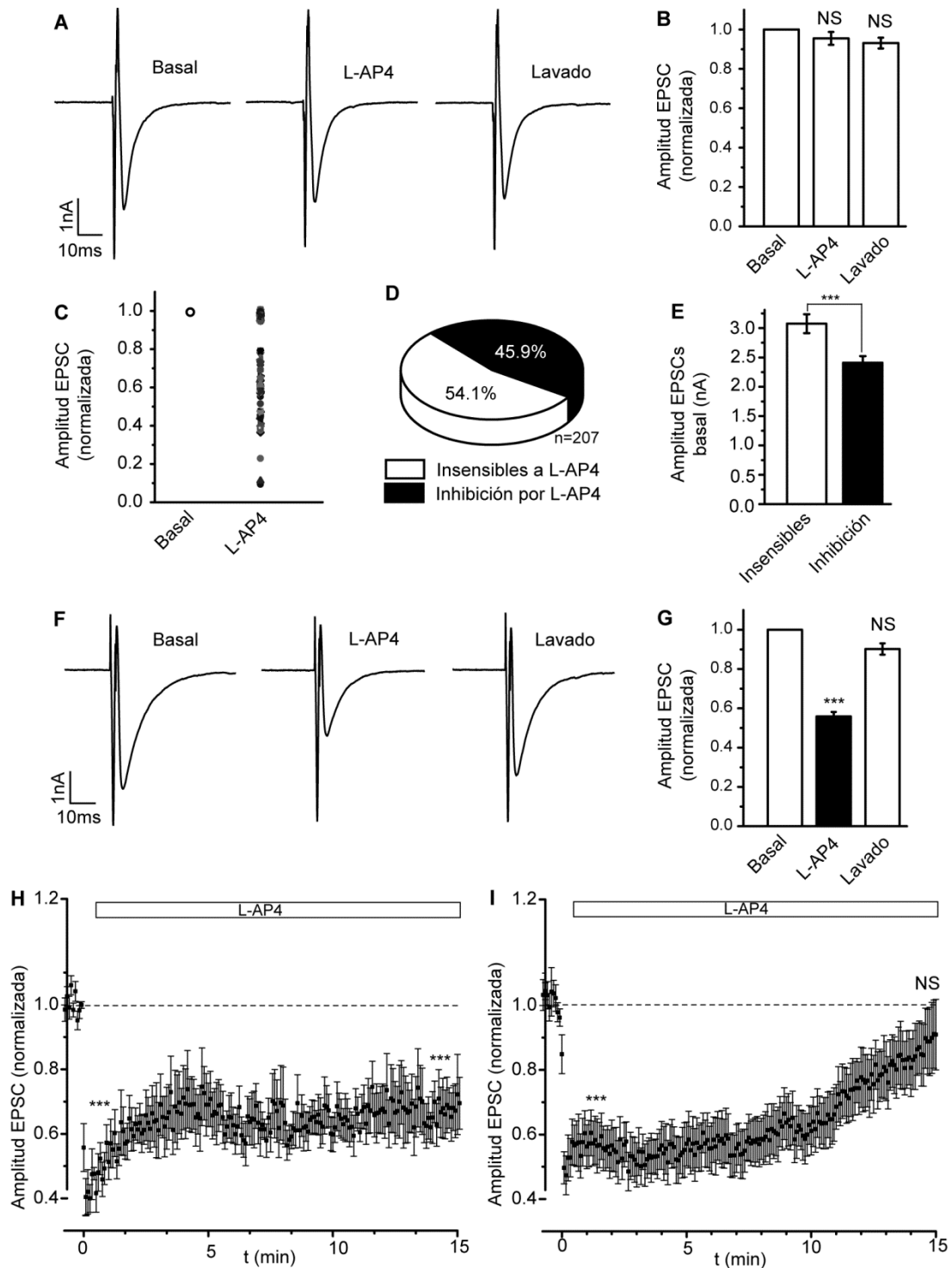


Figura 4.9. La activación prolongada de receptores metabotrópicos del grupo III revierte la inhibición de la liberación inducida en neuronas glutamatergicas. Las neuronas se estudiaron en fijación de voltaje en configuración de célula completa a -70mV, tras la despolarización a 0mV durante 2ms. (A y B) Ausencia de efecto sobre los EPSCs de la aplicación breve de L-AP4 (200µM, 30s). Los datos se normalizaron respecto al control antes del tratamiento con el agonista. (C) Inhibición normalizada de cada neurona. (D) Proporción de neuronas glutamatergicas que responden a la aplicación breve de L-AP4 en cultivos autápticos de hipocampo, (E) Comparación de la amplitud basal de los EPSCs entre las neuronas glutamatergicas sensibles e insensibles a L-AP4. (F y G) Efecto inhibitorio de la amplitud de los EPSCs por la aplicación breve de L-AP4. Los datos se normalizaron frente al control antes del tratamiento con el agonista. (H) Inhibición sostenida de los EPSCs durante la aplicación prolongada de L-AP4 (200µM, 15min). (I) Reversión de la inhibición de los EPSC durante la aplicación prolongada de L-AP4. Los datos se expresaron como la media ± SEM. NS, p>0.05; ***, p<0.001 (test de t de Student).

neurotransmisión de la perfusión sostenida de altas concentraciones de L-AP4. Estos ensayos se realizaron sólo en las neuronas que mostraron sensibilidad a una aplicación breve del fármaco (Fig. 4.9. F y G). Encontramos que, en algunas de las neuronas glutamatérgicas estudiadas, la aplicación prolongada de L-AP4 mostró una inhibición sostenida de los EPSC (Fig. 4.9. H; n=10). Sin embargo, en otra subpoblación de neuronas glutamatérgicas, la inhibición de los EPSC por la aplicación del fármaco se revertió durante la aplicación prolongada del mismo (Fig. 4.9. I; n=8).

Los resultados previos obtenidos en sinaptosomas se han centrado en la modulación de la liberación de glutamato (Martín et al., 2010). Dado que los receptores mGlu7 también están presentes en neuronas GABAérgicas, donde actúan como heteroreceptores (Semyanov y Kullman, 2000; Kogo et al., 2004; Rusakov et al., 2004; Klar et al., 2015), decidimos estudiar el efecto de L-AP4 sobre las neuronas GABAérgicas en los cultivos autápticos de hipocampo. En esta preparación encontramos que un 20.4% (n=11 de las 54 neuronas GABAérgicas estudiadas; Fig. 4.10.D) de las células no mostraron alteraciones en los IPSC tras una aplicación breve de L-AP4 (0.95 ± 0.06 ; Fig. 4.10. A, B y C). Sin embargo, la mayoría de las neuronas (79.6%; n=43) sufrieron una disminución en la amplitud de sus IPSCs durante la aplicación del agonista (0.44 ± 0.05 ; $p < 0.001$; Fig. 4.10. C, F, G), que desapareció tras el lavado del fármaco (0.82 ± 0.04 ; $p > 0.05$; Fig. 4.10. F y G). Es reseñable que la magnitud de la inhibición es muy variable entre las distintas neuronas (Fig. 4.10.C), de manera similar a lo que ocurría con las neuronas glutamatérgicas. La comparación de los IPSCs basales antes del tratamiento con el L-AP4, no mostró diferencias significativas ($p > 0.05$) entre las células sensibles al agonista (5.09 ± 0.33 nA; Fig. 4.10.E) y las que no desarrollan inhibición (5.78 ± 0.87 nA; Fig. 4.10.E). Además, la magnitud de la inhibición en las neuronas glutamatérgicas y GABAérgicas sensibles a L-AP4, fue similar ($p > 0.05$; Fig. 4.10.I).

Además, determinamos el efecto de la activación prolongada de los receptores mGluIII en neuronas GABAérgicas, encontrando que la perfusión prolongada de L-AP4 indujo la reversión de la inhibición inicial de los IPSCs (n=5; Fig. 4.10. H). Es importante destacar que, a diferencia de los dos comportamientos distintos encontrados en neuronas glutamatérgicas, (Fig. 4.9, H e I), todas las neuronas GABAérgicas que mostraron sensibilidad al agonista, desarrollaron la reversión de la inhibición de los IPSCs.

1.2.2. La activación prolongada de los receptores metabotrópicos del grupo III incrementa la frecuencia de la liberación espontánea.

La pérdida de la acción inhibitoria sobre la liberación inducida mediada por los receptores metabotrópicos del grupo III podría deberse a la desensibilización e internalización de dichos receptores tras su activación prolongada (Pelkey et al., 2005).

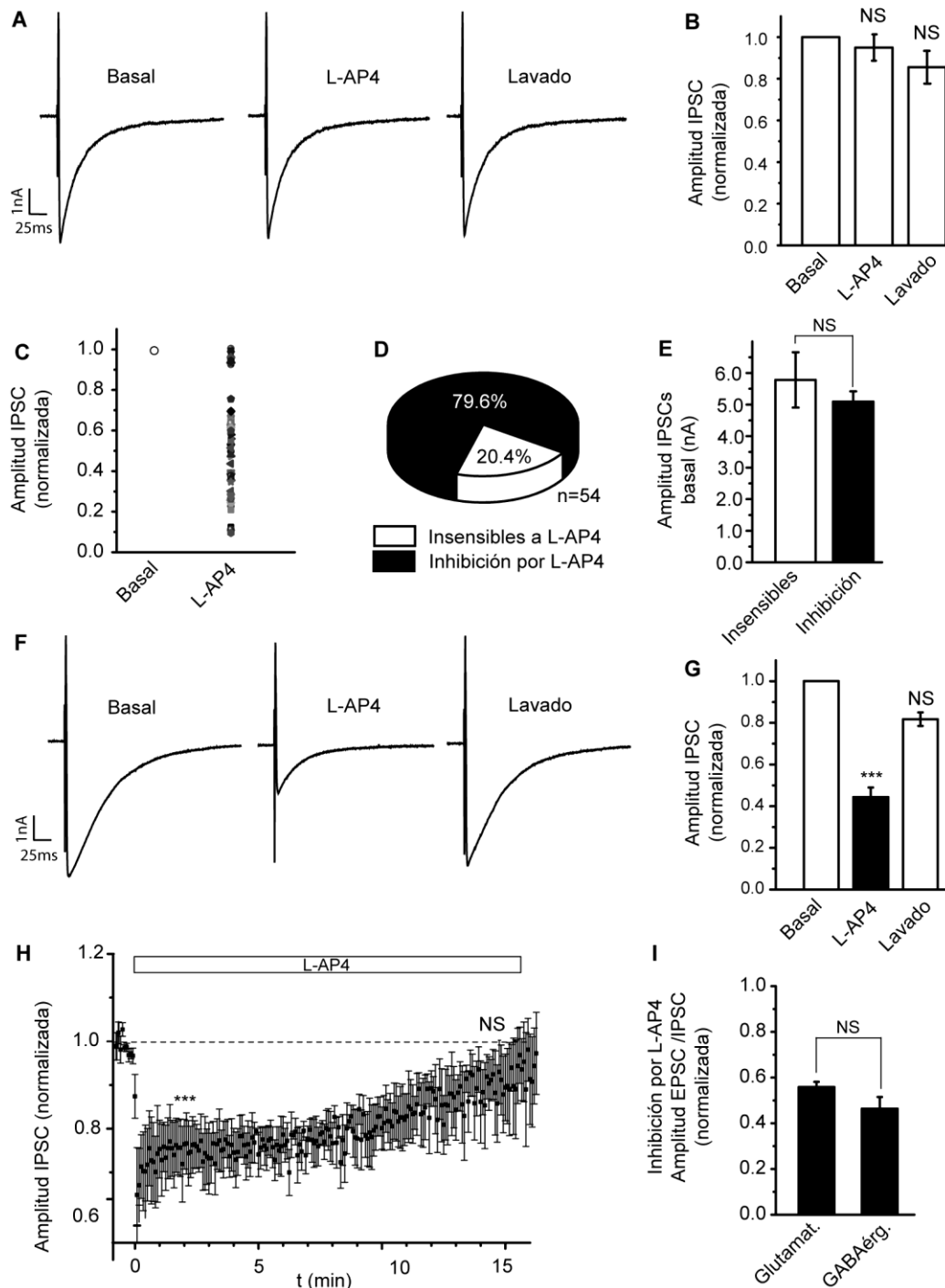


Figura 4.10. La activación prolongada de receptores metabotrópicos del grupo III revierte la inhibición de la liberación inducida en neuronas GABAérgicas. Las neuronas se registraron en fijación de voltaje en configuración de célula completa a -70mV, tras la despolarización a 0mV durante 2ms. (A y B) Ausencia de efecto sobre los IPSCs de la aplicación breve de L-AP4 (200µM, 30s). Los datos se normalizaron frente al control antes del tratamiento con el agonista (C) Inhibición normalizada de cada neurona. (D) Proporción de neuronas GABAérgicas que responden a la aplicación breve de L-AP4 en cultivos autópticos de hipocampo. (E) Comparación de la amplitud basal de los IPSCs entre neuronas GABAérgicas insensibles y sensibles a L-AP4. (F y G) Efecto inhibitorio sobre la amplitud de los IPSCs de la aplicación breve de L-AP4. Los datos se normalizaron frente al control antes del tratamiento con el agonista. (H) Inhibición reversible de los IPSCs durante la aplicación prolongada de L-AP4 (200µM, 15min). (I) Reversión de la inhibición de los IPSC durante la aplicación prolongada de L-AP4. Los datos se expresaron como la media ± SEM. NS, p>0.05; ***, p<0.001 (test de t de Student).

Sin embargo, dado que sólo una subpoblación de las neuronas que expresan estos receptores desarrolla la reversión de la inhibición (Fig. 4.9. H e I), de acuerdo con esta propuesta, los mecanismos de internalización estarían restringidos según los tipos neuronales. Una segunda posibilidad, es que la activación prolongada de los receptores mGlu de tipo III potencie la liberación de neurotransmisores, tal como ha sido descrito en sinaptosomas (Martín et al., 2010), lo que a su vez revertiría la inhibición sobre los VDCC. La potenciación de la liberación de glutamato por receptores mGlu7 descrita en sinaptosomas, probablemente dependa de la modulación de la proteína de la maquinaria excitotóxica Munc13 (Martín et al., 2010), que está implicada en la modulación de liberación espontánea de neurotransmisores (Augustin et al., 1999; Rhee et al., 2002). Por lo tanto, con el objetivo de poder estudiar la potenciación de la transmisión sináptica por los receptores mGlu del grupo III, sin la participación de los mecanismos de inhibición de los VDCC, determinamos la liberación espontánea o mEPSC. La liberación espontánea, se determinó en presencia de TTx (300nm), para impedir la generación de potenciales de acción y descartar la participación de los VDCC. No obstante, para descartar completamente la apertura espontánea de estos canales, las neuronas se trataron también con el bloqueante de los VDCC, CdCl₂ (100µM; Swandulla y Armstrong, 1989). Por lo tanto, en estas condiciones, los efectos observados sobre la liberación espontánea serían independientes de la modulación de canales iónicos y probablemente debidos a la regulación de la maquinaria excitotóxica.

Los efectos de L-AP4 (10min) sobre la liberación espontánea, en presencia de TTx y Cd²⁺, se determinaron en aquellas neuronas que previamente habían mostrado la inhibición de la amplitud de los EPSC por la aplicación breve del agonista (Fig. 4.9. F y G). Encontramos que un 59.4% (n=19 de 32 neuronas glutamatérgicas estudiadas; Fig. 4.11. D) de las neuronas mostró una inhibición de la frecuencia de los mEPSC durante la aplicación del agonista (0.76 ± 0.05 , normalizada frente a la frecuencia basal antes de aplicar L-AP4; $p < 0.001$; Fig. 4.11. A y B), que desapareció tras el lavado del fármaco (0.99 ± 0.04 ; $p > 0.05$; Fig. 4.11. A y B). Además, se observó una ligera, aunque significativa ($p < 0.001$), disminución en la amplitud de los mEPSC (Fig. 4.11.C). Sin embargo, en la otra subpoblación de neuronas glutamatérgicas (40.6%; n=13; Fig 4.11.D), la aplicación prolongada del L-AP4 produjo un aumento de la frecuencia de los mEPSC (1.69 ± 0.23 ; $p < 0.05$, a los 10min de perfusión del agonista, Fig. 4.11. H e I), que continuó tras el lavado del agonista (3.18 ± 0.61 , $p < 0.01$, 10 minutos después del lavado; y 4.88 ± 1.02 , $p < 0.05$, 20 minutos después del lavado; Fig 4.11. H e I). Además, se observó una tendencia, aunque no significativa, al aumento de la amplitud de los mEPSC después del lavado del L-AP4 (0.98 ± 0.04 , $p > 0.05$, a los 10 minutos de perfusión del agonista; 1.14 ± 0.12 , $p > 0.05$, 10 minutos después del lavado; 1.19 ± 0.16 , $p > 0.05$, 20 minutos después del lavado; Fig. 4.11. J). Teniendo en cuenta que las neuronas que muestran sensibilidad a L-AP4 son menos

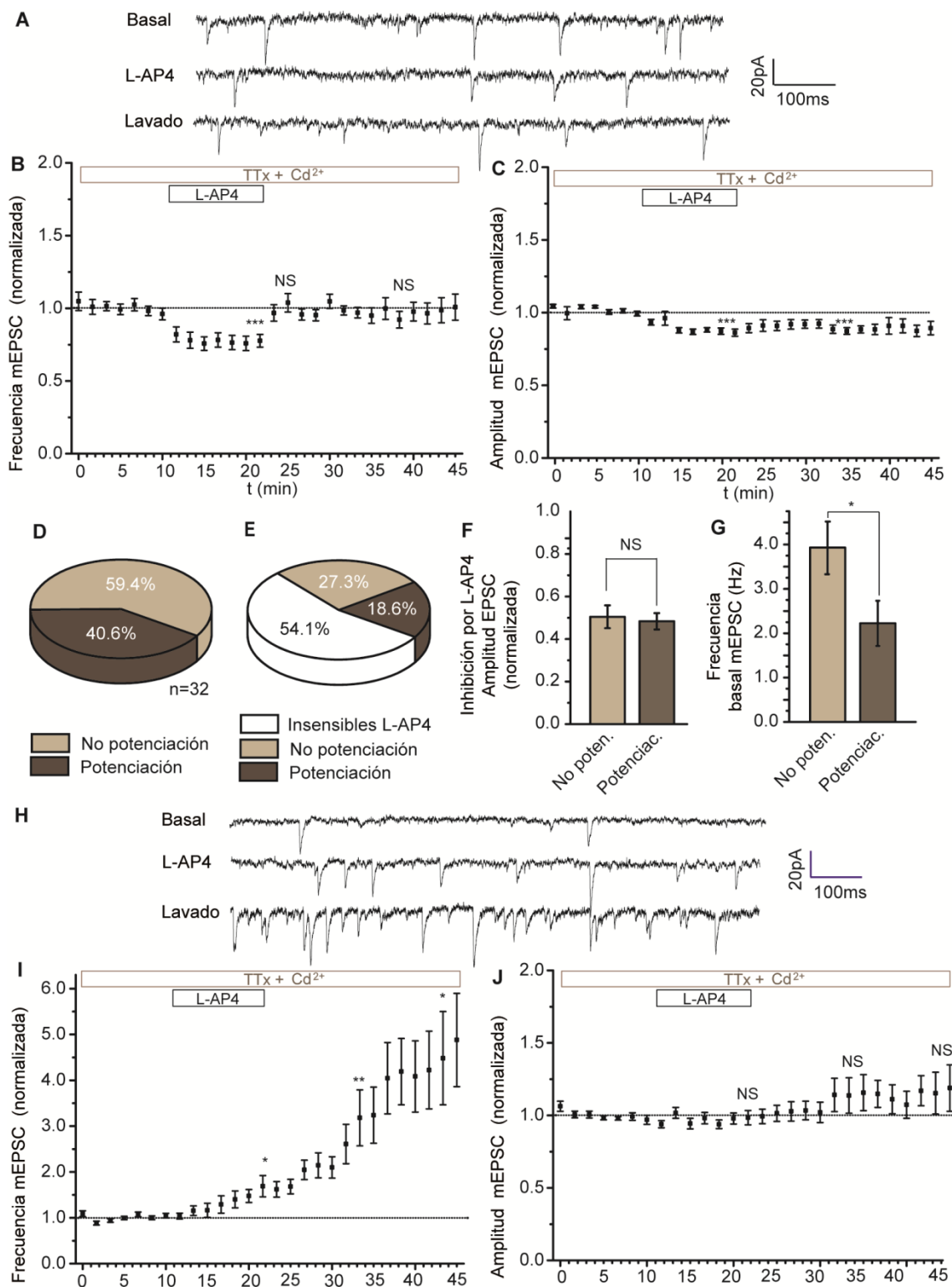


Figura 4.11. La activación prolongada de los receptores metabotrópicos del grupo III incrementa la liberación espontánea en neuronas glutamatergicas. Los mEPSC se registraron en fijación de voltaje en configuración de célula completa a -70mV, en presencia de TTx (300nm) y CdCl₂ (100μM). (A) mEPSC durante la aplicación prolongada de LAP4 (200μM, 10min) en la subpoblación de neuronas que desarrollan la inhibición transitoria de la frecuencia de los mismos. (B) Frecuencia y (C) amplitud de los mEPSCs normalizadas frente a los correspondientes valores basales antes de la aplicación del agonista. (D) Proporción de neuronas glutamatergicas sensibles a L-AP4 que desarrollan o no la potenciación de los mEPSCs. (E) Proporción, sobre el total de neuronas glutamatergicas estudiadas, de neuronas insensibles a L-AP4, y de las que siendo sensibles al agonista desarrollan o no la potenciación de los mEPSCs. (F) Inhibición de los EPSC por la aplicación aguda de L-AP4 de las neuronas glutamatergicas que desarrollan o no la potenciación de los mEPSC. (D) mEPSCs basales (antes de la aplicación de L-AP4) de las neuronas glutamatergicas que desarrollan o no la potenciación de la frecuencia de los mEPSCs. (H) Ejemplos de registros de mEPSCs de la subpoblación de neuronas que desarrollan un aumento persistente de la frecuencia durante la aplicación prolongada de LAP4 y tras el lavado del agonista. (I) Frecuencia y (J) amplitud de los mEPSCs normalizadas frente a los correspondientes valores basales. Los datos se expresaron como la media ± SEM. NS, p>0.05; *, p<0.05; **, p<0.01; ***, p<0.001 (test de t de Student).

de la mitad de las neuronas glutamatérgicas estudiadas (Fig. 4.9. D), estimamos que sólo un 18.6% de neuronas glutamatérgicas totales presentes en los cultivos autápticos de hipocampo desarrollan los mecanismos de potenciación de la frecuencia de los mEPSC (Fig. 4.11.E).

Dentro de las neuronas glutamatérgicas que inhiben la amplitud de los EPSC se distinguen dos comportamientos respecto a la modulación de la frecuencia de los mEPSC: la inhibición dependiente de la presencia de L-AP4 y la potenciación persistente tras el lavado del agonista. La magnitud de la inhibición de los EPSC no difiere ($p > 0.05$) entre las neuronas que potencian los mEPSC (0.48 ± 0.04 , Fig. 4.11.F) y las que no desarrollan este efecto (0.50 ± 0.05 , Fig. 4.11.F). Sin embargo, la frecuencia basal de los mEPSC, antes de la aplicación de L-AP4, es menor ($p < 0.05$) en las neuronas que desarrollan la potenciación de la liberación espontánea (2.2 ± 0.5 Hz; Fig. 4.11.G), que en las neuronas que no muestran el incremento de la liberación espontánea (3.9 ± 0.6 Hz; Fig. 4.11.G). Por lo tanto, probablemente las neuronas con menor frecuencia de liberación espontánea son las que pueden incrementarla por mecanismos dependientes de los receptores mGlu del grupo III.

Dado que los resultados previos demostraron la sensibilidad a L-AP4 de las neuronas GABAérgicas de los cultivos autápticos de hipocampo, determinamos el efecto de la perfusión prolongada del fármaco sobre la liberación espontánea (mIPSC) en presencia de TTx y Cd^{2+} . De la misma manera que en los ensayos anteriores, se seleccionaron las células que mostraron sensibilidad a la aplicación breve de L-AP4 (Fig. 4.10. F y G). El tratamiento prolongado con L-AP4 ($n=8$) aumentó la frecuencia de los mIPSC durante la aplicación del agonista (1.69 ± 0.12 ; $p < 0.001$; Fig. 4.12. A y C) y después del lavado (2.74 ± 0.53 , $p < 0.011$, 10 minutos después del lavado; y 3.92 ± 1.03 , $p < 0.01$, 20 minutos después del lavado; Fig 4.12. A y C). Además, se observó una tendencia, que si llega a ser significativa, al aumento en la amplitud de los mIPSC después del lavado del L-AP4 (1.02 ± 0.03 , $p > 0.05$, a los 10 minutos de perfusión del agonista; 1.15 ± 0.03 , $p < 0.05$, 10 minutos después del lavado; 1.19 ± 0.08 , $p > 0.05$; Fig. 4.12. D). La potenciación de la frecuencia de los mIPSC se observó en todas las neuronas GABAérgicas que mostraron sensibilidad al L-AP4. No se observaron diferencias ($p > 0.05$) entre las frecuencias basales de la liberación espontánea de las neuronas GABAérgicas (1.95 ± 0.44 Hz; Fig 4.12.B) y de las glutamatérgicas que desarrollan la potenciación (2.2 ± 0.5 Hz; Fig. 4.12.B). Por lo tanto, las neuronas que desarrollan la potenciación de la liberación espontánea (una subpoblación de las glutamatérgicas y todas las GABAérgicas) están caracterizadas por presentar una frecuencia basal de eventos espontáneos menor ($p < 0.05$) que la subpoblación de glutamatérgicas que no desarrollan este fenómeno.

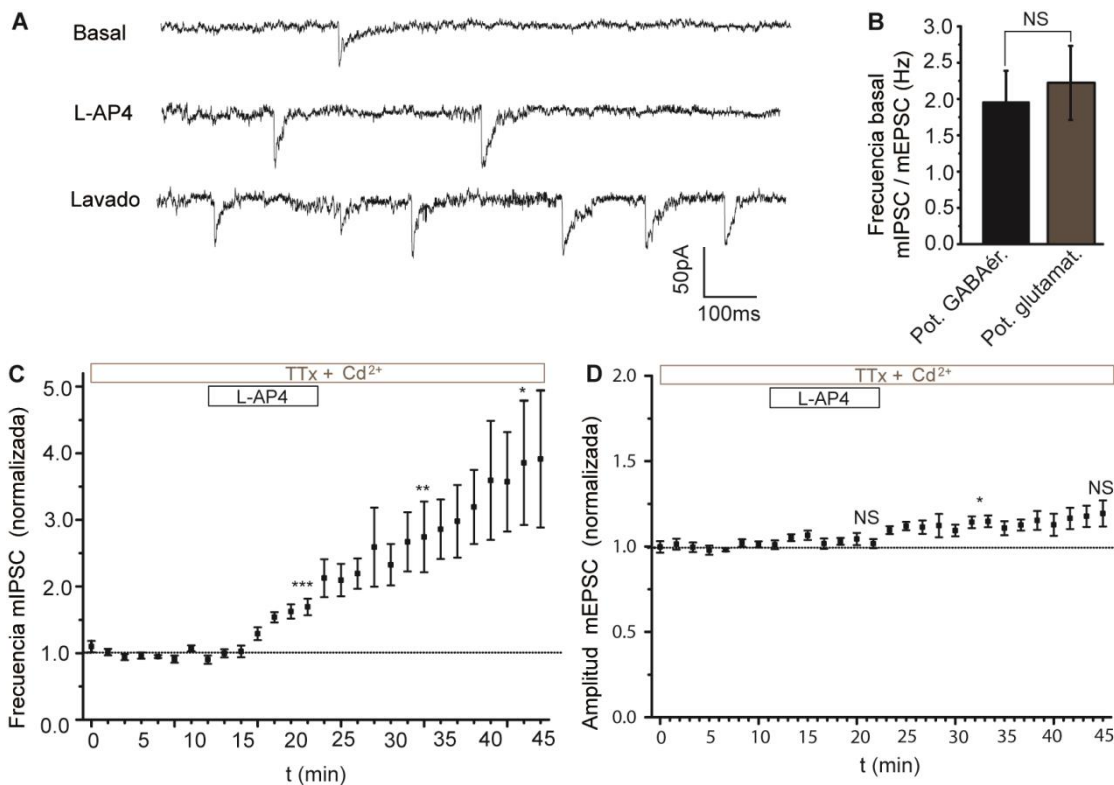


Figura 4.12. Incremento de la liberación espontánea en neuronas GABAérgicas por activación prolongada de receptores metabotrópicos del grupo III. Los mIPSCs se registraron en fijación de voltaje en configuración de célula completa a -70mV, en presencia de TTx (300nm) y CdCl₂ (100μM). (A) mIPSC durante la aplicación prolongada de LAP4 (200μM, 10min). (B) Frecuencia basal de los mEPSC/mIPSC de las neuronas glutamatérgicas y GABAérgicas que desarrollan un aumento de la frecuencia de los eventos espontáneos. (C) Frecuencia y (D) amplitud de los mIPSC normalizadas frente a los correspondientes valores basales antes de la aplicación del agonista. Todas las neuronas GABAérgicas sensibles a la aplicación breve de L-AP4 desarrollaron este fenómeno. Los datos se expresaron como la media ± SEM. NS, p>0.05; *, p<0.05; **, p<0.01; ***, p<0.001 (test de t de Student).

Los mecanismos de potenciación de la liberación independientes de la modulación de los VDCC por receptores mGlu7 en sinaptosomas, probablemente dependan de la acción de la proteína Munc13 (Fig 4.2; 4.3; 4.30; Martín et al., 2010), que es esencial para el proceso de preparación de las SVs para su liberación (Augustin et al., 1999; Rhee et al., 2002). Por lo tanto, el aumento en la liberación espontánea dependiente de la activación prolongada de los receptores mGlu de tipo III en cultivos autápticos, podría implicar la modulación de la maquinaria excitotóxica y el aumento del número de SVs listas para su liberación o RRP. Es posible determinar el RRP, mediante la aplicación de una solución hiperosmótica de sacarosa (0.5M, Rhee et al., 2002). Así, estimamos el tamaño del RRP antes del tratamiento con altas concentraciones de L-AP4 (10min) y 20minutos después del mismo. Encontramos que el tamaño relativo del RRP después del tratamiento fue mayor (p<0.01) en las neuronas que desarrollan el incremento de la frecuencia la liberación espontánea (0.91±0.13, n=6; Fig 4.13), que en las neuronas que no desarrollan esta potenciación (0.31±0.11, n=6; Fig 4.13).

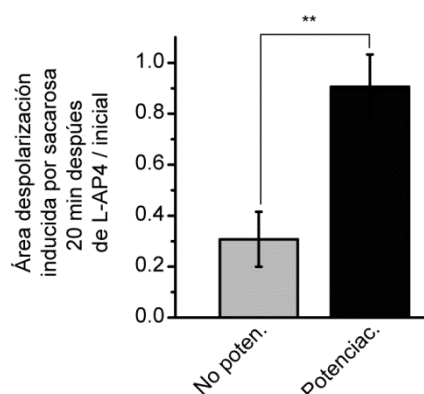


Figura 4.13. Incremento del RRP por la activación prolongada de receptores metabotrópicos del grupo III. El tamaño del RRP se estimó como el área del registro de la despolarización inducida por sacarosa 0.5M, antes de aplicar el agonista, y 20 minutos después de la aplicación del mismo. Los datos se expresaron como la media \pm SEM. **, $p < 0.01$ (test de t de Student).

Por lo tanto, estos resultados ponen de manifiesto que, en cultivos autópticos de neuronas hipocampales, existen mecanismos de potenciación de la liberación de neurotransmisores por la activación prolongada de los receptores metabotrópicos de tipo III. Estos fenómenos se desarrollan tanto en neuronas glutamatérgicas como GABAérgicas, y es posible que impliquen mecanismos de modulación de la maquinaria excitotóxica que participa en la preparación de las SVs.

2. POTENCIACIÓN DE LA LIBERACIÓN DE GLUTAMATO POR RECEPTORES β -ADRENÉRGICOS.

2.1.MECANISMO DE POTENCIACIÓN DE LA LIBERACIÓN DE GLUTAMATO POR RECEPTORES β -ADRENÉRGICOS EN SINAPTOSOMAS DE CORTEZA CEREBRAL.

La generación de cAMP potencia la liberación de glutamato por distintos mecanismos. La proteína quinasa A, PKA, uno de los principales efectores de este segundo mensajero, modula la liberación de glutamato principalmente por la fosforilación de canales iónicos, como los VDCC, y de proteínas de la maquinaria excitotóxica. Sin embargo, existen otras dianas de cAMP distintas de PKA que pueden mediar en esta modulación de la liberación de neurotransmisor (*Introducción: 3.1; Seino y Shibashaki, 2005*).

Uno de los objetivos de este trabajo ha sido estudiar los mecanismos presinápticos dependientes de cAMP que modulan la maquinaria excitotóxica en sinaptosomas de corteza cerebral obtenidos de ratones adultos.

2.1.1. Potenciación de la liberación de glutamato independiente de la proteína quinasa A.

La elevación de los niveles de cAMP que se produce con el activador de la adenilato ciclasa (AC), forskolina (15 μ M), incrementó la liberación de glutamato inducida por bajas

concentraciones (5mM) de KCl ($172.2 \pm 2.9\%$, $n=6$, $p < 0.001$; Fig. 4.14, A y B). La diana del cAMP más ampliamente estudiada en la modulación de la exocitosis es la proteína quinasa activada por cAMP o PKA (*Introducción: 3.1.1*). Con el fin de determinar si esta quinasa participa en la potenciación de la liberación, se aplicó forskolina en presencia del inhibidor de la PKA, H-89 (10 μ M, 30min), observándose una reducción parcial de la magnitud de la potenciación ($138.8 \pm 3.2\%$, $n=10$, $p < 0.001$; Fig. 4.14, A y B), que sugiere la existencia de un componente dependiente de PKA, y otro independiente de esta proteína. El componente independiente de PKA podría modular diversas proteínas, como canales iónicos implicados en la generación de potenciales de acción (canales de Na⁺ y de K⁺), los VDCC o proteínas de la maquinaria exocitótica. Sin embargo, la liberación espontánea observada en condiciones de bloqueo de la generación de potenciales de acción, y de la actividad de los VDCC, es principalmente dependiente de la maquinaria exocitótica. Por lo tanto, dado que el objetivo de este trabajo fue analizar los mecanismos de modulación por cAMP de la maquinaria exocitótica, estudiamos los efectos del cAMP en la liberación espontánea en presencia del bloqueante de los canales de Na⁺, tetrodotoxina (TTx, 1 μ M). En estas condiciones, el incremento de los niveles de cAMP con forskolina (15 μ M) potenció la liberación espontánea de glutamato ($171.5 \pm 10.3\%$, $n=4$, $p < 0.001$; Fig. 4.14, C y D), mientras que, la presencia del inhibidor de la PKA, H89, no afectó a esta respuesta ($162.0 \pm 8.4\%$, $n=5$, $p < 0.001$; Fig. 4.14, C y D). Por tanto, los mecanismos dependientes de cAMP que incrementan la liberación espontánea son independientes de la PKA y presumiblemente reflejan la modulación de la maquinaria exocitótica,

La ionomicina es un ionóforo de Ca²⁺ que se intercala en las membranas biológicas favoreciendo el transporte de este ión a través de las mismas (McMahon y Nicholls, 1991). En sinaptosomas, la ionomicina da lugar a la entrada de Ca²⁺, e induce la exocitosis de manera independiente de la activación y modulación de los VDCC. Con este fin, aplicamos a los sinaptosomas bajas concentraciones de ionomicina (0.5-1 μ M), ajustando su concentración para lograr una liberación baja de glutamato (aproximadamente 0.5-0.6 nmoles de glutamato). La aplicación de forskolina (15 μ M) también potenció la liberación inducida por ionomicina ($272.1 \pm 5.5\%$, $n=7$, $p < 0.001$; Fig. 4.14, E y F), aunque existe un componente dependiente de PKA, ya que H-89 reduce parcialmente el efecto ($212.9 \pm 6.4\%$, $n=6$, $p < 0.001$; Fig. 4.14, E y F). Es posible que, en presencia de la ionomicina, se produzca la despolarización espontánea de la membrana presináptica, y que la modulación de canales iónicos contribuya a la potenciación observada. Para evitar la generación de potenciales de acción, repetimos estos experimentos en condiciones de bloqueo de los canales de Na⁺ con TTx, de manera que la potenciación por cAMP debería depender completamente de la modulación de la maquinaria exocitótica. En estas condiciones, la forskolina incrementó la liberación de glutamato ($170.1 \pm 3.8\%$, $n=9$, $p < 0.001$; Fig. 4.14, E y F), de manera totalmente insensible a la inhibición de la PKA por

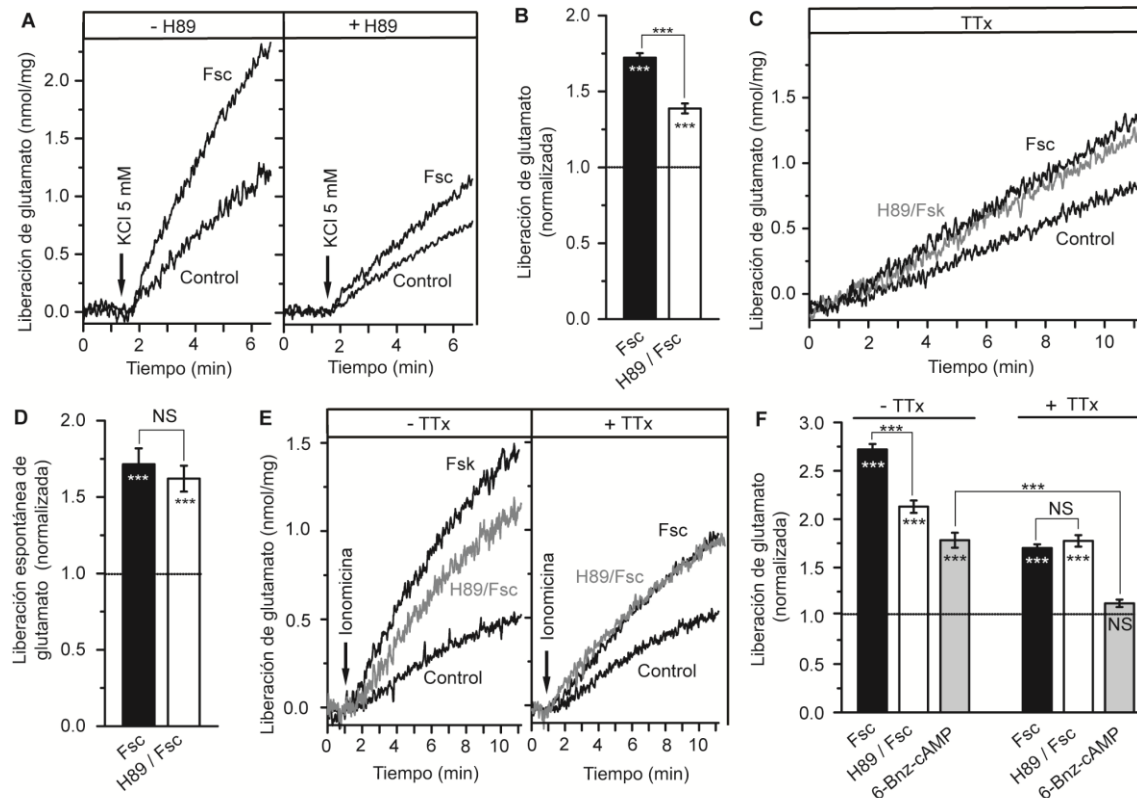


Figura 4.14. La tetrodotoxina aísla el componente PKA-independiente de la potenciación de la liberación de glutamato por cAMP. Modulación de la liberación de glutamato por forskolina (Fsc, 15 μM) en ausencia y en presencia del inhibidor de la PKA, H89 (10 μM, 30min). (A y B) Liberación dependiente de Ca²⁺ inducida por bajas concentraciones de KCl (5mM). La forskolina se aplicó un minuto antes del KCl. La liberación se normalizó frente al control en ausencia de forskolina. (C y D) Liberación espontánea en presencia de TTx (1 μM). La forskolina se aplicó un minuto antes de comenzar el registro. La liberación se normalizó frente al control en ausencia de forskolina. (E y F) Liberación inducida por el ionóforo de Ca²⁺, ionomicina (0.5-1 μM) en ausencia y en presencia de TTx (1 μM). El activador específico de la PKA, N6-Bnz-cAMP (500 μM), y la forskolina se aplicaron un minuto antes de la ionomicina. La liberación se normalizó frente al control con ionomicina. Los datos se expresaron como la media ± SEM (barras de error). NS (no significativo), p>0.05; ***, p<0.001 (ANOVA con test de Bonferroni), comparados con el control (símbolos en el interior de las barras) o frente a otra condición (símbolos en el exterior de las barras).

H89 (177.4±5.9%, n=7, p<0.001; Fig. 4.14, E y F). Además, el análogo de cAMP, N6-Bnz-cAMP, que activa específicamente la PKA, potencia la liberación inducida por ionomicina en ausencia de TTx (178.2±7.8%, n=5, p<0.001; Fig. 4.14, F), pero no en presencia de la toxina (112.9±3.8%, n=7, p>0.05; Fig. 4.14, F).

Estos resultados ponen de manifiesto que el cAMP no sólo potencia la liberación de glutamato por mecanismos dependientes de PKA, sino también por vías de señalización independientes de esta quinasa. Además, en condiciones de bloqueo de la generación de potenciales de acción con TTx, y por tanto, sin la participación de los VDCC ni otros canales iónicos, la potenciación de la liberación espontánea y de la inducida por ionomicina se desarrolla por mecanismos independientes de PKA. Por lo tanto, la presencia de TTx aísla el componente PKA independiente de la potenciación de la liberación por cAMP. Estos resultados concuerdan con otros estudios, en los que se propone que la potenciación por cAMP de la liberación inducida por despolarización presenta componentes dependientes e independientes de PKA, mientras que la espontánea en presencia de TTx, es independiente de PKA (Gekel y Neher, 2008).

La aplicación de altas concentraciones del ionóforo de Ca^{2+} ionomicina podría disminuir la producción de ATP, y llevar a la despolarización de la membrana presináptica y a la liberación de glutamato independiente de los mecanismos de exocitosis vesicular (McMahon y Nicholls, 1991). Aunque este efecto es altamente improbable a las bajas concentraciones de ionomicina empleadas (0.5-1.0 μM), para descartarlo, incubamos los sinaptosomas con el inhibidor de la ATPasa vacuolar, Bafilomicina A1 (1 μM , 45min). Esta ATPasa de las SVs es necesaria para el transporte y almacenamiento del glutamato en interior de las mismas, por lo que su inhibición con Bafilomicina A1 vacía las SVs de glutamato. Este tratamiento anuló la liberación de glutamato inducida por ionomicina ($0.02\pm 0.03\%$ nmoles de glutamato, $n=4$; Fig 4.15.A), en comparación con los sinaptosomas sin tratar con este fármaco ($0.58\pm 0.02\%$, $n=3$; Fig 4.15.A). Por lo tanto, la liberación inducida por bajas concentraciones de ionomicina es dependiente de los mecanismos de fusión de las SVs.

La aplicación de ionomicina, en presencia de TTx, probablemente está asociada a la modulación de la maquinaria exocitótica, y aísla el mecanismo de potenciación de la liberación de glutamato por cAMP independiente de PKA. Además, este protocolo tiene la ventaja experimental de poder ajustar la liberación de glutamato inducida por el ionóforo. Por lo tanto, elegimos este modo de estimulación de los sinaptosomas para estudiar las vías de señalización implicadas en la potenciación de la liberación de glutamato por cAMP.

2.1.2. Los receptores β -adrenérgicos potencian la liberación de glutamato por mecanismos independientes de PKA, que implican la proteína Epac.

Durante muchos años se ha empleado la forskolina como herramienta farmacológica para activar la AC y generar cAMP. Sin embargo, en un contexto fisiológico la AC puede ser activada por receptores GPCR acoplados a proteínas G triméricas del tipo G_{as} (Fig. 1.5). Los receptores β -adrenérgicos (β -AR; *Introducción: 2.2.2*) están acoplados a la formación de cAMP y su activación potencia la liberación de glutamato en diferentes preparaciones (Huang y Hsu, 2006; Ji et al., 2008; Kobayashi et al., 2009), incluida los sinaptosomas cerebrocorticales (Herrero et al., 1996; Millán et al., 2003).

Con el fin de conocer si la activación de los β -AR modula la maquinaria exocitótica, determinamos el efecto de su agonista, isoproterenol, en la liberación inducida por ionomicina en presencia de TTx. El isoproterenol (100 μM) incrementó la liberación de glutamato ($173.1\pm 3.8\%$, $n=23$, $p<0.001$; Fig. 4.15, A y B), mientras que este efecto se pierde en presencia del antagonista de los β -AR, propranolol ($106.5\pm 3.1\%$, $n=6$, $p>0.05$; Fig. 4.15, B). Además, la respuesta al isoproterenol fue insensible al inhibidor de la PKA, H-89 ($178.1\pm 3.3\%$, $n=7$, $p<0.001$; Fig. 4. B). Por tanto, los β -AR además de activar

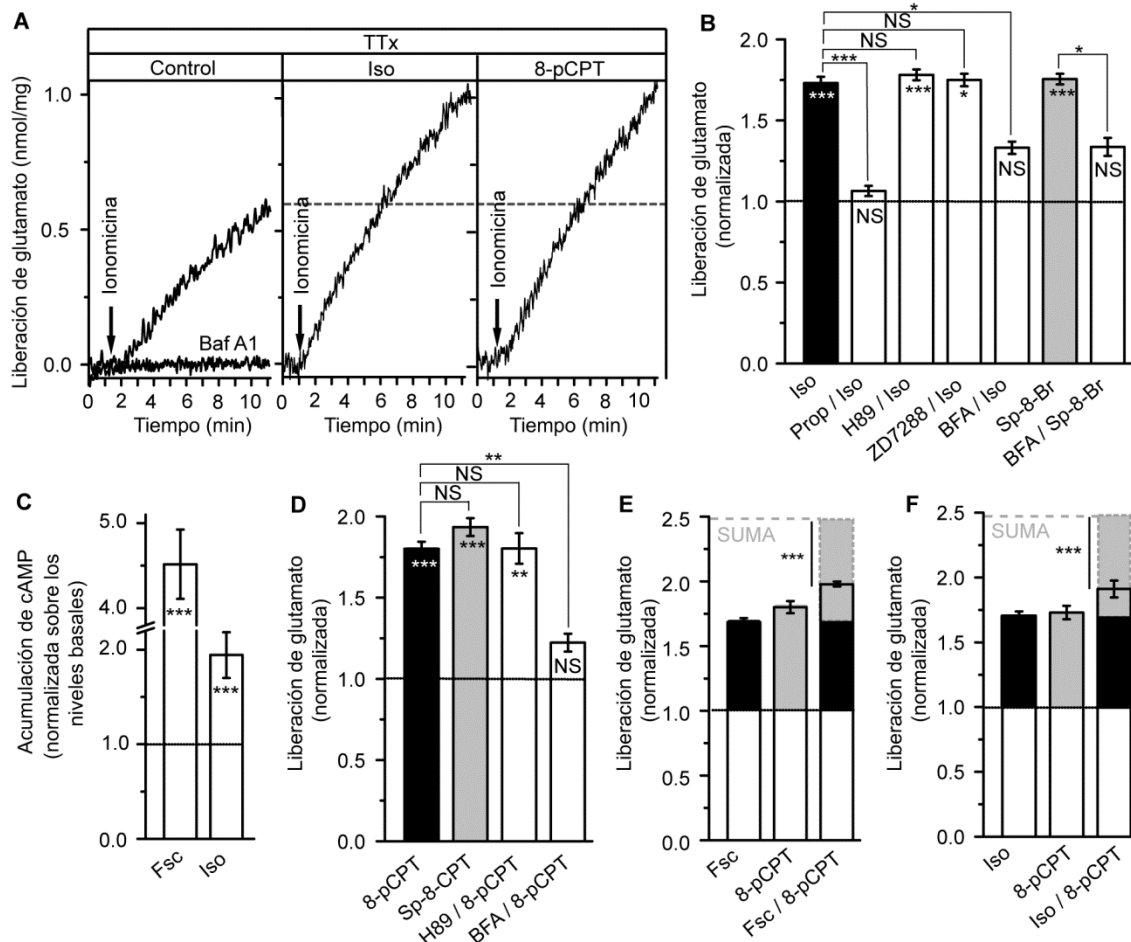


Figura 4.15. La activación de los receptores β -adrenérgicos y de la proteína Epac incrementa la liberación de glutamato por mecanismos independientes de PKA. (A) Modulación de la liberación de glutamato inducida por el ionóforo de Ca^{2+} , ionomicina (0.5-1 μ M), en presencia de TTx (1 μ M), por el activador de los receptores β -adrenérgicos, isoproterenol (Iso, 100 μ M), y el activador específico de Epac, 8-pCPT-2'-Me-cAMP (8-pCPT, 50 μ M). El inhibidor de la ATPasa vacuolar de las SVs, bafilomicina A1 (Baf A1, 1 μ M), se incubó durante 45 minutos. (B) Cuantificación del efecto sobre la liberación de glutamato de isoproterenol y del análogo permeable de cAMP, Sp-8-Br-cAMPs (Sp-8-Br, 250 μ M) en ausencia y en presencia del antagonista de los receptores β -adrenérgicos, propranolol (Prop, 100 μ M, 30min), el inhibidor de la PKA, H-89 (10 μ M, 30min), el bloqueante de los canales HCN, ZD7288 (60 μ M, 30min) y el inhibidor del intercambio GDP-GTP en proteínas G pequeñas, brefeldina A (BFA, 100 μ M, 30min). (C) Acumulación de cAMP en presencia de IBMX (1mM, 30min), normalizada frente a los niveles basales en sinaptosomas sin tratar (3.3 \pm 0.4 pmol/mg), en sinaptosomas tratados con forskolina (15 μ M, 10min) o isoproterenol (100 μ M, 10min). (D) Efecto sobre la liberación de glutamato de la aplicación de 8-pCPT y del análogo no hidrolizable Sp-pCPT-2'-O-Me-cAMP (Sp-8-CPT, 50 μ M), en ausencia y en presencia de H-89 y brefeldina A. (E y F) Aplicación simultánea de 8-pCPT e isoproterenol/forskolina (Fsc, 15 μ M). El 8-pCPT se añadió 40s después de la aplicación de isoproterenol o forskolina y 40s antes de ionomicina. Las barras en líneas discontinuas indican la suma aritmética de las potenciaciones individuales. La aplicación de isoproterenol, 8-pCPT, Sp-8-Br y Sp-8-CPT se realizó un minuto antes de la aplicación de ionomicina. Las liberaciones de glutamato se normalizaron frente a la liberación inducida por ionomicina. Todos los ensayos de liberación de glutamato se realizaron en presencia de TTx (1 μ M), añadida dos minutos antes de empezar el registro. Los datos se expresaron como la media \pm SEM (barras de error). NS (no significativo), $p > 0.05$; *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$ (ANOVA con test de Bonferroni), comparados con el control (símbolos en el interior barras) o frente a otra condición (símbolos en el exterior de las barras).

mecanismos dependientes de PKA (Herrero et al., 1996), también activan en mecanismos independientes de estas quinasas, en preparaciones de sinaptosomas cerebrocorticales.

Es importante señalar que concentraciones mayores de forskolina (100 μ M) produjeron un incremento de la liberación de glutamato (288.3 \pm 6.3%, n=4, dato no mostrado) significativamente superior ($p < 0.001$) al producido por la concentración de isoproterenol empleada (100 μ M), que es la concentración máxima en sinaptosomas (curva dosis respuesta descrita en Herrero et al., 1996). Este hecho sugiere que los efectos de

los β -AR se restringen a una subpoblación de los terminales sinápticos de todos los botones sensibles a forskolina.

A continuación, determinamos si esta acción de los β -AR es dependiente de la generación de cAMP, y no de otros mecanismos (Daaka et al., 1997; Shenoy y Lefkowitz, 2011). En primer lugar, encontramos que la magnitud de la potenciación de la liberación inducida por el análogo de cAMP, Sp-8-Br-cAMPS ($175.5 \pm 3.2\%$, $n=11$, $p < 0.001$; Fig. 4.15, B), es similar a la de isoproterenol. Además, la aplicación de isoproterenol ($100 \mu\text{M}$) aumentó la acumulación de cAMP en sinaptosomas ($194.2 \pm 24.2\%$, $n=6$, $p < 0.001$; Fig. 4.15, C), aunque en menor medida que forskolina ($451.6 \pm 41.7\%$, $n=5$, $p < 0.001$, test de t de Student; Fig. 4.15, C). Por lo tanto, la potenciación de la liberación por activación de los β -AR está asociada al incremento en los niveles de cAMP.

De forma adicional a su efecto sobre PKA, el cAMP puede activar diferentes proteínas cuya acción podría modular la liberación de glutamato (*Introducción: 3.1.*). Una de estas proteínas son los canales catiónicos operados por despolarización y regulados por nucleótidos cíclicos o HCN (He et al., 2014). Aunque el modo de estimulación, empleando bajas concentraciones de ionomicina y TTx, hace improbable la activación de los canales HCN, estudiamos su participación empleando el inhibidor de estos canales, ZD7288. La incubación con ZD7288 ($60 \mu\text{M}$) aumentó la liberación basal (dato no mostrado), probablemente como consecuencia del papel de estos receptores en el mantenimiento del potencial de membrana de reposo (He et al., 2014), aunque no mostró efecto alguno en la potenciación de la liberación inducida por isoproterenol ($175.0 \pm 3.8\%$, $n=4$, $p > 0.05$; Fig. 4.15, B). Por lo tanto, en estas condiciones experimentales, la potenciación por los β -AR no parece implicar la modulación de los canales HCN.

El factor intercambiador de nucleótidos de guanina para proteínas G pequeñas directamente activado por cAMP, o Epac, es uno de los principales efectores de este segundo mensajero implicado en las vías de señalización independientes de PKA (*Introducción: 3.1.2.*). Para estudiar la participación de Epac en la potenciación de la liberación de glutamato inducida por ionomicina en presencia de TTx, empleamos el análogo permeable de cAMP específico de Epac, 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP (8-pCPT). La aplicación de 8-pCPT ($50 \mu\text{M}$) incrementó la liberación de glutamato ($180.1 \pm 4.3\%$, $n=8$, $p < 0.001$; Fig. 4.15, A y D), de manera insensible a la inhibición de la PKA con H-89 ($180.2 \pm 9.4\%$, $n=3$, $p > 0.05$; Fig. 4.15, D). Con el fin de descartar la implicación en el proceso de los productos de hidrólisis del 8-pCPT (Laxman et al., 2006; Poppe et al., 2008), empleamos el análogo no hidrolizable Sp-8-pCPT, que potenció igualmente la liberación de glutamato ($193.4 \pm 5.5\%$, $n=8$, $p < 0.001$; Fig. 4.15, D).

Estos resultados demuestran que la activación de la proteína Epac potencia la liberación inducida por ionomicina en presencia de TTx, pero no aclaran si esta proteína participa o no en la vía de potenciación iniciada por los β -AR. Con el objetivo de estudiar

este aspecto, encontramos que la potenciación tras la aplicación conjunta de forskolina y 8-pCPT ($196.8 \pm 1.9\%$, $n=6$, $p < 0.001$; Fig. 4.15.E) fue sólo ligeramente mayor que las potenciaciones observadas por la aplicación individual de estos fármacos (forskolina $15 \mu\text{M}$: $168.5 \pm 3.0\%$, $n=6$, $p < 0.001$; 8-pCPT $50 \mu\text{M}$: $180.1 \pm 4.3\%$, $n=8$, $p < 0.001$; Fig. 4.15.E). Por tanto, la oclusión entre los efectos producidos por la generación de cAMP y por la activación de Epac, sugiere que esta proteína podría mediar en los mecanismos de potenciación por cAMP. De manera análoga, encontramos también que la aplicación conjunta de isoproterenol y 8-pCPT ($191.1 \pm 6.5\%$, $n=12$, $p < 0.001$; Fig. 4.15.F) fue sólo ligeramente mayor que las potenciaciones individuales (isoproterenol $100 \mu\text{M}$: $131.5 \pm 3.2\%$, $n=5$, $p < 0.001$; 8-pCPT $50 \mu\text{M}$: $172.9 \pm 5.2\%$, $n=5$, $p < 0.001$; Fig. 4.15. F). Por lo tanto, la proteína Epac podría participar también en la vía de señalización dependiente de la activación de los β -AR.

La proteína Epac es una proteína que promueve el intercambio de GDP por GTP, activando proteínas G pequeñas. Para determinar si la acción de Epac depende de esta actividad, empleamos brefeldina A (BFA), un inhibidor de los dominios de acción GEF (Zhong y Zucker, 2005). La incubación con BFA ($100 \mu\text{M}$, 30min) redujo significativamente la potenciación de la liberación por la aplicación de 8-pCPT ($122.3 \pm 5.5\%$, $n=6$, $p > 0.05$; Fig. 4.15. D), de isoproterenol ($133.2 \pm 3.8\%$, $n=6$, $p > 0.05$; Fig. 4.15.B) y del análogo de cAMP, Sp-8-Br-cAMPS ($133.2 \pm 3.8\%$, $n=6$, $p > 0.05$; Fig. 4.15. B), lo que sugiere la implicación de la actividad GEF de Epac en estas respuestas.

Estos resultados farmacológicos sugieren que los β -AR pueden iniciar la potenciación de la liberación de glutamato dependiente de cAMP. Aunque existen más evidencias funcionales a este respecto (Herrero et al., 1996; Huang y Hsu. 2006; Ji et al., 2008; Kobayashi et al., 2009), la localización ultraestructural de estos receptores en las presinápsis glutamatérgicas no ha sido estudiada. Con este fin, realizamos experimentos de microscopía electrónica con inmunodetección con partículas de oro en rodajas de tejido cerebral, con anticuerpos contra la isoforma β_1 -AR, que es el subtipo de receptor de mayor expresión en la corteza cerebral (Nicolas et al., 1993; Paschalis et al., 2009). Nuestros datos mostraron la expresión mayoritariamente presináptica de los β_1 -AR en las capas III-V de la corteza cerebral, aunque también se observa en compartimentos postsinápticos como espinas dendríticas (Fig. 4.16. A-C). El marcaje presináptico de estos receptores se observa en el $22.5 \pm 2.1\%$ (Fig 4.16.; 474 sinapsis, 3 cortezas) de las sinapsis asimétricas, que son consideradas sinapsis glutamatérgicas. Además, los β_1 -AR se localizan mayoritariamente en la zona activa (86%, 318 partículas de oro), aunque también en sitios extrasinápticos (14%).

Estudiamos también la expresión de estos receptores mediante inmunofluorescencia en sinaptosomas cerebrocorticales, identificados por el marcador de las SVs, sinaptofisina. Encontramos que el $30.6 \pm 1.3\%$ de los terminales marcados con

sinaptofisina son positivos para el marcaje con anticuerpos anti- β_1 -AR (7355 sinaptosomas de 25 campos; Fig. 4.16. E y F). Teniendo en cuenta que el 79.8% de sinaptosomas de la preparación cerebrocortical son glutamatérgicos (Millán et al., 2003), se puede concluir que la distribución de los β_1 -AR en rodajas de corteza y en sinaptosomas cerebrocorticales (estimados en aproximadamente un 24%) es muy similar.

Por lo tanto, estos resultados demuestran que los β_1 -AR se expresan en la zona activa presináptica de una subpoblación de terminales glutamatérgicos de la corteza cerebral, apoyando las evidencias funcionales obtenidas.

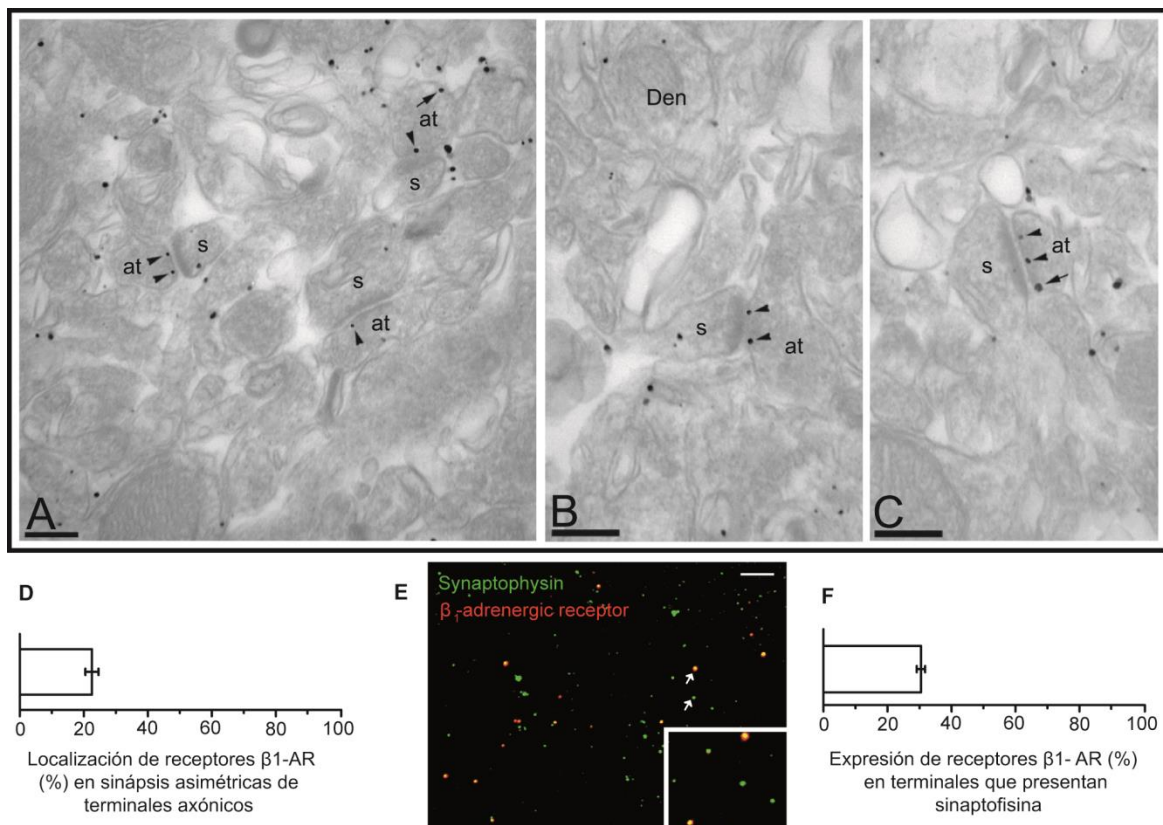


Figura 4.16. Los receptores β -adrenérgicos se localizan mayoritariamente a nivel presináptico. (A-C) Imágenes representativas de la distribución de las subunidades de los receptores β_1 -adrenérgicos en las capas III-V de la corteza cerebral detectados por medio del marcaje con partículas de oro por el método de *pre-embedding* en rodajas de cerebro de ratones adultos. Las partículas de oro se observan mayoritariamente en las zonas activas (puntas de flecha), aunque también en sitios extrasinápticos (flechas), de los terminales axónicos (at) de las sinápsis asimétricas o excitatorias establecidas con espinas dendríticas (s) o dendritas (Den). Barras de escala, 200nm. (D) Cuantificación de la localización de los receptores β_1 -adrenérgicos (porcentaje) en terminales axónicos asimétricos de rodajas de corteza cerebral. (E) Imagen de sinaptosomas marcados con anticuerpos frente a receptores β_1 -adrenérgicos y el marcador presináptico de las SVs, sinaptofisina. Barra de escala, 10 μ m. (F) Cuantificación de la localización de los receptores β_1 -adrenérgicos (porcentaje) en sinaptosomas marcados con sinaptofisina. Los datos se expresaron como la media \pm SEM (barras de error).

2.1.3. Los receptores β -adrenérgicos y de la proteína Epac activan la fosfolipasa C y proteínas dependientes de DAG.

Aunque otros estudios han relacionado la acción de Epac con la potenciación de la liberación de neurotransmisores, los mecanismos de actuación de esta proteína no han sido aclarados (*Introducción*: 3.1.2). Se ha demostrado que Epac puede activar, mediante Rap2B, la fosfolipasa C ϵ , PLC ϵ (Schmidt et al., 2001) en sistemas de secreción no neuronales (Dzuhura et al., 2011), aunque se desconoce su implicación en la liberación de neurotransmisores.

Para ello, hemos determinado si la potenciación dependiente de los β -AR y Epac observada en sinaptosomas es sensible al inhibidor de la PLC, U73122. La potenciación de la liberación por aplicación de isoproterenol se redujo por el tratamiento con el U73122 (2 μ M; 136.4 \pm 7.2%, n=7, p>0.05; Fig. 4.17, A y B), mientras que no se alteró con el análogo inactivo U73343 (2 μ M; 167.5 \pm 5.5%, n=7, p<0.001; Fig. 4.17, B). Además, la potenciación de la liberación con 8-pCPT se vió afectada de manera similar, reduciéndose la potenciación con U73122 (126.1 \pm 4.4%, n=5, p>0.05; Fig. 4.17, C), mientras que el análogo inactivo U73343 no mostró efecto alguno (162.3 \pm 6.2%, n=3, p<0.001; Fig. 4.17 C).

La PLC cataliza la hidrólisis de PIP₂, produciendo DAG e IP₃. El IP₃ se degrada hasta producir IP₁, que se acumula en presencia de LiCl, por lo que se puede determinar la actividad de PLC midiendo la acumulación de IP₁ (Trinquet et al., 2006). La incubación de los sinaptosomas con isoproterenol aumentó la acumulación de IP₁ (143.7 \pm 10.5%, n=12, p<0.05; Fig. 4.17. D), perdiéndose este efecto en presencia del inhibidor de PLC, U73122 (99.3 \pm 2.4%, n=6, p>0.05; Fig. 4.17. D). La aplicación de 8-pCPT también aumentó los niveles de IP₁ (165.5 \pm 11.5%, n=6, p<0.01, ANOVA; Fig. 4.17. D), siendo este efecto igualmente sensible a la inhibición por U73122 (100.5 \pm 3.5%, n=4, p>0.05; Fig. 4.17. D). Por lo tanto, esta vía de señalización presináptica dependiente de los β -AR y Epac parece implicar la activación de la PLC. No obstante, hay que señalar que, aunque la inhibición de la PLC afecta a estas vías de potenciación, no las suprime totalmente, lo que sugiere que la activación de los β -AR y Epac pueda implicar otras vías de señalización además de la activación de PLC.

La activación de PLC genera DAG e IP₃, que pueden actuar como segundos mensajeros y activar otras proteínas y cascadas de señalización. Para estudiar el papel del DAG, tratamos los sinaptosomas con calfostina C (0.1 μ M), que antagoniza la unión a DAG a sus dianas. Así, este fármaco redujo significativamente la potenciación de la liberación de glutamato por la aplicación de isoproterenol (132.9 \pm 7.3%, n=7, p<0.05; Fig. 4.17., A y B) y de 8-pCPT (135.8 \pm 5.5%, n=7, p<0.01, Fig. 4.17. A y C).

Dado que estos resultados parecen indicar la participación de una proteína con dominios de activación por DAG, determinamos la posible implicación de la proteína

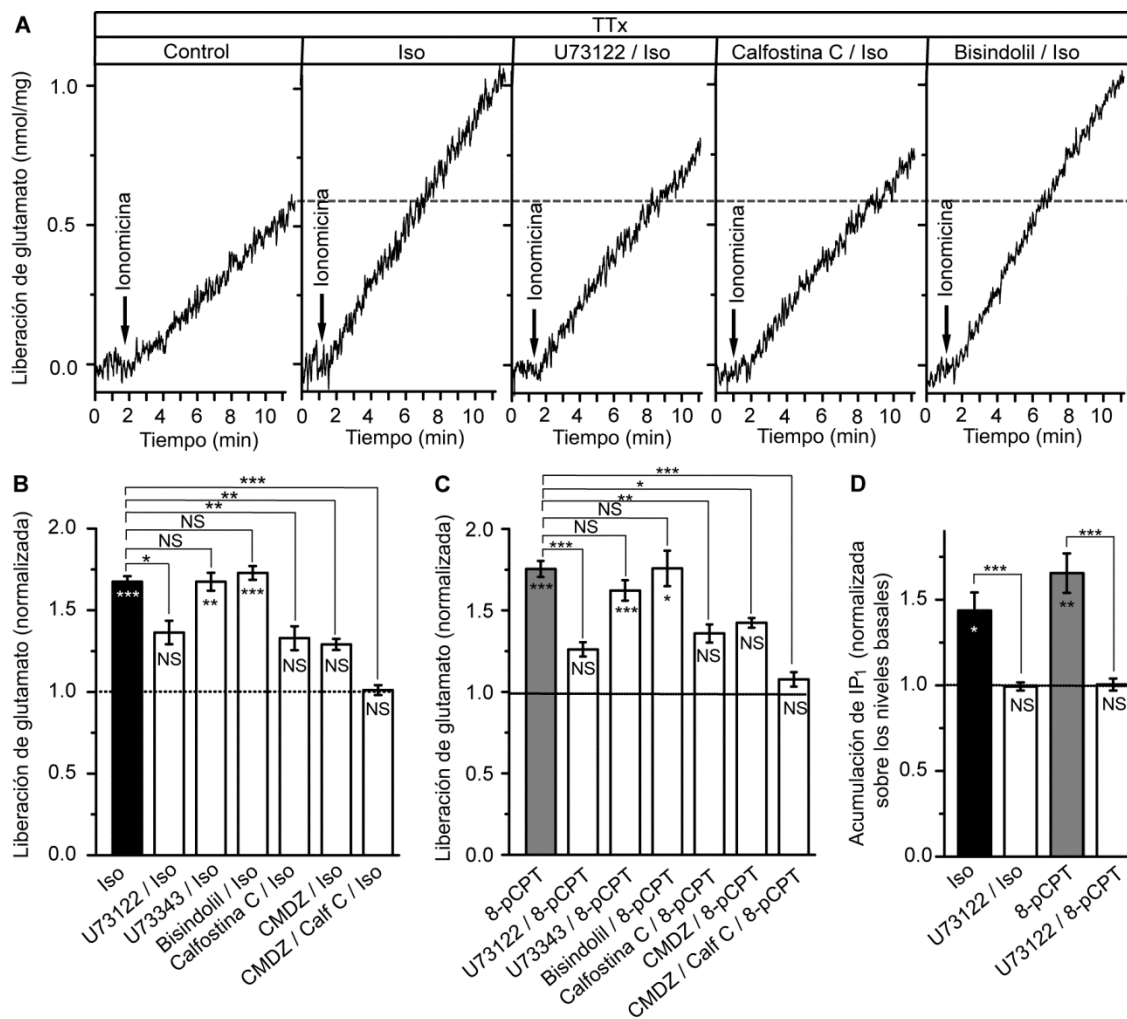


Figura 4.17. La activación de los receptores β -adrenérgicos y de la proteína Epac activan la PLC. (A) Modulación de la liberación de glutamato inducida por el ionóforo de Ca^{2+} , ionomicina ($0.5\text{-}1\mu\text{M}$), en presencia de TTx ($1\mu\text{M}$), por el agonista de los receptores β -adrenérgicos, isoproterenol (Iso, $100\mu\text{M}$) en ausencia y en presencia del inhibidor de la PLC, U73122 ($2\mu\text{M}$, 30min), el inhibidor de proteínas con dominios de unión a DAG, calfoestina C (Calf C, $0.1\mu\text{M}$, 30min) y el inhibidor del dominio de unión de ATP de la PKC, bisindolilmaleimida I (Bisindolil, $1\mu\text{M}$, 30min). (B) Efecto sobre la liberación de glutamato de la aplicación de isoproterenol en ausencia y en presencia de U73122, su análogo inactivo, U73343 ($2\mu\text{M}$), bisindolilmaleimida I, calfoestina C y el inhibidor de la proteína calmodulina, calmidazolium (CMDZ, $1\mu\text{M}$, 30min). (C) Efecto sobre la liberación de glutamato de la aplicación del activador específico de Epac, 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP (8-pCPT, $50\mu\text{M}$), en ausencia y en presencia de los inhibidores empleados anteriormente. (D) Acumulación de IP_1 en presencia de LiCl (50mM , 30min) normalizada frente a los niveles basales ($4.6\pm 0.4\text{ pmol/mg}$), en sinaptosomas tratados con isoproterenol ($100\mu\text{M}$, 10min) y 8-pCPT ($50\mu\text{M}$, 10min) en ausencia o en presencia de U73122 ($2\mu\text{M}$, 30min). La aplicación de isoproterenol y de 8-pCPT se realizó un minuto antes de la aplicación de ionomicina. La liberación de glutamato se normalizó frente a la liberación inducida por ionomicina. Todos los ensayos de liberación de glutamato se realizaron en presencia de TTx ($1\mu\text{M}$), añadida dos minutos antes de empezar el registro. Los datos se expresaron como la media \pm SEM (barras de error). NS (no significativo), $p>0.05$; *, $p<0.05$; **, $p<0.01$; ***, $p<0.001$ (ANOVA con test de Bonferroni), comparados con el control (símbolos en el interior de las barras) o frente a otra condición (símbolos en el exterior de las barras).

quinasa C (PKC) en la potenciación de la liberación por los β -AR/Epac, tratando los sinaptosomas con un antagonista de la unión de ATP al dominio catalítico de la PKC, la bisindolilmaleimida I ($1\mu\text{M}$). Este fármaco no alteró ni la potenciación inducida por isoproterenol ($167.4\pm 3.4\%$, $n=8$, $p<0.001$; Fig. 4.17, A y B), ni la inducida por 8-pCPT ($180.3\pm 6.3\%$, $n=4$, $p<0.05$ Fig. 4.17, C).

Otra proteína activada por DAG es la proteína Munc13, que tiene un papel muy importante en preparación de las SVs para su fusión y en los mecanismos de potenciación presinápticos (Introducción: 3.2.4). Esta proteína es activada por la unión del DAG y Ca^{2+} -

calmodulina (CaCaM; Rhee et al., 2002; Junge et al., 2004). En este contexto, observamos que el tratamiento de los sinaptosomas con el inhibidor de la CaM, calmidazolium, redujo la potenciación por la aplicación de isoproterenol ($129.1 \pm 3.3\%$, $n=7$, $p > 0.05$; Fig. 4.17, B), así como la inducida por 8-pCPT ($142.4 \pm 2.9\%$, $n=6$, $p > 0.05$; Fig. 4.17, C). Además, la inhibición conjunta de la unión de DAG y CaM, por el tratamiento simultáneo con calfofostina C y calmidazolium, anuló completamente la potenciación por la aplicación de isoproterenol ($101.1 \pm 3.0\%$, $n=7$, $p > 0.05$, ANOVA; Fig. 4.17. B) y 8-pCPT ($107.7 \pm 4.4\%$, $n=7$, $p > 0.05$; Fig. 4.17. C). Por lo tanto, estos resultados sugieren que la potenciación por β -AR/Epac de la liberación de glutamato inducida por ionomicina en presencia de TTx implica proteínas activadas por CaM y DAG. No obstante, cabe destacar que, al igual que ocurría con la inhibición de PLC, la inhibición de la unión a DAG no suprime totalmente la potenciación, por lo que estos resultados apoyan la existencia de un componente independiente de PLC y DAG en la vía de señalización activada por los β -AR y Epac.

2.1.4. La activación de los β -AR y de la proteína Epac promueve la translocación a la membrana plasmática de la proteína Munc13-1.

La proteína Munc13 se transloca a la membrana de la zona activa como consecuencia de su unión a DAG y activación funcional (Augustin et al., 1999; Rhee et al., 2002). Por lo tanto, la proteína Munc13 de los terminales presinápticos presenta dos localizaciones subcelulares: la proteína en forma soluble o no unida a DAG, y la proteína localizada en membrana, o fracción particulada, unida a DAG y activa funcionalmente. Por ello, para estudiar la implicación de la activación por DAG de la proteína Munc13 en el mecanismo de potenciación dependiente de los β -AR y Epac, estudiamos la distribución de esta proteína entre las fracciones solubles y de membrana de los sinaptosomas. Para ello, cuantificamos la proteína Munc13-1, que es la isoforma mayoritaria en terminales glutamatérgicos (Rosenmund et al., 2002), presente en estas fracciones mediante inmunotransferencia (*Western-Blot*), tras la separación de las mismas después de un choque hipo-osmótico. La relación entre la proteína Munc13-1 soluble y particulada o de membrana, disminuyó por el tratamiento de los sinaptosomas con 8-pCPT ($0.24 \pm 0.03\%$, $n=10$, $p < 0.01$; Fig. 4.18. A) respecto a los sinaptosomas control ($0.44 \pm 0.04\%$, $n=10$, Fig. 4.18. A), indicando, por tanto, un aumento en la proteína presente en membrana o activada por DAG. Además, este fenómeno de translocación no se produce en presencia del inhibidor de la PLC, U73122 ($0.40 \pm 0.7\%$, $n=5$, $p > 0.05$, ANOVA; Fig. 4.18. A), mientras que el tratamiento con su análogo inactivo, U73343, no afecta la respuesta del 8-pCPT ($0.20 \pm 0.03\%$, $n=5$, $p < 0.01$, ANOVA; Fig. 4.18. A).

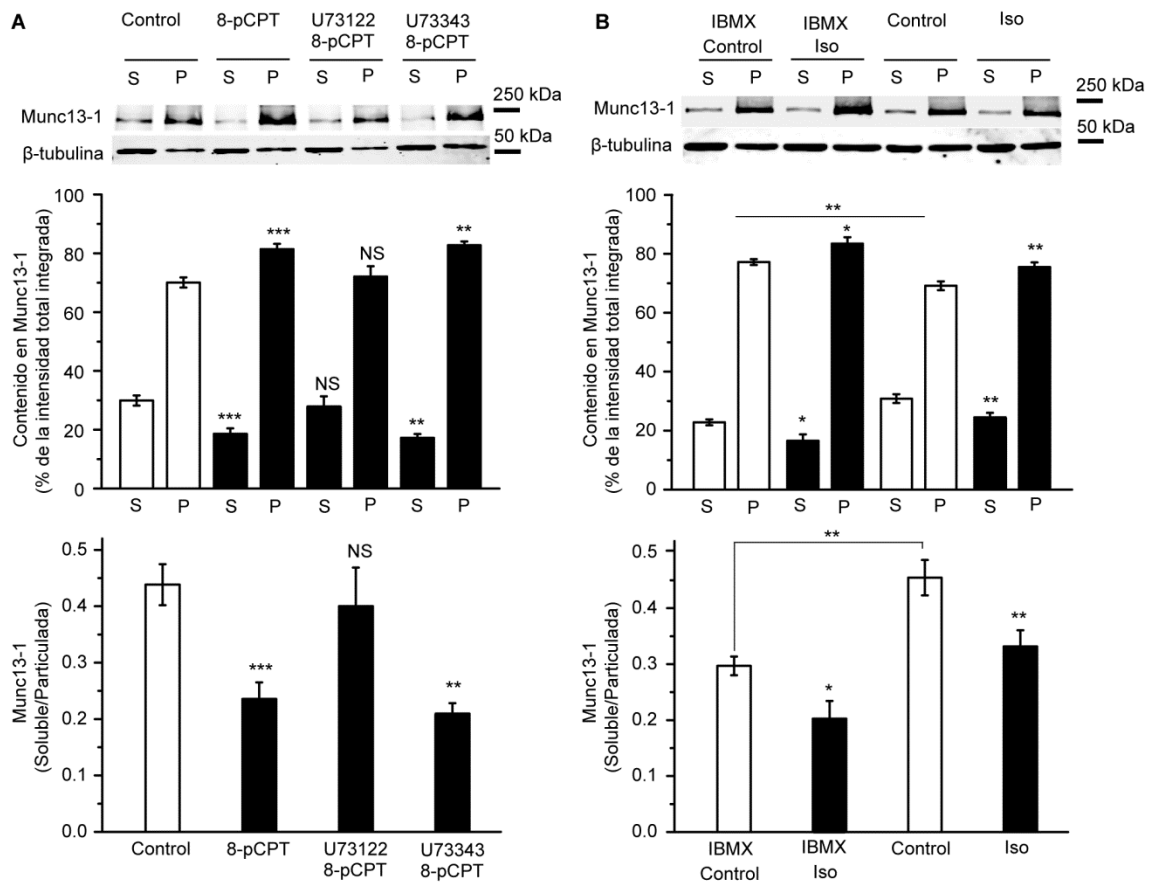


Figura 4.18. La activación de los receptores β -adrenérgicos y de la proteína Epac transloca la proteína Munc13-1. Contenido en Munc13-1, detectado por inmunotransferencia, de la fracción soluble y particulada (de membrana), expresado como porcentaje sobre la suma de la intensidad de las dos fracciones (intensidad integrada total) y como relación entre el contenido de la proteína en la fracción soluble y particulada. Los sinaptosomas se trataron con (A) el activador específico de Epac, 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP (8-pCPT, 50 μ M) en ausencia y en presencia del inhibidor de la PLC, U73122, y de su análogo inactivo, U73343 (2 μ M, 30min); (B) o con el agonista de los receptores β -adrenérgicos, isoproterenol (Iso, 100 μ M) en ausencia y en presencia del inhibidor de la actividad de las fosfodiesterasas, IBMX (1mM, 30min). Los datos se expresaron como la media \pm SEM (barras de error). NS (no significativo), $p > 0.05$; *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$ (ANOVA con test de Bonferroni o t-Student), comparados con sus respectivos controles o frente a otra condición.

Así mismo, la aplicación del agonista de los β -AR, isoproterenol, también incrementó la presencia de Munc13-1 en la fracción de membrana ($0.33 \pm 0.03\%$, $n=13$, $p < 0.01$; Fig. 4.18. B), en comparación con los sinaptosomas control ($0.46 \pm 0.03\%$, $n=13$, Fig. 4.18. B). Por otro lado, el tratamiento de los sinaptosomas con el inhibidor de las fosfodiesterasas, IBMX, que evita degradación del cAMP, también incrementó la distribución de Munc13-1 en membrana ($0.30 \pm 0.02\%$, $n=6$, $p < 0.01$; Fig. 4.18. B). Por tanto, la acumulación de cAMP es suficiente para inducir la translocación de Munc13-1. Además, en estas condiciones de incubación con IBMX, la aplicación de isoproterenol incrementó aún más la translocación de Munc13-1 a la membrana de los sinaptosomas ($0.20 \pm 0.03\%$, $n=6$, $p < 0.05$, Fig. 4.18.B). Como control positivo de los experimentos de translocación de Munc13-1, estudiamos el efecto del análogo de DAG, el éster de forbol PDBU, que induce la translocación máxima de Munc13-1 a la membrana ($0.12 \pm 0.02\%$, $n=9$, $p < 0.001$, dato no

mostrado). Por lo tanto, la activación de la proteína Epac incrementa la fracción de proteína Munc13-1 en la membrana del terminal presináptico, de manera dependiente de la actividad de PLC. Igualmente, la activación de los receptores β -AR y la acumulación de cAMP, promueven este proceso de translocación. Dado que la unión de DAG transloca y activa Munc13 para su función de preparación de las SVs para su fusión, los resultados obtenidos sugieren que la proteína Munc13 está implicada en los mecanismos de potenciación de la liberación de glutamato por la activación de β -AR y Epac.

2.2.5. La activación de los β -AR y de la proteína Epac incrementan la interacción entre Munc13-RIM1 y Rab3a-RIM1.

Los resultados farmacológicos de la potenciación de la liberación por β -AR y por la proteína Epac, sugieren la existencia de vías de señalización adicionales a la de PLC/DAG/Munc13.

La proteína Munc13-1 forma un complejo triple con la proteína de la zona activa RIM1 y la proteína G pequeña o monomérica de las SVs Rab3a, que es necesario para su función en la preparación de las SVs para la exocitosis (Dulubova et al., 2005; Andrew-Zwilling et al., 2006; Deng et al., 2011). Para formar este complejo, Rab3a interactúa con RIM1, de manera dependiente de su intercambio de GDP por GTP (Wang et al., 1999). Es interesante señalar que se ha descrito una disminución en los niveles de Rab3a en el KO de Epac2 (Fernandes et al., 2015), así como la interacción de Epac con RIM en sistemas no neuronales (Ozaki et al., 2000; Kashima et al., 2001; Park et al., 2012). Por lo tanto, es posible que Epac, por medio de su actividad promotora de intercambio de nucleótidos de guanina o GEF, pueda promover la activación de Rab3a para formar parte de este complejo e incrementar la exocitosis, tal como se ha descrito en sistemas de secreción no neuronales (Branham et al., 2009; Park et al., 2012).

Para determinar la posible activación de Rab3a en sinaptosomas, estudiamos la interacción de Rab3a con RIM1, mediante co-inmunoprecipitación e inmunodetección (*Western-Blot*). Tanto la proteína Rab3a como la proteína RIM se expresan en extractos de sinaptosomas, de acuerdo a la inmunodetección de las bandas respectivas, correspondientes con sus pesos moleculares (Crudos, Figura 4.19.A, panel superior). La incubación con el anticuerpo anti-Rab3a inmunoprecipita esta proteína, sin que aparentemente existan cambios en la cantidad de Rab3a inmunoprecipitada por los tratamientos farmacológicos (IP: Rab3a, Figura 4.19.A, panel inferior izquierda). Para estudiar la interacción entre Rab3a y RIM, se inmunodetectó la proteína RIM co-inmunoprecipitada con el anticuerpo anti-Rab3A (IP: RIM1, IP: Rab3A, Figura 4.10.A, panel inferior derecha). La presencia de bandas co-inmunoprecipitadas indica que las proteínas Rab3a y RIM1 forman parte de complejos proteicos en los terminales

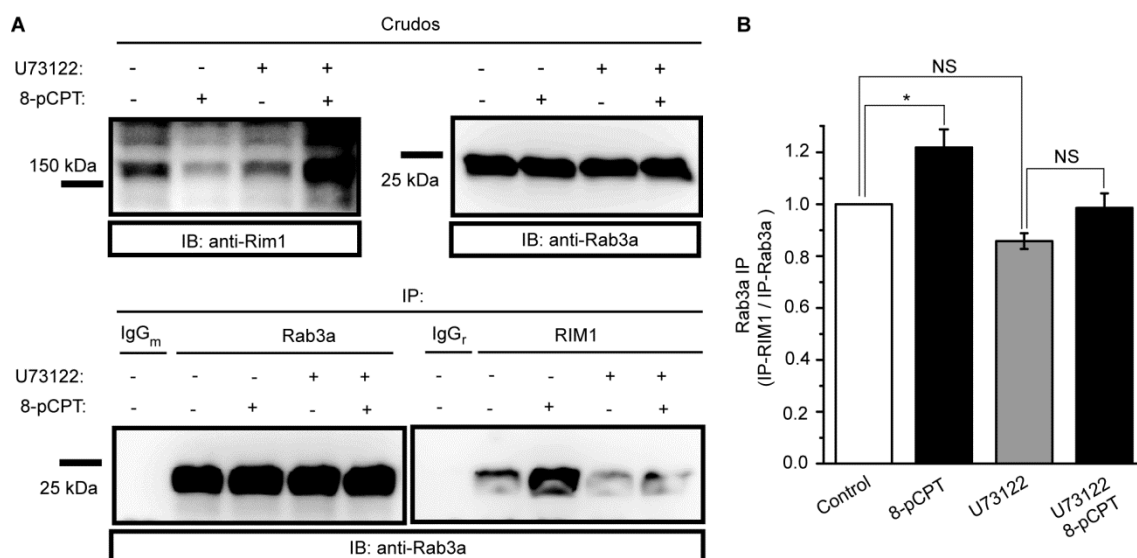


Figura 4.19. La activación de la proteína Epac incrementa la interacción entre las proteínas Rab3a y RIM1. Co-inmunoprecipitación de sinaptosomas tratados con el activador específico de Epac, 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP (8-pCPT, 50µM) en ausencia y en presencia del inhibidor de la PLC, U73122 (2µM, 30min). (A) Los sinaptosomas se solubilizaron después del tratamiento farmacológico e inmunoprecipitaron (IP) con anticuerpos de ratón o conejo anti-Flag (control negativo con epítipo no fisiológico; 4µg, IgG_m e IgG_r), anticuerpos de ratón anti-Rab3a (4µg) o anticuerpos de conejo anti-RIM1 (4µg). Los extractos inmunoprecipitados (IP) y los crudos (muestra sin inmunoprecipitar) se analizaron por inmunotransferencia (IB) empleando anticuerpos primarios anti-RIM1 y anti-Rab3a. (B) La cuantificación de la co-inmunoprecipitación de Rab3a (Rab3a IP) con anticuerpos anti-RIM, se expresó como la relación frente a la inmunoprecipitación de Rab3a y se normalizó al valor de intensidad integrada de los controles sin tratar. Los datos se expresaron como la media ± SEM (barras de error). NS (no significativo), p>0.05; *, p<0.05 (ANOVA con test de Bonferroni), comparados según se indica.

presinápticos de la corteza cerebral, que se mantienen en las condiciones de solubilización y co-inmunoprecipitación empleadas. Para descartar una co-inmunoprecipitación inespecífica, se incluyeron controles negativo inmunoprecipitando con anticuerpos irrelevantes que no reconocen ningún epítipo fisiológico (IgG).

La co-inmunoprecipitación de Rab3a se cuantificó, analizando la relación entre la proteína co-inmunoprecipitada por anti-RIM1 y por anti-Rab3A, para asegurarnos que los tratamientos farmacológicos aplicados no afectan a la cantidad de Rab3a inmunoprecipitada. La co-inmunoprecipitación inversa, incubando con anticuerpos anti-Rab3a y detectando RIM, no fue efectiva (datos no mostrados), probablemente por la dificultad de co-inmunoprecipitar una proteína de gran tamaño con un alto número de interacciones como es RIM (*Introducción: 3.1.3*), con otra de reducido tamaño, como Rab3a.

El tratamiento de los sinaptosomas con 8-pCPT incrementó la cantidad de Rab3a inmunoprecipitada (122±6%, n=3, p<0.05; Fig. 4.19, B). Con el fin de conocer si este incremento en la interacción entre Rab3a y RIM es dependiente de la activación de Munc13 por DAG y la formación del complejo triple, realizamos este experimento en sinaptosomas tratados con el inhibidor de la PLC, U73122. El tratamiento con U73122 mostró una tendencia a reducir, aunque no de manera significativa, la cantidad de Rab3a co-inmunoprecipitada (86±3%, n=3, p>0.05; Fig. 4.19. B). En estas condiciones, el

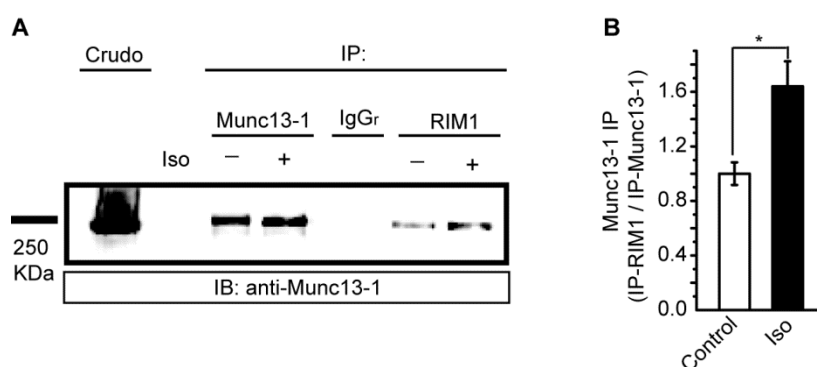


Figura 4.20. La activación de los receptores β -adrenérgicos aumenta la interacción entre las proteínas Munc13-1 y RIM1. Los sinaptosomas se trataron con el agonista de los receptores β -adrenérgicos, isoproterenol (100 μ M, 10min), solubilizándolos e inmunoprecipitándolos con anticuerpos anti-Flag (control negativo con epítipo no fisiológico ; 3.5 μ g; IP: IgGr), anti-Munc13-1 (3.5 μ g; IP: Munc13-1) o anti-RIM1 (3.5 μ g; IP: RIM1). (A) Los extractos inmunoprecipitados (IP) y los crudos (muestra sin inmunoprecipitar) se analizaron por inmunotransferencia (IB) con anticuerpos anti-Munc13-1 de ratón. (B) Cuantificación de la co-inmunoprecipitación de Munc13 (Munc13 IP) con anticuerpos anti-RIM, expresada como relación frente a la inmunoprecipitación de Munc13-1a y normalizada al valor de intensidad integrada de los controles sin tratar. Los datos se expresaron como la media \pm SEM de tres experimentos diferentes. *, $p < 0.05$ (test de t de Student).

tratamiento con 8-pCPT, mostró también una tendencia a incrementar la co-inmunoprecipitación de Rab3a, aunque no resultó significativa ($99 \pm 6\%$, $n=3$, $p > 0.05$; Fig. 4.19, B). Por tanto, el tratamiento de los sinaptosomas con 8-pCPT incrementa la interacción entre Rab3a y RIM, pero de manera dependiente de la actividad de PLC, y probablemente de la activación de Munc13. Por ello, los resultados obtenidos no permiten confirmar la acción directa de Epac en la activación de Rab3a, ya que sugieren que el incremento de interacción RIM1-Rab3A es consecuencia indirecta de otros mecanismos.

En la formación del complejo triple Munc13-RIM-Rab3a, la interacción de Munc13 con la proteína RIM, es necesaria para evitar la formación del dímero autoinhibitorio de Munc13 y permitir la preparación de las SVs para su liberación (Deng et al., 2011). Por lo tanto, la activación de la potenciación de la exocitosis dependiente de la formación de este complejo triple, debería implicar también un incremento en la interacción entre Munc13 y RIM. Por ello, analizamos en sinaptosoma el efecto del agonista de los β -AR, isoproterenol, en la interacción entre Munc13 y RIM, determinada por co-inmunoprecipitación e inmunodetección (*Western-Blot*).

La inmunodetección con anticuerpos anti-Munc13 de la cantidad de proteína inmunoprecipitada con anticuerpos anti-Munc13, mostró que el tratamiento con isoproterenol aparentemente no alteró la cantidad de Munc13 inmunoprecipitada, detectada como una banda de aproximadamente 250kDa (Fig. 4.20. A). Los experimentos de co-inmunoprecipitación, en los que se incubó con anticuerpos anti-RIM1 y se reveló con anticuerpos anti-Munc13, también mostraron una banda que aparentemente corresponde con la proteína Munc13-1 co-inmunoprecipitada (Fig. 4.20. A). Para evitar la influencia de posibles cambios en la inmunoprecipitación de Munc13-1 por el tratamiento farmacológico, la proteína Munc13-1 co-inmunoprecipitada con anticuerpos anti-RIM1 se normalizó

respecto a la proteína inmunoprecipitada. El tratamiento con isoproterenol indujo un aumento de la cantidad de proteína Munc13 co-inmunoprecipitada ($155\pm 6\%$, $n=3$, $p<0.05$; Fig. 4.20. B).

Por lo tanto, este resultado supone un indicio adicional de la participación del complejo triple Munc13-RIM-Rab3 en el mecanismo de potenciación de la liberación de glutamato dependiente de los β -AR.

2.2.6. La activación de los β -AR y de la proteína Epac promueven la aproximación de las SVs a la membrana de la zona activa presináptica.

La función de Munc13, mediada por la formación del complejo triple Munc13-RIM-Rab3A, es preparar las SVs para su liberación. Los cambios moleculares que ocurren durante el proceso de preparación de las SVs conllevan la disposición de dichas SVs en estrecha aposición con la membrana de la zona activa (Imig et al., 2014). Por lo tanto, si los mecanismos de potenciación de la liberación de glutamato por la activación de los β -AR y Epac implican la activación de estas proteínas, deberían estar asociados al incremento en el número de SVs cercanas a la zona activa presináptica.

Para estudiar los posibles cambios en la distribución de las SVs, analizamos los sinaptosomas por medio de microscopía electrónica de transmisión, midiendo la distancia de la membrana de las SVs a la membrana de la zona activa. Aunque la preparación de sinaptosomas supone la purificación de los terminales presinápticos neuronales, el análisis de esta preparación por microscopía electrónica muestra que en el 43% de las zonas activas estudiadas (353 zonas activas de 3 preparaciones) se observan restos de membrana o pequeños sáculos membranosos que presentan, en aposición con la membrana sinaptosomal, zonas electrodensas identificadas como las densidades postsinápticas propias de las sinápsis glutamatérgicas. Dada la importancia de los contactos entre la post y la presinápsis para la organización de la zona activa, y por tanto, probablemente para la organización de las propias SVs, sólo analizamos los sinaptosomas en los que fue posible identificar esta densidad postsináptica.

El tratamiento de los sinaptosomas con isoproterenol ($7.5\pm 0.8\%$, $n=48$, $p<0.001$; Fig. 4.21. B y F) y 8-pCPT ($9.3\pm 1.4\%$, $n=42$, $p<0.001$; Fig. 4.21. C y G) indujo un aumento en las SVs situadas a menos de 10nm de la membrana de la zona activa, frente a los sinaptosomas control ($3.6\pm 0.6\%$, $n=72$, Fig. 4.21. A, F y G). Estos tratamientos farmacológicos no alteraron el número de SVs observadas en los terminales en el plano analizado (control: 30.7 ± 2.4 ; isoproterenol: 33.3 ± 3.1 , $p>0.05$; 8-pCPT: 35.3 ± 3.5 , $p>0.05$; Fig. 4.21. D), ni en el conjunto de SVs situadas a menos de 50nm de la zona activa (control: $25.0\pm 1.0\%$; isoproterenol: $26.3\pm 1.2\%$, $p>0.05$; 8-pCPT: $27.3\pm 1.5\%$, $p>0.05$; Fig.

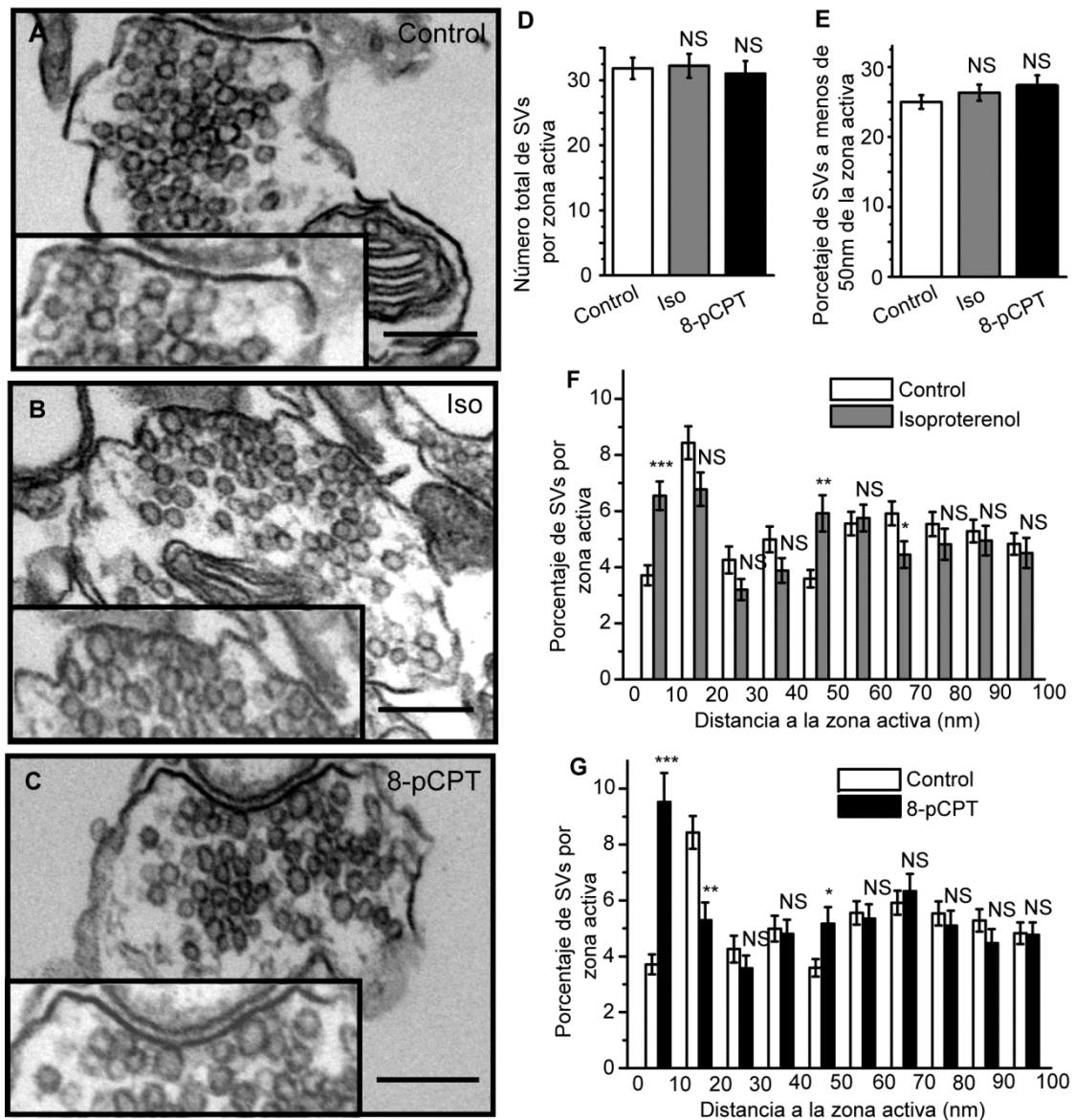


Figura 4.21. La activación de los receptores β -adrenérgicos y de la proteína Epac incrementa el número de SVs próximos a la membrana de la zona activa. Micrografías electrónicas de (A) sinaptosomas control, (B) tratados con el agonista de los receptores β -adrenérgicos, isoproterenol (Iso, 100 μ M, 10min) y (C) tratados con el activador específico de Epac, 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP (8-pCPT, 50 μ M, 10min), con ampliaciones de las zonas activas insertadas. Barra de escala 150nm. (D) Cuantificación del número total de SVs por zona activa, (E) porcentaje de SVs a menos de 50nm de la membrana de la zona activa, (F-G) porcentaje de SVs en relación a su distancia a la zona activa (distribuidas en intervalos de 10nm). Los datos se expresaron como la media \pm SEM. NS, $p > 0.05$; * < 0.05 ; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ (test de t de Student), comparados con el correspondiente valor de los controles.

4.21. E), indicando que los cambios observados se corresponden con la redistribución y acercamiento de las SVs próximas a la zona activa. Estos resultados indican que la vía de potenciación dependiente de los β -AR y Epac da lugar al acercamiento de las SVs a la membrana de la zona activa, probablemente como consecuencia del proceso de preparación de las mismas por la acción del complejo triple Munc13-RIM-Rab3.

Por lo tanto, el conjunto de los resultados obtenidos ponen de manifiesto que, en sinaptosomas de corteza cerebral, la activación de los receptores β -AR induce la generación de cAMP, que activa la proteína Epac. Esta proteína activa la PLC, generando DAG y potenciando la liberación de glutamato por medio de la activación de Munc13-1, que participa en la preparación de las SVs para su exocitosis por medio de la formación del complejo Munc13-RIM-Rab3.

2.2.POTENCIACIÓN DE LA LIBERACIÓN DE GLUTAMATO POR RECEPTORES β -ADRENÉRGICOS Y EPAC EN CULTIVOS PRIMARIOS DE NEURONAS CORTICALES.

Los resultados obtenidos con la preparación de sinaptosomas cerebrocorticales han mostrado que los β -AR, potencian la liberación de glutamato por un mecanismo dependiente de la proteína Epac, que probablemente modula la maquinaria exocitótica (Fig. 4.14-4.21). Con el objetivo de ampliar el estudio de estas vías de señalización de los receptores β -AR a otros modelos, empleamos cultivos primarios de neuronas corticales, transfectadas con el plásmido que codifica la expresión de la vGlut1-pHluorina. Esta proteína presenta una GFP (proteína verde fluorescente) sensible al pH unida a los dominios luminales del transportador vesicular de glutamato de las SVs, vGlut1 (Voglmaier et al., 2006). Dado que el interior de las SVs modifica su pH durante los eventos de exocitosis, es posible monitorizar estos procesos mediante las variaciones en la fluorescencia de la vGlut1-pHluorina. Así, esta proteína emite fluorescencia durante el proceso de exocitosis, al fusionarse las SVs con la membrana de la zona activa y liberar los neurotransmisores, apagándose la fluorescencia en las etapas posteriores de endocitosis y re-acidificación. Además, la alcalinización química del interior de las SVs, por medio de la aplicación de NH_4Cl , induce la emisión de todas las pHluorinas independiente de la exocitosis, lo que permite determinar la fluorescencia máxima de todas las SVs presentes en el terminal presináptico, y estimar así la proporción de SVs movilizadas durante las respuestas exocitóticas (Burrone et al., 2006; Fig. 3.8).

2.2.1. Caracterización de la expresión de la vGlut1-pHluorina y mCherry bajo el promotor de la CaMKII.

El cultivo primario de neuronas corticales empleado contiene tanto neuronas excitatorias como inhibitorias. Además, no se evitó la proliferación de células de glía con el objetivo de intentar simular en el cultivo, en la medida de lo posible, las condiciones

fisiológicas del entorno neuronal. Los cultivos se transfectaron con el plásmido que codifica la expresión de vGlut1-pHluorina y con el plásmido que codifica la expresión de la proteína fluorescente mCherry bajo el promotor de la CaMKII α . La CaMKII α se expresa preferentemente en neuronas excitatorias en la corteza cerebral (Jones et al., 1994; Chiarlone et al., 2014), por lo que la expresión de mCherry podría suponer un marcador de las neuronas excitatorias de los cultivos. Así, analizamos la expresión de mCherry y vGlut1-pHluorina (GFP) por medio de su marcaje por inmunocitofluorescencia en neuronas glutamatérgicas y GABAérgicas, así como en células de glía, identificadas por sus respectivos marcadores, vGlut1, GAD65 y GFAP. Encontramos que la inmunoreactividad de mCherry es específica de neuronas, marcando los somas (Fig. 4.22. A) y las fibras de dichas neuronas (Fig. 4.22. B), y excluyendo las células de glía, identificadas con la proteína fibrilar acídica de la glía o GFAP como marcador. Además, el marcaje punteado de las fibras con GFP, correspondiente a la expresión de vGlut1-pHluorina, indica que la presencia de esta proteína probablemente se restringe a neuronas y no a las células de glía (Fig. 4.22. C).

Por otra parte, encontramos que existe un alto grado de expresión de mCherry en neuronas glutamatérgicas (Fig. 4.22.D y E). Así, el $93.9\pm 4.3\%$ de los somas de neuronas que expresaban mCherry, expresaban además vGlut1 ($n=51$ células, 7 campos; Fig. 4.22.J). Además, existe también un alto grado de co-localización entre la expresión de vGlut1 y el marcaje de GFP correspondiente a vGlut1-pHluorina (Fig. 4.22.F). Concretamente, un $76.1\pm 3.7\%$ de los ROIs inmunoreactivos para GFP son también positivos para vGlut1 ($n=1576$ ROIs, 8 campos; Fig. 4.22. K). Sin embargo, también se observó la expresión de mCherry en algunas de las neuronas GABAérgicas (Fig. 4.22.G y H). Un $50.9\pm 3.7\%$ de los somas de neuronas que mostraron expresión de mCherry, presentaban también marcaje para el marcador de neuronas GABAérgicas, GAD65 ($n=127$ células, 10 campos; Fig 4.22. J). Así mismo, el co-marcaje de GFP correspondiente a vGlut1-pHlorina con GAD65 (Fig. 4.22. I), mostró que el $32.1\pm 2.8\%$ de los ROIs que positivos para vGlut1-pHluorina se co-localizan con neuronas GABAérgicas ($n=4831$, 17 campos; Fig 4.22.K). Por lo tanto, en el cultivo de neuronas corticales mCherry no es un marcador exclusivo de neuronas glutamatérgicas, e incluso la vGlut1-pHluorina se expresa en una subpoblación de neuronas GABAérgicas.

En los estudios funcionales realizados a continuación, se eligieron las áreas en las que se expresa vGlut1-pHluorina, identificadas por la perfusión de NH_4Cl , y que además expresan de mCherry. De acuerdo a los resultados de inmunocitofluorescencia obtenidos, estas áreas se corresponden con terminales presinápticos de neuronas, en su mayoría glutamatérgicas, aunque no exclusivamente de este fenotipo.

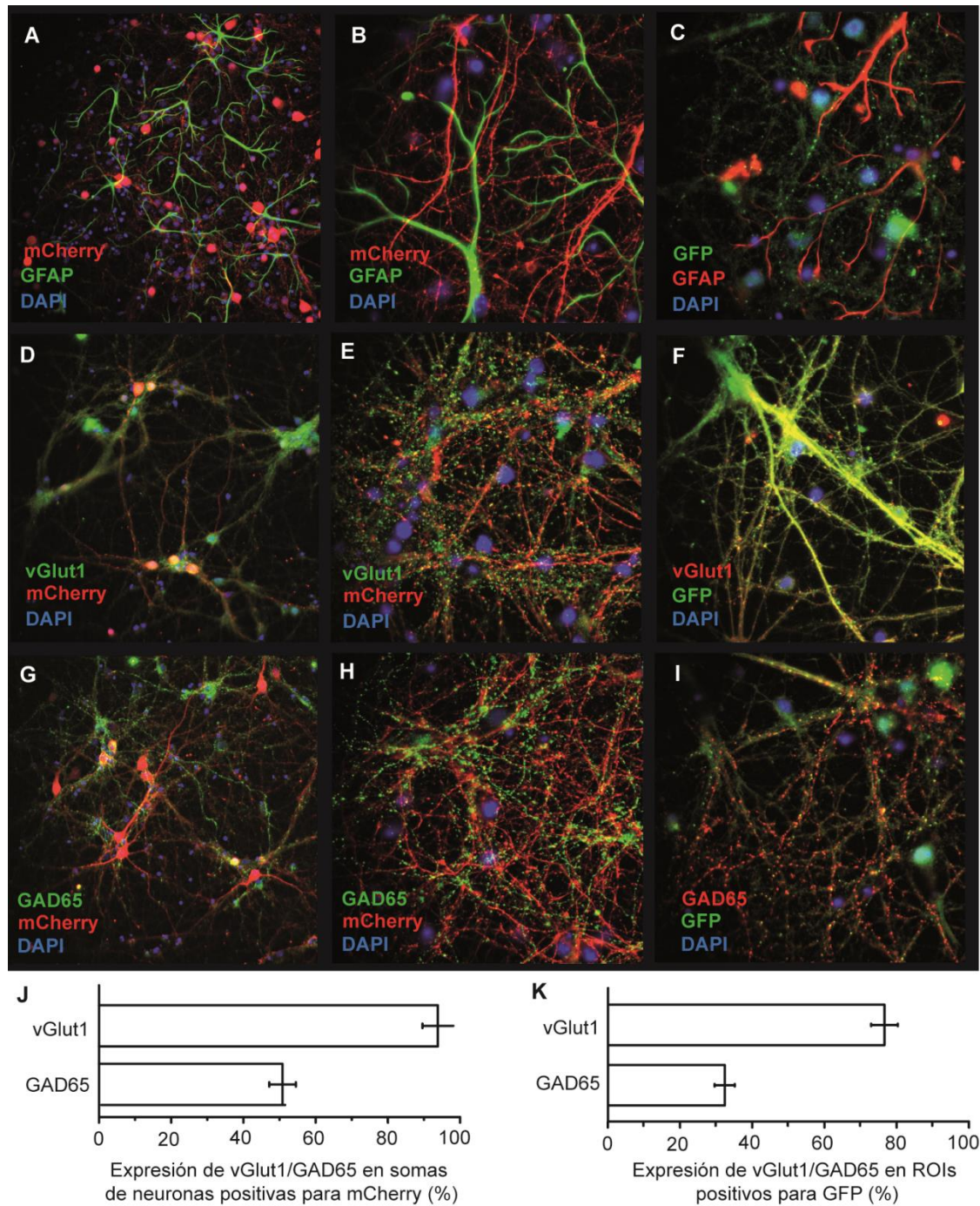


Figura 4.22. Caracterización inmunocitoquímica de la expresión de mCherry y vGlut1-pHluorina en neuronas corticales en cultivo. (A-C) Imágenes de la exclusión entre la expresión de GFAP (marcador de células de glia) y mCherry/ GFP (vGlut1pHluorina). (D-F) Las imágenes muestran un alto grado de co-expresión entre vGlut1 (marcador de neuronas excitatorias) y mCherry/ GFP (sinaptofluorina). (G-I) Estas imágenes muestran una co-expresión parcial entre GAD65 (marcador de neuronas inhibitorias) y mCherry/ GFP (vGlut1pHluorina). (J) Porcentaje de expresión de vGlut1/GAD65 en somas de neuronas positivas para mCherry y en (K) ROIs positivos para mCherry. Los datos fueron representados como la media \pm SEM (barras de error).

2.2.2. Estudio de la liberación espontánea.

Los resultados obtenidos en sinaptosomas mostraron que la inhibición de la generación de potenciales de acción, por la acción del bloqueante de canales de Na⁺ dependientes de voltaje, tetrodotoxina (TTx), aislaba el componente independiente de PKA de la potencia de la liberación de glutamato inducida por los receptores β-adrenérgicos que probablemente están relacionados con la modulación de la maquinaria exocitótica (Fig. 4.14). Por lo tanto, quisimos estudiar la modulación de la liberación espontánea en cultivos primarios de neuronas corticales.

La Bafilomicina A1 es un inhibidor de la ATPasa vacuolar que bombea protones en las SVs, por lo que previene la re-acidificación de las SVs asociada a los procesos de endocitosis, provocando que la fluorescencia emitida por las pHluorinas no descienda después de la exocitosis (Burrone et al., 2006; Fig. 3.8). Por lo tanto, en ausencia de estimulación, y en condiciones de bloqueo de la generación de potenciales de acción con TTx, la presencia de Bafilomicina A1 permite observar un incremento de fluorescencia lineal y acumulativo, que se corresponde con la liberación espontánea. De acuerdo con el método descrito por Hua et al., 2011, se estudió la pendiente (s⁻¹) del incremento espontáneo de fluorescencia en presencia y en ausencia de Bafilomicina A1 (Fig. 3.9.A), normalizándola al máximo de fluorescencia inducida por la perfusión de NH₄Cl ($\Delta F/F_{int}$). Las pendientes individuales de los botones fueron representadas como histogramas de frecuencias para cada una de estas fases, calculando la pendiente media como el valor central de la distribución gaussiana de ajuste de los datos. Finalmente, se calculó la tasa de liberación espontánea como la diferencia entre las pendientes medias de las dos fases estudiadas.

De esta manera, se determinó el efecto de la activación de los β-AR y de la proteína Epac sobre la liberación espontánea en neuronas corticales (14-20 DIV), transfectadas con los plásmidos que codifican la expresión de vGlut1-pHluorina y mCherry bajo el promotor de la CaMKIIα, y tratadas con TTx (1μM) y Bafilomicina A1 (500nM), de acuerdo al protocolo mostrado en la Fig. 3.9.A.

La aplicación del agonista de los β-AR, isoproterenol (100μM), produjo el aumento de la tasa de liberación espontánea ($\Delta F/F_{int} = 7.67 \pm 0.19 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, n=908 botones, p<0.001; Fig. 4.23. A y B), frente a las neuronas sin tratar ($\Delta F/F_{int} = 5.61 \pm 0.15 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, n=1186 botones; Fig. 4.23. A y B). Además, el tratamiento con el activador específico de las proteínas Epac, 8-pCPT (50 μ M), también indujo el aumento de la tasa de liberación espontánea ($\Delta F/F_{int} = 6.85 \pm 0.19 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, n=778 botones, p<0.001; Fig. 4.23, A y B). Así, tanto la activación de los β-AR, como de la proteína Epac, producen un incremento de la liberación espontánea de glutamato en neuronas corticales en cultivo.

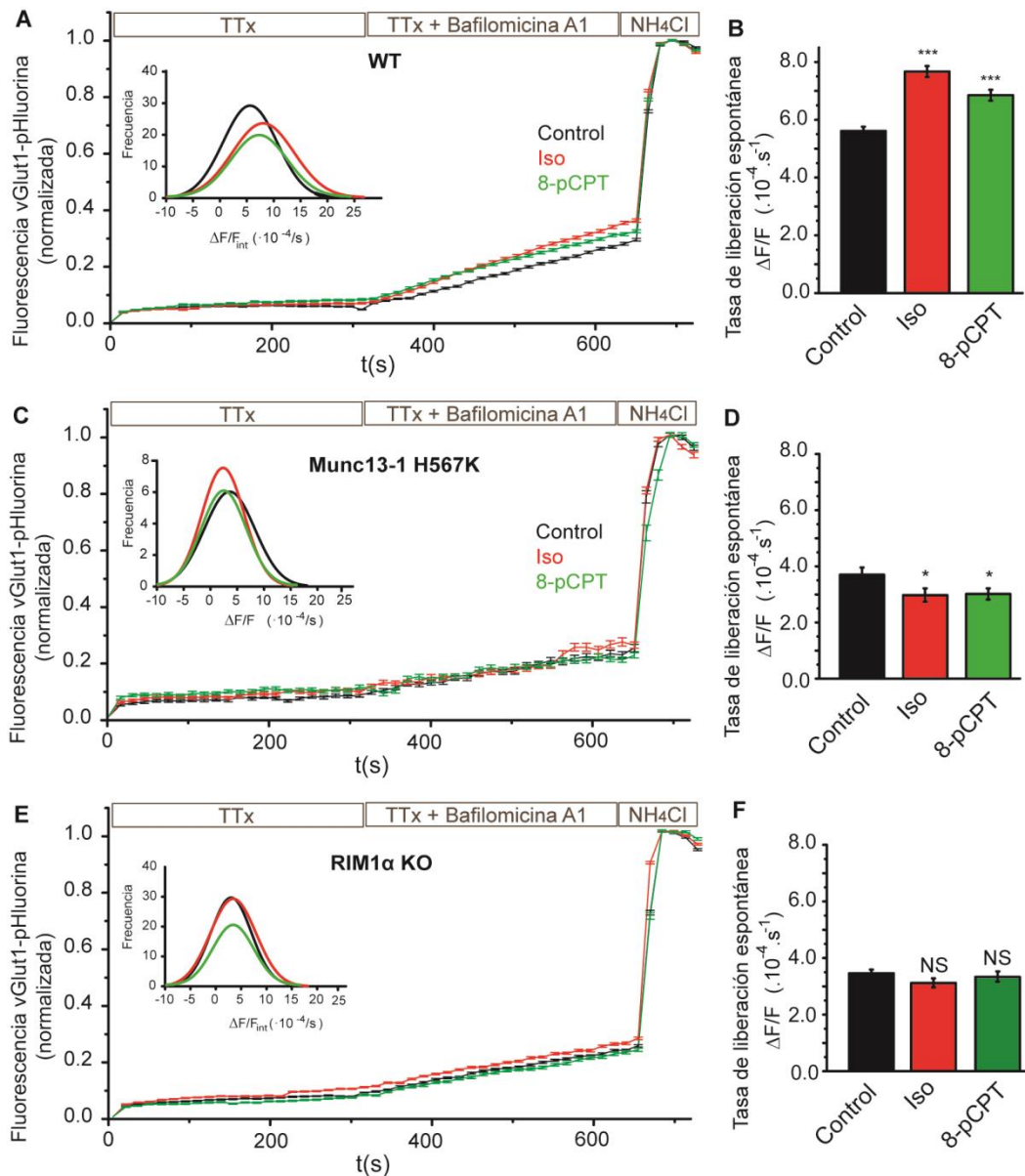


Figura 4.23. Modulación de la liberación espontánea por activación de los receptores β -AR y de la proteína Epac en cultivos primarios de neuronas corticales. Las neuronas corticales (14-19DIV) de ratones (A y B) WT, (C y D) Munc13-1 H567K y (E y F) RIM1 α KO, se transfectaron con los plásmidos que codifican las proteínas vGlut1-pHluorina y de mCherry bajo el promotor de la CaMKII α , y se perfundieron con TTx (1 μ M) y Bafilomicina A1 (500nm). Las neuronas además fueron tratadas en perfusión con el agonista de los receptores β -adrenérgicos, isoproterenol (Iso, 100 μ M), y el activador de la proteína Epac, 8-pCPT- O'-Me-cAMPS (8-pCPT, 50 μ M). (A, C, E) Variación de fluorescencia normalizada frente al máximo de fluorescencia inducido por la perfusión de NH₄Cl. Insertadas en la figura se muestran las distribuciones de gaussianas de ajuste del histograma de frecuencias de los botones individuales para la tasa de liberación espontánea ($\Delta F/F_{int}$). (B, D, F) Tasa de liberación espontánea ($\Delta F/F_{int}$), calculada como la diferencia entre las pendientes de la fase de Bafilomicina A1 y TTx y la de la fase de TTx. Los datos fueron representados como la media \pm SEM (barras de error). NS (no significativo), ***, $p < 0.001$ (test t-Student), comparados con el respectivo control.

La potenciación de la liberación de glutamato inducida tanto por la activación de los β -AR como por activación de la proteína Epac en sinaptosomas implica la activación de PLC y de proteínas activadas por DAG (Fig. 4. 15 y 4.17), probablemente Munc13 (Fig 4.18 y 4.20). Los ratones carentes de las isoformas de Munc13 mueren al nacer (Augustin

et al., 1999; Varoqueaux et al., 2000; Rhee et al., 2002) por lo que no es posible obtener sinaptosomas de ratones adultos para su estudio, aunque sí es factible realizar cultivos primarios con estos modelos animales. Así, estudiamos los ratones mutantes Munc13-1 H567K, que presentan una mutación puntual en el dominio de unión a DAG de esta proteína, que impide que se desarrollen los mecanismos de potenciación de la liberación de neurotransmisores dependientes de la unión de Munc13 a DAG (Rhee et al., 2002).

La tasa de liberación espontánea en ausencia de tratamiento de los cultivos del ratón Munc13-1 H567K fue menor que la de los ratones de genotipo salvaje ($\Delta F/F_{int} = 3.72 \pm 0.26 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, $n=106$ botones; $p>0.001$; Fig. 4.23. C y D). Además, la aplicación de isoproterenol en estas neuronas no produjo un incremento de la tasa de liberación espontánea ($\Delta F/F_{int} = 2.99 \pm 0.24 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, $p<0.05$, $n=137$ botones; Fig. 4.23. C y D). Así mismo, el tratamiento con 8-pCPT, tampoco produjo el aumento en la tasa de liberación espontánea ($\Delta F/F_{int} = 3.02 \pm 0.20 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, $p<0.05$, $n=136$ botones; Fig. 4.23. C y D). Estos resultados muestran que la potenciación de la liberación espontánea por activación de los β -AR y Epac, en neuronas corticales en cultivo, probablemente implique la activación por DAG de la proteína Munc13-1.

Los resultados obtenidos en sinaptosomas sugieren que estos mecanismos de modulación pueden depender de vías de señalación adicionales a la dependiente de PLC/Munc13 (Fig 4.17.). Así, se ha descrito que los mecanismos de plasticidad por cAMP dependen de la proteína RIM1 α (Castillo et al., 2002), y nuestros resultados muestran que la activación de la proteína Epac incrementa la interacción entre Rab3a y RIM1 (Fig. 4.19). Por lo tanto, quisimos estudiar los mecanismos de potenciación de la liberación espontánea por la activación de los β -AR y de las proteínas Epac en cultivos de neuronas corticales obtenidas de ratones carentes de la proteína RIM1 α .

La tasa de liberación espontánea observada en los ratones carentes de la proteína RIM1 α también fue menor que la desarrollada por los ratones de genotipo salvaje ($\Delta F/F_{int} = 3.51 \pm 0.17 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, $p<0.001$, $n=936$ botones; Fig. 4.23. E y F). Además, encontramos que la aplicación de isoproterenol en las neuronas procedentes de estos ratones, no indujo un aumento en la tasa de liberación espontánea ($\Delta F/F_{int} = 3.12 \pm 0.18 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, $p>0.05$, $n=808$ botones; Fig. 4.23. E y F) frente a las neuronas sin tratar con fármaco. De la misma manera, la aplicación de 8-pCPT no dio lugar al incremento de la liberación espontánea ($\Delta F/F_{int} = 3.68 \pm 0.19 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, $p>0.05$, $n=626$ botones; Fig. 4.23. E y F). Por lo tanto, la potenciación de la liberación espontánea dependiente de los β -AR y Epac parece depender también de la presencia de la proteína RIM1 α .

2.2.3. Estudio de la liberación inducida por despolarización.

Los estudios realizados en sinaptosomas se centraron en el análisis de la liberación en presencia de TTx, porque en estas condiciones se aísla un componente de liberación posiblemente dependiente de la modulación de la maquinaria exocitótica. Sin embargo, los resultados obtenidos mostraron que la potenciación por el activador de la AC, forskolina, de la liberación inducida por despolarización también presenta un componente independiente de PKA (Fig. 4.14). Por ello, quisimos estudiar también el efecto de la activación de los β -AR y de la proteína Epac sobre la liberación inducida por despolarización en los cultivos primarios de neuronas corticales.

En estos experimentos empleamos neuronas corticales (14-20 DIV) transfectadas con los plásmidos que codifican las proteínas vGlut1-pHluorina y mCherry bajo el promotor de la CaMKII α . La despolarización de las neuronas se indujo por medio de un estimulador de campo, aplicando un número variable de estímulos eléctricos (APs) de 10 V/cm a 20Hz. Se aplicaron estimulaciónes breves de 40APs, asociadas con la liberación del RRP, y estimulaciónes moderadas de magnitud submáxima de 400APs (Burrone et al., 2006). Además, se aplicaron estímulos de un único AP con el objetivo de estimar la tasa de acierto asociada a la probabilidad de liberación (Blaji y Ryan, 2007). El aumento de fluorescencia de estas respuestas normalizado a la fluorescencia de todas las SVs de cada botón individual, determinada con NH₄Cl. Los protocolos de estimulación eléctrica y de los tratamientos farmacológicos se muestran en la Fig. 3.9. B.

El tratamiento de las neuronas con el activador de la proteína Epac, 8-pCPT (50 μ M), y el agonista de los β -AR, isoproterenol (100 μ M), produjo el incremento de la liberación inducida por 40APs (isoproterenol: 5.8 \pm 0.5%, n=371 ROIs, p<0.001; 8-pCPT: 8.2 \pm 0.6%, n=380 ROIs, p<0.05, respectivamente; Fig. 4.24. A y B), frente a las neuronas control en ausencia de fármacos (4.6 \pm 0.3%, n=846 ROIs, Fig. 4.24. A y B).

Además, la aplicación de isoproterenol (26.1 \pm 1.0%, n=371 ROIs, 5 campos, p<0.001; Fig. 4.24. A y C) y de 8-pCPT (23.3 \pm 1.0, n=380 ROIs, 4 campos, p<0.001; Fig. 4.24) también incrementó la liberación inducida por 400APs, respecto de las neuronas control sin tratar con estos fármacos (17.6 \pm 0.6, n=846 ROIs, Fig. 4.24. A y C).

Así mismo, se estudiaron las cinéticas de la exocitosis y endocitosis de las respuestas a 400APs, determinando las correspondientes constantes de incremento y decaimiento exponencial, respectivamente. Las constantes de exocitosis no se alteraron con isoproterenol (11.6 \pm 1.0s, n=371 ROIs, p>0.05; Fig. 4.24. D y E), u 8-pCPT (10.8 \pm 1.8s, n=380 ROIs, p>0.05; Fig. 4.24. D y E), en comparación con el control en ausencia de fármacos (12.0 \pm 1.6s, n=846 ROIs,; Fig. 4.24. D y E). Sin embargo, si se observaron cambios en las constantes de endocitosis frente al control (46.22 \pm 1.36s, 846 ROIs; Fig. 4.24. D y F), tras el tratamiento con isoproterenol que incrementó la velocidad de la

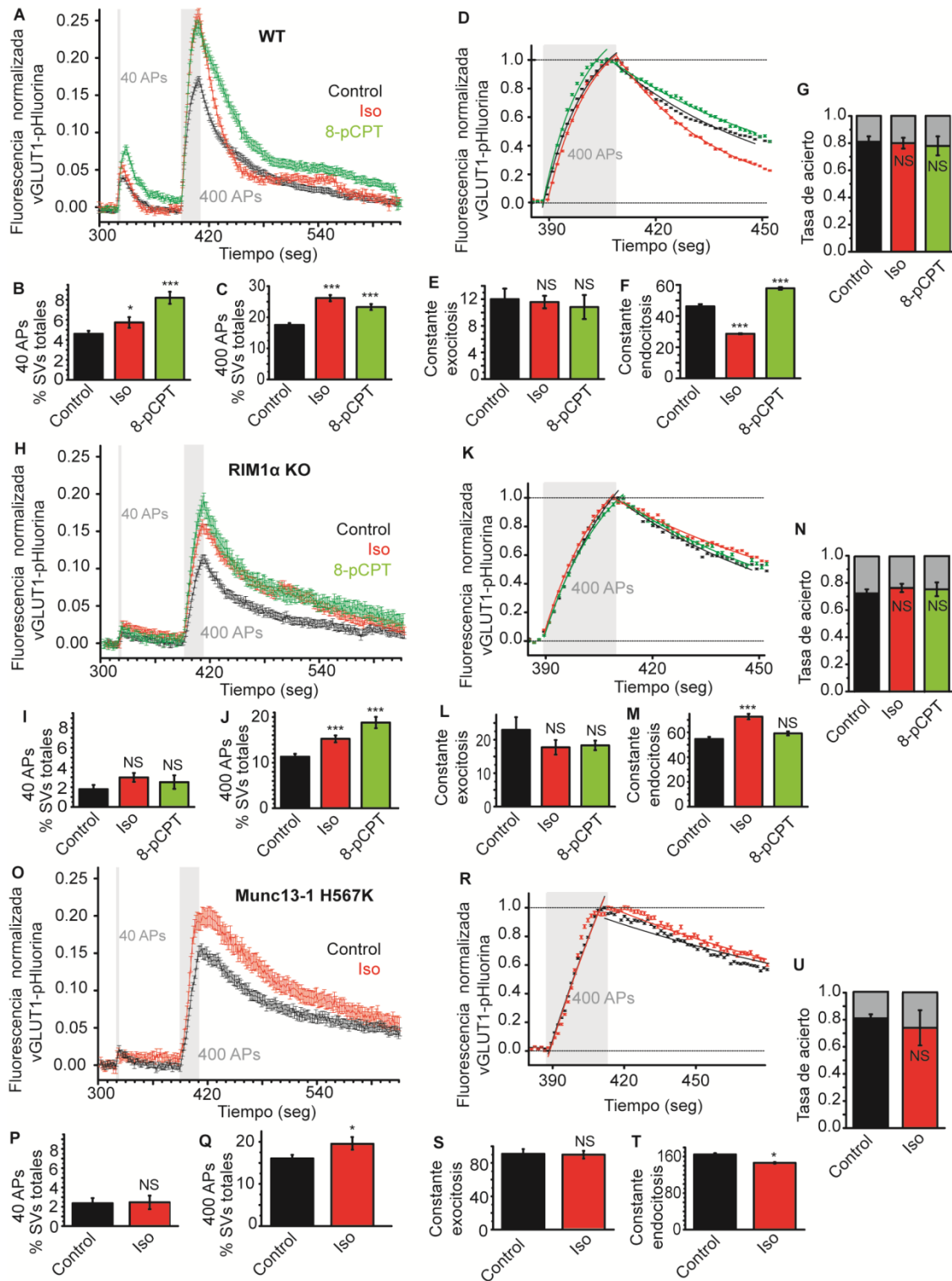


Figura 4.24. La activación de los β -AR y de la proteína Epac modula la liberación inducida por despolarización en cultivos primarios de neuronas corticales. Neuronas corticales (14-19DIV) de ratones (A-G) WT, (H-N) RIM1 α KO y (O-U) Munc13-1 H567K, transfectadas con los plásmidos que codifican las proteínas vGlut1-pHluorina y de mCherry bajo el promotor de la CaMKII α , fueron sometidas a estimulaciones de campo de 40 o 400 potenciales de acción (APs) a 20Hz. Las neuronas además fueron tratadas en perfusión con el agonista de los receptores β -adrenérgicos, isoproterenol (Iso, 100 μ M), y el activador de la proteína Epac, 8-pCPT- O'-Me-cAMPS (8-pCPT, 50 μ M). (A,H,O) Registros de fluorescencia normalizados a la señal del NH $_4$ Cl. (B,C,I,J,P,Q) Porcentaje de SVs liberado por 40 y 400 APs. (D,K,R) Ajuste de las cinéticas de exocitosis y endocitosis inducida por 400APs, normalizados respecto a su valor máximo. (E,F,L,M,S,T) Constantes de exocitosis y endocitosis. (G,N,U) Tasa de aciertos calculada a partir del número de respuestas de exocitosis al aplicar estímulos de un único AP. Los datos fueron representados como la media \pm SEM (barras de error). NS (no significativo); *, p<0.05; **, p<0.01; ***, p<0.001 (test t-Student), comparados con el control respectivo.

endocitosis ($28.61 \pm 0.30s$, $n=371$ ROIs; $p < 0.001$; Fig. 4.24. D y F), mientras que la aplicación de 8-pCPT redujo la velocidad de este proceso ($57.77 \pm 0.83s$; 380 ROIs; $p < 0.001$; Fig. 4.24. D y F). Por lo tanto, la activación de los β -AR y Epac parece tener un efecto contrapuesto sobre la endocitosis, sugiriendo que es posible que estas proteínas modulen este proceso por vías diferentes.

Por último, se estimó la probabilidad de liberación a partir del número de respuestas exocitóticas por la aplicación de un único AP (Balaji y Ryan, 2007). Así, se calculó la tasa de acierto como el número de respuestas frente al número de estímulos aplicados de un único AP. No se observó ningún cambio en la tasa de acierto por el tratamiento con isoproterenol (0.80 ± 0.04 , $n=371$ ROIs; $p > 0.05$; Fig. 4.24.G), ni con 8-pCPT (0.78 ± 0.07 , $n=380$ ROIs; $p > 0.05$; Fig. 4.24. G), frente al control (0.81 ± 0.04 , $n=846$ ROIs). Estos resultados sugieren que la activación de los β -AR y Epac no afecta a la probabilidad de liberación.

Por lo tanto, parece que la activación de los receptores β -AR y de la proteína Epac incrementa la liberación inducida por 40 y 400APs, afectando además a la cinética de endocitosis. Sin embargo, ni la cinética de exocitosis, ni la probabilidad de liberación parecen modificarse por el tratamiento con estos fármacos.

Los resultados obtenidos en sinaptosomas (Fig. 4.18-4.20) y en el estudio de la liberación espontánea en los cultivos de neuronas corticales (Fig. 4.23), sugieren que las proteínas de la maquinaria exocitótica RIM1 α y Munc13-1 pueden ser los efectores finales de los mecanismos de señalización activados por los receptores β -AR y de la proteína Epac. Por lo que decidimos determinar los efectos de la activación de los β -AR y de la proteína Epac sobre la liberación inducida por despolarización en cultivos de neuronas corticales de los ratones carentes de la proteína RIM1 α y de los mutantes para la unión a DAG (H567K) de la proteína Munc13-1.

Las neuronas de los ratones carentes de RIM1 α mostraron una reducción en la respuesta a 40APs ($1.8 \pm 0.4\%$, $n=397$ ROIs, $p < 0.001$; Fig. 4.24. H e I) en comparación con las neuronas control. El tratamiento de estas neuronas carentes de la proteína RIM1 α con isoproterenol ($3.0 \pm 0.5\%$, $n=549$ ROIs, $p > 0.05$; Fig. 4.24. H e I) y con 8-pCPT ($2.5 \pm 0.7\%$, $n=192$ $p > 0.05$; Fig. 4.24. H e I) no potenció significativamente la liberación inducida por 40APs. Las neuronas del ratón Munc13-1 H567K también mostraron una reducción en la liberación por 40APs ($2.4 \pm 0.5\%$, $n=300$, $p < 0.001$; Fig. 4.24. O y P) en comparación con las neuronas control. En las neuronas del ratón Munc13-1 H567K, no se observó ningún efecto por el tratamiento con isoproterenol ($2.5 \pm 0.7\%$, $n=141$ ROIs, $p > 0.05$; Fig. 4.24. O y P).

Por otra parte, las neuronas del ratón KO para RIM1 α también desarrollaron respuestas menores a la estimulación con 400APs ($11.3 \pm 0.6\%$, $n=397$ ROIs, $p < 0.001$; Fig. 4.24. H y J) en comparación con las neuronas control. En las neuronas carentes de RIM1 α

el tratamiento con isoproterenol ($15.2 \pm 0.8\%$, $n=549$ ROIs, $p < 0.001$; Fig. 4.24. H y J) y con 8-pCPT ($18.8 \pm 1.2\%$, $n=192$, $p < 0.001$; Fig. 4.24. H y J) sí incrementó la liberación inducida por 400APs. Las neuronas del ratón Munc13-1 H567K no mostraron alteraciones en la respuesta a 400 APs ($16.1 \pm 0.9\%$, $n=300$, $p > 0.05$; Fig. 4.24. O y Q), pero si aumentaron ligeramente su liberación por el tratamiento con isoproterenol ($19.5 \pm 1.4\%$, $n=141$ ROIs, $p < 0.05$; Fig. 4.24. O y Q).

Los distintos tratamientos farmacológicos no modificaron las cinéticas de exocitosis en las células carentes de RIM1 α (17.72 ± 2.19 s, $p < 0.05$, $n=549$ ROIs, para isoproterenol; y 18.34 ± 1.43 s para 8-pCPT, $p < 0.05$, $n=192$, 4 campos; frente al control 22.94 ± 3.82 s, $n=397$ ROIs; Fig.24.L) ni en las células que expresan el mutante Munc13-1 H567K (90.79 ± 5.75 s para isoproterenol, $p < 0.05$, $n=141$; frente al control 89.87 ± 4.64 s, $n=300$ ROIs; Fig.24.S). Por otro lado se observó que en las neuronas carentes de RIM1 α , se perdieron las modulaciones inducidas por 8pCPT e isoproterenol en las células control (Fig.24.M, frente a Fig.24.F). Así, en las células sin RIM1 α se perdió el efecto de enlentecimiento de la endocitosis inducido por 8PcPT (59.1 ± 1.6 s; $n=192$, $p > 0.05$; Fig. 4.24. M) mientras que la aceleración de la cinética de la endocitosis inducida por isoproterenol se convirtió en un efecto de enlentecimiento (72.7 ± 2.2 s; $n=549$ ROIs, $p < 0.001$; Fig. 4.24. M), frente al control (54.7 ± 1.7 s; $n=397$ ROIs; Fig. 4.24. M). En las células derivadas del ratón Munc13-1 H567K, también se observó un incremento de la velocidad de endocitosis por el tratamiento con isoproterenol (146.31 ± 1.59 s para isoproterenol, $p < 0.001$, $n=141$; frente al control 164.63 ± 2.99 s, $n=300$ ROIs; Fig.24.T), aunque de menor magnitud que el observado en las células de genotipo silvestre. Por lo tanto, estos resultados sugieren que los efectos de la activación de los β -AR y Epac sobre la cinética de endocitosis son probablemente dependientes de la proteína RIM1 α , pero no de Munc13-1.

Finalmente, igual que en neuronas control (Fig. 24.G) el tratamiento con isoproterenol o con 8-pCPT no alteró la tasa de aciertos en las neuronas carentes de proteína RIM1 α (0.76 ± 0.03 , $n=549$ ROIs, $p > 0.05$, para isoproterenol; y 0.75 ± 0.05 ; $n=192$, $p > 0.05$, para 8-pCPT; frente al control, 0.72 ± 0.03 ; $n=397$ ROIs; Fig. 4.24. N) ni en las neuronas Munc13-1 H567K (0.81 ± 0.03 , $n=549$ ROIs, $p > 0.05$, para isoproterenol, frente al control 0.74 ± 0.13 ; $n=397$ ROIs; Fig. 4.24. U). Es de destacar que la tasa de acierto en ausencia de tratamiento es menor ($p < 0.05$) en las células del ratón carente de la proteína RIM1 α que en las neuronas de genotipo salvaje, de acuerdo con la disminución de la probabilidad de liberación descrita previamente en este modelo (Schoch et al., 2002). Sin embargo, la tasa de acierto de las neuronas con Munc13-1 H567K no presentan diferencias ($p > 0.05$) frente al ratón de genotipo salvaje de acuerdo con el fenotipo descrito para estas células (Rhee et al., 2002).

Por lo tanto, los resultados obtenidos sugieren que el incremento de la liberación inducida por 40APs, por la activación de los β -AR y Epac, es dependiente de la proteína

RIM1 α y de la unión de DAG a Munc13-1. Además, las alteraciones observadas en la cinética de endocitosis por la activación de estas proteínas podrían depender de RIM1 α . Sin embargo, el incremento de la liberación inducida por 400APs por la activación de los β -AR y Epac parece ser independiente de la proteína RIM1 α y de la unión de DAG a Munc13-1. Por lo tanto, los mecanismos de potenciación dependientes de los β -AR y Epac parecen implicar a estas proteínas de la maquinaria exocitótica en liberaciones suaves, mientras que los efectos sobre liberaciones de mayor intensidad parecen dependientes de otros mecanismos.

2.2.3. Estudio del tamaño de los grupos de vesículas sinápticas.

Las SVs pueden clasificarse a nivel funcional en tres grupos o *pools* (Introducción 1.3.; Rizzoli y Betz, 2005; Alabi y Tsien, 2012; Fig. 1.2.C). Los resultados obtenidos muestran que la activación de los β -AR/Epac podría estar asociada a un aumento en el número de SVs preparadas para la liberación o RRP (Fig. 4. 21), de acuerdo a la posible implicación de proteínas Munc13-1 y RIM1 α (Fig. 4.18-4.20; Fig. 4.23, 4.24), que participan en la preparación de las SVs (Rhee et al., 2002; Deng et al., 2010).

Es posible estudiar estos grupos de SVs en neuronas que expresan pHluorinas, mediante la aplicación de estímulos de distinta intensidad en presencia de Bafilomicina A1 (Burrone et al., 2006; Figura 3.9.C). Este inhibidor de la ATPasa vacuolar evita la re-acidificación de las SVs, y por tanto, el apagado de la fluorescencia de las pHluorinas asociado a la endocitosis, permitiendo cuantificar la tasa neta de exocitosis en respuesta un determinado estímulo. Así, el incremento de fluorescencia por la aplicación de 40APs corresponde a la liberación de las SVs que constituyen el RRP, mientras que estímulos máximos (800APs) permiten estimar todas las SVs que son susceptibles de ser liberadas o grupo de reciclamiento. Por último, el grupo de reserva o reposo correspondería al porcentaje de SVs no movilizadas durante esta estimulación máxima (Burrone et al., 2006). La aplicación de NH₄Cl induce la emisión de fluorescencia de todas las SVs presentes en el terminal, por lo que es posible estimar el tamaño relativo de los grupos de SVs frente al número total de vesículas.

Estudiamos las respuestas a la despolarización inducida por 40 y 800 estímulos eléctricos de campo (APs) a 20Hz (10 V/cm), en neuronas corticales (14-20DIV) transfectadas con los plásmidos que codifican la expresión de la vGlut1-pHluorina y mCherry bajo el promotor de la CaMKII α . Las neuronas fueron tratadas en perfusión con Bafilomicina A1 (500nM), con el agonista de los β -AR, isoproterenol (100 μ M), y con el activador de la proteína Epac, 8-pCPT (50 μ M), tal como se describe en la Fig. 3.9. C.

Encontramos que la respuesta a la estimulación con 40APs en ausencia de fármacos (4.8 \pm 0.4%, 1393 ROIs, 9 campos), se incrementó tras la aplicación de

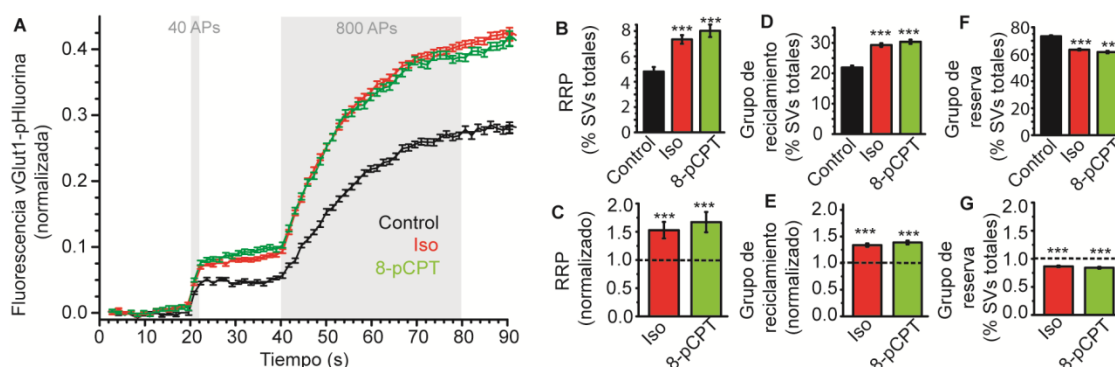


Figura 4.25. Modulación del tamaño de los grupos de SVs por los β -AR y Epac en cultivos primarios de neuronas corticales. Las neuronas corticales (14-19DIV) de ratones WT, transfectadas con los plásmidos que codifican la expresión de las proteínas vGlut1-pHluorina, y de mCherry bajo el promotor de la CaMKII α , fueron sometidas a estimulaciones de campo de 40 y 800 potenciales de acción (APs) a 20Hz, en presencia de Bafilomicina A1 (500nM). Las neuronas además fueron tratadas en perfusión con el agonista de los receptores β -adrenérgicos, isoproterenol (Iso, 100 μ M), y el activador de la proteína Epac, 8-pCPT- O'-Me-cAMPS (8-pCPT, 50 μ M). (A) Registros de fluorescencia normalizados a la fluorescencia máxima inducida por la perfusión de NH $_4$ Cl. Modulación del tamaño del grupo de SVs preparado para la liberación o RRP, correspondiente a la respuesta a 40 APs (B y C); del grupo de reciclamiento, correspondiente a la respuesta a 800 APs (D y E); y del grupo de reserva (F y G). Los datos fueron representados como la media \pm SEM (barras de error). NS (no significativo); ***, $p < 0.001$ (test t-Student), comparados con el respectivo control.

isoproterenol ($7.3 \pm 0.3\%$, 862 ROIs, $p < 0.001$) y de 8-pCPT ($8.1 \pm 0.5\%$, 941 ROIs, $p < 0.001$; Fig. 4.25, A, B y C). Además, observamos que los tratamientos con isoproterenol ($29.3 \pm 0.6\%$, 862 ROIs, $p < 0.001$), y con 8-pCPT ($30.4 \pm 0.7\%$, 941 ROIs, $p < 0.001$), también aumentaron la respuesta máxima inducida por 800 APs, frente a las neuronas sin tratar con estos fármacos ($21.9 \pm 0.6\%$, 1393 ROIs; Fig. 4.25, A, D y E). Finalmente, el grupo de reposo o de reserva fue reducido por ambos tratamientos farmacológicos ($63.4 \pm 0.7\%$, 862 ROIs, $p < 0.001$, para isoproterenol; $61.6 \pm 0.9\%$, 941 ROIs, $p < 0.001$, para 8-pCPT; frente al control, $73.3 \pm 0.7\%$, 1393 ROIs; Fig. 4.25, A, F y G).

Por lo tanto, la activación de los β -AR y de la proteína Epac parece incrementar el número de SVs que forman parte del RRP y del grupo de reciclamiento.

3. SEÑALIZACIÓN CRUZADA DE LOS RECEPTORES β -AR Y mGLU7 EN LA POTENCIACIÓN DE LA LIBERACIÓN DE GLUTAMATO.

Los receptores mGlu7, localizados en la zona activa presináptica, inhiben la liberación de glutamato por medio de la activación de proteínas Gi/o, que reducen la actividad de los VDCC y la entrada de Ca $^{2+}$ que dispara la exocitosis (Herlitz et al., 1996; Takahashi et al., 1996; Pelkey et al., 2005; Millán et al., 2002). Las proteínas Gi/o activadas por estos receptores también inhiben la AC y la generación del cAMP. No

obstante, es muy importante destacar que la inhibición de la AC requiere su estimulación previa, de manera que los receptores mGlu7 no reducen los niveles basales de cAMP (Schoppa y Westbrook, 1997; Millán et al., 2002b). Por lo tanto, se desconoce el papel fisiológico de este mecanismo de inhibición de la AC, aunque probablemente esté relacionado con vías de señalización que aumenten los niveles de cAMP en la zona activa.

Por otra parte, se ha propuesto que la activación prolongada de los receptores mGlu7 favorece mecanismos de potenciación dependientes de cAMP, y se ha sugerido que estos mecanismos involucran cambios en la interacción entre el receptor y la proteína RIM (Pelkey et al., 2008). Este mecanismo, aparentemente contrapuesto a la inhibición de la liberación por estimulación breve de estos receptores, añade todavía más complejidad a la modulación de los niveles de cAMP que ejercen los receptores mGlu7. Hay que señalar que en la preparación de sinaptosomas la activación prolongada de los receptores mGlu7 potencia la liberación de glutamato por medio de una vía de señalización dependiente de PLC/DAG/Munc13 (Martin et al., 2010, apartado 4.1.). Las distintas vías de señalización activadas por los receptores mGlu7 han sido detalladas en el apartado *Introducción: 2.2.1* y mostradas en al Fig. 1.4.C. Además, los resultados obtenidos en este trabajo (apartado 4.2), ponen de manifiesto que los β -AR expresados en la zona activa presináptica activan, mediante la generación de cAMP, la proteína Epac, que a su vez activa la vía PLC/DAG/Munc13, y posiblemente otras vías complementarias, entre las que se postula la activación de Rab3a, incrementando su interacción funcional con RIM.

En este contexto, otro de los objetivos de este trabajo de investigación ha sido estudiar la posible interrelación entre la generación de cAMP por los β -AR y los mecanismos de señalización bidireccionales de los receptores mGlu7, así como las consecuencias de esta interacción en la liberación de glutamato.

3.1. Co-expresión e interacción de los receptores mGlu7 y β -AR.

Para que exista una interacción funcional entre las vías de señalización dependientes de los receptores mGlu7 y β -AR, debe darse la co-expresión de estos en terminales sinápticos. Con este fin, analizamos la localización de estos receptores en la corteza cerebral por medio de técnicas de inmunohistofluorescencia en rodajas coronales de cerebro. Tal como puede apreciarse en las imágenes a distintos aumentos (Fig. 4.26.A), el marcaje de los dos receptores muestra un alto grado de co-localización (puntos amarillos) en corteza cerebral. Además, para verificar que la co-localización de los receptores se correspondía con terminales presinápticos, realizamos un marcaje triple incluyendo el marcador de las SVs, sinaptofisina, que muestra que la co-localización de ambos receptores coincide con el marcaje de sinaptofisina (detalles de imágenes a 60X

mostrados en Fig. 4.26.B). Dado que tanto el receptor mGlu7 (Shigemoto et al., 1997, Figura 1.4.A), como los β_1 -AR (Figura 4.16), se localizan en la zona activa presináptica, esta co-localización probablemente corresponda con la zona activa.

Estudiamos también si la co-localización encontrada en las rodajas de corteza cerebral se observa en la preparación de sinaptosomas cerebrocorticales. Encontramos que los receptores mGlu7a se expresan en un $30.0 \pm 1.2\%$ de los sinaptosomas marcados con sinaptofisina (6094 sinaptosomas, 20 campos; Fig. 4.26. F-G), mientras que los β_1 -AR se expresan en un $30.6 \pm 1.3\%$ de los sinaptosomas (7355 sinaptosomas, 25 campos; Fig. 4.26. H-I). Además del tamaño similar de las dos subpoblaciones de sinaptosomas, el marcaje de los sinaptosomas con anticuerpos contra ambos receptores mostró que el $72.9 \pm 2.6\%$ de los terminales que expresan los β_1 -AR, muestran también marcaje para los receptores mGlu7a (10643 sinaptosomas, 68 campos; Fig. 4. 26.J-K). Estos resultados ponen de manifiesto que los receptores mGlu7a y β_1 -AR se co-expresan en la presinápsis, tanto en rodajas, como en sinaptosomas obtenidos de corteza cerebral.

Para establecer si existe algún tipo de interacción entre los receptores mGlu7 y β_1 -AR, determinamos la formación de complejos entre estas proteínas por co-inmunoprecipitación e inmunotransferencia (*Western-Blot*). La incubación de los sinaptosomas con anticuerpos anti-mGlu7a co-inmunoprecipitó los β_1 -AR, inmunodetectados como una banda co-inmunoprecipitada ligeramente mayor de 100kDa (Fig 4.26. E), que probablemente se corresponda con el dímero que forman estos receptores (Mercier et al., 2002; Lavoie et al., 2002; Angers et al., 2000; Breit et al., 2004), a partir de monómeros de 55kDa. Además, esta banda no se observó en los controles negativos con anticuerpos irrelevantes que no reconocen ningún epítipo fisiológico (anti-Flag), realizados con el objetivo de asegurar que la co-inmunoprecipitación es específica. La co-inmunoprecipitación inversa también mostró la interacción de los dos receptores (datos no mostrados), aunque la intensidad de la banda co-inmunoprecipitada fue muy tenue debido a la baja señal para inmunotransferencia que presentan los anticuerpos anti-mGlu7a disponibles. Por lo tanto, los receptores mGlu7 y β -AR pueden formar parte de complejos proteicos en los botones sinápticos de la corteza cerebral, que se mantienen en las condiciones de solubilización y co-inmunoprecipitación empleadas. Todos estos resultados sugieren una posible interacción entre las vías de señalización iniciadas por estos receptores.

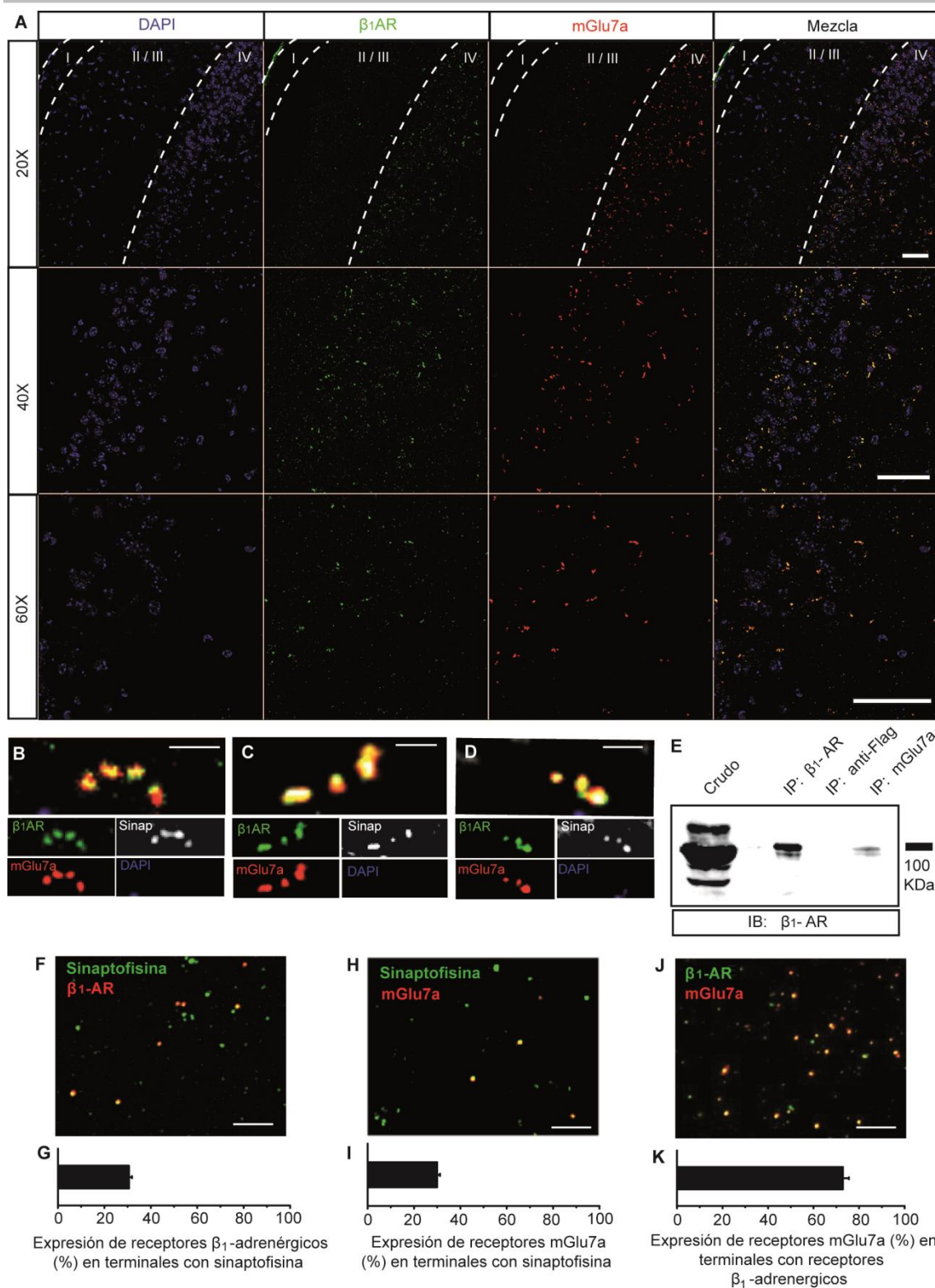


Figura 4.26. Co-expresión e interacción de los receptores mGlu7a y β_1 -adrenérgicos en terminales presinápticos de corteza cerebral. (A) Imágenes del marcaje por inmunohistofluorescencia de rodajas de corteza cerebral con anticuerpos frente a los receptores mGlu7a y β_1 -adrenérgicos a distintos aumentos. Además se incluyó DAPI como marcador de núcleos celulares. Barra de escala, 50 μ m. (B-D) Detalles de rodajas de corteza cerebral con marcaje triple para los receptores y el marcador presináptico sinaptofisina. Barra de escala, 3 μ m. (E) Co-inmunoprecipitación de los receptores mGlu7a y β_1 -adrenérgico. Los sinaptosomas se solubilizaron e inmunoprecipitaron con anticuerpos anti-Flag (control negativo con epítipo no fisiológico; 3.5 μ g; IP: anti-Flag), anti-mGlu7a (3.5 μ g; IP: mGlu7a) o anti- β_1 -adrenérgico (3.5 μ g; IP: β_1 -AR). Los extractos inmunoprecipitados (IP) y los crudos (muestra sin inmunoprecipitar) se analizaron por inmunotransferencia (IB) con anticuerpos anti- β_1 -adrenérgico de conejo. (F, G, J) Imágenes de inmunofluorescencia de sinaptosomas de corteza cerebral marcados con anticuerpos anti-sinaptofisina, anti-mGlu7a y anti- β_1 -adrenérgico. (G,I,K) Cuantificación de la co-localización del marcaje de los anticuerpos empleados. Los datos se expresaron como la media \pm SFM.

3.2. La activación breve de los mGlu7 inhibe la potenciación de la liberación de glutamato dependiente de los receptores β -adrenérgicos.

De acuerdo a los resultados de expresión e interacción de los receptores estudiados, la reducción de los niveles de cAMP por los receptores mGlu7 podría modular la generación de este segundo mensajero por los receptores β -AR y, por tanto, su acción potenciadora sobre la liberación de glutamato.

Para abordar esta posibilidad, empleamos el modo de estimulación usado en el estudio de las vías de potenciación por cAMP (apartado 4.2.1), con bajas concentraciones del ionóforo de Ca^{2+} , ionomicina, en presencia del bloqueante de los canales de Na^+ , TTx, lo que, probablemente, permite aislar mecanismos dependientes de la modulación de la maquinaria excitotónica. Se ha señalado que una estimulación breve con el agonista del receptor mGlu7, L-AP4, activa las vías dependientes de proteínas Gi/o: la inhibición de la generación de cAMP y la inhibición de los VDCC. Sin embargo, en condiciones en las que no se activan los VDCC, usando bajas concentraciones de ionomicina en presencia de TTx, es posible determinar el efecto neto de la inhibición de la AC por mGlu7 sobre la vía de potenciación dependiente β -AR/ AC/cAMP/Epac//PLC/DAG/Munc13 (apartado 4.2.1)

Estimulando los sinaptosomas con ionomicina (0.5-1 μM , ajustando la concentración del ionóforo para obtener una liberación control de 0.5-0.6 nmoles glutamato/mg proteína), en presencia de TTx (1 μM), encontramos que el isoproterenol potenció la liberación de glutamato (176.1 \pm 3.8%, n=8, p<0.001; Fig. 4.27, B y C) frente a el control (0.59 \pm 0.04 nmoles glutamato/mg proteína, n=18). Esta respuesta de potenciación fue abolida tras la aplicación breve del agonista de mGlu7, L-AP4 (102.1 \pm 2.9%, n=8, p>0.05; Fig. 4.27, B y C). Hay que señalar que la aplicación breve de L-AP4 (135.1 \pm 5.5%, n=5, p<0.01, A; Fig. 4.27, D) redujo sólo parcialmente la liberación inducida por el activador de la AC, forskolina (15 μM ; 176.0 \pm 8.4%, n=5, p<0.001; Fig. 4.27, D). Por lo tanto, cabe pensar que los receptores mGlu7 ejercen un control parcial sobre la AC activada en todos los botones de la preparación por forskolina, mientras que tienen un control completo sobre la AC activada en los botones en los que se localizan los β -AR.

Por lo tanto, los resultados funcionales confirman la existencia de una estrecha relación entre los receptores mGlu7 y β -AR en una subpoblación de terminales presinápticos, tal como señalaban los experimentos previos de expresión e interacción.

Para conocer el mecanismo de inhibición de la respuesta potenciadora de los β -AR por mGlu7, realizamos medidas de los niveles de cAMP. El isoproterenol incrementó la acumulación de cAMP (224.0 \pm 25.0%, n=10, p<0.001, Fig. 4.27.E), y este efecto fue anulado (p<0.001) en presencia de L-AP4 (96.0 \pm 14.1%, n=8, p<0.05, Fig. 4.27.E). Por otro lado, el bloqueo de la señalización por proteínas Gi/o con PTx, no alteró la respuesta de isoproterenol (206.0 \pm 16.9%, n=6, p<0.05, Fig. 4.27.E), aunque anuló la capacidad de los

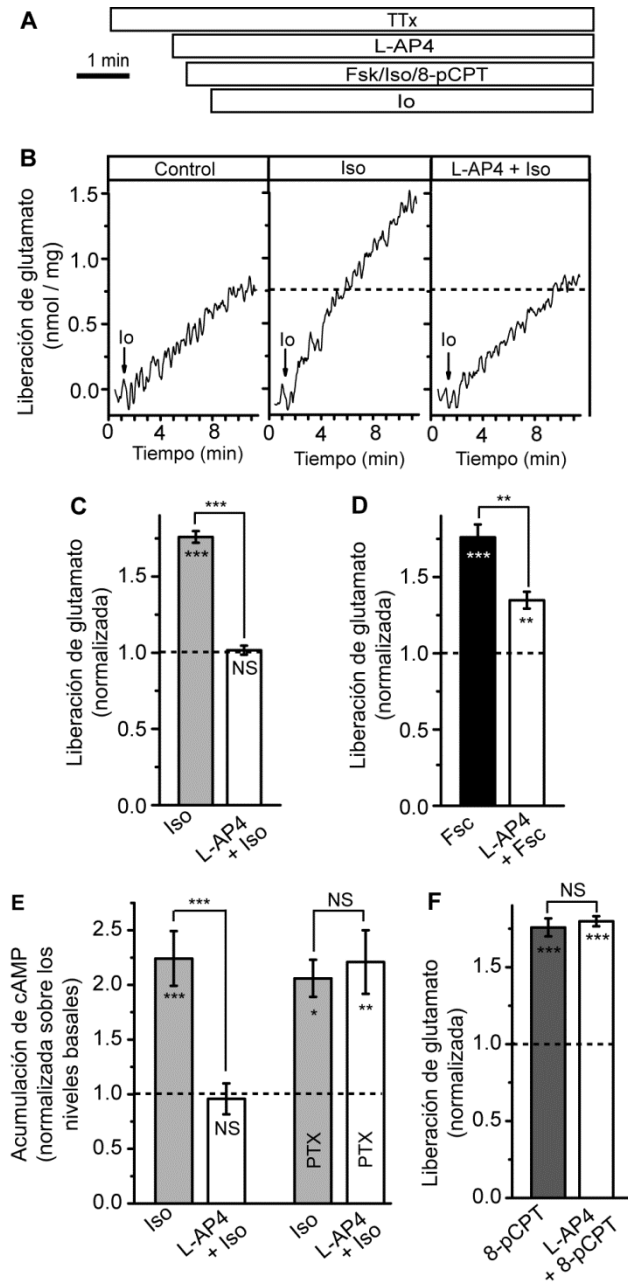


Figura 4.27. La activación breve de los receptores mGlu7 inhibe la potenciación de la liberación dependiente de los receptores β-adrenérgicos.

(A) Protocolo del tratamiento farmacológico de los sinaptosomas. La adición de isoproterenol, forskolina o 8-pCPT se realizó 40s antes de la aplicación del ionóforo de Ca²⁺, ionominina. La aplicación breve de L-AP4 se realizó 20s antes de la adición de los fármacos anteriores. Todos los ensayos de liberación de glutamato se realizaron en presencia de TTx (1μM), añadida dos minutos antes del comienzo del registro. (B) Modulación de la liberación de glutamato inducida por ionomicina (0.5-1μM) en presencia de TTx, por el agonista de los receptores β-adrenérgicos, isoproterenol (Iso, 100μM) y el agonista de los receptores mGlu7, L-AP4 (1mM). (C) Efecto sobre la liberación de glutamato de la aplicación de isoproterenol sin y con la adición previa de L-AP4. (D) Efecto sobre la liberación de glutamato del activador de adenilato ciclasa, forskolina (Fsc, 15μM), sin y con la adición previa de L-AP4. (E) Acumulación de cAMP en presencia de IBMX (1mM, 30min) normalizada frente a los niveles basales (3.3±0.4 pmol/mg), en sinaptosomas tratados con isoproterenol (100μM, 10min) en ausencia y en presencia del bloqueante de la señalización de proteína G_{i/o}, toxina pertúsica (PTx, 1.5 μg/μl, 2h). (F) Efecto sobre la liberación de glutamato de la aplicación del activador específico de Epac, 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP (8-pCPT, 50μM) sin y con la adición previa de L-AP4. Las liberaciones de glutamato se normalizaron frente a la liberación inducida por ionomicina. Los datos se expresaron como la media ± SEM (barras de error). NS (no significativo), p>0.05; *, p<0.05; **, p<0.01; ***, p<0.001 (ANOVA), comparados con el control (símbolos en el interior de las barras) o frente a otra condición (símbolos en el exterior de las barras).

receptores mGlu7 para interferir con la respuesta de los β-AR (220.9±29.1%, n=6, p<0.01; Fig. 4.27.E). Además, la potenciación de la liberación por el activador de la proteína Epac, 8-pCPT-2-O-Me-cAMP (8-pCPT; 176.0±5.8%, n=4, p<0.001, Fig. 4.27. F) no se alteró (p>0.05) por la aplicación previa de L-AP4 (180.0±3.2%, n=7, p<0.001, Fig. 4.27.F), indicando que la inhibición de la vía del cAMP por mGlu7 afecta a la generación de cAMP y no a elementos posteriores de la cascada de señalización.

3.3. La inhibición por mGlu7 de la generación de cAMP inducida por los β -AR persiste después del lavado del agonista L-AP4.

Las vías de potenciación activadas por los receptores mGlu7 (Martín et al., 2010; apartado 4.1) y los β -AR (apartado 4.2) parecen implicar cascadas de señalización que dependen de PLC/DAG/Munc13 en las etapas finales. Teniendo en cuenta además la co-expresión e interacción, así como la relación funcional inhibitoria entre estos dos receptores, podría también existir una interacción entre sus mecanismos de potenciación. La activación prolongada de los mGlu7 con L-AP4 (10min), y posterior lavado del agonista (referido como "Tratamiento L-AP4", Figura 4.28. A), induce la potenciación de la liberación de glutamato (Martín et al., 2010). Además, la estimulación de la liberación con ionomicina en presencia de TTx, permite analizar estos mecanismos de potenciación sin la participación de los fenómenos de inhibición de los VDCC mediados por mGlu7.

El pretratamiento con L-AP4, potenció la liberación de glutamato ($177.0 \pm 3.1\%$, $n=6$, $p < 0.001$, Fig. 4.28. B y C) en cuantía similar a isoproterenol ($172.0 \pm 4.6\%$, $n=6$, $p < 0.001$, Fig. 4.28. B y C). Sin embargo, el tratamiento con L-AP4 seguido de la aplicación de isoproterenol dio lugar a una potenciación ($251.0 \pm 4.3\%$, $n=8$, $p < 0.001$, Fig. 4.28. B y C) que se corresponde con la suma aritmética de las respuestas individuales ($p < 0.05$), lo que sugiere que no existe relación entre las vías de potenciación dependientes de los receptores mGlu7 y β -AR.

En el tratamiento con L-AP4, el agonista es lavado, por lo que los mecanismos de potenciación siguen activos a pesar de haber interrumpido la exposición de los sinaptosomas al fármaco. De manera análoga, existe la posibilidad de que los mecanismos de inhibición de la generación de cAMP por mGlu7 puedan también seguir activos después del lavado del agonista.

Para estudiar esta posibilidad, incubamos los sinaptosomas con PTx, con el fin de bloquear las proteínas Gi/o implicadas en la inhibición de la generación de cAMP por los receptores mGlu7 (Fig. 4.27. E.). En estas condiciones, la potenciación de la liberación por el tratamiento con L-AP4, seguido de la aplicación de isoproterenol, fue mayor ($p < 0.001$) en sinaptosomas tratados con PTx ($220.0 \pm 6.2\%$, $n=9$, $p < 0.001$, Fig. 4.28. D.) que en las muestras sin toxina ($175.0 \pm 6.3\%$, $n=6$, $p < 0.001$, Fig. 4.27. D). Hay que señalar que la potenciación conjunta fue menor que en experimentos previos (Figura 4.28.C), ya que en estos experimentos los sinaptosomas se incubaron durante 2 horas, tiempo necesario para la acción de la PTx, en el que probablemente se vea reducida la funcionalidad de los sinaptosomas. A pesar de ello, el hecho de que exista un incremento en la liberación tras el bloqueo por PTx de las vías de inhibición de los mGlu7, sugiere que estos mecanismos de inhibición de la AC por los receptores mGlu7 permanecen activos tras el lavado del agonista L-AP4. Además, el incremento en la acumulación de cAMP inducido por

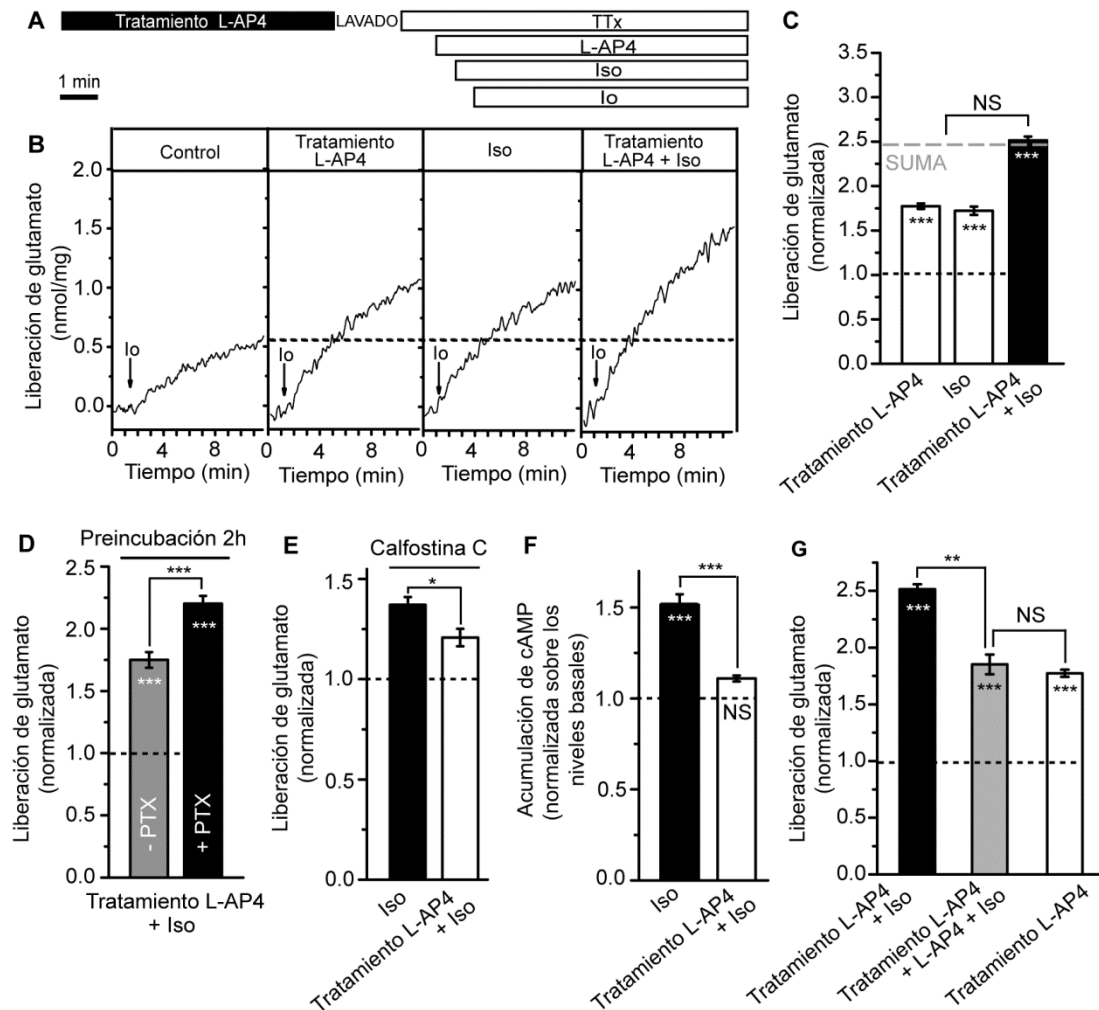


Figura 4.28. La inhibición por los receptores mGlu7 de la potenciación de la liberación dependiente de los receptores β -adrenérgicos persiste después del lavado del agonista L-AP4. (A) Protocolo del tratamiento farmacológico de los sinaptosomas. El tratamiento con L-AP4 se realizó exponiendo los sinaptosomas al agonista durante 10 min, centrifugándolos para retirar el fármaco y re-suspendiéndolos (lavado) para realizar los tratamientos farmacológicos posteriores. La adición de isoproterenol se realizó 40s antes de la aplicación del ionóforo de Ca^{2+} , ionomicina. La aplicación breve de L-AP4 tras el tratamiento se realizó 20s antes de isoproterenol. Todos los ensayos de liberación de glutamato se realizaron en presencia de TTx ($1\mu M$), añadida dos minutos antes del comienzo del registro. (B) Modulación de la liberación de glutamato inducida ionomicina ($0.5-1\mu M$) en presencia de TTx, por el agonista de los receptores mGlu7, L-AP4 ($1mM$, 10min) y la aplicación del agonista de los receptores β -adrenérgicos, isoproterenol (Iso, $100\mu M$), individual y conjuntamente. (C) Efecto sobre la liberación de glutamato normalizada de la aplicación de isoproterenol y del tratamiento con L-AP4, individual y conjuntamente. La línea discontinua indica el valor de la suma aritmética de las potenciaciones individuales. (D) Efecto sobre la liberación de glutamato normalizada del tratamiento con L-AP4 y aplicación sucesiva de isoproterenol, en ausencia (2horas de incubación) o en presencia del bloqueante de la señalización de proteína $G_{i/o}$, toxina pertúsica (PTX, $1.5\mu g/\mu l$, 2h). (E) Efecto sobre la liberación de glutamato de isoproterenol y del tratamiento con L-AP4 seguido de la aplicación de isoproterenol, en presencia del inhibidor de proteínas con dominios de unión a DAG, calyculina C ($0.1\mu M$, 30min). (F) Acumulación de cAMP en presencia de IBMX ($1mM$, 30min) normalizada frente a los niveles basales en sinaptosomas sin tratar. Los sinaptosomas se trataron con isoproterenol ($100\mu M$, 10min) sin y con el tratamiento previo con L-AP4 ($1mM$, 10min, lavando el agonista). (G) Efecto sobre la liberación de glutamato del tratamiento con L-AP4, la aplicación de isoproterenol y un segundo tratamiento en agudo con L-AP4. Las liberaciones de glutamato se normalizaron frente a la liberación inducida por ionomicina. Los datos se expresaron como la media \pm SEM (barras de error). NS (no significativo), $p>0.05$; *, $p<0.05$; **, $p<0.01$; ***, $p<0.001$ (ANOVA), comparados con el control (símbolos en el interior de las barras) o frente a otra condición (símbolos en el exterior de las barras).

isoproterenol ($151.0\pm 6.3\%$, $n=10$, $p<0.001$, Fig. 4.28.E) también se redujo ($p<0.001$) tras el tratamiento previo y lavado del L-AP4 ($111\pm 1.6\%$, $n=13$, $p>0.05$), lo que sugiere que se mantiene la inhibición de la acumulación de cAMP tras la retirada del agonista L-AP4.

La calfofostina C es un inhibidor de la unión de DAG a sus dianas, que bloquea completamente la potenciación de la liberación por el tratamiento con L-AP4 (Martín et al., 2010), mientras que inhibe parcialmente la potenciación mediada por isoproterenol (Figura 4.17.B). Por lo tanto, la modulación de la liberación observada en sinaptosomas tratados con calfofostina C, debería implicar únicamente los mecanismos activados por cAMP independientes de DAG, así como las posibles vías de inhibición de la generación de cAMP por mGlu7 que pudieran permanecer tras el lavado del agonista. En presencia de calfofostina C, la potenciación de la liberación por isoproterenol ($137.0 \pm 3.8\%$, $n=9$, $p < 0.01$, Fig.4.28. F) se redujo en sinaptosomas tratados con L-AP4 ($121.0 \pm 4.3\%$, $n=9$, $p < 0.05$, Fig.4.28.F), lo que demuestra la capacidad de los receptores mGlu7 para reducir la generación de cAMP aún después de lavar el agonista L-AP4.

Con el objetivo de estudiar la capacidad de los receptores mGlu7 de inhibir la AC en ausencia de agonista, analizamos el efecto de una segunda adición breve de L-AP4, después del tratamiento y lavado del L-AP4 (referidos como “L-AP4” y “Tratamiento con L-AP4”, respectivamente; Figura 4.28.A.). El efecto potenciador conjunto del tratamiento con L-AP4 y la aplicación de isoproterenol ($251.4 \pm 4.4\%$, $n=10$, $p < 0.001$, Fig.4.28.G) se redujo ($p < 0.01$) tras una segunda aplicación breve de L-AP4 ($177.4 \pm 3.2\%$, $n=6$, $p < 0.001$, Fig.4.28.G). La magnitud de esta potenciación fue similar ($p < 0.05$) a la obtenida tras el tratamiento con L-AP4 ($185.3 \pm 8.7\%$, $n=8$, $p < 0.001$, Fig.4.28.G), lo que sugiere que la segunda adición de L-AP4 inhibe completamente la generación de cAMP inducida por isoproterenol. Por lo tanto, el mecanismo de inhibición que permanece después del lavado del agonista tiene un efecto submáximo o parcial, frente al fenómeno que se observa en presencia del agonista que es capaz de inhibir completamente la generación de cAMP. Este hecho sugiere que en condiciones de tratamiento y lavado del L-AP4, una subpoblación de los receptores mGlu7 mantiene la capacidad de inhibir la generación de cAMP, aún en ausencia del agonista en el medio extracelular, mientras que otra subpoblación no lo hace. Esta segunda subpoblación podría ser activada por la presencia del agonista tras una segunda adición, alcanzando la máxima inhibición.

3.4. Sinergismo entre las vías de potenciación de la liberación dependientes de los receptores mGlu7 y β -AR.

Dado que la vía de inhibición iniciada por mGlu7 afecta a la AC, la activación de la vía β -AR/AC/cAMP/Epac en etapas posteriores a la AC, podría permitir estudiar la relación de las vías de potenciación sin interferencias de los mecanismos de inhibición. De acuerdo con esta idea, habíamos observado que la potenciación de la liberación por el activador de Epac, 8-pCPT, no es inhibida por el tratamiento breve con L-AP4 (Figura 4.27.

F). Así, encontramos que el 8-pCPT potenció la liberación ($175.0 \pm 5.1\%$, $n=6$, $p < 0.001$, Fig. 4.29. B y C), en cuantía similar al tratamiento con L-AP4 ($180.0 \pm 5.6\%$, $n=6$, $p < 0.001$, Fig. 4. 29. B y C), mientras que la adición de 8-pCPT tras el tratamiento con L-AP4 ($317.0 \pm 8.5\%$, $n=8$, $p < 0.001$, Fig. 4. 29. B y C) provocó un potenciación considerablemente mayor ($p < 0.001$) que la suma de las respuestas individuales.

Otra alternativa farmacológica para estudiar la interrelación entre estas vías de potenciación de la liberación por los receptores mGlu7 y vía β -AR, en ausencia de la inhibición de la AC, fue el uso del análogo de cAMP, Sp-8-Br-cAMPS (Sp-8-Br), que incrementó la liberación de glutamato ($177.0.0 \pm 3.4\%$, $n=10$, $p < 0.001$, Fig. 4. 29. D) en cuantía similar al isoproterenol u 8-pCPT, o a la inducida por el pretratamiento con L-AP4 ($175.0.0 \pm 3.3\%$, $n=7$, $p < 0.001$, Fig. 4 Fig. 4. 29. D) Sin embargo, el pretratamiento con L-AP4 seguido de la adición de Sp-8-Br, también dio lugar a una potenciación de la liberación de glutamato ($314.0 \pm 8.9\%$, $n=11$, $p < 0.001$, Fig. 4. 29. D) notablemente mayor que la suma de las potenciaciones individuales ($p < 0.001$).

Se ha descrito que la activación conjunta de las vías DAG/PKC y cAMP/PKA en sinaptosomas aumenta la liberación de glutamato por activación de los VDCC en ausencia de despolarización (Millán et al., 2003). Aunque, los mecanismos de potenciación estudiados parecen ser independientes de PKC y PKA (Figura 4.14 y 4.15.; Martín et al., 2010), y las condiciones experimentales empleadas deberían evitar el efecto de una posible modulación de los VDCC, quisimos asegurarnos de que el efecto sinérgico no se debía a mecanismos adicionales de modulación de los VDCC. Para ello, cuantificamos este efecto de sinergia en presencia de los bloqueantes de los VDCC de tipo P/Q (ω -agatoxina-I VA, 200nM, 30min) y N (ω -conotoxina-GVIA, 2 μ M, 30min). En sinaptosomas tratados con ambas toxinas, el pretratamiento con L-AP4, seguido de la aplicación de Sp-8-Br produjo una potenciación ($252.0 \pm 5.2\%$, $n=5$, $p < 0.001$, Fig. 4. 29. E) mayor que la suma de las potenciaciones individuales ($p < 0.01$) por el pretratamiento con L-AP4 ($153.0 \pm 3.8\%$, $n=4$, $p < 0.01$, Fig. 4. 29. E) o por Sp-8-Br ($161.0 \pm 2.4\%$, $n=4$, $p < 0.001$, Fig.4. 29. E).

Por lo tanto, cuando se evita la inhibición de la AC por los receptores mGlu7, se desarrolla un efecto sinérgico o supra-aditivo, seguramente debido a la interacción entre las vías de potenciación dependientes de cAMP/Epac y la inducida por la activación prolongada del receptor mGlu7. Este fenómeno podría suponer un novedoso y potente mecanismo de potenciación de liberación de glutamato, mediado probablemente por la modulación de la maquinaria excitotónica.

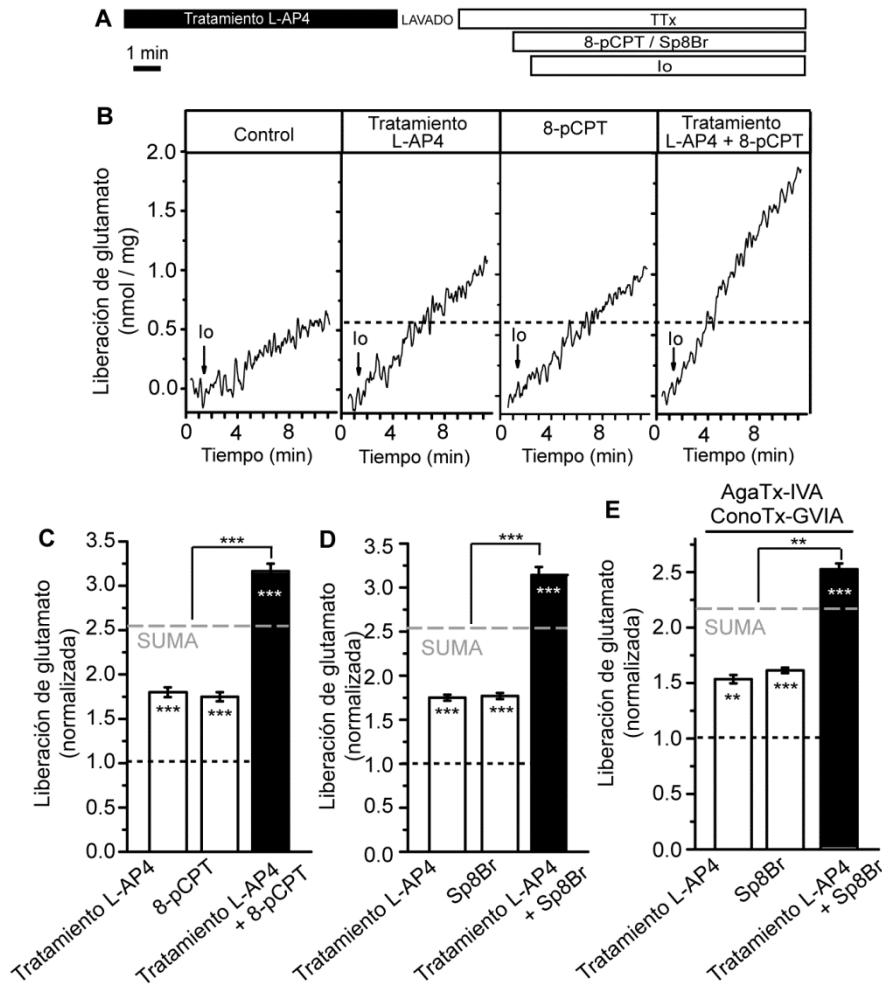


Figura 4.29. Sinergismo entre las vías de potenciación de la liberación dependientes de los receptores mGlu7 y β -adrenérgico. (A) Protocolo del tratamiento farmacológico de los sinaptosomas. El tratamiento con L-AP4 se realizó exponiendo los sinaptosomas al agonista durante 10 min, centrifugándolos para retirar el fármaco y resuspendiéndolos en medio nuevo (lavado) para realizar los tratamientos farmacológicos posteriores. La adición de 8-pCPT o Sp8Br se realizó 40s antes de la aplicación del ionóforo de Ca^{2+} , ionominina. Todos los ensayos de liberación de glutamato se realizaron en presencia de TTx ($1\mu M$), añadida dos minutos antes del comienzo del registro. (B) Modulación de la liberación de glutamato inducida ionomícina ($0.5-1\mu M$) en presencia de TTx, por el tratamiento con el agonista de los receptores mGlu7, L-AP4 ($1mM$, 10min) y la aplicación del activador específico de Epac, 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP (8-pCPT, $50\mu M$), individual y conjuntamente. (C) Efecto sobre la liberación de glutamato de 8-pCPT y del tratamiento con L-AP4, individual y conjuntamente. (D) Efecto sobre la liberación de glutamato del análogo permeable de cAMP, Sp- 8-Br-cAMPS (Sp8Br, $250\mu M$) y del tratamiento con L-AP4, individual y conjuntamente. (E) Efecto sobre la liberación de glutamato del análogo permeable de cAMP, Sp- 8-Br-cAMPS (Sp8Br, $250\mu M$) y del tratamiento con L-AP4, individual y conjuntamente, en presencia de las toxinas bloqueantes de los VDCC, ω -Aga-IVA (200 nm) y ω -CgT-GVIA ($2\mu M$), añadidas 2 min antes de comenzar el ensayo. Las líneas discontinuas indican la suma aritmética de las potenciaciones individuales. Las liberaciones de glutamato se normalizaron frente a la liberación inducida sólo por ionomícina. Los datos se expresaron como la media \pm SEM (barras de error). $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$ (ANOVA), comparados con el control (símbolos en el interior de las barras) o frente a otra condición (símbolos en el exterior de las barras).

3.5. Interacción entre la señalización de los receptores mGlu7 y β -AR en la activación de la PLC y la translocación de Munc13-1.

La actividad de los receptores acoplados a la PLC puede estudiarse midiendo la acumulación de IP_1 en presencia de LiCl (Trinquet et al., 2006). Así, determinamos el efecto de la activación conjunta de las vías de señalización dependientes de los receptores mGlu7 y β -AR sobre la acumulación de IP_1 .

La acumulación de IP_1 se incrementó tras la incubación de los sinaptosomas con isoproterenol ($157.0 \pm 4.0\%$, $n=7$, $p < 0.001$, Fig. 4.30.B), Sp-8-Br ($156.0 \pm 5.6\%$, $n=7$, $p < 0.001$, Fig. 4. 30.B) y el tratamiento con L-AP4 ($170.0 \pm 5.5\%$, $n=7$, $p < 0.001$, Fig. 4. 30.B). Además, la acumulación de IP_1 tras la aplicación conjunta (Fig. 4.30.A) del tratamiento con L-AP4 y de isoproterenol ($204.0 \pm 8.8\%$, $n=7$, $p < 0.001$, Fig. 4. 30.B), fue significativamente menor ($p < 0.01$) que la obtenida por el pretratamiento con L-AP4 y la aplicación de Sp-8-Br ($249.0 \pm 10.2\%$, $n=7$, $p < 0.001$, Fig. 4. 30.B). Por lo tanto, estos resultados sugieren que la interacción entre las dos vías de señalización iniciadas por los receptores mGlu7 y los β -AR se pone de manifiesto también en la regulación de la actividad de PLC.

La proteína Munc13 se transloca a la membrana plasmática de la zona activa y une DAG para desempeñar su papel esencial en la liberación de neurotransmisores (Augustin et al., 1999; Rhee et al., 2002). Así, esta proteína se presenta en dos localizaciones subcelulares: soluble o inactiva y en membrana/particulada o activa, tras la unión de DAG. Por tanto, determinamos los cambios en la distribución de Munc13-1 en sinaptosomas tras la activación conjunta de las vías dependientes de los receptores mGlu7 y β -AR (Fig 4.30.A).

La cantidad de proteína Munc13-1 translocada, cuantificada como el cociente entre la cantidad de proteína presente en la fracción soluble y en la fracción particulada (control $0.41 \pm 0.02\%$, $n=7$), se incrementó con el pretratamiento con L-AP4 ($0.28 \pm 0.02\%$, $n=7$, $p < 0.001$, Fig. 4. 30.C), así como con la incubación con isoproterenol ($0.31 \pm 0.02\%$, $n=7$, $p < 0.05$, Fig. 4. 30.C) u 8-pCPT ($0.27 \pm 0.02\%$, $n=7$, $p < 0.001$, Fig. 4. 30.C). La aplicación conjunta del tratamiento con L-AP4 y de isoproterenol no mostró efectos aditivos en la activación de Munc13 ($0.26 \pm 0.02\%$, $n=7$, $p < 0.001$, Fig. 4. 30.C). Sin embargo, el tratamiento conjunto con L-AP4 y 8-pCPT provocó un incremento ($p < 0.05$) en la translocación de Munc13 ($0.18 \pm 0.01\%$, $n=7$, $p < 0.001$, Fig. 4. 30.C). Por lo tanto, la interacción entre las vías de señalización iniciadas por los receptores mGlu7 y por β -AR/Epac también afecta a la translocación y activación de la proteína Munc13 por unión de DAG.

Los resultados obtenidos demuestran que los receptores mGlu7 y β -AR se expresan conjuntamente en una subpoblación de terminales presinápticos, probablemente

participando en complejos proteicos en la zona activa, y cuyas vías de señalización interaccionan a varios niveles con consecuencias funcionales en la liberación de neurotransmisor. Por una parte, los receptores mGlu7 pueden inhibir la AC y la generación de cAMP, controlando los mecanismos de potenciación de la liberación dependientes de receptores β -AR/Epac. Por otra parte, la potenciación por receptores mGlu7 y β -AR puede dar lugar a un sinergismo en el incremento de la liberación de glutamato.

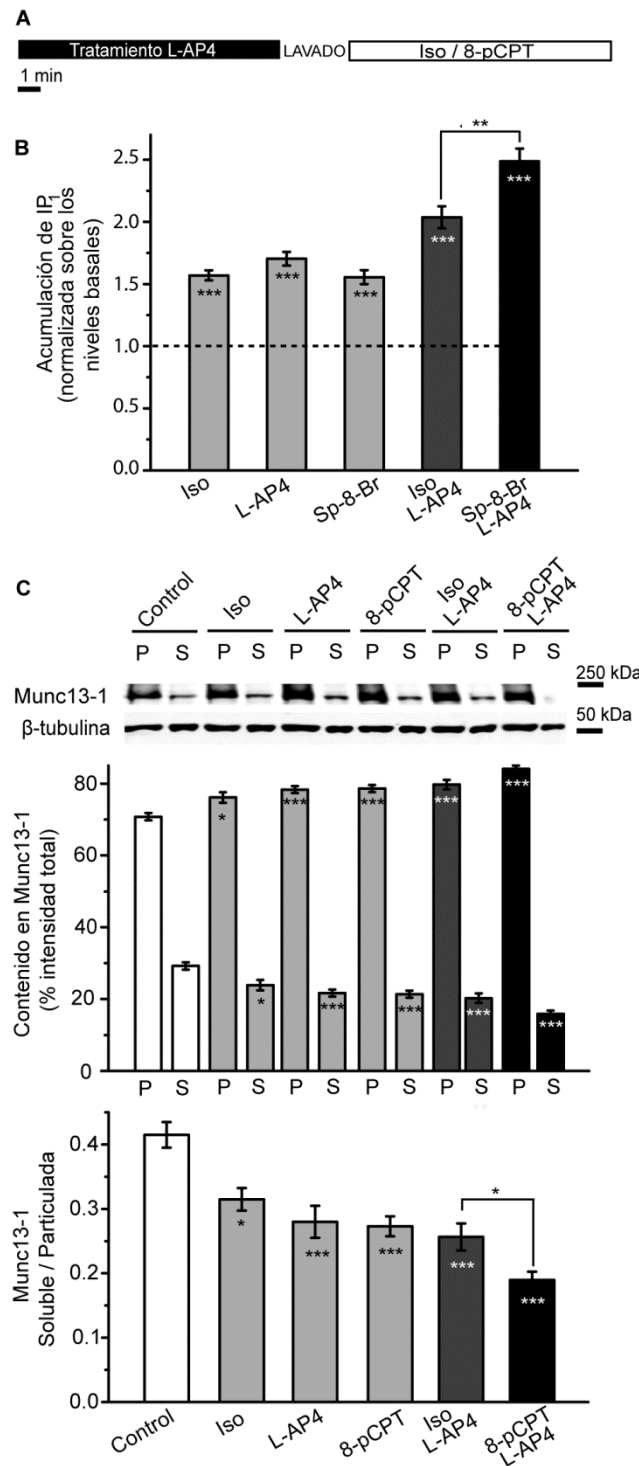


Figura 4.30. Señalización cruzada entre los receptores mGlu7 y β -adrenérgico en la activación de la PLC y la translocación de Munc13-1.

(A) Protocolo del tratamiento farmacológico de los sinaptosomas. El tratamiento con L-AP4 se realizó exponiendo los sinaptosomas al agonista durante 10 min, centrifugándolos para retirar el fármaco y re-suspendiéndolos en medio nuevo (lavado). A continuación, los sinaptosomas se trataron con el agonista de los receptores β -adrenérgicos, isoproterenol (Iso, 100 μ M, 10min) o con el análogo permeable de cAMP, Sp- 8-Br-cAMPS (Sp8Br, 250 μ M, 10 min). (B) Acumulación de IP₁ en presencia de LiCl (50mM, 30min) normalizada frente a los niveles basales. (C) Contenido en Munc13-1 de la fracción soluble y particulada (de membrana), expresado como porcentaje sobre la suma de la intensidad de las dos fracciones (intensidad integrada total) y como relación entre el contenido de la proteína en la fracción soluble y particulada. Los datos se expresaron como la media \pm SEM (barras de error). $p > 0.05$; *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$ (ANOVA), comparados con sus respectivos controles o frente a otra condición.

V. DISCUSIÓN

Potenciación de la liberación por receptores mGlu7

Mecanismo

La señalización canónica de los receptores mGlu7 da lugar a una reducción de la liberación de glutamato mediante la inhibición de los VDCC por un mecanismo dependiente de proteínas Gi/o, y por lo tanto sensible a PTX (Herlitze et al., 1996; Takahashi et al., 1996, Millán et al., 2002). Además de esta señalización, el tratamiento prolongado con el agonista L-AP4 puede dar lugar a la pérdida de este fenómeno de inhibición (Pelkey et al., 2005, Martín et al., 2010), habiéndose postulado que la pérdida de la inhibición es debida a la internalización de los receptores mGlu7 (Pelkey et al., 2005; 2007). Sin embargo, en nuestro grupo de investigación se ha descrito que la incubación prolongada con L-AP4 induce una potenciación de la liberación (Fig 4.1; 4.4-4.13; 4.28), debida a la activación de una nueva vía de señalización dependiente de PLC y de proteínas activadas por DAG (Martín et al., 2010). Esta potenciación es específica de la activación de receptores mGlu7, ya que éste es el único receptor mGlu del grupo III que se expresa en sinaptosomas de corteza cerebral de ratones adultos (Millán et al., 2002; 2003; Martín et al., 2010) y porque esta respuesta no se desarrolla en presencia del antagonista específico de mGlu7, MPIP (Fig. 4.4). La potenciación dependiente de mGlu7 es independiente de la modulación de los VDCC, ya que se observa en condiciones en las que la liberación de glutamato se induce con el ionóforo de Ca^{2+} ionomicina (Martín et al., 2010; Fig. 4.1.) y se desarrolla en presencia de los bloqueantes de los VDCC de tipo N y P/Q (Fig 4.4).

La activación por el receptor mGlu7 de la **PLC** no depende de proteínas G triméricas de tipo Gi/o, ya que el fenómeno de potenciación es insensible a PTx (Martín et al., 2010). Se ha descrito que al menos dos isoformas de PLC, las familias β y η , pueden ser moduladas por proteínas Gq (Wang et al., 1999; 2000; Rhee et al., 2001; Suh et al., 2001; *Introducción 3.2.1*), para activar cascadas de señalización dependientes de DAG (Fig. 1.5). Estas isoformas de PLC tienen una alta expresión en cerebro (Rhee et al., 2001; Suh et al., 2001), por lo que podrían ser activadas por los receptores mGlu7 por medio de proteínas Gq. Además, las proteínas PLC ϵ pueden ser activadas por proteínas G pequeñas (Smrcka et al., 2011; Fig. 1.7). Así, las vías de señalización dependientes de cAMP pueden, por medio de la proteína Epac y de proteínas G pequeñas tipo Rap, activar PLC ϵ (Schmidt et al., 2001). En la sinápsis hipocámpales entre las fibras musgosas e interneuronas del *striatum lucidum*, la activación prolongada de receptores mGlu7 induce formas de potenciación sensibles a los inhibidores de la AC y PKA (Pelkey et al., 2008), lo que sugiere que los mGlu7 se puedan acoplar a proteínas Gs, para generar cAMP. Sin embargo, los datos experimentales obtenidos en sinaptosomas demuestran que el

tratamiento prolongado con L-AP4 no sólo no induce la acumulación de cAMP (Millán et al., 2002), si no que reduce la acumulación de este segundo mensajero producido por activación de los β -AR (Fig. 4.28.F). Además, la potenciación de la liberación de glutamato es independiente de la inhibición de la AC (Martín et al., 2010). Por lo tanto, es posible descartar la activación de PLC ϵ , al menos por medio de esta vía. Los resultados obtenidos por otros autores (Pelkey et al., 2008), probablemente tengan relación con la interacción funcional de los receptores mGlu7 con la vía de señalización por cAMP (Fig. 4.29), tal como discutiremos posteriormente. Por otra parte, aunque no se ha descrito la interacción directa de proteínas Gq con las familias de PLC ϵ y γ , se ha propuesto la modulación indirecta de estas proteínas por GPCRs (Smrcka et al., 2011), por lo que no se puede descartar su implicación.

Cabe destacar que el acoplamiento de los receptores mGlu7 a la PLC ya había sido descrito anteriormente en cultivos de células granulares de cerebelo, aunque con distinto efecto funcional (Perroy et al., 2000), probablemente debido a que estos estudios fueron realizados expresando estos receptores en los somas neuronales. Además, se ha relacionado la activación de PLC con fenómenos de potenciación (STP) dependientes de Munc13 en cultivos hipocámpales (Rosenmund et al., 2002) o en células cromafines (Bauer et al., 2007).

La potenciación de la liberación por la activación prolongada de receptores mGlu7 depende de proteínas activadas por DAG, distintas de PKC (Martín et al., 2010). Dado que este mecanismo es completamente abolido por los inhibidores de los dominios de unión a DAG, probablemente es independiente de la señalización por IP₃. La proteína **Munc13** es otra diana del DAG que puede modular la neurotransmisión (Augustin et al., 1999; Rhee et al., 2002). En cuanto a otras proteínas que también pueden ser activadas por DAG, como quimerinas, PKD o RasGRP, hay que señalar que, hasta el momento, no ha sido descrita su participación directa en el proceso de liberación de neurotransmisores.

Se ha propuesto que Munc13 puede ser la proteína que actúa en estos mecanismos de potenciación. La isoforma mayoritaria de esta proteína en sinápsis glutamatérgicas (Augustin et al., 1999; Rosenmund et al., 2002) y en sinaptosomas de corteza cerebral (Martín et al., 2011) es Munc13-1. Así, el tratamiento prolongado con L-AP4 induce el proceso de translocación de Munc13-1 a la membrana presináptica (Martín et al., 2010; Fig. 4.30), asociado a su activación por DAG (Augustin et al., 1999; Rhee et al., 2002). Además, los receptores mGlu7 forman complejos con la proteína Munc13 (Martín et al., 2010), hecho que sugiere una relación funcional.

La función de Munc13 (Rhee et al., 2002; *Introducción 3.2.4.*) es esencial para la preparación de las SVs para la exocitosis (*Introducción: 1.4.*) y depende de su interacción con la proteína RIM, que evita la formación de su dímero autoinhibitorio (Deng et al.,

2011). Los resultados obtenidos demuestran que el tratamiento prolongado de los sinaptosomas con L-AP4 aumenta la interacción Munc13-RIM (Fig. 4.2) y promueve el acercamiento de las SVs a la membrana de la zona activa (Fig. 4.3), asociado a la preparación de las mismas para su liberación (Iming et al., 2014). Por lo tanto, el tratamiento prolongado de los sinaptosomas con L-AP4 afecta a las distintas etapas de la acción de Munc13: su activación por unión a DAG, que da lugar a su translocación a la membrana plasmática de la zona activa (Martín et al., 2010; Fig.4.30); su interacción con RIM (Fig 4.2); y su acción final acercando las SVs a la membrana plasmática (Fig. 4.3). Todos estos datos apoyan la implicación de Munc13 en el fenómeno de potenciación dependiente de receptores mGlu7.

Con el objetivo de obtener evidencias adicionales de la participación de Munc13, sería muy interesante poder estudiar la potenciación por los receptores mGlu7 en modelos de ratones transgénicos, como los ratones carentes de las proteínas Munc13-1 y Munc13-2 o el mutante para la unión a DAG, Munc13-H567K (Varoqueaux et al., 2000; Rosenmund et al., 2002; Rhee et al., 2002). Sin embargo, dado que estos ratones mueren al nacer, es imposible disponer de animales adultos para obtener sinaptosomas. Futuros estudios, utilizando otras preparaciones y metodologías, serán muy útiles para aportar la evidencia definitiva de la implicación de Munc13.

Otros estudios han propuesto la implicación de los receptores mGlu del grupo III, durante estimulaciones de alta frecuencia, en mecanismos de compensación de su acción inhibitoria sobre los VDCC, que resultan en un aumento del RRP (Billups et al., 2005). Por lo tanto, el mecanismo de potenciación de la liberación de glutamato por receptores mGlu7 estudiado en sinaptosomas podría estar implicado en estos procesos.

Se ha descrito la modulación de la proteína Munc13 por otros receptores presinápticos, como los receptores de histamina H1 en células cromoafines (Bauer et al., 2007) o los receptores del CKR-2 del neuropéptido NLP-12 en la unión neuromuscular de *C.elegans* (Hu et al., 2015). Sin embargo, la modulación de Munc13 por receptores mGlu7 en sinaptosomas cerebrocorticales, supone la primera evidencia descrita acerca de la regulación de esta proteína por receptores presinápticos en sinápsis excitadoras de mamíferos.

Tiempo de activación

El desarrollo de la potenciación requiere tiempos relativamente largos de activación de los receptores mGlu7 (Fig. 4.1), lo que sugiere un mal acoplamiento del receptor a la PLC. Sin embargo, los resultados obtenidos con inhibidores de la degradación de DAG (Fig. 4.1) señalan que el tiempo de latencia de esta respuesta de potenciación obedece al control metabólico sobre la acumulación de DAG existente en los terminales presinápticos.

Así, inhibiendo las vías de degradación del DAG, la potenciación se desarrolla en un tiempo mucho menor (Fig. 4.1). Dado que la mayoría de los estudios de las funciones del DAG en la regulación de la neurotransmisión han sido realizados empleando sus análogos, los ésteres de forbol (Rhee et al., 2002; Wierda et al., 2007), es posible que la importancia de la regulación del metabolismo de DAG en estos fenómenos de potenciación haya permanecido encubierto. Por ello, la regulación de estas enzimas implicadas en el metabolismo de DAG (Fig.1.7.A) podría suponer un aspecto esencial en el desarrollo de los fenómenos fisiológicos de plasticidad mediados por DAG.

Es de destacar que la magnitud de la potenciación máxima no difiere en presencia de los inhibidores del metabolismo de DAG (Fig. 4.1), lo que sugiere que existe un factor limitante para el desarrollo de este fenómeno, posterior en la cascada de señalización a la acumulación de DAG. Para su liberación, las SVs se disponen en los sitios activos o de fusión, donde se localiza la maquinaria exocitótica. Dado que la función de Munc13 es preparar a las SVs para su liberación, el posible factor limitante que establece el techo máximo de la potenciación podría ser la disponibilidad de sitios activos. Así, aunque se incremente la acumulación de DAG, activando mayor número de proteínas Munc13, la capacidad de actuación de estas proteínas estaría limitada por el número de sitios activos.

Relación con la expresión de los VDCC en corteza e hipocampo

En sinaptosomas cerebrocorticales de ratones adultos, los VDCC de tipo N y P/Q se distribuyen segregados en distintas subpoblaciones de botones sinápticos, y los receptores mGlu7 inhiben la liberación de glutamato sólo en terminales de corteza cerebral con VDCC de tipo N (Millán et al., 2002a; 2003).

Los resultados obtenidos muestran que la potenciación de la liberación por receptores mGlu7 en **sinaptosomas cerebrocorticales** se desarrolla sólo en terminales con canales de tipo N, que son los únicos en los que expresan el receptor (Fig 4.7 y 5.1). Además, la potenciación por mGlu7 se pierde en terminales de corteza del ratón KO de los VDCC tipo N (Fig. 4.8). Por tanto, parece que existe una relación entre la expresión de canales N y receptores mGlu7 en los terminales de corteza cerebral. Teniendo en cuenta el peor acoplamiento a la exocitosis de los terminales con canales N en comparación con los canales P/Q (Millán et al., 2003; Ladera et al., 2009), es posible que el desarrollo de la potenciación por mGlu7 en estos botones suponga una forma de compensar estas deficiencias. En este sentido, se ha descrito que la potenciación por análogos de DAG incrementa la sensibilidad al Ca^{2+} de la maquinaria exocitótica (Lou et al., 2005). Por lo tanto, la presencia de mecanismos de potenciación en los botones sinápticos con canales N permitirían abarcar un amplio rango dinámico de liberación de neurotransmisor.

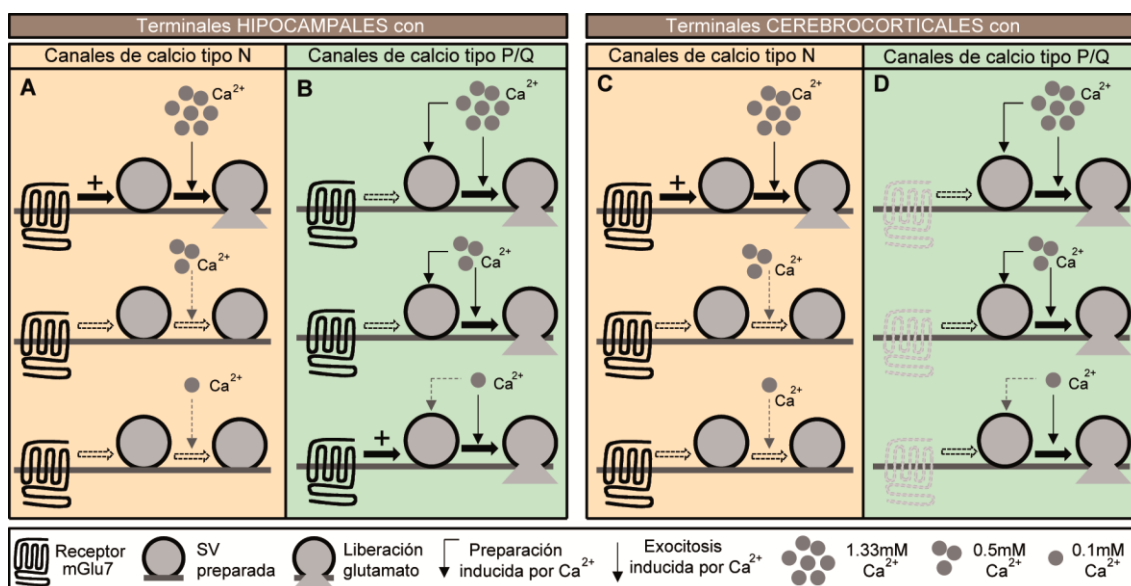


Fig. 5.1. Potenciación de la liberación de glutamato dependiente de receptores mGlu7 en terminales con canales de Ca^{2+} de tipo P/Q y N en sinaptosomas de corteza cerebral e hipocampo. Los terminales con canales N participan en la liberación de glutamato sólo a concentraciones de Ca^{2+} fisiológicas, mientras que los que expresan canales P/Q también participan a concentraciones de Ca^{2+} menores. (A y C) Los terminales con canales N de corteza e hipocampo sólo desarrollan la potenciación dependiente de mGlu7 a concentraciones de Ca^{2+} fisiológicas. (B) Los terminales con canales P/Q de hipocampo sólo desarrollan la potenciación dependiente de mGlu7 a concentraciones de Ca^{2+} bajas, ya a concentraciones mayores estos mecanismos son ocluidos. (D) Los terminales con canales P/Q no desarrollan la potenciación dependiente de mGlu7. Las líneas discontinuas representan la pérdida de la acción de los mecanismos funcionales o de la expresión de los receptores.

Además, teniendo en cuenta la baja afinidad de los receptores mGlu7 por glutamato y el peor acoplamiento de los canales N a la exocitosis, se podría suponer que las neuronas con este tipo de botones sinápticos podrían participar en circuitos cerebrales dependientes de estimulaciones intensas y/o prolongadas.

Los terminales sinápticos corticales del ratón carente de los canales N no muestran la potenciación por L-AP4, a pesar de que los receptores mGlu7 se expresen en los terminales con canales P/Q (Fig. 4.8). Dado que, en las condiciones estudiadas, la potenciación no depende de la modulación de los VDCC (Fig. 4.4), el hecho de que este fenómeno sólo se observe en terminales con canales de tipo N sugiere diferencias intrínsecas al tipo de terminal, relacionadas posiblemente otras proteínas implicadas en el mecanismo de potenciación.

No se han observado diferencias en los niveles de expresión de Munc13-1 entre las preparaciones de sinaptosomas de los ratones carentes de los canales tipo N y los de genotipo silvestre (Martín et al., 2011). Algunos estudios, han relacionado la implicación de Munc13-2 en mecanismos de potenciación dependientes de PLC/Munc13 en cultivos de hipocampo (Rosenmund et al., 2002). Sin embargo, dado que Munc13-1 es la isoforma predominante en sinaptosomas de corteza (Martín et al., 2011) y se observa tanto la translocación (Fig. 4.30) como la interacción con RIM1 (Fig 4.2) de esta isoforma, es improbable que Munc13-2 tenga una participación destacada en estos mecanismos en

esta preparación. Otra posibilidad para explicar la ausencia de potenciación en los terminales con canales P/Q, a pesar de expresar el receptor mGlu7, sería que los terminales de corteza con VDCC de tipo N, fuesen los únicos que expresasen las isoformas de PLC implicadas en la potenciación.

El hecho de que los sinaptosomas carentes de los canales de tipo N no muestren la potenciación por los receptores mGlu7, a pesar de expresar el receptor (Fig 4.8), sugiere que estos podrían tener una localización subcelular alterada, que no permita su acoplamiento a la vía de potenciación. Así, en sinaptosomas cerebrocorticales de los ratones KO para los canales N, los receptores mGlu7 conservan su capacidad para inhibir la generación de cAMP (Millán et al., 2002), pero no para inhibir los VDCC (Martín et al., 2007) o potenciar la liberación (Fig. 4.8). Por lo tanto, es posible que para la inhibición del cAMP no sea esencial la correcta localización del receptor en la membrana de la zona activa, pero si lo sea para que los receptores mGlu7 activen otras vías de señalización. La correcta localización de los receptores mGlu7 depende de su interacción con la proteína PICK1 (Boudin et al., 2000; El Far et al., 2000), por lo que cambios en la expresión de esta proteína entre terminales con distintos tipos de VDCC podría influir en la función del receptor. Además, otras proteínas que también interaccionan con los receptores mGlu7 (Enz et al., 2007; *Introducción: 2.2.1*), podrían estar involucradas en este aspecto. Por último, los propios canales de tipo N podrían actuar como proteínas de andamiaje, permitiendo la localización de los receptores mGlu7 en complejos de señalización en los que interaccionasen funcionalmente con las otras proteínas implicadas en la vía de potenciación. En este contexto, sería interesante estudiar si existen variaciones en el contenido en proteínas sinápticas, entre los botones sinápticos con canales N y los botones con canales P/Q.

En contraste con los sinaptosomas de corteza cerebral, en sinaptosomas de hipocampo, los receptores mGlu7 se expresan tanto en terminales con canales N, como con canales P/Q (Fig. 4.5). Sin embargo, este hecho no implica una mayor magnitud de la potenciación de la liberación en hipocampo frente a la observada en corteza, a concentraciones fisiológicas de Ca^{2+} , en las que deberían participar tanto terminales con canales N como los terminales con canales P/Q (Fig. 4.5). Además, a concentraciones de Ca^{2+} bajas, en las que no participarían los terminales con canales N por el peor acoplamiento de estos canales a la excitación, se observa también la potenciación (Fig.4.5). Una posible explicación sería que a $[Ca^{2+}]_e$ fisiológicas, sólo se observe la potenciación en los terminales sinápticos con canales de tipo N, estando probablemente ocluida la potenciación asociada a los terminales sinápticos con canales P/Q, tal como sugiere la observación de que en los botones de hipocampo de ratones carentes de los canales N se pierda la potenciación a $[Ca^{2+}]_e$ fisiológico, pero no a $[Ca^{2+}]_e$ bajo (Fig. 4.6). De acuerdo con esta hipótesis, el inhibidor de proteínas activadas por DAG, calfofistina C,

no reduce la liberación basal a concentraciones de Ca^{2+} muy bajas, pero si lo hace a concentraciones mayores (datos no mostrados). Por lo tanto, parece que existe una activación tónica por Ca^{2+} de las vías de potenciación dependientes de PLC, en los terminales con canales de tipo P/Q, de manera que la potenciación dependiente de los receptores mGlu7 en estos terminales sinápticos sólo se desarrolla a concentraciones de Ca^{2+} muy bajas (Fig. 5.1). De acuerdo con esta propuesta, otros trabajos han descrito que la potenciación dependiente de Munc13, sólo se observa en condiciones moderadas de estimulación (Lou et al., 2005), en las que la concentración de Ca^{2+} no aumenta en gran medida. Además, los fenómenos de potenciación dependientes de DAG y de calcio parecen desarrollarse por los mismos mecanismos (Rosenmund et al., 2002). Por tanto, la oclusión por Ca^{2+} podría afectar a la actividad de PLC, ya que este ión activa todas las isoformas de esta enzima (Rhee et al., 2001; Suh et al., 2001; *Introducción 3.2.1*), y/o a la actividad de Munc13, ya que esta proteína es también activada por Ca/CaM y Ca^{2+} además de por diacilglicerol (Junge et al., 2004; Shin et al., 2010; Lipstein et al., 2012).

Por otra parte, en sinaptosomas de hipocampo del ratón carente de los canales de tipo N, el tratamiento con L-AP4 origina una inhibición de la liberación de glutamato dependiente de proteína Gi/o (Fig. 4.6). Dado que esta acción ocurre en condiciones en las que la liberación es independiente de los VDCC (Fig. 4.4), esta inhibición debería implicar otras dianas (Fig. 1.4; *Introducción: 2.2.1.1*). Los receptores mGlu7 también inhiben la generación de cAMP vía Gi/o (Okamoto et al., 1994; Schoepp y Johnson, 1993; Millán et al., 2002; Martín et al., 2007) y se ha propuesto un posible papel de los receptores mGlu de tipo III inhibiendo directamente la maquinaria excitotóxica (Erdmann et al., 2012). Esta inhibición estaría mediada por un mecanismo que podría seguir activo, aun después del lavado el agonista, tal como se hemos observado para la respuesta de inhibición de la generación de cAMP (Fig. 4.28). Por lo tanto, es posible que los mecanismos de inhibición dependientes de receptores mGlu7 que permanecen activos tras el lavado del agonista, sólo se observen en determinadas condiciones porque la vía de potenciación enmascara el desarrollo de esta respuesta inhibidora. Ahora bien, la inhibición tampoco se observa a concentraciones de Ca^{2+} intermedias de 0.5mM, en las que no hay potenciación de la liberación, lo que parece indicar que la inhibición de la liberación requiere concentraciones de Ca^{2+} fisiológicas. La señalización vía proteínas $\text{G}\beta\gamma$ de los receptores mGlu7 requiere su interacción con CaCaM (Fig.1.4.B; O'Connor et al., 1999; El Far et al., 2000; Bertaso et al., 2000). Por lo tanto, a concentraciones de Ca^{2+} menores de las fisiológicas es posible que este modo de regulación dependiente del ion Ca^{2+} no esté completamente activo y, por tanto, no se observa la inhibición de la liberación.

Potenciación de la transmisión sináptica en cultivos autápticos de hipocampo.

Encontramos que, en neuronas autápticas de hipocampo, la aplicación prolongada del agonista L-AP4, produce la reversión de la inhibición de la liberación inducida por despolarización (Fig. 4.9 y 4.10). Otros autores han propuesto que este hecho es consecuencia de la internalización de los receptores mGlu7 (Pelkey et al., 2005). Sin embargo, al igual que ocurría en sinaptosomas (Fig 4.1; Martín et al., 2010), encontramos que la exposición prolongada al agonista da lugar a mecanismos netos de potenciación que no se explican por la simple pérdida de la inhibición de los VDCC. Así, en condiciones en las que no se desarrolla la inhibición de los VDCC (en presencia de TTx y el bloqueante de los VDCC, Cd²⁺), se observa un aumento en la frecuencia de los mEPSC. Este incremento comienza durante la aplicación del agonista, y se mantiene hasta por lo menos 20 minutos después del lavado del mismo (Fig. 4.11 y 4.12). El hecho de que exista un mecanismo neto de potenciación indica que la reversión de la inhibición no se debe a la mera pérdida de los mecanismos inhibidores por la internalización de los receptores. Además, estos resultados ponen de manifiesto que los fenómenos de potenciación dependientes de los receptores mGlu7 no ocurren sólo en sinaptosomas, si no que se desarrollan también en neuronas. La potenciación de la frecuencia de la liberación espontánea por receptores mGlu7, en condiciones de bloqueo de los VDCC, sugiere la modulación de la maquinaria excitotóxica, lo que está de acuerdo con el mayor RRP de las neuronas que desarrollan la potenciación (Fig. 4.13). El hecho de que las neuronas que no presentan incremento de la frecuencia de los mEPSC, presenten una acusada disminución del RRP después de los 40 minutos de registro probablemente refleje la disminución en el número de sinapsis funcionales, fenómeno que es habitual en este tipo de cultivos. Por lo tanto, que las neuronas que desarrollan la potenciación no muestren el descenso en el tamaño del RRP, probablemente indique que las sinapsis que permanecen funcionales incrementan en gran medida el tamaño de su RRP. Así, es probable que los mecanismos funcionales dependientes de los receptores mGlu7 impliquen proteínas de la maquinaria excitotóxica que participan en el proceso de preparación de las SVs para su liberación (*Introducción: 1.4*).

Por otra parte, la incubación con L-AP4, además de inducir el aumento claro de la frecuencia de la liberación espontánea, parece promover una tendencia al incremento de la amplitud de los eventos espontáneos, especialmente en tiempos prolongados después del lavado del agonista. (Fig. 4.11 y 4.12). Esto sugiere que, además del origen presináptico del fenómeno, podría existir también la modulación de elementos postsinápticos en las fases más avanzadas de la potenciación. En este sentido se ha observado que la plasticidad a largo plazo dependiente de los receptores mGlu7, involucra también a receptores postsinápticos, como los AMPA en procesos de LTD (Laezza et al.,

1999) o los NMDA en fenómenos de LTP (Tolchard et al., 2000). Por lo tanto, es posible que los receptores mGlu7 participen en la inducción de fenómenos de plasticidad, pero que la consolidación de la plasticidad dependa también de modulaciones postsinápticas. Así, se ha descrito la que el ratón que carece del receptor mGlu7 presenta una reducción en la STP y en la fase inicial de la LTP (Bushell et al., 2002).

Es importante destacar la aplicación de altas concentraciones del agonista L-AP4 utilizadas pueden activar todos los **subtipos de receptores metabotrópicos de glutamato del grupo III** presentes en neuronas hipocámpales, como los receptores mGlu7, pero también los receptores mGlu4 y mGlu8 (Shigemoto et al., 1997a). En los experimentos previos realizados en sinaptosomas cerebrocorticales de ratones adultos, el L-AP4 sólo modula los receptores mGlu7 porque son los únicos receptores del grupo III que se expresan en estos terminales (Martín et al., 2010). Bajas concentraciones de L-AP4, del rango micromolar o incluso submicromolar, activan los receptores mGlu4 y 8 de alta afinidad, mientras que los receptores mGlu7 requieren concentraciones submilimolares o milimolares (Schoepp et al., 1999). Por lo tanto, sería interesante estudiar la sensibilidad a bajas y altas concentraciones de L-AP4 de los mecanismos de inhibición y potenciación en cultivos autópticos de hipocampo.

Aproximadamente un 46% de las neuronas glutamatérgicas de los cultivos autópticos responden a la aplicación breve de L-AP4, activando los mecanismos de inhibición de la transmisión sináptica (Fig. 4.9), y por lo tanto expresan receptores mGlu del grupo III. Sin embargo, sólo un 41% las neuronas glutamatérgicas sensibles a L-AP4 (19% del total de las neuronas glutamatérgicas) desarrollan la potenciación de la liberación espontánea (Fig. 4.11). Teniendo en cuenta que las altas concentraciones de L-AP4 pueden activar receptores mGlu4, mGlu7 y mGlu8, es posible que estos tres tipos de receptores participen en la inhibición, pero que la participación en la potenciación esté restringida a algún tipo de receptor.

Además, aproximadamente un 80% de las neuronas GABAérgicas de los cultivos autópticos mostraron sensibilidad a la aplicación breve de L-AP4 (Fig. 4.10), y, sorprendentemente, todas ellas también desarrollaron los mecanismos de potenciación (Fig. 4.12). Este resultado sugiere que, o bien en neuronas GABAérgicas los tres subtipos de receptores del grupo III tienen capacidad de acoplarse a los mecanismos de potenciación, o que, en este tipo de neuronas, se expresan preferentemente los subtipos asociados al desarrollo de la potenciación.

Así, los resultados obtenidos sugieren que una subpoblación de las neuronas glutamatérgicas sensibles a L-AP4 presenta los subtipos de receptores mGlu del grupo III acoplados a la inhibición (Fig. 5.2.A), mientras que el resto de neuronas glutamatérgicas y todas las GABAérgicas también expresan los subtipos de receptores mGlu del grupo III acoplados a la potenciación de la liberación espontánea (Fig. 5.2.B)

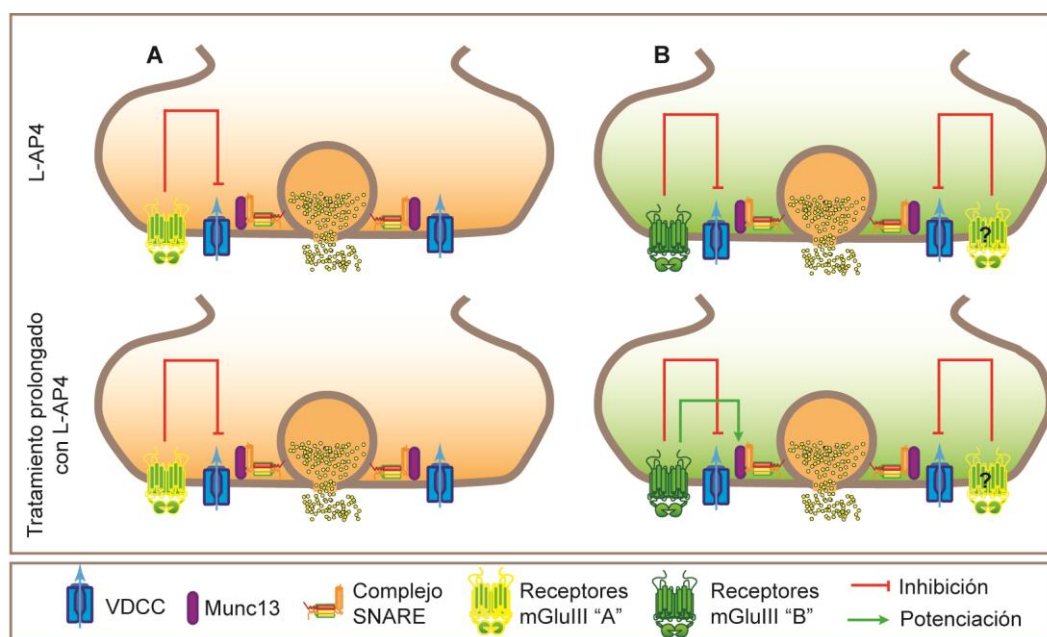


Fig. 5.2. Activación de los receptores mGlu del grupo III en neuronas de cultivos autápticos de hipocampo. (A) Parte de las neuronas glutamatérgicas que presentan sensibilidad a L-AP4 sólo experimentan fenómenos de inhibición de la liberación de glutamato. (B) Las restantes neuronas glutamatérgicas sensibles a L-AP4 y todas las neuronas GABAérgicas con sensibilidad al agonista, además de los mecanismos de inhibición, pueden desarrollar fenómenos de potenciación que probablemente impliquen la modulación de proteínas de la maquinaria exocitótica. La diferencia entre estas subpoblaciones neuronales podría deberse a la distinta expresión de los tipos de receptores mGluIII. En los terminales en los que sólo se desarrolla la inhibición se expresaría sólo un tipo de receptor (receptores "A") asociado sólo a estos fenómenos, mientras que, en las neuronas que también están acopladas a la potenciación de la liberación espontánea, se expresaría otro tipo de receptor mGluIII (receptores "B").

Se ha descrito que la expresión de los receptores mGlu7 en terminales presinápticos depende de la neurona postsináptica con la que establece sinapsis. Así, en hipocampo, los botones sinápticos derivados de la misma neurona piramidal (glutamatérgica) expresan más de diez veces más receptores mGlu7 en sinapsis con interneuronas (GABAérgicas) que en terminales que contactan con otras neuronas piramidales (Shigemoto et al., 1997b; Fig. 1.4.A), probablemente asociado a la expresión de la proteína Efn1 en las interneuronas (Tomioka et al., 2014). Dado que en los cultivos autápticos las neuronas establecen sinapsis consigo mismas, las únicas neuronas que tendrían las postsinapsis inhibitorias que localizan los receptores mGlu7 serían las propias neuronas GABAérgicas. Por lo tanto, es posible que los receptores mGlu7 se localicen preferentemente en neuronas GABAérgicas en cultivos autápticos de hipocampo. Por ello, sería muy interesante realizar futuros experimentos para determinar la expresión de los receptores mGlu7, así como de los otros receptores mGlu del grupo III, en las subpoblaciones de neuronas gluta- y GABAérgicas de los cultivos autápticos de hipocampo.

Por otra parte, teniendo en cuenta que aproximadamente un 80% de las neuronas estudiadas son glutamatérgicas, frente al 20% GABAérgicas, podemos estimar que un

34% de las neuronas del cultivo desarrollan la potenciación. Se ha descrito que un 38% de los terminales presinápticos de hipocampo presentan los receptores mGlu7 (Martín et al., 2007). Por lo tanto, la distribución de los receptores mGlu7 en hipocampo se asemeja a la proporción de neuronas que desarrollan la potenciación.

Teniendo en cuenta estas evidencias, es posible sugerir la hipótesis de que el subtipo de receptores mGlu del grupo III que, en todas las neuronas GABAérgicas y parte de las glutamatérgicas sensibles a L-AP4 (Fig 5.2), se acopla a la vía de potenciación de la liberación espontánea, podría ser el receptor mGlu7.

Se ha descrito que, en cultivos autápticos de neuronas hipocampales la **plasticidad a corto plazo** es dependientes de Munc13. La mayoría de las neuronas glutamatérgicas muestran depresión (STD) después de su estimulación a alta frecuencia (HFS). Sin embargo, la mayoría de las neuronas GABAérgicas y una pequeña parte de las glutamatérgicas, desarrollan fenómenos de potenciación (STP) dependiente de PLC (Rosenmund et al., 2002) tras la HFS. El hecho de que la distribución de neuronas que desarrollan fenómenos de potenciación por HFS sea muy similar a las que experimentan la potenciación por el tratamiento con L-AP4, y que ambos fenómenos dependan de proteínas de la maquinaria excitotóxica, podría sugerir que los receptores mGlu del grupo III podrían participar en la inducción de estos fenómenos de plasticidad. Además, la STP es dependiente de PLC (Rosenmund et al., 2002), al igual que los mecanismos de potenciación por L-AP4 en sinaptosomas (Martín et al., 2010). No obstante, la lentitud de la inducción de los fenómenos de potenciación por L-AP4, en la escala de minutos, frente a la rapidez de los procesos de STP, en el rango de segundos, parece contradecir esta hipótesis. Sin embargo, es importante tener en cuenta que la activación farmacológica por el tratamiento prolongado con L-AP4 quizá no mimetice completamente la activación fisiológica de los receptores mGlu del grupo III en condiciones de alta estimulación. Así, se ha descrito que la acción funcional de estos receptores implica, además de la unión a sus ligandos ortostéticos, como glutamato o L-AP4, la interacción con Ca^{2+} -CaM (Fig. 1.4; O'Connor et al., 1999; El Far et al., 2002; Bertaso et al., 2006; Millán et al., 2002a). Además, el propio dominio de unión a glutamato puede unir Ca^{2+} , como forma de modulación del receptor (Kubo et al., 1998; Francesconi y Duvosin, 2004). Por lo tanto, la regulación por Ca^{2+} parece ser muy importante para la activación del receptor. En las condiciones de alta estimulación que inducen los fenómenos de STP, se produce la liberación de altas concentraciones de glutamato que activarían los receptores, pero además, se da un gran aumento en la concentración de Ca^{2+} en la zona activa para activar la maquinaria excitotóxica. Por lo tanto, los receptores del grupo III, situados en la zona activa (Shigemoto et al., 1997a,b), estarían expuestos para su activación a estas altas concentraciones de glutamato y Ca^{2+} . Así, es posible que, en estas condiciones, estos receptores se acoplen a la vía facilitadora más eficientemente y con mayor rapidez que

cuando se activan únicamente con su agonista farmacológico. Por ello, sería muy interesante para futuros ensayos, estudiar si los fenómenos de potenciación inducidos por estimulaciones de alta frecuencia en cultivos autápticos de hipocampo son sensibles a los antagonistas de los receptores mGlu del grupo III o a los antagonistas específicos de los subtipos de estos receptores. Además, de acuerdo con esta hipótesis, sería posible pensar que los receptores mGlu del grupo III que podrían participar en estos fenómenos activados por estimulaciones de alta frecuencia, podrían ser los receptores de baja afinidad por glutamato (mGlu7). En este sentido, hay que señalar que en las sinapsis entre neuronas piramidales CA3 y CA1 del hipocampo se ha encontrado una reducción en la STP en los ratones carentes de los receptores mGlu7 (Bushell et al., 2002).

Papel fisiológico del mecanismo

Las inhibición de la liberación de glutamato por receptores mGlu del grupo III, de acuerdo a la localización de estos receptores en la zona activa (Shigemoto et al., 1997a), probablemente esté relacionada con el control de la concentración de este neurotransmisor en la brecha sináptica para evitar la neurotoxicidad. Es posible que los receptores de alta afinidad por glutamato, mGlu4 y mGlu8, desempeñen este papel durante la actividad neuronal normal, como sugiere la activación tónica de estos receptores (Pekhletski et al., 1996; Cao et al., 1997; Schader y Tasker, 1997; Xi et al., 2003; Losonczy et al., 2003; Acuna-Goycolea et al., 2004; Chu y Moenter, 2005; Li y Neugebauer, 2006). En este sentido, se ha descrito que existe un aumento en la probabilidad de liberación de los ratones KOs para los receptores mGlu4 (Pekhletski et al., 1996). Por otra parte, la baja afinidad por glutamato de los receptores mGlu7 hace improbable su activación en condiciones de actividad normal, aunque su acción inhibitoria podría ser especialmente relevante en situaciones patológicas de exceso de liberación de glutamato, como sugiere el fenotipo convulsivo resultante de la pérdida del receptor (Sansig y cols., 2001; Zhang y cols., 2008) y la acción neuroprotectora del receptor en modelos de privación de oxígeno y glucosa (Domin et al., 2015).

Es probable que, a nivel fisiológico, los receptores mGlu7 se activen en **condiciones de estimulación intensa**. Así, se ha demostrado que la HFS recluta estos receptores (Semyanov y Kullmann, 2000), y que la elevación en la concentración de glutamato en la hendidura sináptica aumenta los efectos inhibitorios de los receptores mGlu del grupo III (Oliet et al., 2001; Semyanov y Kullmann, 2000; Piet et al., 2004; Vera y Tapia, 2012).

No obstante, los antagonistas de los mGlu del grupo III parecen tener un efecto mínimo o incluso nulo en la modulación de la HFS (von Gersdorff et al., 1997; Chen et al.,

2002; Lorez et al., 2003; Capogna, 2004; Cosgrove et al., 2011). Se ha propuesto que esto se debe a que los receptores mGlu del grupo III, además del efecto inhibitorio sobre los VDCC, simultáneamente activan mecanismos de potenciación que incrementan el RRP (Billups et al., 2005). Aunque serían mecanismos aparentemente contrapuestos, esta modulación dual podría tener un sentido fisiológico en sinápsis que reciben estímulos de alta intensidad y frecuencia. En estas situaciones, en las que se requiera mantener la liberación prolongada de neurotransmisor, se evitaría mantener los altos niveles de Ca^{2+} en el terminal presináptico durante largos periodos, dado el potencial citotóxico de este ión (Cain y Snutch, 2011; Stanika et al., 2009; 2012). Además de la existencia de otros mecanismos para el control de la concentración de Ca^{2+} , hay que tener en cuenta que durante estimulación prolongada se producirá la inhibición de los VDCC (Caterall y Few, 2008), por los GPCRs (Hille, 1994; Herlitze et al., 1996). Por ello, para mantener la liberación en las sinápsis que lo requieran fisiológicamente, es necesario un mecanismo compensatorio. Los mecanismos que regulan positivamente la maquinaria excitotóxica, como los que aumentan el número de SVs preparadas, podrían desempeñar esta función. Así, la acción de Munc13 incrementa el RRP (Augustin et al., 1999; Rhee et al., 2002) y aumenta la sensibilidad a Ca^{2+} de los mecanismos de liberación de neurotransmisores (Lou et al., 2005). El mecanismo de potenciación dependiente de receptores mGlu7, probablemente activa la proteína Munc13 (Fig 4.2, 4.30; Martín et al., 2010) y aumenta el RRP (Fig. 4.3; 4.13). Por lo tanto, este mecanismo podría desempeñar esta función homeostática de compensación de la inhibición, para permitir el mantenimiento de liberaciones de neurotransmisor prolongadas. Esta hipótesis concuerda con la falta de efecto de los antagonistas en los estudios comentados anteriormente, y también con las evidencias que muestran que la activación prolongada de los receptores mGlu7, asociada a estimulaciones intensas, revierte los mecanismos de inhibición hasta los niveles basales de liberación (Pelkey et al., 2005). También coincide con los resultados obtenidos (Fig. 4.9 y 4.10) que muestran la reversión de la inhibición de la liberación inducida por despolarización por activación prolongada de receptores mGlu del grupo III. De acuerdo con esta idea, la segregación de comportamientos observados por el tratamiento con L-AP4 en los cultivos autápticos de hipocampo (Fig. 4.11 y 4.12), podría deberse a que la subpoblación de neuronas que sólo muestra mecanismos de inhibición, serían células que no desarrollan a nivel fisiológico liberaciones de alta intensidad o duración (Fig. 5.2.A), por lo que la única función de los receptores mGlu del grupo III en estas neuronas sería la de inhibir la liberación de glutamato para evitar la neurotoxicidad. Por otra parte, la subpoblación de neuronas que desarrolla los mecanismos de potenciación (Fig. 5.2.B) correspondería a las células cuya función está relacionada con estimulaciones fisiológicas de alta intensidad y requieren mecanismos que compensen la reducción en la entrada de Ca^{2+} , para mantener la liberación de forma prolongada.

El control de la liberación de glutamato por mGlu7 podría estar relacionado con su participación en **mecanismos de plasticidad** (*Introducción: 2.2.1*). Así, se ha propuesto la implicación de los receptores mGlu7 no sólo en fenómenos de LTD (Laezza et al., 1999; Pelkey et al., 2005; Klausnitzer et al., 2004; Naie et al., 2005; 2006; Altinbilek y Manahan-Vaughan, 2007; Lodge et al., 2007), sino también de STP (Bushell et al., 2002) y LTP (Tolchard et al., 2000; Grober y Yan, 1999; Bushell et al., 2002; Fend et al., 2013; Gee et al., 2014; Klar et al., 2015). En este sentido, sería interesante determinar la implicación de los receptores mGlu7, así como de PLC y de la proteína Munc13, en estos fenómenos de STP y LTP. Es posible que los mecanismos de potenciación por mGlu7 puedan participar en el desarrollo de los fenómenos cognitivos de aprendizaje y de memoria. Así, se ha descrito que los receptores mGlu del grupo III (Gerlai et al., 1998; 2002; Altinbilek y Manahan-Vaughan, 2007) y concretamente los mGlu7 (Holscher et al., 2004; 2005), están implicados en estos procesos.

En cuanto a la relevancia fisiopatológica del control de la liberación, hay que señalar que la mayoría de las acciones de los receptores mGlu del grupo III probablemente dependan de su acción inhibitoria, de acuerdo a su destacada acción anticonvulsinante y neuroprotectora (*Introducción 2.2.1*; Mercier y Lodge, 2014). Sin embargo, cabe destacar que los mGlu7, en algunas situaciones, parecen desempeñar un efecto dual u opuesto a lo esperable de mecanismos inhibitorios, como en procesos de nocicepción (Marabese et al., 2007; Palazzo et al., 2008; 2011; 2013) o ansiedad (Cryan et al., 2003; Stachowicz et al., 2008; Palazzo et al., 2008; Gee et al., 2013; Fendt et al., 2013). Este efecto dual de los mGlu7 quizá pueda deberse a la implicación de sus mecanismos de potenciación de la liberación de glutamato.

Potenciación de la liberación por receptores β -adrenérgicos

Modulación de la liberación de glutamato por vías dependientes de cAMP

La generación de cAMP, por activación de la AC modula la liberación de neurotransmisores por distintos mecanismos (Fig 1.5.; *Introducción: 3.1*). En sinaptosomas cerebrocorticales de ratones adultos existen mecanismos de modulación dependientes de PKA, pero también independientes de esta proteína (Fig.4.14). Mientras que la liberación inducida por despolarización muestra estos dos componentes, los protocolos de estimulación que no implican la activación de canales iónicos (de Na⁺ y K⁺, o VDCC) revelan que esta potenciación de la liberación por cAMP es independiente de PKA (Fig.4.14). Estos resultados concuerdan con las observaciones previas de otros grupos

que proponen que la modulación de la liberación espontánea es completamente independiente de la PKA y dependiente de la proteína Epac (Gekel y Neher, 2008).

La PKA puede modular la excitabilidad neuronal fosforilando canales de K^+ (Begúin et al., 1999), así como modular diversas subunidades de los VDCC (Hell et al., 1995; Gao et al., 1997; Bunnemann et al., 1999). Por lo tanto, es probable que estas modulaciones de canales iónicos participen en la modulación de la liberación inducida por despolarización y sean sensibles a los inhibidores de la PKA (Fig. 4.14). Además, la PKA puede modular diversas proteínas de la maquinaria exocitótica, como CSP (Evans et al., 2001); snapina (Cheda et al., 2001), SNAP-25 (Nagy et al., 2005); sinaptotagnina12 (Maximov et al., 2012), RIM (Lonart et al., 2003), sinaptofilina (Boczan et al., 2004), sinapsina (Fuimara et al., 2004), α SNAP (Hirling y Scheller, 1996), complexina (Cho et al., 2015) o rafilina3 (Fykse et al., 1995; Schuleter et al., 1999; Foletti et al., 2001). Sin embargo, ni la inhibición, ni la activación específica de PKA, tiene efecto alguno sobre la potenciación dependiente de cAMP de la liberación de glutamato espontánea o la inducida por dosis bajas de ionomicina en sinaptosomas (Fig. 4.14). Aunque la liberación con estos protocolos depende en gran medida de la maquinaria exocitótica, parece que, en las condiciones estudiadas, la fosforilación de estas proteínas por PKA no tiene un papel significativo en la modulación de la liberación de glutamato. Esto puede deberse a las diferencias en cuanto a las preparaciones y regiones cerebrales estudiadas, así como a las distintas condiciones en las que están realizados estos estudios. No obstante hay que señalar que, aunque la fosforilación de proteínas por PKA se ha asociado a fenómenos de plasticidad (Lonart et al., 2003), no se ha demostrado que las fosforilaciones mediadas por la PKA sean esenciales en estos fenómenos (Kaeser et al., 2008b; Yang y Calakos, 2010).

Los resultados obtenidos muestran que las vías de potenciación de la liberación de glutamato por cAMP independientes de PKA, están asociadas a la activación de la proteína Epac (Fig. 4.15). Además de Epac, existen otras dianas de cAMP (*Introducción: 3.1.3.3*), como los canales HCN, aunque los resultados obtenidos en esta Tesis muestran que estos canales no median las acciones del cAMP en la preparación de sinaptosomas en las condiciones estudiadas (Fig. 4.15). Dado que los HCN son activados por despolarización y los experimentos de liberación de glutamato se realizaron en condiciones de bloqueo por TTx de la generación de potenciales de acción, era esperable que no se observara participación de estos canales. Además, estos resultados coinciden con otros autores que proponen que los HCN no están implicados en la potenciación de la neurotransmisión mediada por cAMP (Zhong et al., 2004; 2005). No obstante, hay que señalar que los canales HCN probablemente estén presentes en los sinaptosomas, tal como sugiere el efecto de su bloqueo sobre la liberación basal (dato no mostrado).

Nuestros resultados parecen indicar que la proteína Epac es la diana del cAMP implicada en la potenciación de la liberación de glutamato independiente de PKA (Fig.

4.15). La participación de Epac en la neurotransmisión (*Introducción: 3.1.2*) ha sido claramente puesta de manifiesto en experimentos con ratones carentes de esta proteína (Yang et al., 2012; Fernandes et al., 2015). Además, el uso de su activador específico, 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP, ha demostrado que Epac potencia la liberación de neurotransmisores en numerosos modelos y sistemas (Zhong y Zucker, 2005; Cheung et al., 2006; Sakaba y Neher, 2003; Kaneko y Takahashi, 2004; Gekel y Neher, 2008; Huang y Hsu, 2006; Woolfrey et al., 2009; Ster et al. 2007; Gelinás et al., 2008; Ster et al., 2009; Yang et al., 2012; Fernandes et al., 2015). La acción de Epac se ha asociado tanto a la modulación de la liberación inducida por despolarización (Sakaba y Neher, 2003; Kaneko y Takahashi, 2004; Gekel y Neher, 2008), como a la regulación de la liberación espontánea (Gekel y Neher, 2008). Por lo tanto, además de los efectos estudiados (Fig. 4.15), es posible que Epac también pueda participar en el componente independiente de PKA de la liberación inducida por despolarización (Fig.4.14).

Epac presenta dos isoformas, Epac1 que se expresa de forma ubicua, aunque su expresión en el sistema nervioso es baja, y Epac2, predominante en cerebro, incluida la corteza cerebral (Kawasaki et al., 1998; Ozaki et al., 2000). La expresión de estas isoformas varía con el desarrollo, reduciéndose la expresión de Epac1 y aumentando la de Epac2 (Ulacan et al., 2007). Por lo tanto, es probable que en sinaptosomas de corteza cerebral de ratones adultos la isoforma predominante sea Epac2. Sin embargo, no es posible descartar que ambas isoformas estén implicadas en las funciones neuronales de esta proteína (Yang et al., 2012). Sería interesante realizar estudios futuros para determinar la isoforma implicada en estos mecanismos, bien empleando inhibidores específicos de estas isoformas (Rehmann et al., 2013) o ratones carentes de las mismas (Yang et al., 2012; Fernandes et al., 2015).

Receptores β -adrenérgicos en sinápsis glutamatérgicas

Los β -AR son activados por norepinefrina en el SNC, y a nivel subcelular estos receptores se localizan en neuronas catecolaminérgicas, a nivel pre- y postsináptico (Aoki et al., 1989), así como en astrocitos asociados a estas neuronas (Aoki y Pickel, 1992). Por lo tanto, en sinapsis glutamatérgicas, los β -AR actúan como heteroreceptores. La activación de los β -AR ha sido relacionada con mecanismos de potenciación de la liberación de glutamato en numerosas preparaciones (Huang y Hsu, 2006; Ji et al., 2008; Kobayashi et al., 2009; Huang et al., 1992; 1996; 1998a; 1998b; Abraham et al., 2008; Gereau y Conn 1994a; 1994b; Gereau et al., 1995; Hillman et al., 2005), incluidos los sinaptosomas de corteza cerebral (Herrero y Sánchez-Prieto, 1996; Millán et al., 2003). Sin embargo, no existían evidencias claras a nivel ultraestructural de la presencia de estos receptores en terminales presinápticos glutamatérgicos.

La innervación noradrenérgica de la corteza cerebral se origina en el *locus ceruleus* (Foote et al., 1993; Kvetnasky et al., 2009), una región del tronco encefálico. Las isoformas β_1 y β_2 son las de mayor expresión en tejido cerebral, siendo mayoritaria en corteza cerebral la expresión de la isoforma β_1 (Nicolas et al., 1993; Paschalis et al., 2009). Los experimentos de localización de los β_1 -AR en rodajas de corteza cerebral de ratones adultos, mostraron la expresión de estos receptores en sinápsis asimétricas o excitatorias, mayoritariamente a nivel presináptico (Fig. 4.16). Además, la abundancia de los β_1 -AR en sinaptosomas de corteza cerebral fue muy similar a la observada en las rodajas (Fig. 4.16). Estos estudios suponen la primera evidencia ultraestructural de la presencia de los β -AR en los terminales presinápticos glutamatérgicos y concuerdan con las evidencias funcionales mostradas por otros autores y con los resultados obtenidos en esta Tesis (Fig.4.15). Además, la similitud entre los resultados obtenidos en corteza cerebral y en sinaptosomas cerebrocorticales sugiere que la distribución de los β -AR se mantiene en los terminales sinápticos aislados. Por lo tanto, dado que probablemente los sinaptosomas mantienen la maquinaria de transducción de señales de los terminales nativos, es posible que los mecanismos estudiados en sinaptosomas tengan relevancia fisiológica a nivel cerebral.

Modulación de la maquinaria exocitótica por la proteína Epac

La potenciación de la liberación por activación de los β -AR y de las proteínas Epac es sensible a los inhibidores farmacológicos de la PLC, de las proteínas de unión a DAG y de CaM (Fig 4.17), aunque el efecto es parcial. No parece probable que esto se deba a la baja eficacia o concentración de los fármacos, ya que estas mismas concentraciones inhiben completamente la potenciación dependiente de mGlu7/PLC/Munc13 en sinaptosomas (Martín et al., 2010; 2011). Además, los inhibidores de PLC inhiben completamente la actividad de PLC determinada por la acumulación de IP_1 (Fig. 4.17) y la activación/translocación de Munc13 (Fig 4.18). Por lo tanto, es posible que existan dos vías de señalización implicadas en la potenciación dependiente de los β -AR y Epac: una dependiente de la actividad de PLC y de la activación de Munc13 por DAG, y otra independiente de estos mecanismos. Es improbable que esta vía se deba a mecanismos mediados por IP_3 , ya que los inhibidores de la PLC tienen el mismo efecto que los inhibidores de las proteínas de unión a DAG.

Es posible descartar la activación directa por los β -AR de las isoformas de PLC moduladas por proteínas G triméricas (Wang et al., 1999), ya que las evidencias farmacológicas señalan la dependencia de PLC en etapas posteriores a Epac en la cascada de señalización (Fig. 4.15 y 4.16). Sin embargo, hay formas de PLC, como las de

la familia ϵ , que pueden ser activadas por proteínas G pequeñas o monoméricas de la familia Ras, entre las que se incluye la proteína Rap (Smrcka et al., 2011; Fig. 1.7). Así, la proteína Epac, también denominada Rap-GEF, es una proteína con actividad intercambiadora de nucleótidos de guanina que activa proteínas G pequeñas (de Rooj et al., 1998; Kawasaki et al., 1998). Se ha descrito que Epac puede activar PLC ϵ por medio de su diana Rap2B (Schmidt et al., 2002). Además, este mecanismo participa en el control de otros sistemas de exocitosis, como la secreción de insulina (Dhuzura et al., 2011). Por lo tanto, es probable que, en los mecanismos de potenciación de la liberación de glutamato estudiados, Epac active PLC ϵ por medio de las proteínas Rap.

La potenciación de la liberación de neurotransmisor dependiente de los β -AR y Epac parece implicar proteínas activadas por DAG y CaM (Fig. 4.16). Las principales dianas del DAG son la proteína Munc13 y la PKC (Brose y Rosenmund, 2002), aunque los resultados farmacológicos descartan la participación de esta quinasa (Fig. 4.16). Parece improbable la participación de otras proteínas activadas por DAG, como quimerina, PKD o RasGRP, ya que hasta ahora no ha sido descrita su participación directa en el proceso de liberación de neurotransmisores.

La proteína **Munc13** (*Introducción 3.2.4*) es una proteína esencial en la preparación de las SVs para su liberación, que es regulada por la unión a DAG y CaM (Augustin et al., 1999; Rhee et al., 2002; Junge et al., 2004; Lipstein et al., 2012). Munc13 se transloca a la membrana plasmática como consecuencia de su activación por unión de DAG (Betz et al., 1998; Augustin et al., 1999; Rhee et al., 2002). Además, la activación de Munc13 requiere la interacción con la proteína RIM, que evita la formación de su dímero autoinhibitorio (Deng et al., 2011). Los resultados obtenidos muestran que la activación de los β -AR y Epac induce la translocación de Munc13 (Fig. 4.18), incrementa su interacción con RIM (Fig. 4.20), y promueve el acercamiento de las SVs a membrana de la zona activa (Fig. 4.21). Por lo tanto, estas evidencias sugieren la probable implicación de Munc13 en el fenómeno de potenciación dependiente de los β -AR y Epac. Estos resultados son apoyados por otros estudios que proponen que Epac participa en el mantenimiento del RRP (Fernandes et al., 2015). Cabe destacar que los β -AR serían uno de los pocos receptores descritos hasta ahora con capacidad de modular la proteína Munc13 (Bauer et al., 2007; Martin et al., 2010; Hu et al., 2015) y, junto con los receptores mGlu7, los únicos receptores presinápticos conocidos que regulan esta proteína en sinápsis excitatorias de mamífero.

No obstante, los resultados farmacológicos parecen indicar que, en la potenciación por β -AR y Epac, participa una vía de señalización adicional a la dependiente de PLC/Munc13, en base a que la acción conjunta de los antagonistas de la unión de DAG y de la proteína CaM inhiben completamente la potenciación, mientras que las correspondientes acciones individuales sólo tienen un efecto parcial (Fig. 4.17). En

principio esto podría sugerir que los mecanismos de potenciación implican dos componentes diferenciados: la comentada vía dependiente de DAG y otra, dependiente de CaM. Sin embargo, es necesario tener en cuenta la activación de la función de Munc13 requiere no sólo su localización en la membrana presináptica por unión de DAG (Rhee et al., 2002), sino también su regulación por la unión por Ca^{2+} y CaM (Junge et al., 2004; Rodríguez-Castañeda et al., 2009). Por un lado, hay que considerar que la proteína no unida a DAG y que permanece soluble en el compartimento citosólico, podría ser activada por Ca^{2+} y CaM aunque su localización fuera de la zona activa impediría su función. Por otro lado, la proteína translocada a la membrana por su unión a DAG, necesitaría de la unión de Ca^{2+} y CaM para desarrollar su actividad máxima.

De acuerdo con esto, el antagonista de la unión de DAG, calfofistina C, evitaría la activación de la Munc13 soluble, pero probablemente no de la Munc13 que está translocada a la membrana, que podría ser activada por los niveles basales de Ca^{2+} y de actividad de CaM. Además, aunque el inhibidor desplazase la unión del diacilglicerol a la proteína de la membrana de la zona activa, las interacciones de Munc13 con otras proteínas de dicha zona activa (Wang et al., 2009), entre las que destaca RIM (Duluvoba et al., 2005; Andrews-Zwilling et al., 2006), probablemente mantendrían su localización en membrana y por tanto su función.

Además, la inhibición farmacológica de CaM, no impediría la activación de la Munc13 soluble por el DAG generado por los mecanismos de potenciación, pero, tanto la Munc13 presente en membrana en condiciones basales, como la translocada por la generación de DAG, perdería su activación dependiente de CaM. No obstante, hay que señalar que esta forma de activación por CaM parece que no es esencial para la neurotransmisión (Lipstein et al., 2012), de manera que Munc13 podría mantener su actividad, aunque reducida, en presencia de antagonistas de CaM. Por último, la inhibición conjunta de la translocación y de activación por DAG y por CaM evitaría cualquier función de la proteína.

Siguiendo esta hipótesis, se explicaría la inhibición total de la potenciación por β -AR/Epac por el tratamiento conjunto con calfofistina C y con el antagonista de la CaM, así como la inhibición parcial por bloqueo de la acción de CaM. Así mismo, de acuerdo con esta idea, el componente de la potenciación por Epac independiente de la vía PLC/DAG, podría ser dependiente de la actividad de la Munc13 ya translocada a la membrana.

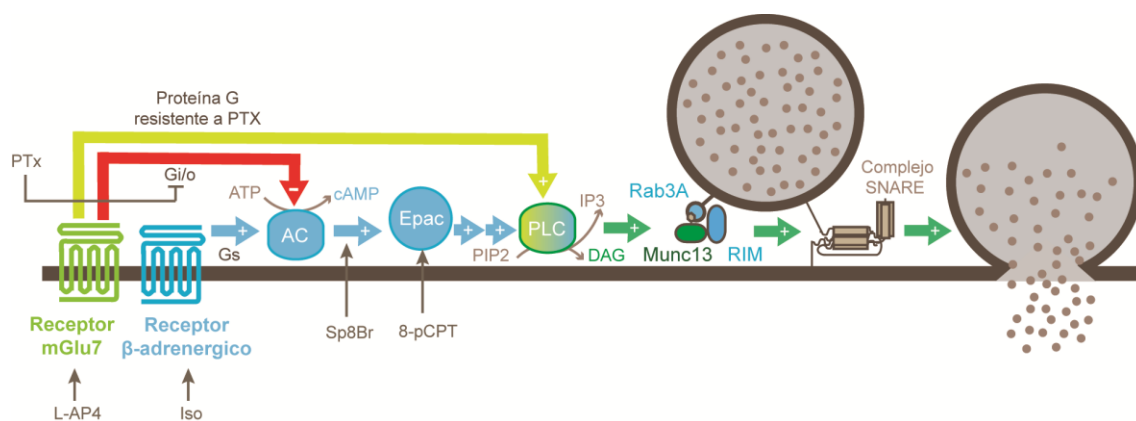


Fig. 5.3. Señalización cruzada de los receptores mGlu7 y β-adrenérgicos en la potenciación de la liberación de glutamato. Potenciación dependiente de receptores β-adrenérgicos (β-AR). Los receptores β-AR activan la adenilato ciclasa (AC) para generar AMP cíclico (cAMP), que activa la proteína Epac. Epac activa la fosfolipasa C (PLC), probablemente PLCε a través de Rap2A. El DAG generado activa la proteína Munc13. Además, Epac incrementa la interacción entre Rab3A y RIM. El complejo Munc13-RIM-Rab3a promueve la preparación de las vesículas sinápticas para su liberación. Los receptores mGlu7 controlan bidireccionalmente la potenciación dependiente de los β-AR. Los **receptores mGlu7 inhiben la generación de cAMP** a través de proteínas Gi/o. Además, la activación conjunta de los β-AR y de la **potenciación dependiente de los receptores mGlu7**, puede dar lugar a un **incremento supra-aditivo de la liberación de glutamato**.

La Munc13 de la membrana de la zona activa interacciona con RIM (Deng et al. 2011) y RIM interacciona a su vez con la proteína G pequeña de las SVs, **Rab3a**, formando un complejo triple entre estas tres proteínas, necesario para la preparación de las SVs (Duluvoba et al., 2005; Andrews-Zwilling et al., 2006). La unión de RIM-Rab3 depende de la activación de Rab3 por medio del intercambio de GDP por GTP (Wang et al., 1997; 2000). Por lo tanto, Epac, a través de su actividad GEF, activadora del intercambio de GDP por GTP, podría llevar a cabo esta función de activación de Rab3.

La interacción entre RIM1-Rab3a aumenta tras la activación de Epac (Figura 4.19), pero este efecto es revertido por la inhibición de PLC, sugiriendo que este fenómeno es consecuencia de la acción indirecta de la activación de Munc13 sobre la interacción RIM-Rab3a, y no de la activación directa de Rab3a por Epac. Hay que señalar, no obstante, que existe una tendencia al aumento de la interacción, aun en presencia del inhibidor de PLC, aunque no significativa (Fig. 4.19), por lo que es posible que la sensibilidad de la técnica no sea suficiente para discernir claramente este aspecto. Por ello, convendría realizar experimentos adicionales que pudiesen aclarar la participación de la activación directa de Rab3a por Epac en estos mecanismos.

Existen diversas evidencias que sugieren la activación directa de Rab3a por Epac. Se ha demostrado una disminución en la expresión de Rab3a en ratón carente de Epac2 (Fernandes et al., 2015). Además, se ha implicado a la modulación directa de Epac sobre Rab3 en otros sistemas de exocitosis, como la secreción de insulina (Park et al., 2012) o la reacción acrosómica (Branham et al., 2009). Así mismo, se ha propuesto la interacción de

Epac con RIM en células secretoras de insulina (Ozaki et al., 2000; Kashima et al., 2001; Park et al., 2012), apoyando la relación de Epac con el complejo RIM-Rab3.

El complejo triple Munc13-RIM-Rab3a es esencial para el proceso de preparación de las SVs para su liberación (*Introducción: 1.4*). Se ha propuesto que este complejo puede ser modulado por diversas cascadas de señalización (Fig 1.5). En primer lugar, a través de Munc13, por acción de DAG y Ca^{2+}/CaM (Rhee et al., 2002; Junge et al., 2004). También se ha demostrado la implicación de la proteína RIM en la potenciación de la liberación dependiente de cAMP (Castillo et al., 2002), habiéndose propuesto la acción de PKA en este fenómeno, fosforilando la Ser413 de esta proteína (Lonart et al., 2003), aunque posteriormente se ha cuestionado la participación de esta fosforilación en estos procesos de plasticidad (Kaeser et al., 2008a; Yang y Calakos, 2010). Además, dado que la interacción de Rab3 con RIM depende de su intercambio de GDP por GTP (Wang et al., 1999), la formación del complejo triple podría estar regulada por proteínas con actividad GEF, tal como se ha propuesto en otros sistema de exocitosis (Branham et al., 2009 ; Park et al., 2012). Por lo tanto, el complejo que forman estas proteínas supone el punto de confluencia de las vías de potenciación de la liberación de neurotransmisores dependientes de cAMP y DAG, de gran importancia y ampliamente estudiadas. De acuerdo a los resultados obtenidos en esta Tesis, la vía de potenciación por activación de los β -AR favorecería la formación del complejo triple Munc13-RIM-Rab3 por medio de dos vías de señalización diferentes dependientes de Epac (Fig. 5.3): 1) la activación de PLC, para generar DAG y activar Munc13; y 2) posiblemente la activación directa de Rab3a. Por lo tanto, los mecanismos de modulación de la liberación de neurotransmisores por β -AR/Epac estudiados desvelan novedosas evidencias acerca de los receptores presinápticos implicados en las importantes cascadas de señalización dependientes de cAMP y DAG que confluyen en el complejo triple Munc13-RIM-Rab3.

Estudio de la potenciación de la transmisión sináptica empleando vGlut1-pHluorina en cultivos primarios de corteza cerebral

El estudio de la expresión de mCherry bajo el promotor de la CaMKII α , en los cultivos primarios de neuronas de corteza (Fig. 4.22), mostró que la expresión de esta proteína no constituye un marcador específico de neuronas glutamatérgicas, tal como se ha descrito en tejido cerebral (Jones et al., 1994; Chiarlone et al., 2014). Probablemente, esto se deba a las diferencias en la maduración de las neuronas en el cultivo, cuya disgregación provoca la pérdida de las interacciones y quimiotaxismos propios del desarrollo de estas células en el cerebro, originando la modificación de su fenotipo. Sin

embargo, la expresión de la proteína mCherry permite asegurar que los estudios realizados se restringen sólo a neuronas (Fig. 4.22), en contraste con algunos estudios que demuestran que las pHluorinas pueden expresarse también en vesículas de las células de glía (Sinhg et al., 2014; Stenovec et al., 2015). Por lo tanto, las células estudiadas, que expresan la vGlut1-pHluorina y mCherry, se corresponden con neuronas mayoritariamente, aunque no exclusivamente, glutamatérgicas.

La liberación espontánea aumenta por el tratamiento de las neuronas con el agonista de los β -AR, isoprotrenol, y el activador específico de Epac, 8-pCPT. Es de destacar que la potenciación de la liberación espontánea inducida por la activación de los β -AR fue mayor ($p < 0.01$) que la inducida por la activación de Epac (Fig. 4.23.A), mientras que el incremento del RRP inducido por el tratamiento con estos fármacos (Fig. 4.25) no fue significativamente diferente ($p > 0.05$). Estas evidencias sugieren que, en cultivos primarios de neuronas corticales, los receptores β -AR podrían activar otras vías de potenciación de la liberación espontánea adicionales a la mediada por Epac, que probablemente esté relacionada con el aumento del RRP. Así, los β -AR pueden inducir fenómenos de potenciación dependientes de PKA (Gereu y Conn, 1994; Herrero et al., 1996; Gelinás et al., 2008a) y ERK/mTOR (Gelinás et al., 2007; Eijkelkamp et al., 2010; Connor et al., 2012), que podrían modular la liberación espontánea. Además, recientemente se ha descrito que fosforilación por PKA de las proteínas complexinas incrementa la liberación espontánea (Cho et al., 2015), por lo que este mecanismo podría estar relacionado con el efecto adicional de la activación de los β -AR. Así mismo, la PKA fosforila la sinaptotagmina-12, que está implicada en la modulación de la liberación espontánea (Maximov et al., 2007).

Ahora bien, el hecho de que la potenciación de la liberación espontánea inducida por los β -AR se pierda totalmente en los ratones mutantes de Munc13-1, así como en los ratones carentes de RIM1 α , parece indicar que la acción suplementaria de isoproterenol en la potenciación de la liberación espontánea, también depende de estas proteínas. Dado que las complexinas participan en el ensamblaje del complejo SNARE y en la preparación de las SVs (Cai et al., 2008, Jorquera et al., 2012; Diao et al., 2013; Sudhof et al., 2013), la ausencia de las proteínas RIM1 α y de la activación por DAG de Munc13-1, esenciales para el proceso de preparación de las SVs (Rhee et al., 2002; Deng et al., 2011), podría afectar también a los mecanismos de la potenciación de la liberación espontánea dependientes de PKA/complexinas (Cho et al., 2015).

Además, la potenciación de la liberación espontánea por la activación de los β -AR y Epac parece ser dependiente de la unión de DAG a Munc13-1 (Fig. 4.23.B). Estos resultados están en consonancia con trabajos previos que demuestran que en el ratón mutante Munc13 H567K presenta una gran disminución en la magnitud de la potenciación de la liberación espontánea por ésteres de forbol (Rhee et al., 2002; Lou et al., 2008).

Además, el incremento de la liberación espontánea estudiado parece ser dependiente también de la presencia de la proteína RIM1 α (Fig.23.C). No obstante, es importante tener en cuenta que el ratón carente de la proteína RIM1 α muestra un aumento en la cantidad de Munc13-1 soluble (Schoch et al., 2002; 2006; Kaeser et al 2008a; Deng et al., 2011). Por lo tanto, sería necesario realizar ensayos adicionales para determinar si los mecanismos de potenciación por β -AR y Epac están alterados en este modelo de manera directa por la ausencia de RIM1 α , o de manera indirecta por el aumento de la solubilidad de Munc13-1. Además, en ambos modelos animales se produce una disminución de la liberación espontánea basal. Sin embargo, estos resultados no concuerdan con trabajos previos, que han descrito que no existen cambios en la frecuencia de la liberación espontánea en el mutante Munc13-1 H567K (Rhee et al., 2002) ni en el ratón carente de RIM1 α (Schoch et al., 2002). Es posible que estas diferencias estén relacionadas con las distintas áreas cerebrales estudiadas, ya que nuestros resultados han sido obtenidos analizando neuronas de corteza cerebral, frente a los estudios anteriores que se realizaron en células hipocámpales, de rodajas (Schoch et al., 2002) y de cultivos autápticos (Rhee et al., 2002).

Los resultados obtenidos en sinaptosomas han mostrado que los receptores β -AR y la proteína Epac también modulan la liberación inducida por despolarización (Fig. 4.21). Por esta razón, estudiamos el efecto de la activación de estas proteínas sobre estimulaciones eléctricas breves (40APs) y submáximas (400APs), encontrando que la activación de estas proteínas incrementa la proporción de SVs liberadas en ambos tipos de estímulos (Fig. 4.24.A-C). Sin embargo, tanto en las neuronas del ratón que no une DAG a la Munc13 (H567K) como del ratón carente de RIM1 α , se perdió el efecto modulador de β -AR y Epac sobre las estimulaciones a 40APs, aunque no sobre las estimulaciones a 400APs (Fig. 4.24.H-J; O-Q). Esto parece indicar que la potenciación de la liberación por estas proteínas podría ser dependiente de la unión de DAG a Munc13-1 y de la presencia de la proteína RIM1 α , en estimulaciones de baja intensidad mientras que, estimulaciones de mayor magnitud, involucraría otras vías de señalización. Así, se ha propuesto que la potenciación por DAG es dependiente de Munc13, pero también de PKC, a través de la fosforilación de Munc18 (Wierda et 2007; Lou et al., 2008) o PKC/sinaptotagmina-1 (de Jong et al., 2016). Así, se ha propuesto que Epac puede potenciar la liberación por medio de la vía PKC/Munc18 (Hucho et al., 2005; Gekel y Neher, 2008). Además, en la liberación inducida por despolarización, los β -AR pueden modular los VDCC (Huang et al., 1996; 1998; Ji et al., 2008), mientras que Epac puede activar la vía ERK/mTOR (Gelinas et al., 2007; Eijkelkamp et al., 2010; Connor et al., 2012) y modular otros canales iónicos, como los canales de K⁺ sensibles a ATP (Zhao et al., 2013).

Además, se observó una disminución en las respuestas control a 40 y 400 APs en el ratón carente de RIM1 α (Fig. 4.24. O-Q), aunque en este modelo no se han descrito alteraciones en la liberación inducida por despolarización (Schoch et al., 2002), pudiendo deberse estas discrepancias a las diferencias en los modelos de estudio, asociadas a las compensaciones sobre la delección de esta isoforma, según áreas del cerebro. Por otra parte, en el mutante Munc13-1 H567K sólo se observó la disminución de la respuesta basal a 40APs (Fig. 4.24. H-J). Estos resultados concuerdan el fenotipo descrito para este mutante, en el que no se observan cambios en la amplitud de los EPSCs, pero si existe una reducción en el RRP (Rhee et al., 2002), siendo este el grupo de SVs exocitadas en las estimulaciones de 40 APs (Burrone et al., 2006).

Las cinéticas de exocitosis no fueron modificadas por la activación de los β -AR y Epac, ni en las células de genotipo salvaje, ni en neuronas obtenidas de los mutantes carentes de RIM1 α y los Munc13-1 H567K (Fig. 4.24. D, E, K, L, R, S), por lo que estos mecanismos no parecen afectar a la velocidad de liberación de las SVs. Sin embargo, las velocidades basales de exocitosis aumentan en los ratones mutantes estudiados, lo que podría tener relación con la modulación de los VDCC por RIM (Kiyonaka et al., 2007, Liu et al., 2011; Kaeser et al., 2011) y por Munc13 (Collaway et al., 2015), así como con el papel de estas proteínas en la regulación de la cinética de la apertura del poro de fusión (Acuna et al., 2014).

Sin embargo, las cinéticas de endocitosis son alteradas por la activación de los β -AR, que induce un aumento en la velocidad de este proceso, y de Epac, que, por el contrario, reduce su velocidad (Fig. 4.24. D, F, K, M, R, O). Los efectos contrapuestos de la activación de estas proteínas sugieren que los mecanismos por los que estas proteínas controlan la endocitosis son diferentes. Una posibilidad sería que los efectos asociados a los β -AR en la endocitosis sean dependientes también de la activación de la PKA. En este sentido, hay que señalar que la PKA fosforila proteínas implicadas en la endocitosis, como sinapsina, sinaptofilina o sinaptotagmina. La fosforilación de la sinapsina por PKA induce la disociación de la esta proteína de las SVs (Hosaka et al., 1999; Cousin y Evans, 2011; Perlini et al., 2011) y aumenta la velocidad de endocitosis (Menegon et al., 2006). La fosforilación de sinaptofilina por PKA reduce su acción inhibitoria (Boczan et al., 2004) sobre la proteína dinamina1 (Lao et al., 2000), esencial para la endocitosis (Shpetner y Vallee, 1989; Vallee y Shpetner, 1993; De Camilli et al., 1995; Ferguson et al., 2007). PKA también fosforila isoformas de la sinaptotagmina (Maximov et al., 2007), que es esencial para la endocitosis (Littleton et al., 2001; Poskanzer et al., 2003; Llinas et al., 2004). Por último, PKA fosforila los VDCC (Hell et al., 1995), incrementando su actividad (Gao et al., 1997; Bunnemann et al., 1999), siendo el Ca²⁺ inductor de todos los tipos de endocitosis (Marks y McMahon, 1998; Wu et al., 2009). En este sentido, cabe destacar que PKA también fosforila RIM (Lonart et al., 2003), proteína que regula y localiza los VDCC

(Kiyonaka et al., 2007, Liu et al., 2011; Kaeser et al., 2011, Acuna et al., 2015). El hecho de que en el ratón carente de la proteína RIM1 α el efecto sobre la endocitosis de la activación de los β -AR se vea alterado, podría estar relacionado con la modulación por PKA de proteínas que interaccionan con RIM1 α , como la sinaptotagmina (Coppola et al., 2001) o los VDCC (Kaeser et al., 2011).

Por otra parte, Epac podría regular la endocitosis por regulación directa de proteínas G pequeñas de la familia Rab que participan en este proceso, como Rab5 (Kawauchi et al., 2010), Rab10 (Shi et al., 2012) o Rab35 (Dutta y Donaldson, 2015). Sin embargo, Epac favorecería la activación de las proteínas G pequeñas por su actividad GEF, por lo que su actuación no explicaría el enlentecimiento de la endocitosis observado. Además, Epac podría regular la endocitosis por medio de la activación de PLC (Schmidt et al., 2001), ya que el sustrato de esta enzima, el PIP₂, localiza proteínas implicadas en la endocitosis, como las proteínas adaptadoras AP (Cremona et al., 1999) o la dinamina (Okamoto et al., 1997; Shupliakov et al., 1997; Anggono y Robinson, 2007), y es esencial en el acoplamiento de los ciclos de exo- /endocitosis por medio de su interacción con sinaptotagmina (Martín et al., 2014). Por lo tanto, la activación de PLC por Epac podría reducir el PIP₂ en membrana, limitando su acción funcional y enlenteciendo la endocitosis. Además, en el ratón carente de la proteína RIM1 α el efecto de la activación de Epac se pierde, lo que podría estar relacionado con la interacción de RIM con la proteína sinaptotagmina-1 (Coppola et al., 2001), en relación al papel esencial en la endocitosis de la interacción de esta proteína con PIP₂.

Por lo tanto, aunque existen evidencias de la modulación de la endocitosis por los β -AR y Epac, así como de la posible dependencia de estos fenómenos de la expresión de la proteína RIM1 α , sería necesario profundizar notablemente en el estudio de estos mecanismos para determinar las vías de señalización implicadas y explicar los diferentes efectos observados.

Los resultados obtenidos muestran que la activación de los β -AR y de la proteína Epac no alteran la probabilidad de liberación estimada por la tasa de respuestas frente a un AP (Fig 4.24.G). Sin embargo, nuestros resultados sí muestran el aumento en el RRP como consecuencia de estos tratamientos (Fig. 4.25). El hecho de que un aumento en el número de vesículas preparadas no incremente la probabilidad de liberación parece contradictorio. Sin embargo, estudios previos han propuesto que la potenciación de la liberación por cAMP no implica un aumento en la probabilidad de liberación, si no que depende de un incremento en la sensibilidad a Ca²⁺ como consecuencia del aumento del número de SVs preparadas para su liberación (Sakaba y Neher, 2001). Este hecho podría explicarse teniendo en cuenta que el RRP presenta SVs de liberación muy rápida (RRP rápido), que son liberadas antes que el resto de las SVs de este grupo (RRP lento; Wu y Borst, 1999; Sakaba y Neher, 2001). Así, el RRP rápido se correspondería con las SVs

situadas en los sitios activos, muy cerca de los VDCC, mientras que las SVs del RRP lento se localizaría más alejadas (Neher y Sakaba, 2008; Chen et al., 2015), habiéndose propuesto que estas SVs son liberadas después de sustituir en los sitios activos al RRP rápido (Hanse y Gustafsson, 2001). Por lo tanto, al aplicar un único AP se induciría la fusión de SVs pertenecientes al RRP rápido únicamente, mientras que probablemente los mecanismos que aumentan el RRP, como la activación de los β -AR o de Epac, incrementan el número de SVs pertenecientes al RRP lento.

Además, nuestros resultados muestran una disminución de la tasa de acierto en las neuronas del ratón de RIM1 α , pero no del mutante Munc13-1 H567K. Estudios previos de estos modelos por técnicas de electrofisiología muestran una disminución en la probabilidad de liberación en el ratón KO para RIM1 α (Schoch et al., 2002), pero no en el Munc13-1 H567K (Rhee et al., 2002). Por lo tanto, la similitud en el fenotipo observado sugiere la validez de la estimación de la probabilidad de liberación a través de la determinación de la tasa de respuestas a un único potencial de acción.

Hay que señalar que es necesario profundizar en estos experimentos, especialmente aumentando el número de ensayos en el caso del estudio del ratón Munc13-1 H567K, y estudiando el efecto del activador de Epac. Además, tal como se ha comentado previamente, sería necesario dilucidar si las deficiencias en las potenciaciones observadas en el ratón carente de RIM1 α se deben directamente a la ausencia de esta proteína o al aumento de la solubilidad de Munc13-1 asociado a este modelo (Schoch et al., 2002; 2006; Kaeser et al 2008a; Deng et al., 2011).

Por otra parte, los resultados obtenidos acerca del tamaño de los grupos de SVs son similares a los datos obtenidos por otros estudios en células hipocámpales en cultivo, que proponen que el RRP corresponde a ~5% de las SVs y el grupo de reciclamiento oscila entre ~10-20% (Harata et al., 2001a; 2001b; Rizzoli y Betz, 2004; 2005) y un ~45% (Burrone et al., 2006). Nuestros datos muestran que la activación de los β -AR y de Epac aumenta notablemente el tamaño del RRP (Fig. 4.25). En este sentido, Epac se ha relacionado con el mantenimiento del RRP necesario para el desarrollo de fenómenos de potenciación (Fernandes et al., 2015). Además, estos resultados apoyan las evidencias obtenidas en sinaptosomas que muestran que la activación de los β -AR y Epac incrementa el número de SVs cercanas a la zona activa (Fig. 4.21), asociadas al RRP (Imig et al., 2014). Hay que señalar, que aunque la activación de los β -AR y Epac incrementa el RRP de manera similar, la respuesta a este mismo estímulo, en ausencia de Bafilomicina A1, es mayor para la activación de Epac (Fig. 4.24.A y B). Ahora bien, la activación de los β -AR incrementa la velocidad de endocitosis (Fig. 4.24. D y F), lo que podría reducir la magnitud de la respuesta en ausencia de Bafilomicina A1, explicando las diferencias observadas. Epac parece modular proteínas relacionadas con la preparación de las SVs (Fig. 4.18-4.20, 4.23, 4.24), como Munc13 (Rhee et al., 2002; Imig et al., 2014) o la proteína RIM

(Deng et al., 2011; Fernandez-Busnadiego et al., 2013), por lo que sería muy interesante estudiar estos mecanismos de modulación del tamaño de los grupos de SVs en neuronas del ratón carente de RIM1 α y del mutante Munc13-1 H567K. Por otra parte, la activación de los β -AR y de Epac también parece incrementar ligeramente el tamaño del grupo de reciclamiento (Fig. 4.25). Es posible que la activación de los β -AR pueda promover la fosforilación de sinapsina por PKA (Hosaka et al., 1999; Menegon et al., 2006; Cousin y Evans, 2011; Perlini et al., 2011). Así, se ha descrito que, tanto la vía cAMP/PKA (Kurumi y Kidokoro, 2005), como la fosforilación de la sinapsina (Orenbuch et al., 2012; Verstegen et al., 2014), están implicadas en el incremento del número de SVs pertenecientes al grupo de reciclamiento. Además, se ha relacionado la quinasa CDK5 con estos procesos (Kim y Ryan, 2010; Verstegen et al., 2014). Por otra parte, no se conocen evidencias de la acción de Epac en la modulación del grupo de reciclamiento, aunque podría estar relacionada con su acción sobre distintas proteínas G pequeñas, como las proteínas de la familia Rabs que interaccionan con las SVs, (Binotti et al., 2016) o las proteínas de la familia Rho (Croisé et al., 2014) o Arf (Gillingham y Munro, 2006) que regulan la dinámica del citoesqueleto de actina, implicado en el mantenimiento de la distribución espacial del grupo de reciclamiento (Marra et al., 2012; Ratnayaka et al., 2012).

Por último, hay que señalar que los receptores β -AR se expresan en una subpoblación de neuronas de corteza (Fig. 4.16), lo que sugiere que los mecanismos de potenciación por los β -AR/Epac podrían estar restringidos a una subpoblación de tipos neuronales. Por lo tanto, los estudios realizados en cultivos primarios de neuronas corticales probablemente comprendan tanto botones sinápticos de neuronas que desarrollan estos mecanismos, como botones de neuronas que no lo hagan. Esto sugiere que los resultados observados probablemente muestren reducida la magnitud de estos fenómenos por la ausencia de contribución de una parte de las neuronas. Por lo tanto, sería muy interesante para futuros estudios identificar la expresión de las proteínas implicadas en estos mecanismos en las células en cultivo, por ejemplo con técnicas de inmunocitoquímica *post-hoc* (Ramírez-Franco et al., 2013), o desarrollando modelos de ratones transgénicos que presenten estas proteínas unidas a proteínas fluorescentes.

Papel fisiológico del mecanismo

Es posible que los mecanismos de potenciación de la liberación de glutamato por β -AR/Epac antes descritos participen en procesos de plasticidad sináptica. Así, se ha demostrado los β -AR participan en procesos de **LTP** (Thomas et al., 1996; Moody et al., 1998; Lin et al., 2003; Gelinás y Nguyen, 2005; Hansen y Manahan-Vaughan; 2015)

relacionados con la proteína proteína Epac (Gelinás et al., 2007; 2008; Yang et al., 2012; Fernandes et al., 2015).

La actividad de los β -AR y de la proteína Epac se ha relacionado con fenómenos de plasticidad sináptica que a su vez están involucrados en los procesos cognitivos como el **aprendizaje y la memoria** cerebrales (Kandel et al., 2014). Así, se ha descrito que la activación de los β -AR facilita procesos de aprendizaje y memoria (Nielson y Jensen, 1994; Cahill et al., 2000; Sternberg et al., 1985; Roulet and Sara, 1998) y participa en la memoria emocional o la memoria asociada al estrés (Cahill et al., 1997; Hu et al., 2007; Roozendaal et al., 2009). Además, los procesos de memoria dependientes de la actividad hipocámpal se ven afectados por la reducción en la acción de la NE o por el bloqueo de los receptores β -AR (Ji et al., 2003; Murchinson et al., 2004). Así mismo, el bloqueo de los β -AR afecta a distintas funciones según la región cerebral: en la región CA1 de hipocampo, afecta a la consolidación de la memoria contextual por miedo y a la memoria espacial (Ji et al., 2003a, 2003b); en la amígdala basolateral, origina déficits en la memoria por miedo (Debiec y Ledoux, 2004; Hurlleman et al., 2005) y de la memoria asociada al gusto (Miranda et al., 2003); en corteza prefrontal, produce amnesia (Tronel et al., 2004) y déficits en la memoria de trabajo (Ramos et al., 2005). Por otra parte, la carencia de Epac1/2 origina problemas en el aprendizaje espacial y en las interacciones sociales (Yang et al., 2012), mientras que la de Epac 2 también muestra deficiencias en interacciones sociales y comunicación (Srivastava et al., 2012a). Además, Epac tiene un papel en el establecimiento de memoria a largo plazo, de manera independiente de PKA (Ma et al., 2009). Así mismo, la activación de Epac rescata los déficits en memoria y en el condicionamiento por miedo del ratón deficiente en NE/E, dopamina β -hidroxilasa KO (Ouyang et al., 2008), y mejora la recuperación de la memoria asociada al miedo (Ostroveanu et al., 2010). También se han relacionado la activación de Epac por los β -AR con cambios bidireccionales en la memoria emocional en hipocampo (Schutsky et al., 2011). Cabe destacar que el ratón carente de RIM1 α también muestra déficits de aprendizaje y memoria (Powell et al., 2004).

A nivel **fisiopatológico** es destacable que tanto los β -AR (Kalaria et al., 1989; Lee et al., 1997; Ni et al., 2006; Yu et al., 2008; 2010; Arrieta-Cruz et al., 2010; Wang et al., 2011; Li et al., 2013), como la proteína Epac (Maillet et al., 2003; Robert et al., 2005; McPhee et al., 2005) han sido relacionados con la enfermedad de Alzheimer. Además, Epac se ha asociado con autismo (Srivastava et al., 2012b), esquizofrenia (Kelly et al., 2009), ansiedad y depresión (Middeldorp et al., 2010), así como con la enfermedad de Huntington (Sarkar et al., 2009). Por lo tanto, es posible que esta vía de señalización iniciada por los β -AR pueda desempeñar algún papel en el desarrollo de estas patologías.

Modulación bidireccional de la vía de potenciación dependiente de β -AR y Epac por los receptores mGlu7.

Acción inhibitoria de la liberación por receptores mGlu7 en ausencia del agonista

Los receptores mGlu7 y β -AR se co-expresan en una subpoblación de terminales presinápticos (Fig. 4.26), y las vías de señalización asociadas a dichos receptores interactúan, modificando sus efectos moduladores sobre la liberación de glutamato (Fig. 5.3).

Los receptores mGlu7, acoplados a proteínas Gi/o, reducen la generación de cAMP, inhibiendo la potenciación dependiente de β -AR/Epac/PLC/Munc13 (Fig.4.27). Hay que señalar que la activación de los mGlu7 no inhibe completamente la potenciación inducida por el activador de la AC, forskolina, pero sí aquella inducida por el agonista de los β -AR, isoproterenol, probablemente porque, mientras que la forskolina activa la AC en todos los sinaptosomas, el isoproterenol sólo lo hace en la subpoblación de terminales que expresan los β -AR. Por lo tanto, la inhibición total por mGlu7 de la potenciación de los β -AR (Fig. 4.27), confirma la estrecha relación funcional existente entre estos receptores, tal como aventuraba su alto grado de colocalización (Fig. 4.26). Estudios previos han puesto de manifiesto la capacidad de los receptores mGlu7 para inhibir la generación de cAMP (Schoepp y Johnson, 1993; Okamoto et al., 1994; Schaffhauser et al., 1997; Herrero et al., 1996; Wu et al., 1998; Millán et al. 2002b; Martín et al., 2007). Además, se ha descrito que esta inhibición no afecta a los niveles basales de cAMP, desarrollándose sólo en condiciones de estimulación farmacológica de la AC (Schoppa y Westbrook, 1997; Herrero et al., 1996; Millán et al., 2002a, Martín et al., 2007). Sin embargo, se desconocía la función exacta de estos mecanismos, así como su relevancia fisiológica. Los resultados obtenidos en esta Tesis desvelan el papel de la inhibición de la AC por los receptores mGlu7, sugiriendo que controla la potenciación de la liberación de glutamato dependiente de cAMP, que a su vez regula el proceso de preparación de las SVs para su liberación (Fig. 4.14 - 4.21).

Sorprendentemente, hemos encontrado que, después de una activación prolongada de los receptores mGlu7, estos continúan inhibiendo la generación de cAMP, a pesar del lavado del agonista (Fig. 4.28). No obstante, este efecto es sólo parcial, desarrollándose la inhibición completa sólo después de una nueva adición del agonista (Fig. 4.28).

Estos resultados podrían deberse a distintas causas. En primer lugar, podría deberse a un lavado incompleto del agonista, existiendo una concentración reducida, aunque parcialmente efectiva, en el medio. No obstante, hay que tener en cuenta que el mGlu7 se caracteriza por su baja afinidad a glutamato, requiriendo altas concentraciones

para su activación (Schoepp et al., 1999). Por ello, es difícil pensar que, la concentración del fármaco remanente después del lavado, pudiese ser suficiente para activar este receptor.

Así mismo, sería posible que las proteínas implicadas en la vía de inhibición permanezcan activas aún después del lavado del agonista. Dado que la inhibición de los VDCC por este receptor se revierte rápidamente en ausencia del agonista (Fig. 4.9 y 4.10), parece improbable que tanto los receptores, como las proteínas Gi/o implicadas, se mantengan activos tras la retirada del agonista. Sin embargo, es posible que los cambios regulatorios desarrollados por la AC para reducir su actividad persistan de manera parcial durante un tiempo después de cesar la señalización por Gi/o. Así, la segunda adición del agonista volvería a inhibir completamente esta proteína y la generación de cAMP.

Otra posibilidad sería que sólo una subpoblación de receptores mGlu7 permaneciese acoplada a la vía de inhibición del cAMP después del lavado del fármaco, mientras que el resto de receptores mGlu7 permanecerían inactivos después del lavado y no responderían hasta la segunda aplicación de L-AP4. Se ha descrito que el tratamiento prolongado con L-AP4 induce la internalización de parte de los receptores mGlu7 (Pelkey et al., 2005; 2007; Lavazzari y Roche, 2008; Suh et al., 2008). Aunque tradicionalmente se ha relacionado la internalización en endosomas de los GPCR con su degradación y pérdida de función (von Zastrow y Williams, 2012), estudios recientes han demostrado que los GPCR internalizados en endosomas pueden seguir señalizando (Kotowski et al., 2011; Irannejad et al., 2013; 2014; 2015; Tsvetanova et al., 2014; 2015). Por lo tanto, es posible que el tratamiento con L-AP4 internalice parte de los receptores mGlu7 junto con el agonista, que seguirían inhibiendo la AC y la generación de cAMP, mientras que los receptores presentes en membrana permanecerían inactivos tras el lavado, y seguirían así hasta una segunda adición del agonista. No obstante, hay que señalar que la capacidad de los receptores mGlu7 de inhibir la entrada de Ca^{2+} inducida por altas concentraciones de potasio no se ve afectada por el tratamiento y lavado de L-AP4 (Martín et al., 2010), lo que parece ir en contra de la internalización masiva de estos receptores, aunque es posible que, aún en el caso de que se internalicen parte de los receptores, la población de éstos que permanezca en membrana sea suficiente para dar lugar a la inhibición de los VDCC. En el ratón carente de los canales N, que, tal como se ha discutido previamente, es posible que muestre una alteración en la localización subcelular de los receptores mGlu7, se conserva la capacidad de estos receptores de inhibir la generación de cAMP (Millán et al., 2002), pero no la de inhibir los VDCC (Martín et al., 2007). Por lo tanto, la localización de los receptores mGlu7 en la membrana de la zona activa podría no ser esencial para la inhibición de la AC. Por otra parte, la internalización de los receptores por su exposición prolongada al agonista (Pelkey et al., 2005; 2007; Lavazzari y Roche, 2008; Suh et al., 2008), en lugar de inducir su desensibilización (Pelkey et al., 2005), podría estar

relacionado con su acoplamiento a la vía de PLC y con la potenciación de la liberación. Esta hipótesis explicaría también porque los receptores continúan potenciando la liberación en ausencia del agonista (Fig 4.1). Por lo tanto, sería muy interesante estudiar si los receptores mGlu7 se internalizan en sinaptosomas y cómo afecta esta internalización al desarrollo de los mecanismos de inhibición y potenciación de la liberación de glutamato.

Sinergismo entre las vías de potenciación

La potenciación por los receptores mGlu7 depende de la activación de PLC (Martín et al., 2010) y probablemente de la proteína Munc13 (Fig 4.2; Martín et al., 2010), que promueve la colocación (Fig.4.3) y preparación de las SVs (Fig. 4.13) para su liberación. Por otra parte, los mecanismos de potenciación por β -AR también promueven el acercamiento de las SVs (Fig. 4.21), por mecanismos que implican PLC (4.17) y Munc13 (Fig 4.18 y 4.20), e incrementan la interacción entre las proteínas RIM y Rab3a (Fig. 4.19). Por lo tanto, ambos mecanismos involucran la modulación de PLC y probablemente del complejo Munc13-RIM-Rab3a. Dado que estos receptores se co-expresan e interaccionan en una subpoblación de terminales presinápticos (Fig. 4.26), y la inhibición de la generación de cAMP por receptores mGlu7 controla la vía de potenciación dependiente de receptores β -AR/Epac (Fig. 4.27), existía la posibilidad de que los mecanismos de potenciación asociados a estos dos receptores también presenten una interacción funcional.

La activación conjunta de ambos receptores (empleando L-AP4 e isoproterenol, Fig 5.3) dio lugar a una potenciación de la liberación equivalente a la suma de las potenciaciones individuales, sugiriendo que no existe interacción entre estas vías (Fig. 4.28). Sin embargo, el estudio en profundidad de esta respuesta demostró que la inhibición de la generación de cAMP por receptores mGlu7 persiste aún después del lavado del agonista de los mismos (Fig. 4.28). Así, la activación directa de Epac, de manera que la inhibición de la AC no afecta a la potenciación (empleando 8-pCPT o Sp8Br, Fig 5.3), resulta en una respuesta mayor que la suma de las potenciaciones individuales (Fig. 4.29). La activación conjunta de PKC y PKA promueve una potenciación resistente a TTx que depende de la modulación de los VDCC (Millán et al., 2003). Sin embargo, el sinergismo observado en la potenciación se desarrolla igualmente en presencia de las toxinas que bloquean los VDCC (Fig. 4.29), por lo que se puede descartar la activación suplementaria de la vía de potenciación dependiente de estas quinasas. Además, la interacción dependiente de los receptores mGlu7 y β -AR, no sólo se manifiesta en la liberación de glutamato, sino también en la activación de PLC y en la translocación de Munc13 (Fig. 4.30).

Tal como se ha discutido previamente, la potenciación dependiente de receptores mGlu7 es insensible a PTx (Martín et al., 2010), por lo que podría involucrar isoformas de PLC activadas directamente por proteínas Gq, como las familias β y η (Wang et al., 1999; 2000; Rhee et al., 2001; Suh et al., 2001). Por otra parte, la potenciación por Epac también depende de PLC, probablemente de la activación de la PLC ϵ por medio de Rap2B (Smrcka et al., 2011; Schmidt et al., 2002). Por lo tanto, podemos suponer que las vías de potenciación de los receptores mGlu7 y β -AR podrían depender de distintas isoformas de PLC. Esto explicaría porque no se observa el sinergismo en la actividad de PLC (Fig. 4.30), sugiriendo que la interacción entre las vías de potenciación ocurre en una etapa posterior en la cascada de señalización. Sin embargo, la supra-aditividad de las respectivas respuestas tampoco se observa en la translocación de la proteína Munc13 (Fig. 4.30). En este caso, es muy probable que la técnica presente limitaciones en cuanto a su sensibilidad para reflejar este tipo de fenómenos. Por lo tanto, sería muy interesante intentar abordar el estudio de la integración de la señalización de estas dos vías de potenciación sobre la proteína Munc13 empleando otras metodologías en el futuro.

Otros autores han mostrado que la activación prolongada de los receptores mGlu7 induce el desarrollo de fenómenos de LTP dependientes de cAMP (Pelkey et al., 2008). En este estudio, la activación prolongada de los receptores mGlu7 reduce su interacción con la proteína RIM y los ratones carentes de RIM1 α presentan deficiencias en estos procesos de LTP (Pelkey et al., 2008). La respuesta supra-aditiva por activación conjunta de las vías de potenciación dependientes de los receptores mGlu7 y β -AR podría estar relacionada con estos fenómenos. Así, los procesos de plasticidad propuestos (Pelkey et al., 2008) podrían ser un reflejo de estos mecanismos, sugiriendo que la activación conjunta de estas vías de potenciación podrían dar lugar a procesos de LTP. Además, teniendo en cuenta las numerosas interacciones de RIM con otras proteínas de la zona activa (Mittelstaedt et al., 2010), incluido con los VDCC (Kaesler et al., 2011), es difícil suponer que esta proteína altere su localización en estos procesos de plasticidad. Por lo tanto, la disminución en la interacción de esta proteína con los receptores mGlu7 (Pelkey et al., 2008), probablemente esté relacionada con cambios de la localización de los receptores, apoyando la idea de que los mecanismos de potenciación dependientes de mGlu7 pueden estar relacionados con el tráfico o internalización del receptor.

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto la capacidad de los receptores mGlu7 de controlar la potenciación dependiente de β -AR/Epac de manera bidireccional, pudiendo tanto inhibir estas respuestas potenciadoras, como confluir con las mismas, desarrollando potenciaciones de magnitud supra-aditiva. Por lo tanto, los receptores mGlu7 probablemente desempeñen un papel dual y de gran relevancia en la modulación de los mecanismos de plasticidad presinápticos dependientes de la maquinaria excitotóxica que participa en el proceso de preparación de las SVs para su liberación.

VI. CONCLUSIONES

Las principales conclusiones de esta Tesis Doctoral fueron:

1. El tiempo prolongado de activación de los receptores mGlu7, necesario para la potenciación de la liberación de glutamato, está asociado a acumulación de DAG.
2. La activación prolongada de los receptores mGlu7 posiblemente implica a la proteína Munc13-1, ya que aumenta la interacción entre las proteínas Munc13-1/RIM1 y el número de vesículas sinápticas cercanas a la zona activa.
3. La potenciación de la liberación de glutamato por receptores mGlu7, en corteza cerebral, se desarrolla únicamente en terminales que expresan VDCC de tipo N. Por otra parte, en hipocampo, se observa tanto en terminales sinápticos con VDCC de tipo N, como en terminales con canales de tipo P/Q.
4. La activación prolongada de los receptores mGlu de tipo III, en cultivos autápticos de neuronas de hipocampo, da lugar a la reversión de la inhibición de la liberación inducida y al incremento de frecuencia de la liberación espontánea, asociada al aumento del RRP.
5. Los receptores β -adrenérgicos potencian la liberación de glutamato activando la proteína Epac. Este mecanismo implica la activación de la fosfolipasa C, la translocación de Munc13-1, el incremento en las interacciones entre Rab3a/RIM1 y Munc13-1/RIM1, y del número de vesículas sinápticas cercanas a la zona activa.
6. La activación de los receptores β -adrenérgicos y de la proteína Epac, en cultivos primarios de neuronas corticales, induce un aumento de la liberación espontánea, la liberación inducida por despolarización y de las vesículas sinápticas preparadas para su liberación o RRP, regulando además la cinética de endocitosis.
7. El incremento de la liberación por la activación de los receptores β -adrenérgicos y de la proteína Epac, en cultivos primarios de neuronas corticales, es dependiente de la proteína RIM1 α y de la unión a DAG de la proteína Munc13-1.
8. Los receptores mGlu7 controlan el desarrollo de la potenciación dependiente de los receptores β -adrenérgicos y de la proteína Epac de manera bidireccional, inhibiéndola o dando lugar a una potenciación supra-aditiva.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Abe, T., H. Sugihara, H. Nawa, R. Shigemoto, N. Mizuno and S. Nakanishi (1992). "Molecular characterization of a novel metabotropic glutamate receptor mGluR5 coupled to inositol phosphate/Ca²⁺ signal transduction." *J Biol Chem* 267(19): 13361-13368.
- Abitbol, K., F. Acher and H. Daniel (2008). "Depression of excitatory transmission at PF-PC synapse by group III metabotropic glutamate receptors is provided exclusively by mGluR4 in the rodent cerebellar cortex." *J Neurochem* 105(6): 2069-2079.
- Abraham, P. A., G. Xing, L. Zhang, E. Z. Yu, R. Post, E. H. Gamble and H. Li (2008). "beta1- and beta2-adrenoceptor induced synaptic facilitation in rat basolateral amygdala." *Brain Res* 1209: 65-73.
- Ackermann, F., C. L. Waites and C. C. Garner (2015). "Presynaptic active zones in invertebrates and vertebrates." *EMBO Rep* 16(8): 923-938.
- Acuna, C., Q. Guo, J. Burre, M. Sharma, J. Sun and T. C. Sudhof (2014). "Microsecond dissection of neurotransmitter release: SNARE-complex assembly dictates speed and Ca²⁺(+) sensitivity." *Neuron* 82(5): 1088-1100.
- Acuna, C., X. Liu, A. Gonzalez and T. C. Sudhof (2015). "RIM-BPs Mediate Tight Coupling of Action Potentials to Ca²⁺-Triggered Neurotransmitter Release." *Neuron* 87(6): 1234-1247.
- Acuna-Goycolea, C., Y. Li and A. N. Van Den Pol (2004). "Group III metabotropic glutamate receptors maintain tonic inhibition of excitatory synaptic input to hypocretin/orexin neurons." *J Neurosci* 24(12): 3013-3022.
- Aiba, A., M. Kano, C. Chen, M. E. Stanton, G. D. Fox, K. Herrup, T. A. Zwingman and S. Tonegawa (1994). "Deficient cerebellar long-term depression and impaired motor learning in mGluR1 mutant mice." *Cell* 79(2): 377-388.
- Airas, J. M., H. Betz and O. El Far (2001). "PKC phosphorylation of a conserved serine residue in the C-terminus of group III metabotropic glutamate receptors inhibits calmodulin binding." *FEBS Lett* 494(1-2): 60-63.
- Akins, M. R., H. E. Berk-Rauch and J. R. Fallon (2009). "Presynaptic translation: stepping out of the postsynaptic shadow." *Front Neural Circuits* 3: 17.
- Alabi, A. A. and R. W. Tsien (2012). "Synaptic vesicle pools and dynamics." *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4(8): a013680.
- Alle, H., P. Jonas and J. R. Geiger (2001). "PTP and LTP at a hippocampal mossy fiber-interneuron synapse." *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(25): 14708-14713.
- Allen, V., P. Swigart, R. Cheung, S. Cockcroft and M. Katan (1997). "Regulation of inositol lipid-specific phospholipase c delta by changes in Ca²⁺ ion concentrations." *Biochem J* 327 (Pt 2): 545-552.
- Almahariq, M., T. Tsalkova, F. C. Mei, H. Chen, J. Zhou, S. K. Sastry, F. Schwede and X. Cheng (2013). "A novel EPAC-specific inhibitor suppresses pancreatic cancer cell migration and invasion." *Mol Pharmacol* 83(1): 122-128.
- Altinbilek, B. and D. Manahan-Vaughan (2007). "Antagonism of group III metabotropic glutamate receptors results in impairment of LTD but not LTP in the hippocampal CA1 region, and prevents long-term spatial memory." *Eur J Neurosci* 26(5): 1166-1172.
- Alvarez-Baron, E., K. Michel, T. Mittelstaedt, T. Opitz, F. Schmitz, H. Beck, D. Dietrich, A. J. Becker and S. Schoch (2013). "RIM3gamma and RIM4gamma are key regulators of neuronal arborization." *J Neurosci* 33(2): 824-839.
- Amalric, M., S. Lopez, C. Goudet, G. Fisone, G. Battaglia, F. Nicoletti, J. P. Pin and F. C. Acher (2013). "Group III and subtype 4 metabotropic glutamate receptor agonists: discovery and pathophysiological applications in Parkinson's disease." *Neuropharmacology* 66: 53-64.
- Anderson, C. M. and R. A. Swanson (2000). "Astrocyte glutamate transport: review of properties, regulation, and physiological functions." *Glia* 32(1): 1-14.
- Andrews-Zwilling, Y. S., H. Kawabe, K. Reim, F. Varoqueaux and N. Brose (2006). "Binding to Rab3A-interacting molecule RIM regulates the presynaptic recruitment of Munc13-1 and ubMunc13-2." *J Biol Chem* 281(28): 19720-19731.
- Angers, S., A. Salahpour, E. Joly, S. Hilairt, D. Chelsky, M. Dennis and M. Bouvier (2000). "Detection of beta 2-adrenergic receptor dimerization in living cells using bioluminescence resonance energy transfer (BRET)." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(7): 3684-3689.
- Anggono, V. and P. J. Robinson (2007). "Syndapin I and endophilin I bind overlapping proline-rich regions of dynamin I: role in synaptic vesicle endocytosis." *J Neurochem* 102(3): 931-943.
- Anson, J. and G. G. Collins (1987). "Possible presynaptic actions of 2-amino-4-phosphonobutyrate in rat olfactory cortex." *Br J Pharmacol* 91(4): 753-761.
- Aoki, C. and V. M. Pickel (1992). "C-terminal tail of beta-adrenergic receptors: immunocytochemical localization within astrocytes and their relation to catecholaminergic neurons in N. tractus solitarii and area postrema." *Brain Res* 571(1): 35-49.
- Aoki, C. and V. M. Pickel (1992). "Ultrastructural relations between beta-adrenergic receptors and catecholaminergic neurons." *Brain Res Bull* 29(3-4): 257-263.
- Aoki, C., B. A. Zemcik, C. D. Strader and V. M. Pickel (1989). "Cytoplasmic loop of beta-adrenergic receptors: synaptic and intracellular localization and relation to catecholaminergic neurons in the nuclei of the solitary tracts." *Brain Res* 493(2): 331-347.
- Aponte, Y., C. C. Lien, E. Reisinger and P. Jonas (2006). "Hyperpolarization-activated cation channels in fast-spiking interneurons of rat hippocampus." *J Physiol* 574(Pt 1): 229-243.
- Aravamudan, B., T. Fergestad, W. S. Davis, C. K. Rodesch and K. Broadie (1999). "Drosophila UNC-13 is essential for synaptic transmission." *Nat Neurosci* 2(11): 965-971.
- Arrieta-Cruz, I., J. Wang, C. Pavlides and G. M. Pasinetti (2010). "Carvedilol reestablishes long-term potentiation in a mouse model of Alzheimer's disease." *J Alzheimers Dis* 21(2): 649-654.
- Augustin, I., A. Betz, C. Herrmann, T. Jo and N. Brose (1999). "Differential expression of two novel Munc13 proteins in rat brain." *Biochem J* 337 (Pt 3): 363-371.

- Augustin, I., S. Korte, M. Rickmann, H. A. Kretschmar, T. C. Sudhof, J. W. Herms and N. Brose (2001). "The cerebellum-specific Munc13 isoform Munc13-3 regulates cerebellar synaptic transmission and motor learning in mice." *J Neurosci* 21(1): 10-17.
- Augustin, I., C. Rosenmund, T. C. Sudhof and N. Brose (1999). "Munc13-1 is essential for fusion competence of glutamatergic synaptic vesicles." *Nature* 400(6743): 457-461.
- Austin, P. J., M. J. Betts, M. Broadstock, M. J. O'Neill, S. N. Mitchell and S. Duty (2010). "Symptomatic and neuroprotective effects following activation of nigral group III metabotropic glutamate receptors in rodent models of Parkinson's disease." *Br J Pharmacol* 160(7): 1741-1753.
- Ayala, J. E., C. M. Niswender, Q. Luo, J. L. Banko and P. J. Conn (2008). "Group III mGluR regulation of synaptic transmission at the SC-CA1 synapse is developmentally regulated." *Neuropharmacology* 54(5): 804-814.
- Bacaj, T., D. Wu, J. Burre, R. C. Malenka, X. Liu and T. C. Sudhof (2015). "Synaptotagmin-1 and -7 Are Redundantly Essential for Maintaining the Capacity of the Readily-Releasable Pool of Synaptic Vesicles." *PLoS Biol* 13(10): e1002267.
- Bacaj, T., D. Wu, X. Yang, W. Morishita, P. Zhou, W. Xu, R. C. Malenka and T. C. Sudhof (2013). "Synaptotagmin-1 and synaptotagmin-7 trigger synchronous and asynchronous phases of neurotransmitter release." *Neuron* 80(4): 947-959.
- Backstrom, P. and P. Hyttia (2005). "Suppression of alcohol self-administration and cue-induced reinstatement of alcohol seeking by the mGlu2/3 receptor agonist LY379268 and the mGlu8 receptor agonist (S)-3,4-DCPG." *Eur J Pharmacol* 528(1-3): 110-118.
- Bahi, A., K. Fizia, M. Dietz, F. Gasparini and P. J. Flor (2012). "Pharmacological modulation of mGluR7 with AMN082 and MPMIP exerts specific influences on alcohol consumption and preference in rats." *Addict Biol* 17(2): 235-247.
- Balaji, J. and T. A. Ryan (2007). "Single-vesicle imaging reveals that synaptic vesicle exocytosis and endocytosis are coupled by a single stochastic mode." *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(51): 20576-20581.
- Barclay, J. W., T. J. Craig, R. J. Fisher, L. F. Ciufu, G. J. Evans, A. Morgan and R. D. Burgoyne (2003). "Phosphorylation of Munc18 by protein kinase C regulates the kinetics of exocytosis." *J Biol Chem* 278(12): 10538-10545.
- Barrie, A. P., D. G. Nicholls, J. Sanchez-Prieto and T. S. Sihra (1991). "An ion channel locus for the protein kinase C potentiation of transmitter glutamate release from guinea pig cerebrocortical synaptosomes." *J Neurochem* 57(4): 1398-1404.
- Baskys, A. and R. C. Malenka (1991). "Agonists at metabotropic glutamate receptors presynaptically inhibit EPSCs in neonatal rat hippocampus." *J Physiol* 444: 687-701.
- Basu, J., A. Betz, N. Brose and C. Rosenmund (2007). "Munc13-1 C1 domain activation lowers the energy barrier for synaptic vesicle fusion." *J Neurosci* 27(5): 1200-1210.
- Basu, J., N. Shen, I. Dulubova, J. Lu, R. Guan, O. Guryev, N. V. Grishin, C. Rosenmund and J. Rizo (2005). "A minimal domain responsible for Munc13 activity." *Nat Struct Mol Biol* 12(11): 1017-1018.
- Battaglia, G., C. L. Busceti, G. Molinaro, F. Biagioni, A. Traficante, F. Nicoletti and V. Bruno (2006). "Pharmacological activation of mGlu4 metabotropic glutamate receptors reduces nigrostriatal degeneration in mice treated with 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine." *J Neurosci* 26(27): 7222-7229.
- Bauer, C. S., R. J. Woolley, A. G. Teschemacher and E. P. Seward (2007). "Potentiation of exocytosis by phospholipase C-coupled G-protein-coupled receptors requires the priming protein Munc13-1." *J Neurosci* 27(1): 212-219.
- Beaumont, V., N. Zhong, R. C. Froemke, R. W. Ball and R. S. Zucker (2002). "Temporal synaptic tagging by I(h) activation and actin: involvement in long-term facilitation and cAMP-induced synaptic enhancement." *Neuron* 33(4): 601-613.
- Beaumont, V. and R. S. Zucker (2000). "Enhancement of synaptic transmission by cyclic AMP modulation of presynaptic I_h channels." *Nat Neurosci* 3(2): 133-141.
- Beguín, P., K. Nagashima, M. Nishimura, T. Gonoï and S. Seino (1999). "PKA-mediated phosphorylation of the human K(ATP) channel: separate roles of Kir6.2 and SUR1 subunit phosphorylation." *EMBO J* 18(17): 4722-4732.
- Beickert, Z. (1975). "[Classification, diagnosis, and therapy of immunological aspects of disease according to reaction types]." *Z Gesamte Inn Med* 30(18): 589-595.
- Beierlein, M., D. Fioravante and W. G. Regehr (2007). "Differential expression of posttetanic potentiation and retrograde signaling mediate target-dependent short-term synaptic plasticity." *Neuron* 54(6): 949-959.
- Bekkers, J. M. and C. F. Stevens (1991). "Excitatory and inhibitory autaptic currents in isolated hippocampal neurons maintained in cell culture." *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(17): 7834-7838.
- Bender, R. A., T. Kirschstein, O. Kretz, A. L. Brewster, C. Richichi, C. Ruschenschmidt, R. Shigemoto, H. Beck, M. Frotscher and T. Z. Baram (2007). "Localization of HCN1 channels to presynaptic compartments: novel plasticity that may contribute to hippocampal maturation." *J Neurosci* 27(17): 4697-4706.
- Bender, V. A., K. J. Bender, D. J. Brasier and D. E. Feldman (2006). "Two coincidence detectors for spike timing-dependent plasticity in somatosensory cortex." *J Neurosci* 26(16): 4166-4177.
- Bennett, M. K., N. Calakos and R. H. Scheller (1992). "Syntaxin: a synaptic protein implicated in docking of synaptic vesicles at presynaptic active zones." *Science* 257(5067): 255-259.
- Bennouar, K. E., M. A. Uberti, C. Melon, M. D. Bacolod, H. N. Jimenez, M. Cajina, L. Kerkerian-Le Goff, D. Doller and P. Gubellini (2013). "Synergy between L-DOPA and a novel positive allosteric modulator of metabotropic glutamate receptor 4: implications for Parkinson's disease treatment and dyskinesia." *Neuropharmacology* 66: 158-169.
- Bergles, D. E., V. A. Doze, D. V. Madison and S. J. Smith (1996). "Excitatory actions of norepinephrine on multiple classes of hippocampal CA1 interneurons." *J Neurosci* 16(2): 572-585.

- Berridge, C. W., B. E. Schmeichel and R. A. Espana (2012). "Noradrenergic modulation of wakefulness/arousal." *Sleep Med Rev* 16(2): 187-197.
- Berridge, M. J. (1998). "Neuronal calcium signaling." *Neuron* 21(1): 13-26.
- Bertaso, F., Y. Lill, J. M. Airas, J. Espeut, J. Blahos, J. Bockaert, L. Fagni, H. Betz and O. El-Far (2006). "MacMARCKS interacts with the metabotropic glutamate receptor type 7 and modulates G protein-mediated constitutive inhibition of calcium channels." *J Neurochem* 99(1): 288-298.
- Bertram, R., A. Sherman and E. F. Stanley (1996). "Single-domain/bound calcium hypothesis of transmitter release and facilitation." *J Neurophysiol* 75(5): 1919-1931.
- Best, A. R. and W. G. Regehr (2009). "Inhibitory regulation of electrically coupled neurons in the inferior olive is mediated by asynchronous release of GABA." *Neuron* 62(4): 555-565.
- Betts, M. J., M. J. O'Neill and S. Duty (2012). "Allosteric modulation of the group III mGlu4 receptor provides functional neuroprotection in the 6-hydroxydopamine rat model of Parkinson's disease." *Br J Pharmacol* 166(8): 2317-2330.
- Betz, A., U. Ashery, M. Rickmann, I. Augustin, E. Neher, T. C. Sudhof, J. Rettig and N. Brose (1998). "Munc13-1 is a presynaptic phorbol ester receptor that enhances neurotransmitter release." *Neuron* 21(1): 123-136.
- Betz, A., M. Okamoto, F. Benseler and N. Brose (1997). "Direct interaction of the rat unc-13 homologue Munc13-1 with the N terminus of syntaxin." *J Biol Chem* 272(4): 2520-2526.
- Betz, A., P. Thakur, H. J. Junge, U. Ashery, J. S. Rhee, V. Scheuss, C. Rosenmund, J. Rettig and N. Brose (2001). "Functional interaction of the active zone proteins Munc13-1 and RIM1 in synaptic vesicle priming." *Neuron* 30(1): 183-196.
- Beurrier, C., S. Lopez, D. Revy, C. Selvam, C. Goudet, M. Lherondel, P. Gubellini, L. Kerkerian-LeGoff, F. Acher, J. P. Pin and M. Amalric (2009). "Electrophysiological and behavioral evidence that modulation of metabotropic glutamate receptor 4 with a new agonist reverses experimental parkinsonism." *FASEB J* 23(10): 3619-3628.
- Biel, M., C. Wahl-Schott, S. Michalakis and X. Zong (2009). "Hyperpolarization-activated cation channels: from genes to function." *Physiol Rev* 89(3): 847-885.
- Billups, B., B. P. Graham, A. Y. Wong and I. D. Forsythe (2005). "Unmasking group III metabotropic glutamate autoreceptor function at excitatory synapses in the rat CNS." *J Physiol* 565(Pt 3): 885-896.
- Binotti, B., R. Jahn and J. J. Chua (2016). "Functions of Rab Proteins at Presynaptic Sites." *Cells* 5(1).
- Boczan, J., A. G. Leenders and Z. H. Sheng (2004). "Phosphorylation of syntrophin by cAMP-dependent protein kinase modulates its interaction with syntaxin-1 and annuls its inhibitory effect on vesicle exocytosis." *J Biol Chem* 279(18): 18911-18919.
- Bonci, A., P. Grillner, A. Siniscalchi, N. B. Mercuri and G. Bernardi (1997). "Glutamate metabotropic receptor agonists depress excitatory and inhibitory transmission on rat mesencephalic principal neurons." *Eur J Neurosci* 9(11): 2359-2369.
- Borland, G., M. Gupta, M. M. Magiera, C. J. Rundell, S. Fuld and S. J. Yarwood (2006). "Microtubule-associated protein 1B-light chain 1 enhances activation of Rap1 by exchange protein activated by cyclic AMP but not intracellular targeting." *Mol Pharmacol* 69(1): 374-384.
- Bouchard, R., R. Pattarini and J. D. Geiger (2003). "Presence and functional significance of presynaptic ryanodine receptors." *Prog Neurobiol* 69(6): 391-418.
- Boudin, H., A. Doan, J. Xia, R. Shigemoto, R. L. Huganir, P. Worley and A. M. Craig (2000). "Presynaptic clustering of mGluR7a requires the PICK1 PDZ domain binding site." *Neuron* 28(2): 485-497.
- Boyes, J., J. P. Bolam, R. Shigemoto and I. M. Stanford (2007). "Functional presynaptic HCN channels in the rat globus pallidus." *Eur J Neurosci* 25(7): 2081-2092.
- Bradley, S. R., H. D. Rees, H. Yi, A. I. Levey and P. J. Conn (1998). "Distribution and developmental regulation of metabotropic glutamate receptor 7a in rat brain." *J Neurochem* 71(2): 636-645.
- Bradley, S. R., D. G. Standaert, K. J. Rhodes, H. D. Rees, C. M. Testa, A. I. Levey and P. J. Conn (1999). "Immunohistochemical localization of subtype 4a metabotropic glutamate receptors in the rat and mouse basal ganglia." *J Comp Neurol* 407(1): 33-46.
- Branham, M. T., M. A. Bustos, G. A. De Blas, H. Rehmann, V. E. Zarelli, C. L. Trevino, A. Darszon, L. S. Mayorga and C. N. Tomes (2009). "Epac activates the small G proteins Rap1 and Rab3A to achieve exocytosis." *J Biol Chem* 284(37): 24825-24839.
- Branham, M. T., L. S. Mayorga and C. N. Tomes (2006). "Calcium-induced acrosomal exocytosis requires cAMP acting through a protein kinase A-independent, Epac-mediated pathway." *J Biol Chem* 281(13): 8656-8666.
- Breit, A., M. Lagace and M. Bouvier (2004). "Hetero-oligomerization between beta2- and beta3-adrenergic receptors generates a beta-adrenergic signaling unit with distinct functional properties." *J Biol Chem* 279(27): 28756-28765.
- Breustedt, J., A. Gundlfinger, F. Varoquaux, K. Reim, N. Brose and D. Schmitz (2010). "Munc13-2 differentially affects hippocampal synaptic transmission and plasticity." *Cereb Cortex* 20(5): 1109-1120.
- Breustedt, J., K. E. Vogt, R. J. Miller, R. A. Nicoll and D. Schmitz (2003). "Alpha1E-containing Ca2+ channels are involved in synaptic plasticity." *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(21): 12450-12455.
- Brodin, L. and O. Shupliakov (2006). "Giant reticulospinal synapse in lamprey: molecular links between active and periaxonal zones." *Cell Tissue Res* 326(2): 301-310.
- Brose, N., K. Hofmann, Y. Hata and T. C. Sudhof (1995). "Mammalian homologues of *Caenorhabditis elegans* unc-13 gene define novel family of C2-domain proteins." *J Biol Chem* 270(42): 25273-25280.
- Brose, N. and C. Rosenmund (2002). "Move over protein kinase C, you've got company: alternative cellular effectors of

- diacylglycerol and phorbol esters." *J Cell Sci* 115(Pt 23): 4399-4411.
- Brose, N., C. Rosenmund and J. Rettig (2000). "Regulation of transmitter release by Unc-13 and its homologues." *Curr Opin Neurobiol* 10(3): 303-311.
- Bruno, V., A. Copani, L. Bonanno, T. Knoepfel, R. Kuhn, P. J. Roberts and F. Nicoletti (1996). "Activation of group III metabotropic glutamate receptors is neuroprotective in cortical cultures." *Eur J Pharmacol* 310(1): 61-66.
- Bubis, J., J. J. Neitzel, L. D. Saraswat and S. S. Taylor (1988). "A point mutation abolishes binding of cAMP to site A in the regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase." *J Biol Chem* 263(20): 9668-9673.
- Bunemann, M., B. L. Gerhardstein, T. Gao and M. M. Hosey (1999). "Functional regulation of L-type calcium channels via protein kinase A-mediated phosphorylation of the beta(2) subunit." *J Biol Chem* 274(48): 33851-33854.
- Burgalossi, A., S. Jung, K. N. Man, R. Nair, W. J. Jockusch, S. M. Wojcik, N. Brose and J. S. Rhee (2012). "Analysis of neurotransmitter release mechanisms by photolysis of caged Ca(2)(+) in an autaptic neuron culture system." *Nat Protoc* 7(7): 1351-1365.
- Burre, J., M. Sharma and T. C. Sudhof (2014). "alpha-Synuclein assembles into higher-order multimers upon membrane binding to promote SNARE complex formation." *Proc Natl Acad Sci U S A* 111(40): E4274-4283.
- Burre, J., M. Sharma, T. Tsetsenis, V. Buchman, M. R. Etherton and T. C. Sudhof (2010). "Alpha-synuclein promotes SNARE-complex assembly in vivo and in vitro." *Science* 329(5999): 1663-1667.
- Burre, J., S. Vivona, J. Diao, M. Sharma, A. T. Brunger and T. C. Sudhof (2013). "Properties of native brain alpha-synuclein." *Nature* 498(7453): E4-6; discussion E6-7.
- Burrone, J., Z. Li and V. N. Murthy (2006). "Studying vesicle cycling in presynaptic terminals using the genetically encoded probe synaptopHluorin." *Nat Protoc* 1(6): 2970-2978.
- Bushell, T. J., D. E. Jane, H. W. Tse, J. C. Watkins, J. Garthwaite and G. L. Collingridge (1996). "Pharmacological antagonism of the actions of group II and III mGluR agonists in the lateral perforant path of rat hippocampal slices." *Br J Pharmacol* 117(7): 1457-1462.
- Bushell, T. J., G. Sansig, V. J. Collett, H. van der Putten and G. L. Collingridge (2002). "Altered short-term synaptic plasticity in mice lacking the metabotropic glutamate receptor mGlu7." *ScientificWorldJournal* 2: 730-737.
- Cabin, D. E., K. Shimazu, D. Murphy, N. B. Cole, W. Gottschalk, K. L. McIlwain, B. Orrison, A. Chen, C. E. Ellis, R. Paylor, B. Lu and R. L. Nussbaum (2002). "Synaptic vesicle depletion correlates with attenuated synaptic responses to prolonged repetitive stimulation in mice lacking alpha-synuclein." *J Neurosci* 22(20): 8797-8807.
- Cahill, L., C. A. Pham and B. Setlow (2000). "Impaired memory consolidation in rats produced with beta-adrenergic blockade." *Neurobiol Learn Mem* 74(3): 259-266.
- Cai, Z., J. A. Saugstad, S. D. Sorensen, K. J. Ciombor, C. Zhang, H. Schaffhauser, F. Hubalek, J. Pohl, R. M. Duvoisin and P. J. Conn (2001). "Cyclic AMP-dependent protein kinase phosphorylates group III metabotropic glutamate receptors and inhibits their function as presynaptic receptors." *J Neurochem* 78(4): 756-766.
- Caillard, O., Y. Ben-Ari and J. L. Gaiarsa (2000). "Activation of presynaptic and postsynaptic ryanodine-sensitive calcium stores is required for the induction of long-term depression at GABAergic synapses in the neonatal rat hippocampus." *J Neurosci* 20(17): RC94.
- Cain, S. M., H. J. Meadows, J. Dunlop and T. J. Bushell (2008). "mGlu4 potentiation of K(2P)2.1 is dependant on C-terminal dephosphorylation." *Mol Cell Neurosci* 37(1): 32-39.
- Cain, S. M. and T. P. Snutch (2011). "Voltage-gated calcium channels and disease." *Biofactors* 37(3): 197-205.
- Calakos, N., S. Schoch, T. C. Sudhof and R. C. Malenka (2004). "Multiple roles for the active zone protein RIM1alpha in late stages of neurotransmitter release." *Neuron* 42(6): 889-896.
- Calloway, N., G. Gouzer, M. Xue and T. A. Ryan (2015). "The active-zone protein Munc13 controls the use-dependence of presynaptic voltage-gated calcium channels." *Elife* 4.
- Cao, C. Q., H. W. Tse, D. E. Jane, R. H. Evans and P. M. Headley (1997). "Antagonism of mGlu receptors and potentiation of EPSCs at rat spinal motoneurons in vitro." *Neuropharmacology* 36(3): 313-318.
- Cao, P., X. Yang and T. C. Sudhof (2013). "Complexin activates exocytosis of distinct secretory vesicles controlled by different synaptotagmins." *J Neurosci* 33(4): 1714-1727.
- Capogna, M. (2004). "Distinct properties of presynaptic group II and III metabotropic glutamate receptor-mediated inhibition of perforant pathway-CA1 EPSCs." *Eur J Neurosci* 19(10): 2847-2858.
- Castillo, P. E. (2012). "Presynaptic LTP and LTD of excitatory and inhibitory synapses." *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4(2).
- Castillo, P. E., S. Schoch, F. Schmitz, T. C. Sudhof and R. C. Malenka (2002). "RIM1alpha is required for presynaptic long-term potentiation." *Nature* 415(6869): 327-330.
- Catterall, W. A. and A. P. Few (2008). "Calcium channel regulation and presynaptic plasticity." *Neuron* 59(6): 882-901.
- Chandra, S., G. Gallardo, R. Fernandez-Chacon, O. M. Schluter and T. C. Sudhof (2005). "Alpha-synuclein cooperates with CSPalpha in preventing neurodegeneration." *Cell* 123(3): 383-396.
- Chang, C. Y., X. Jiang, K. L. Moulder and S. Mennerick (2010). "Rapid activation of dormant presynaptic terminals by phorbol esters." *J Neurosci* 30(30): 10048-10060.
- Chang, S., K. Reim, M. Pedersen, E. Neher, N. Brose and H. Taschenberger (2015). "Complexin stabilizes newly primed synaptic vesicles and prevents their premature fusion at the mouse calyx of held synapse." *J Neurosci* 35(21): 8272-8290.
- Chapman, A. G., K. Nanan, P. Yip and B. S. Meldrum (1999). "Anticonvulsant activity of a metabotropic glutamate receptor 8

- preferential agonist, (R,S)-4-phosphonophenylglycine." *Eur J Pharmacol* 383(1): 23-27.
- Chapman, P. F., B. G. Frenguelli, A. Smith, C. M. Chen and A. J. Silva (1995). "The alpha-Ca²⁺/calmodulin kinase II: a bidirectional modulator of presynaptic plasticity." *Neuron* 14(3): 591-597.
- Chaudhari, N., A. M. Landin and S. D. Roper (2000). "A metabotropic glutamate receptor variant functions as a taste receptor." *Nat Neurosci* 3(2): 113-119.
- Chavis, P., L. Fagni, J. Bockaert and J. B. Lansman (1995). "Modulation of calcium channels by metabotropic glutamate receptors in cerebellar granule cells." *Neuropharmacology* 34(8): 929-937.
- Chavis, P., P. Mollard, J. Bockaert and O. Manzoni (1998). "Visualization of cyclic AMP-regulated presynaptic activity at cerebellar granule cells." *Neuron* 20(4): 773-781.
- Chen, C. Y., E. H. Ling Eh, J. M. Horowitz and A. C. Bonham (2002). "Synaptic transmission in nucleus tractus solitarius is depressed by Group II and III but not Group I presynaptic metabotropic glutamate receptors in rats." *J Physiol* 538(Pt 3): 773-786.
- Chen, H., T. Tsalkova, F. C. Mei, Y. Hu, X. Cheng and J. Zhou (2012). "5-Cyano-6-oxo-1,6-dihydro-pyrimidines as potent antagonists targeting exchange proteins directly activated by cAMP." *Bioorg Med Chem Lett* 22(12): 4038-4043.
- Chen, H., C. Wild, X. Zhou, N. Ye, X. Cheng and J. Zhou (2014). "Recent advances in the discovery of small molecules targeting exchange proteins directly activated by cAMP (EPAC)." *J Med Chem* 57(9): 3651-3665.
- Chen, Z., B. Das, Y. Nakamura, D. A. DiGregorio and S. M. Young, Jr. (2015). "Ca²⁺ channel to synaptic vesicle distance accounts for the readily releasable pool kinetics at a functionally mature auditory synapse." *J Neurosci* 35(5): 2083-2100.
- Cherezov, V., D. M. Rosenbaum, M. A. Hanson, S. G. Rasmussen, F. S. Thian, T. S. Kobilka, H. J. Choi, P. Kuhn, W. I. Weis, B. K. Kobilka and R. C. Stevens (2007). "High-resolution crystal structure of an engineered human beta2-adrenergic G protein-coupled receptor." *Science* 318(5854): 1258-1265.
- Cheung, U., H. L. Atwood and R. S. Zucker (2006). "Presynaptic effectors contributing to cAMP-induced synaptic potentiation in *Drosophila*." *J Neurobiol* 66(3): 273-280.
- Chevalleyre, V., B. D. Heifets, P. S. Kaeser, T. C. Sudhof and P. E. Castillo (2007). "Endocannabinoid-mediated long-term plasticity requires cAMP/PKA signaling and RIM1alpha." *Neuron* 54(5): 801-812.
- Chheda, M. G., U. Ashery, P. Thakur, J. Rettig and Z. H. Sheng (2001). "Phosphorylation of Snapin by PKA modulates its interaction with the SNARE complex." *Nat Cell Biol* 3(4): 331-338.
- Chiarlone, A., L. Bellocchio, C. Blazquez, E. Resel, E. Soria-Gomez, A. Cannich, J. J. Ferrero, O. Sagredo, C. Benito, J. Romero, J. Sanchez-Prieto, B. Lutz, J. Fernandez-Ruiz, I. Galve-Roperh and M. Guzman (2014). "A restricted population of CB1 cannabinoid receptors with neuroprotective activity." *Proc Natl Acad Sci U S A* 111(22): 8257-8262.
- Cho, R. W., L. K. Buhl, D. Volfson, A. Tran, F. Li, Y. Akbergenova and J. T. Littleton (2015). "Phosphorylation of Complexin by PKA Regulates Activity-Dependent Spontaneous Neurotransmitter Release and Structural Synaptic Plasticity." *Neuron* 88(4): 749-761.
- Choi, S. and D. M. Lovinger (1996). "Metabotropic glutamate receptor modulation of voltage-gated Ca²⁺ channels involves multiple receptor subtypes in cortical neurons." *J Neurosci* 16(1): 36-45.
- Chu, Y., D. Fioravante, M. Leitges and W. G. Regehr (2014). "Calcium-dependent PKC isoforms have specialized roles in short-term synaptic plasticity." *Neuron* 82(4): 859-871.
- Chu, Z. and S. M. Moenter (2005). "Endogenous activation of metabotropic glutamate receptors modulates GABAergic transmission to gonadotropin-releasing hormone neurons and alters their firing rate: a possible local feedback circuit." *J Neurosci* 25(24): 5740-5749.
- Chua, J. J., S. Kindler, J. Boyken and R. Jahn (2010). "The architecture of an excitatory synapse." *J Cell Sci* 123(Pt 6): 819-823.
- Cijsouw, T., J. P. Weber, J. H. Broeke, J. A. Broek, D. Schut, T. Kroon, I. Saarloos, M. Verhage and R. F. Toonen (2014). "Munc18-1 redistributes in nerve terminals in an activity- and PKC-dependent manner." *J Cell Biol* 204(5): 759-775.
- Cochilla, A. J. and S. Alford (1998). "Metabotropic glutamate receptor-mediated control of neurotransmitter release." *Neuron* 20(5): 1007-1016.
- Coleman, W. L., C. A. Bill and M. Bykhovskaia (2007). "Rab3a deletion reduces vesicle docking and transmitter release at the mouse diaphragm synapse." *Neuroscience* 148(1): 1-6.
- Conn, P. J. and J. P. Pin (1997). "Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 37: 205-237.
- Connor, S. A., S. Maity, B. Roy, D. W. Ali and P. V. Nguyen (2012). "Conversion of short-term potentiation to long-term potentiation in mouse CA1 by coactivation of beta-adrenergic and muscarinic receptors." *Learn Mem* 19(11): 535-542.
- Contractor, A., C. Mülle and G. T. Swanson (2011). "Kainate receptors coming of age: milestones of two decades of research." *Trends Neurosci* 34(3): 154-163.
- Coppola, T., S. Magnin-Luthi, V. Perret-Menoud, S. Gattesco, G. Schiavo and R. Regazzi (2001). "Direct interaction of the Rab3 effector RIM with Ca²⁺ channels, SNAP-25, and synaptotagmin." *J Biol Chem* 276(35): 32756-32762.
- Corlew, R., D. J. Brasier, D. E. Feldman and B. D. Philpot (2008). "Presynaptic NMDA receptors: newly appreciated roles in cortical synaptic function and plasticity." *Neuroscientist* 14(6): 609-625.
- Corti, C., L. Aldegheri, P. Somogyi and F. Ferraguti (2002). "Distribution and synaptic localisation of the metabotropic glutamate receptor 4 (mGluR4) in the rodent CNS." *Neuroscience* 110(3): 403-420.
- Corti, C., G. Battaglia, G. Molinaro, B. Rizzo, A. Pittaluga, M. Corsi, M. Mugnaini, F. Nicoletti and V. Bruno (2007). "The use of knock-out mice unravels distinct roles for mGlu2 and mGlu3

- metabotropic glutamate receptors in mechanisms of neurodegeneration/neuroprotection." *J Neurosci* 27(31): 8297-8308.
- Cosgrove, K. E., S. D. Meriney and G. Barrionuevo (2011). "High affinity group III mGluRs regulate mossy fiber input to CA3 interneurons." *Hippocampus* 21(12): 1302-1317.
- Cousin, M. A. and G. J. Evans (2011). "Activation of silent and weak synapses by cAMP-dependent protein kinase in cultured cerebellar granule neurons." *J Physiol* 589(Pt 8): 1943-1955.
- Cox, D. J., C. Racca and F. E. LeBeau (2008). "Beta-adrenergic receptors are differentially expressed in distinct interneuron subtypes in the rat hippocampus." *J Comp Neurol* 509(6): 551-565.
- Craig, T. J., G. J. Evans and A. Morgan (2003). "Physiological regulation of Munc18/nSec1 phosphorylation on serine-313." *J Neurochem* 86(6): 1450-1457.
- Crawford, D. C., X. Jiang, A. Taylor, K. L. Moulder and S. Mennerick (2012). "Differential requirement for protein synthesis in presynaptic unmuting and muting in hippocampal glutamate terminals." *PLoS One* 7(12): e51930.
- Crawford, D. C. and S. Mennerick (2012). "Presynaptically silent synapses: dormancy and awakening of presynaptic vesicle release." *Neuroscientist* 18(3): 216-223.
- Cremona, O., G. Di Paolo, M. R. Wenk, A. Luthi, W. T. Kim, K. Takei, L. Daniell, Y. Nemoto, S. B. Shears, R. A. Flavell, D. A. McCormick and P. De Camilli (1999). "Essential role of phosphoinositide metabolism in synaptic vesicle recycling." *Cell* 99(2): 179-188.
- Croise, P., C. Estay-Ahumada, S. Gasman and S. Ory (2014). "Rho GTPases, phosphoinositides, and actin: a tripartite framework for efficient vesicular trafficking." *Small GTPases* 5: e29469.
- Cryan, J. F., P. H. Kelly, H. C. Neijt, G. Sansig, P. J. Flor and H. van Der Putten (2003). "Antidepressant and anxiolytic-like effects in mice lacking the group III metabotropic glutamate receptor mGluR7." *Eur J Neurosci* 17(11): 2409-2417.
- Cuomo, D., G. Martella, E. Barabino, P. Platania, D. Vita, G. Madeo, C. Selvam, C. Goudet, N. Oueslati, J. P. Pin, F. Acher, A. Pisani, C. Beurrier, C. Melon, L. Kerkerian-Le Goff and P. Gubellini (2009). "Metabotropic glutamate receptor subtype 4 selectively modulates both glutamate and GABA transmission in the striatum: implications for Parkinson's disease treatment." *J Neurochem* 109(4): 1096-1105.
- Cussac, D., S. Schaak, C. Gales, C. Flordellis, C. Denis and H. Paris (2002). "alpha(2B)-Adrenergic receptors activate MAPK and modulate proliferation of primary cultured proximal tubule cells." *Am J Physiol Renal Physiol* 282(5): F943-952.
- Daaka, Y., L. M. Luttrell and R. J. Lefkowitz (1997). "Switching of the coupling of the beta2-adrenergic receptor to different G proteins by protein kinase A." *Nature* 390(6655): 88-91.
- Dai, H., D. R. Tomchick, J. Garcia, T. C. Sudhof, M. Machius and J. Rizo (2005). "Crystal structure of the RIM2 C2A-domain at 1.4 Å resolution." *Biochemistry* 44(41): 13533-13542.
- Dani, A., B. Huang, J. Bergan, C. Dulac and X. Zhuang (2010). "Superresolution imaging of chemical synapses in the brain." *Neuron* 68(5): 843-856.
- Daniel, H. and F. Crepel (2001). "Control of Ca(2+) influx by cannabinoid and metabotropic glutamate receptors in rat cerebellar cortex requires K(+) channels." *J Physiol* 537(Pt 3): 793-800.
- David, H. N. and J. H. Abraini (2003). "Blockade of the locomotor stimulant effects of amphetamine by group I, group II, and group III metabotropic glutamate receptor ligands in the rat nucleus accumbens: possible interactions with dopamine receptors." *Neuropharmacology* 44(6): 717-727.
- Davis, M. J., R. M. Duvoisin and J. Raber (2013). "Related functions of mGlu4 and mGlu8." *Pharmacol Biochem Behav* 111: 11-16.
- Davletov, B. A. and T. C. Sudhof (1993). "A single C2 domain from synaptotagmin I is sufficient for high affinity Ca2+/phospholipid binding." *J Biol Chem* 268(35): 26386-26390.
- Daw, M. I., L. Tricoire, F. Erdelyi, G. Szabo and C. J. McBain (2009). "Asynchronous transmitter release from cholecystokinin-containing inhibitory interneurons is widespread and target-cell independent." *J Neurosci* 29(36): 11112-11122.
- De Camilli, P., K. Takei and P. S. McPherson (1995). "The function of dynamin in endocytosis." *Curr Opin Neurobiol* 5(5): 559-565.
- de Jong, A. P. and M. Verhage (2009). "Presynaptic signal transduction pathways that modulate synaptic transmission." *Curr Opin Neurobiol* 19(3): 245-253.
- de Jong, A.P., Meijer M, Saarloos I, Cornelisse LN, Toonen RF, Sørensen JB, Verhage M (2016). "Phosphorylation of synaptotagmin-1 controls a post-priming step in PKC-dependent presynaptic plasticity." *PNAS*.
- de Rooij, J., H. Rehmann, M. van Triest, R. H. Cool, A. Wittinghofer and J. L. Bos (2000). "Mechanism of regulation of the Epac family of cAMP-dependent RapGEFs." *J Biol Chem* 275(27): 20829-20836.
- de Rooij, J., F. J. Zwartkruis, M. H. Verheijen, R. H. Cool, S. M. Nijman, A. Wittinghofer and J. L. Bos (1998). "Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP." *Nature* 396(6710): 474-477.
- de Vries, K. J., A. Geijtenbeek, E. C. Brian, P. N. de Graan, W. E. Ghijsen and M. Verhage (2000). "Dynamics of munc18-1 phosphorylation/dephosphorylation in rat brain nerve terminals." *Eur J Neurosci* 12(1): 385-390.
- Debanne, D., N. C. Guerineau, B. H. Gähwiler and S. M. Thompson (1996). "Paired-pulse facilitation and depression at unitary synapses in rat hippocampus: quantal fluctuation affects subsequent release." *J Physiol* 491 (Pt 1): 163-176.
- Debiec, J. and J. E. LeDoux (2006). "Noradrenergic signaling in the amygdala contributes to the reconsolidation of fear memory: treatment implications for PTSD." *Ann N Y Acad Sci* 1071: 521-524.

- Deken, S. L., R. Vincent, G. Hadwiger, Q. Liu, Z. W. Wang and M. L. Nonet (2005). "Redundant localization mechanisms of RIM and ELKS in *Caenorhabditis elegans*." *J Neurosci* 25(25): 5975-5983.
- Delaney, K. R., R. S. Zucker and D. W. Tank (1989). "Calcium in motor nerve terminals associated with posttetanic potentiation." *J Neurosci* 9(10): 3558-3567.
- Deng, L., P. S. Kaeser, W. Xu and T. C. Sudhof (2011). "RIM proteins activate vesicle priming by reversing autoinhibitory homodimerization of Munc13." *Neuron* 69(2): 317-331.
- Dev, K. K., Y. Nakajima, J. Kitano, S. P. Braithwaite, J. M. Henley and S. Nakanishi (2000). "PICK1 interacts with and regulates PKC phosphorylation of mGLUR7." *J Neurosci* 20(19): 7252-7257.
- Dev, K. K., S. Nakanishi and J. M. Henley (2001). "Regulation of mglu(7) receptors by proteins that interact with the intracellular C-terminus." *Trends Pharmacol Sci* 22(7): 355-361.
- Diao, J., J. Burre, S. Vivona, D. J. Cipriano, M. Sharma, M. Kyoung, T. C. Sudhof and A. T. Brunger (2013). "Native alpha-synuclein induces clustering of synaptic-vesicle mimics via binding to phospholipids and synaptobrevin-2/VAMP2." *Elife* 2: e00592.
- Diao, J., D. J. Cipriano, M. Zhao, Y. Zhang, S. Shah, M. S. Padolina, R. A. Pfuetzner and A. T. Brunger (2013). "Complexin-1 enhances the on-rate of vesicle docking via simultaneous SNARE and membrane interactions." *J Am Chem Soc* 135(41): 15274-15277.
- Diao, J., Z. Su, X. Lu, T. Y. Yoon, Y. K. Shin and T. Ha (2010). "Single-Vesicle Fusion Assay Reveals Munc18-1 Binding to the SNARE Core Is Sufficient for Stimulating Membrane Fusion." *ACS Chem Neurosci* 1(3): 168-174.
- Dietrich, D., H. Beck, T. Kral, H. Clusmann, C. E. Elger and J. Schramm (1997). "Metabotropic glutamate receptors modulate synaptic transmission in the perforant path: pharmacology and localization of two distinct receptors." *Brain Res* 767(2): 220-227.
- Dietrich, D., T. Kirschstein, M. Kukley, A. Pereverzev, C. von der Brélie, T. Schneider and H. Beck (2003). "Functional specialization of presynaptic Cav2.3 Ca²⁺ channels." *Neuron* 39(3): 483-496.
- Dimova, K., S. Kalkhof, I. Pottratz, C. Ihling, F. Rodriguez-Castaneda, T. Liepold, C. Griesinger, N. Brose, A. Sinz and O. Jahn (2009). "Structural insights into the calmodulin-Munc13 interaction obtained by cross-linking and mass spectrometry." *Biochemistry* 48(25): 5908-5921.
- Dimova, K., H. Kawabe, A. Betz, N. Brose and O. Jahn (2006). "Characterization of the Munc13-calmodulin interaction by photoaffinity labeling." *Biochim Biophys Acta* 1763(11): 1256-1265.
- Diniz, E. M. and F. A. Vaz (1982). "[Respiratory distress syndrome (hyaline membrane disease)]." *Rev Paul Med* 99(3): 22-28.
- Dityatev, A., M. Schachner and P. Sonderegger (2010). "The dual role of the extracellular matrix in synaptic plasticity and homeostasis." *Nat Rev Neurosci* 11(11): 735-746.
- Do Monte, F. H., N. S. Canteras, D. Fernandes, J. Assreuy and A. P. Carobrez (2008). "New perspectives on beta-adrenergic mediation of innate and learned fear responses to predator odor." *J Neurosci* 28(49): 13296-13302.
- Dodge-Kafka, K. L., J. Soughayer, G. C. Pare, J. J. Carlisle Michel, L. K. Langeberg, M. S. Kapiloff and J. D. Scott (2005). "The protein kinase A anchoring protein mAKAP coordinates two integrated cAMP effector pathways." *Nature* 437(7058): 574-578.
- Domin, H., K. Golembiowska, D. Jantas, K. Kaminska, B. Zieba and M. Smialowska (2014). "Group III mGlu receptor agonist, ACPT-I, exerts potential neuroprotective effects in vitro and in vivo." *Neurotox Res* 26(1): 99-113.
- Doumazane, E., P. Scholler, J. M. Zwier, E. Trinquet, P. Rondard and J. P. Pin (2011). "A new approach to analyze cell surface protein complexes reveals specific heterodimeric metabotropic glutamate receptors." *FASEB J* 25(1): 66-77.
- Doze, V. A., G. A. Cohen and D. V. Madison (1991). "Synaptic localization of adrenergic disinhibition in the rat hippocampus." *Neuron* 6(6): 889-900.
- Drake, M. T., S. K. Shenoy and R. J. Lefkowitz (2006). "Trafficking of G protein-coupled receptors." *Circ Res* 99(6): 570-582.
- Duguid, I. and P. J. Sjöström (2006). "Novel presynaptic mechanisms for coincidence detection in synaptic plasticity." *Curr Opin Neurobiol* 16(3): 312-322.
- Dulubova, I., M. Khvotchev, S. Liu, I. Huryeva, T. C. Sudhof and J. Rizo (2007). "Munc18-1 binds directly to the neuronal SNARE complex." *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(8): 2697-2702.
- Dulubova, I., X. Lou, J. Lu, I. Huryeva, A. Alam, R. Schneggenburger, T. C. Sudhof and J. Rizo (2005). "A Munc13/RIM/Rab3 tripartite complex: from priming to plasticity?" *EMBO J* 24(16): 2839-2850.
- Dulubova, I., S. Sugita, S. Hill, M. Hosaka, I. Fernandez, T. C. Sudhof and J. Rizo (1999). "A conformational switch in syntaxin during exocytosis: role of munc18." *EMBO J* 18(16): 4372-4382.
- Dunkley, P. R., P. E. Jarvie, J. W. Heath, G. J. Kidd and J. A. Rostas (1986). "A rapid method for isolation of synaptosomes on Percoll gradients." *Brain Res* 372(1): 115-129.
- Dunkley, P. R., P. E. Jarvie and P. J. Robinson (2008). "A rapid Percoll gradient procedure for preparation of synaptosomes." *Nat Protoc* 3(11): 1718-1728.
- Dunlap, K., J. I. Luebke and T. J. Turner (1995). "Exocytotic Ca²⁺ channels in mammalian central neurons." *Trends Neurosci* 18(2): 89-98.
- Durand, D., C. Caruso, L. Carniglia and M. Lasaga (2010). "Metabotropic glutamate receptor 3 activation prevents nitric oxide-induced death in cultured rat astrocytes." *J Neurochem* 112(2): 420-433.
- Dutta, D. and J. G. Donaldson (2015). "Sorting of Clathrin-Independent Cargo Proteins Depends on Rab35 Delivered by Clathrin-Mediated Endocytosis." *Traffic* 16(9): 994-1009.
- Duvoisin, R. M., T. Pfankuch, J. M. Wilson, J. Grabell, V. Chhajlani, D. G. Brown, E. Johnson and J. Raber (2010). "Acute

- pharmacological modulation of mGluR8 reduces measures of anxiety." *Behav Brain Res* 212(2): 168-173.
- Duvoisin, R. M., C. Zhang, T. F. Pfankuch, H. O'Connor, J. Gayet-Primo, S. Quraishi and J. Raber (2005). "Increased measures of anxiety and weight gain in mice lacking the group III metabotropic glutamate receptor mGluR8." *Eur J Neurosci* 22(2): 425-436.
- Dzhura, I., O. G. Chepurny, C. A. Leech, M. W. Roe, E. Dzhura, X. Xu, Y. Lu, F. Schwede, H. G. Genieser, A. V. Smrcka and G. G. Holz (2011). "Phospholipase C-epsilon links Epac2 activation to the potentiation of glucose-stimulated insulin secretion from mouse islets of Langerhans." *Islets* 3(3): 121-128.
- Edwards, R. H. (2007). "The neurotransmitter cycle and quantal size." *Neuron* 55(6): 835-858.
- Eijkelpamp, N., H. Wang, A. Garza-Carbajal, H. L. Willems, F. J. Zwartkruis, J. N. Wood, R. Dantzer, K. W. Kelley, C. J. Heijnen and A. Kavelaars (2010). "Low nociceptor GRK2 prolongs prostaglandin E2 hyperalgesia via biased cAMP signaling to Epac/Rap1, protein kinase Cepsilon, and MEK/ERK." *J Neurosci* 30(38): 12806-12815.
- El Far, O., J. Airas, E. Wischmeyer, R. B. Nehring, A. Karschin and H. Betz (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(12): 4215-4221.
- El Far, O. and H. Betz (2002). "G-protein-coupled receptors for neurotransmitter amino acids: C-terminal tails, crowded signalosomes." *Biochem J* 365(Pt 2): 329-336.
- Elezgarai, I., R. Benitez, J. M. Mateos, E. Lazaro, A. Osorio, J. J. Azkue, A. Bilbao, K. Lingenhoehl, H. Van Der Putten, D. R. Hampson, R. Kuhn, T. Knopfel and P. Grandes (1999). "Developmental expression of the group III metabotropic glutamate receptor mGluR4a in the medial nucleus of the trapezoid body of the rat." *J Comp Neurol* 411(3): 431-440.
- Enserink, J. M., A. E. Christensen, J. de Rooij, M. van Triest, F. Schwede, H. G. Genieser, S. O. Doskeland, J. L. Blank and J. L. Bos (2002). "A novel Epac-specific cAMP analogue demonstrates independent regulation of Rap1 and ERK." *Nat Cell Biol* 4(11): 901-906.
- Enz, R. (2002). "The actin-binding protein Filamin-A interacts with the metabotropic glutamate receptor type 7." *FEBS Lett* 514(2-3): 184-188.
- Enz, R. (2002). "The metabotropic glutamate receptor mGluR7b binds to the catalytic gamma-subunit of protein phosphatase 1." *J Neurochem* 81(5): 1130-1140.
- Enz, R. (2007). "The trick of the tail: protein-protein interactions of metabotropic glutamate receptors." *Bioessays* 29(1): 60-73.
- Enz, R. and C. Croci (2003). "Different binding motifs in metabotropic glutamate receptor type 7b for filamin A, protein phosphatase 1C, protein interacting with protein kinase C (PICK) 1 and syntenin allow the formation of multimeric protein complexes." *Biochem J* 372(Pt 1): 183-191.
- Erdmann, E., V. Rupprecht, E. Matthews, M. Kukley, S. Schoch and D. Dietrich (2012). "Depression of release by mGluR8 alters Ca²⁺ dependence of release machinery." *Cereb Cortex* 22(7): 1498-1509.
- Essen, L. O., O. Perisic, R. Cheung, M. Katan and R. L. Williams (1996). "Crystal structure of a mammalian phosphoinositide-specific phospholipase C delta." *Nature* 380(6575): 595-602.
- Evans, D. I., R. S. Jones and G. Woodhall (2000). "Activation of presynaptic group III metabotropic receptors enhances glutamate release in rat entorhinal cortex." *J Neurophysiol* 83(5): 2519-2525.
- Evans, G. J. and A. Morgan (2002). "Phosphorylation-dependent interaction of the synaptic vesicle proteins cysteine string protein and synaptotagmin I." *Biochem J* 364(Pt 2): 343-347.
- Evans, G. J., M. C. Wilkinson, M. E. Graham, K. M. Turner, L. H. Chamberlain, R. D. Burgoyne and A. Morgan (2001). "Phosphorylation of cysteine string protein by protein kinase A. Implications for the modulation of exocytosis." *J Biol Chem* 276(51): 47877-47885.
- Fadool, D. A., K. Tucker, J. J. Phillips and J. A. Simmen (2000). "Brain insulin receptor causes activity-dependent current suppression in the olfactory bulb through multiple phosphorylation of Kv1.3." *J Neurophysiol* 83(4): 2332-2348.
- Fedchyshyn, M. J. and L. Y. Wang (2005). "Developmental transformation of the release modality at the calyx of Held synapse." *J Neurosci* 25(16): 4131-4140.
- Feil, R. and T. Kleppisch (2008). "NO/cGMP-dependent modulation of synaptic transmission." *Handb Exp Pharmacol*(184): 529-560.
- Fendt, M., S. Imobersteg, D. Peterlik, F. Chaperon, C. Mattes, C. Wittmann, H. R. Olpe, J. Mosbacher, I. Vranesic, H. van der Putten, K. H. McAllister, P. J. Flor and C. E. Gee (2013). "Differential roles of mGlu(7) and mGlu(8) in amygdala-dependent behavior and physiology." *Neuropharmacology* 72: 215-223.
- Ferguson, S. M., G. Brasnjo, M. Hayashi, M. Wolfel, C. Collesi, S. Giovedi, A. Raimondi, L. W. Gong, P. Ariel, S. Paradise, E. O'Toole, R. Flavell, O. Cremona, G. Miesenbock, T. A. Ryan and P. De Camilli (2007). "A selective activity-dependent requirement for dynamin 1 in synaptic vesicle endocytosis." *Science* 316(5824): 570-574.
- Ferguson, S. S. (2001). "Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling." *Pharmacol Rev* 53(1): 1-24.
- Fernandes, H. B., S. Riordan, T. Nomura, C. L. Remmers, S. Kraniotis, J. J. Marshall, L. Kukreja, R. Vassar and A. Contractor (2015). "Epac2 Mediates cAMP-Dependent Potentiation of Neurotransmission in the Hippocampus." *J Neurosci* 35(16): 6544-6553.
- Fernandez-Busnadiego, R., S. Asano, A. M. Oprisoreanu, E. Sakata, M. Doengi, Z. Kochovski, M. Zurner, V. Stein, S. Schoch, W. Baumeister and V. Lucic (2013). "Cryo-electron tomography reveals a critical role of RIM1alpha in synaptic vesicle tethering." *J Cell Biol* 201(5): 725-740.
- Fernandez-Busnadiego, R., B. Zuber, U. E. Maurer, M. Cyrklaff, W. Baumeister and V. Lucic (2010). "Quantitative analysis of the native presynaptic cytomatrix by cryoelectron tomography." *J Cell Biol* 188(1): 145-156.

- Fernandez-Chacon, R., A. Konigstorfer, S. H. Gerber, J. Garcia, M. F. Matos, C. F. Stevens, N. Brose, J. Rizo, C. Rosenmund and T. C. Sudhof (2001). "Synaptotagmin I functions as a calcium regulator of release probability." *Nature* 410(6824): 41-49.
- Ferraguti, F., T. Klausberger, P. Cobden, A. Baude, J. D. Roberts, P. Szucs, A. Kinoshita, R. Shigemoto, P. Somogyi and Y. Dalezios (2005). "Metabotropic glutamate receptor 8-expressing nerve terminals target subsets of GABAergic neurons in the hippocampus." *J Neurosci* 25(45): 10520-10536.
- Finley, M. F., R. H. Scheller and D. V. Madison (2003). "SNAP-25 Ser187 does not mediate phorbol ester enhancement of hippocampal synaptic transmission." *Neuropharmacology* 45(6): 857-862.
- Fioravante, D., Y. Chu, M. H. Myoga, M. Leitges and W. G. Regehr (2011). "Calcium-dependent isoforms of protein kinase C mediate posttetanic potentiation at the calyx of Held." *Neuron* 70(5): 1005-1019.
- Fitzjohn, S. M., A. J. Irving, M. J. Palmer, J. Harvey, D. Lodge and G. L. Collingridge (1996). "Activation of group I mGluRs potentiates NMDA responses in rat hippocampal slices." *Neurosci Lett* 203(3): 211-213.
- Fiumara, F., S. Giovedi, A. Menegon, C. Milanese, D. Merlo, P. G. Montarolo, F. Valtorta, F. Benfenati and M. Ghirardi (2004). "Phosphorylation by cAMP-dependent protein kinase is essential for synapsin-induced enhancement of neurotransmitter release in invertebrate neurons." *J Cell Sci* 117(Pt 21): 5145-5154.
- Fiumara, F., C. Milanese, A. Corradi, S. Giovedi, G. Leitinger, A. Menegon, P. G. Montarolo, F. Benfenati and M. Ghirardi (2007). "Phosphorylation of synapsin domain A is required for post-tetanic potentiation." *J Cell Sci* 120(Pt 18): 3228-3237.
- Folbergrova, J., R. Druga, R. Haugvicova, P. Mares and J. Otahal (2008). "Anticonvulsant and neuroprotective effect of (S)-3,4-dicarboxyphenylglycine against seizures induced in immature rats by homocysteic acid." *Neuropharmacology* 54(4): 665-675.
- Folbergrova, J., R. Haugvicova and P. Mares (2003). "Seizures induced by homocysteic acid in immature rats are prevented by group III metabotropic glutamate receptor agonist (R,S)-4-phosphonophenylglycine." *Exp Neurol* 180(1): 46-54.
- Foletti, D. L., J. T. Blitzer and R. H. Scheller (2001). "Physiological modulation of rabphilin phosphorylation." *J Neurosci* 21(15): 5473-5483.
- Foote, S. L., F. E. Bloom and G. Aston-Jones (1983). "Nucleus locus ceruleus: new evidence of anatomical and physiological specificity." *Physiol Rev* 63(3): 844-914.
- Fotuhi, M., A. H. Sharp, C. E. Glatt, P. M. Hwang, M. von Krosigk, S. H. Snyder and T. M. Dawson (1993). "Differential localization of phosphoinositide-linked metabotropic glutamate receptor (mGluR1) and the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor in rat brain." *J Neurosci* 13(5): 2001-2012.
- Fourcaudot, E., F. Gambino, G. Casassus, B. Poulain, Y. Humeau and A. Luthi (2009). "L-type voltage-dependent Ca(2+) channels mediate expression of presynaptic LTP in amygdala." *Nat Neurosci* 12(9): 1093-1095.
- Fourcaudot, E., F. Gambino, Y. Humeau, G. Casassus, H. Shaban, B. Poulain and A. Luthi (2008). "cAMP/PKA signaling and RIM1alpha mediate presynaptic LTP in the lateral amygdala." *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(39): 15130-15135.
- Francesconi, A. and R. M. Duvoisin (2004). "Divalent cations modulate the activity of metabotropic glutamate receptors." *J Neurosci Res* 75(4): 472-479.
- Francis, S. H. and J. D. Corbin (1994). "Structure and function of cyclic nucleotide-dependent protein kinases." *Annu Rev Physiol* 56: 237-272.
- Fredj, N. B. and J. Burrone (2009). "A resting pool of vesicles is responsible for spontaneous vesicle fusion at the synapse." *Nat Neurosci* 12(6): 751-758.
- Friedman, J. I., D. G. Stewart and J. M. Gorman (2004). "Potential noradrenergic targets for cognitive enhancement in schizophrenia." *CNS Spectr* 9(5): 350-355.
- Fujimoto, K., T. Shibasaki, N. Yokoi, Y. Kashima, M. Matsumoto, T. Sasaki, N. Tajima, T. Iwanaga and S. Seino (2002). "Piccolo, a Ca2+ sensor in pancreatic beta-cells. Involvement of cAMP-GEFII.Rim2. Piccolo complex in cAMP-dependent exocytosis." *J Biol Chem* 277(52): 50497-50502.
- Fykse, E. M., C. Li and T. C. Sudhof (1995). "Phosphorylation of rabphilin-3A by Ca2+/calmodulin- and cAMP-dependent protein kinases in vitro." *J Neurosci* 15(3 Pt 2): 2385-2395.
- Gallardo, G., O. M. Schluter and T. C. Sudhof (2008). "A molecular pathway of neurodegeneration linking alpha-synuclein to ApoE and Abeta peptides." *Nat Neurosci* 11(3): 301-308.
- Galvan, E. J., E. Calixto and G. Barrionuevo (2008). "Bidirectional Hebbian plasticity at hippocampal mossy fiber synapses on CA3 interneurons." *J Neurosci* 28(52): 14042-14055.
- Galvan, E. J., K. E. Cosgrove, J. C. Mauna, J. P. Card, E. Thiels, S. D. Meriney and G. Barrionuevo (2010). "Critical involvement of postsynaptic protein kinase activation in long-term potentiation at hippocampal mossy fiber synapses on CA3 interneurons." *J Neurosci* 30(8): 2844-2855.
- Gandhi, C. R. and D. H. Ross (1987). "Inositol 1,4,5-trisphosphate induced mobilization of Ca2+ from rat brain synaptosomes." *Neurochem Res* 12(1): 67-72.
- Gao, T., A. Yatani, M. L. Dell'Acqua, H. Sako, S. A. Green, N. Dascal, J. D. Scott and M. M. Hosey (1997). "cAMP-dependent regulation of cardiac L-type Ca2+ channels requires membrane targeting of PKA and phosphorylation of channel subunits." *Neuron* 19(1): 185-196.
- Gasparini, F., V. Bruno, G. Battaglia, S. Lukic, T. Leonhardt, W. Inderbitzin, D. Laurie, B. Sommer, M. A. Varney, S. D. Hess, E. C. Johnson, R. Kuhn, S. Urwyler, D. Sauer, C. Portet, M. Schmutz, F. Nicoletti and P. J. Flor (1999). "(R,S)-4-phosphonophenylglycine, a potent and selective group III metabotropic glutamate receptor agonist, is anticonvulsant and neuroprotective in vivo." *J Pharmacol Exp Ther* 289(3): 1678-1687.
- Gean, P. W., C. C. Huang, J. H. Lin and J. J. Tsai (1992). "Sustained enhancement of NMDA receptor-mediated synaptic potential by isoproterenol in rat amygdala slices." *Brain Res* 594(2): 331-334.

- Gee, C. E., D. Peterlik, C. Neuhauser, R. Bouhelal, K. Kaupmann, G. Laue, N. Uschold-Schmidt, D. Feuerbach, K. Zimmermann, S. Ofner, J. F. Cryan, H. van der Putten, M. Fendt, I. Vranesic, R. Glatthar and P. J. Flor (2014). "Blocking metabotropic glutamate receptor subtype 7 (mGlu7) via the Venus flytrap domain (VFTD) inhibits amygdala plasticity, stress, and anxiety-related behavior." *J Biol Chem* 289(16): 10975-10987.
- Gekel, I. and E. Neher (2008). "Application of an Epac activator enhances neurotransmitter release at excitatory central synapses." *J Neurosci* 28(32): 7991-8002.
- Gelinas, J. N., J. L. Banko, L. Hou, N. Sonenberg, E. J. Weeber, E. Klann and P. V. Nguyen (2007). "ERK and mTOR signaling couple beta-adrenergic receptors to translation initiation machinery to gate induction of protein synthesis-dependent long-term potentiation." *J Biol Chem* 282(37): 27527-27535.
- Gelinas, J. N., J. L. Banko, M. M. Peters, E. Klann, E. J. Weeber and P. V. Nguyen (2008). "Activation of exchange protein activated by cyclic-AMP enhances long-lasting synaptic potentiation in the hippocampus." *Learn Mem* 15(6): 403-411.
- Gelinas, J. N. and P. V. Nguyen (2005). "Beta-adrenergic receptor activation facilitates induction of a protein synthesis-dependent late phase of long-term potentiation." *J Neurosci* 25(13): 3294-3303.
- Gelinas, J. N., G. Tenorio, N. Lemon, T. Abel and P. V. Nguyen (2008). "Beta-adrenergic receptor activation during distinct patterns of stimulation critically modulates the PKA-dependence of LTP in the mouse hippocampus." *Learn Mem* 15(5): 281-289.
- Genc, O., O. Kochubey, R. F. Toonen, M. Verhage and R. Schneggenburger (2014). "Munc18-1 is a dynamically regulated PKC target during short-term enhancement of transmitter release." *Elife* 3: e01715.
- Geppert, M., Y. Goda, R. E. Hammer, C. Li, T. W. Rosahl, C. F. Stevens and T. C. Südhof (1994). "Synaptotagmin I: a major Ca²⁺ sensor for transmitter release at a central synapse." *Cell* 79(4): 717-727.
- Gereau, R. W. t. and P. J. Conn (1994). "Potentiation of cAMP responses by metabotropic glutamate receptors depresses excitatory synaptic transmission by a kinase-independent mechanism." *Neuron* 12(5): 1121-1129.
- Gereau, R. W. t. and P. J. Conn (1994). "Presynaptic enhancement of excitatory synaptic transmission by beta-adrenergic receptor activation." *J Neurophysiol* 72(3): 1438-1442.
- Gereau, R. W. t. and P. J. Conn (1995). "Multiple presynaptic metabotropic glutamate receptors modulate excitatory and inhibitory synaptic transmission in hippocampal area CA1." *J Neurosci* 15(10): 6879-6889.
- Gereau, R. W. t., D. G. Winder and P. J. Conn (1995). "Pharmacological differentiation of the effects of co-activation of beta-adrenergic and metabotropic glutamate receptors in rat hippocampus." *Neurosci Lett* 186(2-3): 119-122.
- Gerlai, R., B. Adams, T. Fitch, S. Chaney and M. Baez (2002). "Performance deficits of mGluR8 knockout mice in learning tasks: the effects of null mutation and the background genotype." *Neuropharmacology* 43(2): 235-249.
- Gerlai, R., J. C. Roder and D. R. Hampson (1998). "Altered spatial learning and memory in mice lacking the mGluR4 subtype of metabotropic glutamate receptor." *Behav Neurosci* 112(3): 525-532.
- Ghalayini, A. J., A. P. Tarver, W. M. Mackin, C. A. Koutz and R. E. Anderson (1991). "Identification and immunolocalization of phospholipase C in bovine rod outer segments." *J Neurochem* 57(4): 1405-1412.
- Ghirardi, M., O. Braha, B. Hochner, P. G. Montarolo, E. R. Kandel and N. Dale (1992). "Roles of PKA and PKC in facilitation of evoked and spontaneous transmitter release at depressed and nondepressed synapses in *Aplysia* sensory neurons." *Neuron* 9(3): 479-489.
- Gibson, H. E., J. G. Edwards, R. S. Page, M. J. Van Hook and J. A. Kauer (2008). "TRPV1 channels mediate long-term depression at synapses on hippocampal interneurons." *Neuron* 57(5): 746-759.
- Gillingham, A. K. and S. Munro (2007). "The small G proteins of the Arf family and their regulators." *Annu Rev Cell Dev Biol* 23: 579-611.
- Gillis, K. D., R. Mossner and E. Neher (1996). "Protein kinase C enhances exocytosis from chromaffin cells by increasing the size of the readily releasable pool of secretory granules." *Neuron* 16(6): 1209-1220.
- Girach, F., T. J. Craig, D. L. Rocca and J. M. Henley (2013). "RIM1alpha SUMOylation is required for fast synaptic vesicle exocytosis." *Cell Rep* 5(5): 1294-1301.
- Gitler, D., Q. Cheng, P. Greengard and G. J. Augustine (2008). "Synapsin IIa controls the reserve pool of glutamatergic synaptic vesicles." *J Neurosci* 28(43): 10835-10843.
- Giustizieri, M., G. Bernardi, N. B. Mercuri and N. Berretta (2005). "Distinct mechanisms of presynaptic inhibition at GABAergic synapses of the rat substantia nigra pars compacta." *J Neurophysiol* 94(3): 1992-2003.
- Gladycheva, S. E., C. S. Ho, Y. Y. Lee and E. L. Stuenkel (2004). "Regulation of syntaxin1A-munc18 complex for SNARE pairing in HEK293 cells." *J Physiol* 558(Pt 3): 857-871.
- Glaum, S. R. and R. J. Miller (1995). "Presynaptic metabotropic glutamate receptors modulate omega-conotoxin-GVIA-insensitive calcium channels in the rat medulla." *Neuropharmacology* 34(8): 953-964.
- Gloerich, M. and J. L. Bos (2010). "Epac: defining a new mechanism for cAMP action." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 50: 355-375.
- Gomez, J., C. Joly, R. Kuhn, T. Knopfel, J. Bockaert and J. P. Pin (1996). "The second intracellular loop of metabotropic glutamate receptor 1 cooperates with the other intracellular domains to control coupling to G-proteins." *J Biol Chem* 271(4): 2199-2205.
- Gonzalez-Maeso, J., R. L. Ang, T. Yuen, P. Chan, N. V. Weisstaub, J. F. Lopez-Gimenez, M. Zhou, Y. Okawa, L. F. Callado, G. Milligan, J. A. Gingrich, M. Filizola, J. J. Meana and S. C. Sealon (2008). "Identification of a serotonin/glutamate receptor complex implicated in psychosis." *Nature* 452(7183): 93-97.

- Goudet, C., E. Chapuy, A. Alloui, F. Acher, J. P. Pin and A. Eschalier (2008). "Group III metabotropic glutamate receptors inhibit hyperalgesia in animal models of inflammation and neuropathic pain." *Pain* 137(1): 112-124.
- Goudet, C., V. Magnaghi, M. Landry, F. Nagy, R. W. t. Gereau and J. P. Pin (2009). "Metabotropic receptors for glutamate and GABA in pain." *Brain Res Rev* 60(1): 43-56.
- Goudet, C., B. Vilar, T. Courtiol, T. Deltheil, T. Bessiron, I. Brabet, N. Oueslati, D. Rigault, H. O. Bertrand, H. McLean, H. Daniel, M. Amalric, F. Acher and J. P. Pin (2012). "A novel selective metabotropic glutamate receptor 4 agonist reveals new possibilities for developing subtype selective ligands with therapeutic potential." *FASEB J* 26(4): 1682-1693.
- Gracheva, E. O., G. Hadwiger, M. L. Nonet and J. E. Richmond (2008). "Direct interactions between *C. elegans* RAB-3 and Rim provide a mechanism to target vesicles to the presynaptic density." *Neurosci Lett* 444(2): 137-142.
- Grandoch, M., S. S. Roscioni and M. Schmidt (2010). "The role of Epac proteins, novel cAMP mediators, in the regulation of immune, lung and neuronal function." *Br J Pharmacol* 159(2): 265-284.
- Granger, A. J. and R. A. Nicoll (2014). "Expression mechanisms underlying long-term potentiation: a postsynaptic view, 10 years on." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 369(1633): 20130136.
- Groemer, T. W. and J. Klingauf (2007). "Synaptic vesicles recycling spontaneously and during activity belong to the same vesicle pool." *Nat Neurosci* 10(2): 145-147.
- Groffen, A. J., S. Martens, R. Diez Arazola, L. N. Cornelisse, N. Lozovaya, A. P. de Jong, N. A. Goriounova, R. L. Habets, Y. Takai, J. G. Borst, N. Brose, H. T. McMahon and M. Verhage (2010). "Doc2b is a high-affinity Ca²⁺ sensor for spontaneous neurotransmitter release." *Science* 327(5973): 1614-1618.
- Grote, E., C. M. Carr and P. J. Novick (2000). "Ordering the final events in yeast exocytosis." *J Cell Biol* 151(2): 439-452.
- Grover, L. M. and C. Yan (1999). "Evidence for involvement of group II/III metabotropic glutamate receptors in NMDA receptor-independent long-term potentiation in area CA1 of rat hippocampus." *J Neurophysiol* 82(6): 2956-2969.
- Gu, Z., W. Liu, J. Wei and Z. Yan (2012). "Regulation of N-methyl-D-aspartic acid (NMDA) receptors by metabotropic glutamate receptor 7." *J Biol Chem* 287(13): 10265-10275.
- Guan, R., H. Dai, D. R. Tomchick, I. Dulubova, M. Machius, T. C. Sudhof and J. Rizo (2007). "Crystal structure of the RIM1alpha C2B domain at 1.7 Å resolution." *Biochemistry* 46(31): 8988-8998.
- Gubellini, P., Y. Ben-Ari and J. L. Gaiarsa (2005). "Endogenous neurotrophins are required for the induction of GABAergic long-term potentiation in the neonatal rat hippocampus." *J Neurosci* 25(24): 5796-5802.
- Gulley, R. L. and T. S. Reese (1981). "Cytoskeletal organization at the postsynaptic complex." *J Cell Biol* 91(1): 298-302.
- Gupta, M. and S. J. Yarwood (2005). "MAP1A light chain 2 interacts with exchange protein activated by cyclic AMP 1 (EPAC1) to enhance Rap1 GTPase activity and cell adhesion." *J Biol Chem* 280(9): 8109-8116.
- Habets, R. L. and J. G. Borst (2005). "Post-tetanic potentiation in the rat calyx of Held synapse." *J Physiol* 564(Pt 1): 173-187.
- Habets, R. L. and J. G. Borst (2006). "An increase in calcium influx contributes to post-tetanic potentiation at the rat calyx of Held synapse." *J Neurophysiol* 96(6): 2868-2876.
- Hallermann, S., A. Fejtova, H. Schmidt, A. Weyhersmuller, R. A. Silver, E. D. Gundelfinger and J. Eilers (2010). "Bassoon speeds vesicle reloading at a central excitatory synapse." *Neuron* 68(4): 710-723.
- Han, J. S., G. C. Bird and V. Neugebauer (2004). "Enhanced group III mGluR-mediated inhibition of pain-related synaptic plasticity in the amygdala." *Neuropharmacology* 46(7): 918-926.
- Han, Y., P. S. Kaeser, T. C. Sudhof and R. Schneggenburger (2011). "RIM determines Ca²⁺ channel density and vesicle docking at the presynaptic active zone." *Neuron* 69(2): 304-316.
- Hanse, E. and B. Gustafsson (2001). "Vesicle release probability and pre-primed pool at glutamatergic synapses in area CA1 of the rat neonatal hippocampus." *J Physiol* 531(Pt 2): 481-493.
- Hansen, N. and D. Manahan-Vaughan (2015). "Locus Coeruleus Stimulation Facilitates Long-Term Depression in the Dentate Gyrus That Requires Activation of beta-Adrenergic Receptors." *Cereb Cortex* 25(7): 1889-1896.
- Hanson, P. I., R. Roth, H. Morisaki, R. Jahn and J. E. Heuser (1997). "Structure and conformational changes in NSF and its membrane receptor complexes visualized by quick-freeze/deep-etch electron microscopy." *Cell* 90(3): 523-535.
- Harden, T. K., G. L. Waldo, S. N. Hicks and J. Sondek (2011). "Mechanism of activation and inactivation of Gq/phospholipase C-beta signaling nodes." *Chem Rev* 111(10): 6120-6129.
- Harris, E. W. and C. W. Cotman (1983). "Effects of acidic amino acid antagonists on paired-pulse potentiation at the lateral perforant path." *Exp Brain Res* 52(3): 455-460.
- Harris, K. M. and R. J. Weinberg (2012). "Ultrastructure of synapses in the mammalian brain." *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4(5).
- Harvey, C. D., F. Collman, D. A. Dombeck and D. W. Tank (2009). "Intracellular dynamics of hippocampal place cells during virtual navigation." *Nature* 461(7266): 941-946.
- Hata, Y., C. A. Slaughter and T. C. Sudhof (1993). "Synaptic vesicle fusion complex contains unc-18 homologue bound to syntaxin." *Nature* 366(6453): 347-351.
- Hauger, R. L., V. Risbrough, R. H. Oakley, J. A. Olivares-Reyes and F. M. Dautzenberg (2009). "Role of CRF receptor signaling in stress vulnerability, anxiety, and depression." *Ann N Y Acad Sci* 1179: 120-143.
- Hay, M. and D. L. Kunze (1994). "Glutamate metabotropic receptor inhibition of voltage-gated calcium currents in visceral sensory neurons." *J Neurophysiol* 72(1): 421-430.
- He, C., F. Chen, B. Li and Z. Hu (2014). "Neurophysiology of HCN channels: from cellular functions to multiple regulations." *Prog Neurobiol* 112: 1-23.

- Hefft, S. and P. Jonas (2005). "Asynchronous GABA release generates long-lasting inhibition at a hippocampal interneuron-principal neuron synapse." *Nat Neurosci* 8(10): 1319-1328.
- Heifets, B. D. and P. E. Castillo (2009). "Endocannabinoid signaling and long-term synaptic plasticity." *Annu Rev Physiol* 71: 283-306.
- Hein, L. (2006). "Adrenoceptors and signal transduction in neurons." *Cell Tissue Res* 326(2): 541-551.
- Hell, J. W., C. T. Yokoyama, L. J. Breeze, C. Chavkin and W. A. Catterall (1995). "Phosphorylation of presynaptic and postsynaptic calcium channels by cAMP-dependent protein kinase in hippocampal neurons." *EMBO J* 14(13): 3036-3044.
- Henze, D. A., D. B. McMahon, K. M. Harris and G. Barrionuevo (2002). "Giant miniature EPSCs at the hippocampal mossy fiber to CA3 pyramidal cell synapse are monoquantal." *J Neurophysiol* 87(1): 15-29.
- Herlitze, S., D. E. Garcia, K. Mackie, B. Hille, T. Scheuer and W. A. Catterall (1996). "Modulation of Ca²⁺ channels by G-protein beta gamma subunits." *Nature* 380(6571): 258-262.
- Herlitze, S., H. Zhong, T. Scheuer and W. A. Catterall (2001). "Allosteric modulation of Ca²⁺ channels by G proteins, voltage-dependent facilitation, protein kinase C, and Ca(v)beta subunits." *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(8): 4699-4704.
- Hernandez, C. C., O. Zaika, G. P. Tolstikh and M. S. Shapiro (2008). "Regulation of neural KCNQ channels: signalling pathways, structural motifs and functional implications." *J Physiol* 586(7): 1811-1821.
- Herrero, I., M. T. Miras-Portugal and J. Sanchez-Prieto (1992). "Positive feedback of glutamate exocytosis by metabotropic presynaptic receptor stimulation." *Nature* 360(6400): 163-166.
- Herrero, I., M. T. Miras-Portugal and J. Sanchez-Prieto (1994). "Rapid desensitization of the metabotropic glutamate receptor that facilitates glutamate release in rat cerebrocortical nerve terminals." *Eur J Neurosci* 6(1): 115-120.
- Herrero, I., M. T. Miras-Portugal and J. Sanchez-Prieto (1998). "Functional switch from facilitation to inhibition in the control of glutamate release by metabotropic glutamate receptors." *J Biol Chem* 273(4): 1951-1958.
- Herrero, I. and J. Sanchez-Prieto (1996). "cAMP-dependent facilitation of glutamate release by beta-adrenergic receptors in cerebrocortical nerve terminals." *J Biol Chem* 271(48): 30554-30560.
- Herzog, E., F. Nadrigny, K. Silm, C. Biesemann, I. Helling, T. Bersot, H. Steffens, R. Schwartzmann, U. V. Nagerl, S. El Mestikawy, J. Rhee, F. Kirchhoff and N. Brose (2011). "In vivo imaging of intersynaptic vesicle exchange using VGLUT1 Venus knock-in mice." *J Neurosci* 31(43): 15544-15559.
- Hibino, H., R. Pironkova, O. Onwumere, M. Vologodskaja, A. J. Hudspeth and F. Lesage (2002). "RIM binding proteins (RBPs) couple Rab3-interacting molecules (RIMs) to voltage-gated Ca(2+) channels." *Neuron* 34(3): 411-423.
- Hillman, K. L., V. A. Doze and J. E. Porter (2005). "Functional characterization of the beta-adrenergic receptor subtypes expressed by CA1 pyramidal cells in the rat hippocampus." *J Pharmacol Exp Ther* 314(2): 561-567.
- Hirbec, H., O. Perestenko, A. Nishimune, G. Meyer, S. Nakanishi, J. M. Henley and K. K. Dev (2002). "The PDZ proteins PICK1, GRIP, and syntenin bind multiple glutamate receptor subtypes. Analysis of PDZ binding motifs." *J Biol Chem* 277(18): 15221-15224.
- Hirling, H. and R. H. Scheller (1996). "Phosphorylation of synaptic vesicle proteins: modulation of the alpha SNAP interaction with the core complex." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(21): 11945-11949.
- Hnasko, T. S. and R. H. Edwards (2012). "Neurotransmitter corelease: mechanism and physiological role." *Annu Rev Physiol* 74: 225-243.
- Hoivik, E. A., S. L. Witsoe, I. R. Bergheim, Y. Xu, I. Jakobsson, A. Tengholm, S. O. Doskeland and M. Bakke (2013). "DNA methylation of alternative promoters directs tissue specific expression of Epac2 isoforms." *PLoS One* 8(7): e67925.
- Holscher, C., S. Schmid, P. K. Pilz, G. Sansig, H. van der Putten and C. F. Plappert (2004). "Lack of the metabotropic glutamate receptor subtype 7 selectively impairs short-term working memory but not long-term memory." *Behav Brain Res* 154(2): 473-481.
- Holscher, C., S. Schmid, P. K. Pilz, G. Sansig, H. van der Putten and C. F. Plappert (2005). "Lack of the metabotropic glutamate receptor subtype 7 selectively modulates Theta rhythm and working memory." *Learn Mem* 12(5): 450-455.
- Holz, G. G. (2004). "Epac: A new cAMP-binding protein in support of glucagon-like peptide-1 receptor-mediated signal transduction in the pancreatic beta-cell." *Diabetes* 53(1): 5-13.
- Hoogland, T. M. and P. Saggau (2004). "Facilitation of L-type Ca²⁺ channels in dendritic spines by activation of beta2 adrenergic receptors." *J Neurosci* 24(39): 8416-8427.
- Hopkins, C. R., C. W. Lindsley and C. M. Niswender (2009). "mGluR4-positive allosteric modulation as potential treatment for Parkinson's disease." *Future Med Chem* 1(3): 501-513.
- Hosaka, M., R. E. Hammer and T. C. Sudhof (1999). "A phospho-switch controls the dynamic association of synapsins with synaptic vesicles." *Neuron* 24(2): 377-387.
- Hosoi, N., M. Holt and T. Sakaba (2009). "Calcium dependence of exo- and endocytotic coupling at a glutamatergic synapse." *Neuron* 63(2): 216-229.
- Hosoi, N., T. Sakaba and E. Neher (2007). "Quantitative analysis of calcium-dependent vesicle recruitment and its functional role at the calyx of Held synapse." *J Neurosci* 27(52): 14286-14298.
- Houamed, K. M., J. L. Kuijper, T. L. Gilbert, B. A. Haldeman, P. J. O'Hara, E. R. Mulvihill, W. Almers and F. S. Hagen (1991). "Cloning, expression, and gene structure of a G protein-coupled glutamate receptor from rat brain." *Science* 252(5010): 1318-1321.
- Houeland, G., A. Nakhost, W. S. Sossin and V. F. Castellucci (2007). "PKC modulation of transmitter release by SNAP-25 at sensory-to-motor synapses in aplysia." *J Neurophysiol* 97(1): 134-143.
- Hu, H., E. Real, K. Takamiya, M. G. Kang, J. Ledoux, R. L. Huganir and R. Malinow (2007). "Emotion enhances learning via

- norepinephrine regulation of AMPA-receptor trafficking." *Cell* 131(1): 160-173.
- Hu, K., C. S. Huang, Y. N. Jan and L. Y. Jan (2003). "ATP-sensitive potassium channel traffic regulation by adenosine and protein kinase C." *Neuron* 38(3): 417-432.
- Hu, Z., A. B. Vashlishan-Murray and J. M. Kaplan (2015). "NLP-12 engages different UNC-13 proteins to potentiate tonic and evoked release." *J Neurosci* 35(3): 1038-1042.
- Hua, Y. and R. H. Scheller (2001). "Three SNARE complexes cooperate to mediate membrane fusion." *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(14): 8065-8070.
- Hua, Y., R. Sinha, M. Martineau, M. Kahms and J. Klingauf (2010). "A common origin of synaptic vesicles undergoing evoked and spontaneous fusion." *Nat Neurosci* 13(12): 1451-1453.
- Hua, Z., S. Leal-Ortiz, S. M. Foss, C. L. Waites, C. C. Garner, S. M. Voglmaier and R. H. Edwards (2011). "v-SNARE composition distinguishes synaptic vesicle pools." *Neuron* 71(3): 474-487.
- Huang, C. C. and K. S. Hsu (2006). "Presynaptic mechanism underlying cAMP-induced synaptic potentiation in medial prefrontal cortex pyramidal neurons." *Mol Pharmacol* 69(3): 846-856.
- Huang, C. C., K. S. Hsu and P. W. Gean (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(3): 1026-1033.
- Huang, C. C., C. H. Lin and P. W. Gean (1998). "Potentiation of N-methyl-D-aspartate currents by isoproterenol in the acutely dissociated rat amygdala neurons." *Neurosci Lett* 253(1): 9-12.
- Huang, C. C., J. J. Tsai and P. W. Gean (1994). "Actions of isoproterenol on amygdala neurons in vitro." *Chin J Physiol* 37(2): 73-78.
- Huang, C. C., S. J. Wang and P. W. Gean (1998). "Selective enhancement of P-type calcium currents by isoproterenol in the rat amygdala." *J Neurosci* 18(6): 2276-2282.
- Huang, Y. Y. and E. R. Kandel (1996). "Modulation of both the early and the late phase of mossy fiber LTP by the activation of beta-adrenergic receptors." *Neuron* 16(3): 611-617.
- Huang, Y. Y., S. S. Zakharenko, S. Schoch, P. S. Kaeser, R. Janz, T. C. Sudhof, S. A. Siegelbaum and E. R. Kandel (2005). "Genetic evidence for a protein-kinase-A-mediated presynaptic component in NMDA-receptor-dependent forms of long-term synaptic potentiation." *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(26): 9365-9370.
- Huang, Z., R. Lujan, I. Kadurin, V. N. Uebele, J. J. Renger, A. C. Dolphin and M. M. Shah (2011). "Presynaptic HCN1 channels regulate Cav3.2 activity and neurotransmission at select cortical synapses." *Nat Neurosci* 14(4): 478-486.
- Hucho, T. B., O. A. Dina and J. D. Levine (2005). "Epac mediates a cAMP-to-PKC signaling in inflammatory pain: an isolectin B4(+) neuron-specific mechanism." *J Neurosci* 25(26): 6119-6126.
- Huettner, J. E. and R. W. Baughman (1986). "Primary culture of identified neurons from the visual cortex of postnatal rats." *J Neurosci* 6(10): 3044-3060.
- Huntwork, S. and J. T. Littleton (2007). "A complexin fusion clamp regulates spontaneous neurotransmitter release and synaptic growth." *Nat Neurosci* 10(10): 1235-1237.
- Hurlemann, R., B. Hawellek, A. Matusch, H. Kolsch, H. Wollersen, B. Madea, K. Vogetley, W. Maier and R. J. Dolan (2005). "Noradrenergic modulation of emotion-induced forgetting and remembering." *J Neurosci* 25(27): 6343-6349.
- Hwang, J. I., Y. S. Oh, K. J. Shin, H. Kim, S. H. Ryu and P. G. Suh (2005). "Molecular cloning and characterization of a novel phospholipase C, PLC-eta." *Biochem J* 389(Pt 1): 181-186.
- Iacovelli, L., V. Bruno, L. Salvatore, D. Melchiorri, R. Gradini, A. Caricasole, E. Barletta, A. De Blasi and F. Nicoletti (2002). "Native group-III metabotropic glutamate receptors are coupled to the mitogen-activated protein kinase/phosphatidylinositol-3-kinase pathways." *J Neurochem* 82(2): 216-223.
- Iacovelli, L., L. Salvatore, L. Capobianco, A. Picascia, E. Barletta, M. Storto, S. Mariggio, M. Sallèse, A. Porcellini, F. Nicoletti and A. De Blasi (2003). "Role of G protein-coupled receptor kinase 4 and beta-arrestin 1 in agonist-stimulated metabotropic glutamate receptor 1 internalization and activation of mitogen-activated protein kinases." *J Biol Chem* 278(14): 12433-12442.
- Ikeda, S. R., D. M. Lovinger, B. A. McCool and D. L. Lewis (1995). "Heterologous expression of metabotropic glutamate receptors in adult rat sympathetic neurons: subtype-specific coupling to ion channels." *Neuron* 14(5): 1029-1038.
- Imig, C., S. W. Min, S. Krinner, M. Arancillo, C. Rosenmund, T. C. Sudhof, J. Rhee, N. Brose and B. H. Cooper (2014). "The morphological and molecular nature of synaptic vesicle priming at presynaptic active zones." *Neuron* 84(2): 416-431.
- Inchauspe, C. G., I. D. Forsythe and O. D. Uchitel (2007). "Changes in synaptic transmission properties due to the expression of N-type calcium channels at the calyx of Held synapse of mice lacking P/Q-type calcium channels." *J Physiol* 584(Pt 3): 835-851.
- Inchauspe, C. G., F. J. Martini, I. D. Forsythe and O. D. Uchitel (2004). "Functional compensation of P/Q by N-type channels blocks short-term plasticity at the calyx of Held presynaptic terminal." *J Neurosci* 24(46): 10379-10383.
- Ino, M., T. Yoshinaga, M. Wakamori, N. Miyamoto, E. Takahashi, J. Sonoda, T. Kagaya, T. Oki, T. Nagasu, Y. Nishizawa, I. Tanaka, K. Imoto, S. Aizawa, S. Koch, A. Schwartz, T. Niidome, K. Sawada and Y. Mori (2001). "Functional disorders of the sympathetic nervous system in mice lacking the alpha 1B subunit (Cav 2.2) of N-type calcium channels." *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(9): 5323-5328.
- Inoue, E., S. Mochida, H. Takagi, S. Higa, M. Deguchi-Tawarada, E. Takao-Rikitsu, M. Inoue, I. Yao, K. Takeuchi, I. Kitajima, M. Setou, T. Ohtsuka and Y. Takai (2006). "SAD: a presynaptic kinase associated with synaptic vesicles and the active zone cytomatrix that regulates neurotransmitter release." *Neuron* 50(2): 261-275.
- Irannejad, H., A. Kebriaeezadeh, A. Zarghi, F. Montazer-Sadegh, A. Shafiee, A. Assadieskandar and M. Amini (2014).

- "Synthesis, docking simulation, biological evaluations and 3D-QSAR study of 5-Aryl-6-(4-methylsulfonyl)-3-(methylthio)-1,2,4-triazine as selective cyclooxygenase-2 inhibitors." *Bioorg Med Chem* 22(2): 865-873.
- Irannejad, R., N. G. Tsvetanova, B. T. Lobingier and M. von Zastrow (2015). "Effects of endocytosis on receptor-mediated signaling." *Curr Opin Cell Biol* 35: 137-143.
- Irannejad, R. and M. von Zastrow (2014). "GPCR signaling along the endocytic pathway." *Curr Opin Cell Biol* 27: 109-116.
- Ishikawa, T., M. Kaneko, H. S. Shin and T. Takahashi (2005). "Presynaptic N-type and P/Q-type Ca²⁺ channels mediating synaptic transmission at the calyx of Held of mice." *J Physiol* 568(Pt 1): 199-209.
- Ishisaka, M. and H. Hara (2014). "The roles of diacylglycerol kinases in the central nervous system: review of genetic studies in mice." *J Pharmacol Sci* 124(3): 336-343.
- Iwasaki, S., A. Momiyama, O. D. Uchitel and T. Takahashi (2000). "Developmental changes in calcium channel types mediating central synaptic transmission." *J Neurosci* 20(1): 59-65.
- Jahn, R. and D. Fasshauer (2012). "Molecular machines governing exocytosis of synaptic vesicles." *Nature* 490(7419): 201-207.
- Jahn, R. and H. Grubmüller (2002). "Membrane fusion." *Curr Opin Cell Biol* 14(4): 488-495.
- Jahn, R. and R. H. Scheller (2006). "SNAREs--engines for membrane fusion." *Nat Rev Mol Cell Biol* 7(9): 631-643.
- James, D. J., C. Khodthong, J. A. Kowalchuk and T. F. Martin (2010). "Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate regulation of SNARE function in membrane fusion mediated by CAPS." *Adv Enzyme Regul* 50(1): 62-70.
- James, D. J., J. Kowalchuk, N. Daily, M. Petrie and T. F. Martin (2009). "CAPS drives trans-SNARE complex formation and membrane fusion through syntaxin interactions." *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(41): 17308-17313.
- Ji, J., X. Zhang and B. Li (2003). "beta-adrenergic modulation of in vivo long-term potentiation in area CA1 and its role in spatial learning in rats." *Sci China C Life Sci* 46(6): 605-614.
- Ji, J. Z., X. H. Zhang and B. M. Li (2003). "Deficient spatial memory induced by blockade of beta-adrenoceptors in the hippocampal CA1 region." *Behav Neurosci* 117(6): 1378-1384.
- Ji, X. H., X. H. Cao, C. L. Zhang, Z. J. Feng, X. H. Zhang, L. Ma and B. M. Li (2008). "Pre- and postsynaptic beta-adrenergic activation enhances excitatory synaptic transmission in layer V/VI pyramidal neurons of the medial prefrontal cortex of rats." *Cereb Cortex* 18(7): 1506-1520.
- Jiang, L., J. Xu, M. Nedergaard and J. Kang (2001). "A kainate receptor increases the efficacy of GABAergic synapses." *Neuron* 30(2): 503-513.
- Jiang, Y., F. Sakane, H. Kanoh and J. P. Walsh (2000). "Selectivity of the diacylglycerol kinase inhibitor 3-[2-(4-[bis-(4-fluorophenyl)methylene]-1-piperidinyl)ethyl]-2, 3-dihydro-2-thioxo-4(1H)quinazolinone (R59949) among diacylglycerol kinase subtypes." *Biochem Pharmacol* 59(7): 763-772.
- Jingami, H., S. Nakanishi and K. Morikawa (2003). "Structure of the metabotropic glutamate receptor." *Curr Opin Neurobiol* 13(3): 271-278.
- Jockusch, W. J., D. Speidel, A. Sigler, J. B. Sorensen, F. Varoquaux, J. S. Rhee and N. Brose (2007). "CAPS-1 and CAPS-2 are essential synaptic vesicle priming proteins." *Cell* 131(4): 796-808.
- Joly, C., J. Gomeza, I. Brabet, K. Curry, J. Bockaert and J. P. Pin (1995). "Molecular, functional, and pharmacological characterization of the metabotropic glutamate receptor type 5 splice variants: comparison with mGluR1." *J Neurosci* 15(5 Pt 2): 3970-3981.
- Jones, C. K., M. Bubser, A. D. Thompson, J. W. Dickerson, N. Turle-Lorenzo, M. Amalric, A. L. Blobaum, T. M. Bridges, R. D. Morrison, S. Jadhav, D. W. Engers, K. Italiano, J. Bode, J. S. Daniels, C. W. Lindsley, C. R. Hopkins, P. J. Conn and C. M. Niswender (2012). "The metabotropic glutamate receptor 4-positive allosteric modulator VU0364770 produces efficacy alone and in combination with L-DOPA or an adenosine 2A antagonist in preclinical rodent models of Parkinson's disease." *J Pharmacol Exp Ther* 340(2): 404-421.
- Jones, E. G., G. W. Huntley and D. L. Benson (1994). "Alpha calcium/calmodulin-dependent protein kinase II selectively expressed in a subpopulation of excitatory neurons in monkey sensory-motor cortex: comparison with GAD-67 expression." *J Neurosci* 14(2): 611-629.
- Jones, P. J., Z. Xiang and P. J. Conn (2008). "Metabotropic glutamate receptors mGluR4 and mGluR8 regulate transmission in the lateral olfactory tract-piriform cortex synapse." *Neuropharmacology* 55(4): 440-446.
- Jorgacevski, J., M. Potokar, S. Grilc, M. Kreft, W. Liu, J. W. Barclay, J. Buckers, R. Medda, S. W. Hell, V. Parpura, R. D. Burgoyne and R. Zorec (2011). "Munc18-1 tuning of vesicle merger and fusion pore properties." *J Neurosci* 31(24): 9055-9066.
- Jorquera, R. A., S. Huntwork-Rodriguez, Y. Akbergenova, R. W. Cho and J. T. Littleton (2012). "Complexin controls spontaneous and evoked neurotransmitter release by regulating the timing and properties of synaptotagmin activity." *J Neurosci* 32(50): 18234-18245.
- Jovanovic, J. N., F. Benfenati, Y. L. Siow, T. S. Sihra, J. S. Sanghera, S. L. Pelech, P. Greengard and A. J. Czernik (1996). "Neurotrophins stimulate phosphorylation of synapsin I by MAP kinase and regulate synapsin I-actin interactions." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(8): 3679-3683.
- Junge, H. J., J. S. Rhee, O. Jahn, F. Varoquaux, J. Spiess, M. N. Waxham, C. Rosenmund and N. Brose (2004). "Calmodulin and Munc13 form a Ca²⁺ sensor/effector complex that controls short-term synaptic plasticity." *Cell* 118(3): 389-401.
- Kabachinski, G., M. Yamaga, D. M. Kiehl-Grevstad, S. Bruinsma and T. F. Martin (2014). "CAPS and Munc13 utilize distinct PIP2-linked mechanisms to promote vesicle exocytosis." *Mol Biol Cell* 25(4): 508-521.
- Kaesler, P. S., L. Deng, A. E. Chavez, X. Liu, P. E. Castillo and T. C. Sudhof (2009). "ELKS2alpha/CAST deletion selectively increases neurotransmitter release at inhibitory synapses." *Neuron* 64(2): 227-239.

- Kaesler, P. S., L. Deng, Y. Wang, I. Dulubova, X. Liu, J. Rizo and T. C. Sudhof (2011). "RIM proteins tether Ca²⁺ channels to presynaptic active zones via a direct PDZ-domain interaction." *Cell* 144(2): 282-295.
- Kaesler, P. S., H. B. Kwon, J. Blundell, V. Chevaleyre, W. Morishita, R. C. Malenka, C. M. Powell, P. E. Castillo and T. C. Sudhof (2008). "RIM1alpha phosphorylation at serine-413 by protein kinase A is not required for presynaptic long-term plasticity or learning." *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(38): 14680-14685.
- Kaesler, P. S., H. B. Kwon, C. Q. Chiu, L. Deng, P. E. Castillo and T. C. Sudhof (2008). "RIM1alpha and RIM1beta are synthesized from distinct promoters of the RIM1 gene to mediate differential but overlapping synaptic functions." *J Neurosci* 28(50): 13435-13447.
- Kaesler, P. S. and T. C. Sudhof (2005). "RIM function in short- and long-term synaptic plasticity." *Biochem Soc Trans* 33(Pt 6): 1345-1349.
- Kalaria, R. N., A. C. Andorn, M. Tabaton, P. J. Whitehouse, S. I. Harik and J. R. Unnerstall (1989). "Adrenergic receptors in aging and Alzheimer's disease: increased beta 2-receptors in prefrontal cortex and hippocampus." *J Neurochem* 53(6): 1772-1781.
- Kamat, A. and G. Carpenter (1997). "Phospholipase C-gamma1: regulation of enzyme function and role in growth factor-dependent signal transduction." *Cytokine Growth Factor Rev* 8(2): 109-117.
- Kammermeier, P. J. (2012). "Functional and pharmacological characteristics of metabotropic glutamate receptors 2/4 heterodimers." *Mol Pharmacol* 82(3): 438-447.
- Kammermeier, P. J. and S. R. Ikeda (1999). "Expression of RGS2 alters the coupling of metabotropic glutamate receptor 1a to M-type K⁺ and N-type Ca²⁺ channels." *Neuron* 22(4): 819-829.
- Kammermeier, P. J., B. Xiao, J. C. Tu, P. F. Worley and S. R. Ikeda (2000). "Homer proteins regulate coupling of group I metabotropic glutamate receptors to N-type calcium and M-type potassium channels." *J Neurosci* 20(19): 7238-7245.
- Kandel, E. R., Y. Dudai and M. R. Mayford (2014). "The molecular and systems biology of memory." *Cell* 157(1): 163-186.
- Kaneko, M. and T. Takahashi (2004). "Presynaptic mechanism underlying cAMP-dependent synaptic potentiation." *J Neurosci* 24(22): 5202-5208.
- Kano, M., T. Ohno-Shosaku, Y. Hashimoto, M. Uchigashima and M. Watanabe (2009). "Endocannabinoid-mediated control of synaptic transmission." *Physiol Rev* 89(1): 309-380.
- Kao, H. T., H. J. Song, B. Porton, G. L. Ming, J. Hoh, M. Abraham, A. J. Czernik, V. A. Pieribone, M. M. Poo and P. Greengard (2002). "A protein kinase A-dependent molecular switch in synapsins regulates neurite outgrowth." *Nat Neurosci* 5(5): 431-437.
- Kapur, A., M. F. Yeckel, R. Gray and D. Johnston (1998). "L-Type calcium channels are required for one form of hippocampal mossy fiber LTP." *J Neurophysiol* 79(4): 2181-2190.
- Kashima, Y., T. Miki, T. Shibasaki, N. Ozaki, M. Miyazaki, H. Yano and S. Seino (2001). "Critical role of cAMP-GEFII--Rim2 complex in incretin-potentiated insulin secretion." *J Biol Chem* 276(49): 46046-46053.
- Katsuki, H., Y. Izumi and C. F. Zorumski (1997). "Noradrenergic regulation of synaptic plasticity in the hippocampal CA1 region." *J Neurophysiol* 77(6): 3013-3020.
- Katz, B. and R. Miledi (1967). "A study of synaptic transmission in the absence of nerve impulses." *J Physiol* 192(2): 407-436.
- Katz, B. and R. Miledi (1968). "The role of calcium in neuromuscular facilitation." *J Physiol* 195(2): 481-492.
- Kauppinen, R. A. and D. G. Nicholls (1986). "Synaptosomal bioenergetics. The role of glycolysis, pyruvate oxidation and responses to hypoglycaemia." *Eur J Biochem* 158(1): 159-165.
- Kavalali, E. T. (2015). "The mechanisms and functions of spontaneous neurotransmitter release." *Nat Rev Neurosci* 16(1): 5-16.
- Kawasaki, H., G. M. Springett, N. Mochizuki, S. Toki, M. Nakaya, M. Matsuda, D. E. Housman and A. M. Graybiel (1998). "A family of cAMP-binding proteins that directly activate Rap1." *Science* 282(5397): 2275-2279.
- Kawauchi, T., K. Sekine, M. Shikanai, K. Chihama, K. Tomita, K. Kubo, K. Nakajima, Y. Nabeshima and M. Hoshino (2010). "Rab GTPases-dependent endocytic pathways regulate neuronal migration and maturation through N-cadherin trafficking." *Neuron* 67(4): 588-602.
- Kazanietz, M. G. (2002). "Novel "nonkinase" phorbol ester receptors: the C1 domain connection." *Mol Pharmacol* 61(4): 759-767.
- Kelly, M. P., J. M. Stein, C. G. Vecsey, C. Favilla, X. Yang, S. F. Bizily, M. F. Esposito, G. Wand, S. J. Kanes and T. Abel (2009). "Developmental etiology for neuroanatomical and cognitive deficits in mice overexpressing Galphas, a G-protein subunit genetically linked to schizophrenia." *Mol Psychiatry* 14(4): 398-415, 347.
- Kew, J. N., J. M. Ducarre, M. C. Pflimlin, V. Mutel and J. A. Kemp (2001). "Activity-dependent presynaptic autoinhibition by group II metabotropic glutamate receptors at the perforant path inputs to the dentate gyrus and CA1." *Neuropharmacology* 40(1): 20-27.
- Khodthong, C., G. Kabachinski, D. J. James and T. F. Martin (2011). "Munc13 homology domain-1 in CAPS/UNC31 mediates SNARE binding required for priming vesicle exocytosis." *Cell Metab* 14(2): 254-263.
- Khvotchev, M., I. Dulubova, J. Sun, H. Dai, J. Rizo and T. C. Sudhof (2007). "Dual modes of Munc18-1/SNARE interactions are coupled by functionally critical binding to syntaxin-1 N terminus." *J Neurosci* 27(45): 12147-12155.
- Kim, J. K., S. Lim, J. Kim, S. Kim, J. H. Kim, S. H. Ryu and P. G. Suh (2011). "Subtype-specific roles of phospholipase C-beta via differential interactions with PDZ domain proteins." *Adv Enzyme Regul* 51(1): 138-151.

- Kim, S. H. and T. A. Ryan (2010). "CDK5 serves as a major control point in neurotransmitter release." *Neuron* 67(5): 797-809.
- Kinoshita, A., R. Shigemoto, H. Ohishi, H. van der Putten and N. Mizuno (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(3): 332-352.
- Kiyonaka, S., M. Wakamori, T. Miki, Y. Uriu, M. Nonaka, H. Bito, A. M. Beedle, E. Mori, Y. Hara, M. De Waard, M. Kanagawa, M. Itakura, M. Takahashi, K. P. Campbell and Y. Mori (2007). "RIM1 confers sustained activity and neurotransmitter vesicle anchoring to presynaptic Ca²⁺ channels." *Nat Neurosci* 10(6): 691-701.
- Klar, R., A. G. Walker, D. Ghose, B. A. Grueter, D. W. Engers, C. R. Hopkins, C. W. Lindsley, Z. Xiang, P. J. Conn and C. M. Niswender (2015). "Activation of Metabotropic Glutamate Receptor 7 Is Required for Induction of Long-Term Potentiation at SC-CA1 Synapses in the Hippocampus." *J Neurosci* 35(19): 7600-7615.
- Klausnitzer, J., A. Kulla and D. Manahan-Vaughan (2004). "Role of the group III metabotropic glutamate receptor in LTP, depotentiation and LTD in dentate gyrus of freely moving rats." *Neuropharmacology* 46(2): 160-170.
- Kniazeff, J., A. S. Bessis, D. Maurel, H. Ansanay, L. Prezeau and J. P. Pin (2004). "Closed state of both binding domains of homodimeric mGlu receptors is required for full activity." *Nat Struct Mol Biol* 11(8): 706-713.
- Kobayashi, K., T. Manabe and T. Takahashi (1999). "Calcium-dependent mechanisms involved in presynaptic long-term depression at the hippocampal mossy fibre-CA3 synapse." *Eur J Neurosci* 11(5): 1633-1638.
- Kobayashi, M., M. Kojima, Y. Koyanagi, K. Adachi, K. Imamura and N. Koshikawa (2009). "Presynaptic and postsynaptic modulation of glutamatergic synaptic transmission by activation of alpha(1)- and beta-adrenoceptors in layer V pyramidal neurons of rat cerebral cortex." *Synapse* 63(4): 269-281.
- Koch, H., K. Hofmann and N. Brose (2000). "Definition of Munc13-homology-domains and characterization of a novel ubiquitously expressed Munc13 isoform." *Biochem J* 349(Pt 1): 247-253.
- Koch, M. and M. Holt (2012). "Coupling exo- and endocytosis: an essential role for PIP(2) at the synapse." *Biochim Biophys Acta* 1821(8): 1114-1132.
- Kogo, N., Y. Dalezios, M. Capogna, F. Ferraguti, R. Shigemoto and P. Somogyi (2004). "Depression of GABAergic input to identified hippocampal neurons by group III metabotropic glutamate receptors in the rat." *Eur J Neurosci* 19(10): 2727-2740.
- Kohara, K., A. Ogura, K. Akagawa and K. Yamaguchi (2001). "Increase in number of functional release sites by cyclic AMP-dependent protein kinase in cultured neurons isolated from hippocampal dentate gyrus." *Neurosci Res* 41(1): 79-88.
- Koike, C., T. Obara, Y. Uriu, T. Numata, R. Sanuki, K. Miyata, T. Koyasu, S. Ueno, K. Funabiki, A. Tani, H. Ueda, M. Kondo, Y. Mori, M. Tachibana and T. Furukawa (2010). "TRPM1 is a component of the retinal ON bipolar cell transduction channel in the mGluR6 cascade." *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(1): 332-337.
- Konieczny, J., J. Wardas, K. Kuter, A. Pilc and K. Ossowska (2007). "The influence of group III metabotropic glutamate receptor stimulation by (1S,3R,4S)-1-aminocyclo-pentane-1,3,4-tricarboxylic acid on the parkinsonian-like akinesia and striatal proenkephalin and prodynorphin mRNA expression in rats." *Neuroscience* 145(2): 611-620.
- Korogod, N., X. Lou and R. Schneggenburger (2005). "Presynaptic Ca²⁺ requirements and developmental regulation of posttetanic potentiation at the calyx of Held." *J Neurosci* 25(21): 5127-5137.
- Korogod, N., X. Lou and R. Schneggenburger (2007). "Posttetanic potentiation critically depends on an enhanced Ca(2+) sensitivity of vesicle fusion mediated by presynaptic PKC." *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(40): 15923-15928.
- Kotowski, S. J., F. W. Hopf, T. Seif, A. Bonci and M. von Zastrow (2011). "Endocytosis promotes rapid dopaminergic signaling." *Neuron* 71(2): 278-290.
- Koulen, P. and J. H. Brandstatter (2002). "Pre- and Postsynaptic Sites of Action of mGluR8a in the mammalian retina." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43(6): 1933-1940.
- Koushika, S. P., J. E. Richmond, G. Hadwiger, R. M. Weimer, E. M. Jorgensen and M. L. Nonet (2001). "A post-docking role for active zone protein Rim." *Nat Neurosci* 4(10): 997-1005.
- Kozlovsky, Y. and M. M. Kozlov (2002). "Stalk model of membrane fusion: solution of energy crisis." *Biophys J* 82(2): 882-895.
- Kubo, Y., T. Miyashita and Y. Murata (1998). "Structural basis for a Ca²⁺-sensing function of the metabotropic glutamate receptors." *Science* 279(5357): 1722-1725.
- Kuno, T., H. Shuntoh, M. Sakaue, K. Saijoh, T. Takeda, K. Fukuda and C. Tanaka (1988). "Site-directed mutagenesis of the cAMP-binding sites of the recombinant type I regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase." *Biochem Biophys Res Commun* 153(3): 1244-1250.
- Kuromi, H. and Y. Kidokoro (2005). "Exocytosis and endocytosis of synaptic vesicles and functional roles of vesicle pools: lessons from the Drosophila neuromuscular junction." *Neuroscientist* 11(2): 138-147.
- Kvetnansky, R., E. L. Sabban and M. Palkovits (2009). "Catecholaminergic systems in stress: structural and molecular genetic approaches." *Physiol Rev* 89(2): 535-606.
- Kwan, E. P., X. Gao, Y. M. Leung and H. Y. Gaisano (2007). "Activation of exchange protein directly activated by cyclic adenosine monophosphate and protein kinase A regulate common and distinct steps in promoting plasma membrane exocytic and granule-to-granule fusions in rat islet beta cells." *Pancreas* 35(3): e45-54.
- Kwan, E. P., L. Xie, L. Sheu, T. Ohtsuka and H. Y. Gaisano (2007). "Interaction between Munc13-1 and RIM is critical for glucagon-like peptide-1 mediated rescue of exocytotic defects in Munc13-1 deficient pancreatic beta-cells." *Diabetes* 56(10): 2579-2588.

- Kyuyoung, C. L. and J. R. Huguenard (2014). "Modulation of short-term plasticity in the corticothalamic circuit by group III metabotropic glutamate receptors." *J Neurosci* 34(2): 675-687.
- Lacey, C. J., C. A. Potheary and T. E. Salt (2005). "Modulation of retino-collicular transmission by Group III metabotropic glutamate receptors at different ages during development." *Neuropharmacology* 49 Suppl 1: 26-34.
- Lachamp, P. M., Y. Liu and S. J. Liu (2009). "Glutamatergic modulation of cerebellar interneuron activity is mediated by an enhancement of GABA release and requires protein kinase A/RIM1alpha signaling." *J Neurosci* 29(2): 381-392.
- Ladera, C., C. Godino Mdel, R. Martin, R. Lujan, R. Shigemoto, F. Ciruela, M. Torres and J. Sanchez-Prieto (2007). "The coexistence of multiple receptors in a single nerve terminal provides evidence for pre-synaptic integration." *J Neurochem* 103(6): 2314-2326.
- Ladera, C., R. Martin, D. Bartolome-Martin, M. Torres and J. Sanchez-Prieto (2009). "Partial compensation for N-type Ca(2+) channel loss by P/Q-type Ca(2+) channels underlines the differential release properties supported by these channels at cerebrocortical nerve terminals." *Eur J Neurosci* 29(6): 1131-1140.
- Laezza, F., J. J. Doherty and R. Dingledine (1999). "Long-term depression in hippocampal interneurons: joint requirement for pre- and postsynaptic events." *Science* 285(5432): 1411-1414.
- Lai, Y., J. Diao, D. J. Cipriano, Y. Zhang, R. A. Pfuetzner, M. S. Padolina and A. T. Brunger (2014). "Complexin inhibits spontaneous release and synchronizes Ca2+-triggered synaptic vesicle fusion by distinct mechanisms." *Elife* 3: e03756.
- Landis, D. M. and T. S. Reese (1983). "Cytoplasmic organization in cerebellar dendritic spines." *J Cell Biol* 97(4): 1169-1178.
- Lao, G., V. Scheuss, C. M. Gerwin, Q. Su, S. Mochida, J. Rettig and Z. H. Sheng (2000). "Syntaphilin: a syntaxin-1 clamp that controls SNARE assembly." *Neuron* 25(1): 191-201.
- Laurent, A. C., M. Breckler, M. Berthouze and F. Lezoualc'h (2012). "Role of Epac in brain and heart." *Biochem Soc Trans* 40(1): 51-57.
- Lauri, S. E., A. Vesikansa, M. Segerstrale, G. L. Collingridge, J. T. Isaac and T. Taira (2006). "Functional maturation of CA1 synapses involves activity-dependent loss of tonic kainate receptor-mediated inhibition of glutamate release." *Neuron* 50(3): 415-429.
- Lavezzari, G. and K. W. Roche (2007). "Constitutive endocytosis of the metabotropic glutamate receptor mGluR7 is clathrin-independent." *Neuropharmacology* 52(1): 100-107.
- Lavoie, C., J. F. Mercier, A. Salahpour, D. Umapathy, A. Breit, L. R. Villeneuve, W. Z. Zhu, R. P. Xiao, E. G. Lakatta, M. Bouvier and T. E. Hebert (2002). "Beta 1/beta 2-adrenergic receptor heterodimerization regulates beta 2-adrenergic receptor internalization and ERK signaling efficacy." *J Biol Chem* 277(38): 35402-35410.
- Lee, D., K. H. Lee, W. K. Ho and S. H. Lee (2007). "Target cell-specific involvement of presynaptic mitochondria in post-tetanic potentiation at hippocampal mossy fiber synapses." *J Neurosci* 27(50): 13603-13613.
- Lee, R. K., W. Araki and R. J. Wurtman (1997). "Stimulation of amyloid precursor protein synthesis by adrenergic receptors coupled to cAMP formation." *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(10): 5422-5426.
- Lefkowitz, R. J., J. Pitcher, K. Krueger and Y. Daaka (1998). "Mechanisms of beta-adrenergic receptor desensitization and resensitization." *Adv Pharmacol* 42: 416-420.
- Lerma, J. and J. M. Marques (2013). "Kainate receptors in health and disease." *Neuron* 80(2): 292-311.
- Li, C., B. Ullrich, J. Z. Zhang, R. G. Anderson, N. Brose and T. C. Sudhof (1995). "Ca(2+)-dependent and -independent activities of neural and non-neural synaptotagmins." *Nature* 375(6532): 594-599.
- Li, S., M. Jin, D. Zhang, T. Yang, T. Koeglsperger, H. Fu and D. J. Selkoe (2013). "Environmental novelty activates beta2-adrenergic signaling to prevent the impairment of hippocampal LTP by Abeta oligomers." *Neuron* 77(5): 929-941.
- Li, W. and V. Neugebauer (2006). "Differential changes of group II and group III mGluR function in central amygdala neurons in a model of arthritic pain." *J Neurophysiol* 96(4): 1803-1815.
- Li, X., E. L. Gardner and Z. X. Xi (2008). "The metabotropic glutamate receptor 7 (mGluR7) allosteric agonist AMN082 modulates nucleus accumbens GABA and glutamate, but not dopamine, in rats." *Neuropharmacology* 54(3): 542-551.
- Li, X., J. Li, X. Q. Peng, K. Spiller, E. L. Gardner and Z. X. Xi (2009). "Metabotropic glutamate receptor 7 modulates the rewarding effects of cocaine in rats: involvement of a ventral pallidal GABAergic mechanism." *Neuropsychopharmacology* 34(7): 1783-1796.
- Li, X. M., C. C. Li, S. S. Yu, J. T. Chen, K. Sabapathy and D. Y. Ruan (2007). "JNK1 contributes to metabotropic glutamate receptor-dependent long-term depression and short-term synaptic plasticity in the mice area hippocampal CA1." *Eur J Neurosci* 25(2): 391-396.
- Li, Y., S. Asuri, J. F. Rebhun, A. F. Castro, N. C. Paranavitana and L. A. Quilliam (2006). "The RAP1 guanine nucleotide exchange factor Epac2 couples cyclic AMP and Ras signals at the plasma membrane." *J Biol Chem* 281(5): 2506-2514.
- Limbach, C., M. M. Laue, X. Wang, B. Hu, N. Thiede, G. Hultqvist and M. W. Kilimann (2011). "Molecular in situ topology of Aczonin/Piccolo and associated proteins at the mammalian neurotransmitter release site." *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(31): E392-401.
- Lin, Y. C., J. Huang, Q. Zhang, J. M. Hollander, J. C. Frisbee, K. H. Martin, C. Nestor, R. Goodman and H. G. Yu (2010). "Inactivation of L-type calcium channel modulated by HCN2 channel." *Am J Physiol Cell Physiol* 298(5): C1029-1037.
- Lin, Y. W., M. Y. Min, T. H. Chiu and H. W. Yang (2003). "Enhancement of associative long-term potentiation by activation of beta-adrenergic receptors at CA1 synapses in rat hippocampal slices." *J Neurosci* 23(10): 4173-4181.
- Linden, A. M., B. G. Johnson, S. C. Peters, H. E. Shannon, M. Tian, Y. Wang, J. L. Yu, A. Koster, M. Baez and D. D. Schoepp (2002). "Increased anxiety-related behavior in mice deficient for metabotropic glutamate 8 (mGlu8) receptor." *Neuropharmacology* 43(2): 251-259.

- Liou, J. C., K. H. Kang, L. S. Chang and S. Y. Ho (2006). "Mechanism of beta-bungarotoxin in facilitating spontaneous transmitter release at neuromuscular synapse." *Neuropharmacology* 51(3): 671-680.
- Lipstein, N., T. Sakaba, B. H. Cooper, K. H. Lin, N. Strenzke, U. Ashery, J. S. Rhee, H. Taschenberger, E. Neher and N. Brose (2013). "Dynamic control of synaptic vesicle replenishment and short-term plasticity by Ca(2+)-calmodulin-Munc13-1 signaling." *Neuron* 79(1): 82-96.
- Lipstein, N., S. Schaks, K. Dimova, S. Kalkhof, C. Ihling, K. Kolbel, U. Ashery, J. Rhee, N. Brose, A. Sinz and O. Jahn (2012). "Nonconserved Ca(2+)/calmodulin binding sites in Munc13s differentially control synaptic short-term plasticity." *Mol Cell Biol* 32(22): 4628-4641.
- Littleton, J. T., J. Bai, B. Vyas, R. Desai, A. E. Baltus, M. B. Garment, S. D. Carlson, B. Ganetzky and E. R. Chapman (2001). "synaptotagmin mutants reveal essential functions for the C2B domain in Ca2+-triggered fusion and recycling of synaptic vesicles in vivo." *J Neurosci* 21(5): 1421-1433.
- Littleton, J. T., M. Stern, K. Schulze, M. Perin and H. J. Bellen (1993). "Mutational analysis of Drosophila synaptotagmin demonstrates its essential role in Ca(2+)-activated neurotransmitter release." *Cell* 74(6): 1125-1134.
- Liu, H., J. A. Enyeart and J. J. Enyeart (2008). "ACTH inhibits bTREK-1 K+ channels through multiple cAMP-dependent signaling pathways." *J Gen Physiol* 132(2): 279-294.
- Liu, K. S., M. Siebert, S. Mertel, E. Knoche, S. Wegener, C. Wichmann, T. Matkovic, K. Muhammad, H. Depner, C. Mettke, J. Buckers, S. W. Hell, M. Muller, G. W. Davis, D. Schmitz and S. J. Sigrist (2011). "RIM-binding protein, a central part of the active zone, is essential for neurotransmitter release." *Science* 334(6062): 1565-1569.
- Llano, I., J. Gonzalez, C. Caputo, F. A. Lai, L. M. Blayney, Y. P. Tan and A. Marty (2000). "Presynaptic calcium stores underlie large-amplitude miniature IPSCs and spontaneous calcium transients." *Nat Neurosci* 3(12): 1256-1265.
- Llinas, R. R., M. Sugimori, K. A. Moran, J. E. Moreira and M. Fukuda (2004). "Vesicular reuptake inhibition by a synaptotagmin I C2B domain antibody at the squid giant synapse." *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(51): 17855-17860.
- Lodge, D., P. Tidball, M. S. Mercier, S. J. Lucas, L. Hanna, L. Ceolin, M. Kritikos, S. M. Fitzjohn, J. L. Sherwood, N. Bannister, A. Volianskis, D. E. Jane, Z. A. Bortolotto and G. L. Collingridge (2013). "Antagonists reversibly reverse chemical LTD induced by group I, group II and group III metabotropic glutamate receptors." *Neuropharmacology* 74: 135-146.
- Lonart, G., R. Janz, K. M. Johnson and T. C. Sudhof (1998). "Mechanism of action of rab3A in mossy fiber LTP." *Neuron* 21(5): 1141-1150.
- Lonart, G., S. Schoch, P. S. Kaeser, C. J. Larkin, T. C. Sudhof and D. J. Linden (2003). "Phosphorylation of RIM1alpha by PKA triggers presynaptic long-term potentiation at cerebellar parallel fiber synapses." *Cell* 115(1): 49-60.
- Lopez De Jesus, M., M. B. Stope, P. A. Oude Weernink, Y. Mahlke, C. Borgermann, V. N. Ananaba, C. Rimbach, D. Roskopf, M. C. Michel, K. H. Jakobs and M. Schmidt (2006). "Cyclic AMP-dependent and Epac-mediated activation of R-Ras by G protein-coupled receptors leads to phospholipase D stimulation." *J Biol Chem* 281(31): 21837-21847.
- Lopez, S., L. Jouve, N. Turle-Lorenzo, L. Kerkerian-Legoff, P. Salin and M. Amalric (2012). "Antiparkinsonian action of a selective group III mGlu receptor agonist is associated with reversal of subthalamonigral overactivity." *Neurobiol Dis* 46(1): 69-77.
- Lopez, S., N. Turle-Lorenzo, F. Acher, E. De Leonibus, A. Mele and M. Amalric (2007). "Targeting group III metabotropic glutamate receptors produces complex behavioral effects in rodent models of Parkinson's disease." *J Neurosci* 27(25): 6701-6711.
- Lopez-Bendito, G., R. Shigemoto, A. Fairen and R. Lujan (2002). "Differential distribution of group I metabotropic glutamate receptors during rat cortical development." *Cereb Cortex* 12(6): 625-638.
- Lopez, M., U. Humbel, M. C. Pflimlin and J. N. Kew (2003). "Group III metabotropic glutamate receptors as autoreceptors in the cerebellar cortex." *Br J Pharmacol* 138(4): 614-625.
- Losonczy, A., P. Somogyi and Z. Nusser (2003). "Reduction of excitatory postsynaptic responses by persistently active metabotropic glutamate receptors in the hippocampus." *J Neurophysiol* 89(4): 1910-1919.
- Lou, X., N. Korogod, N. Brose and R. Schneggenburger (2008). "Phorbol esters modulate spontaneous and Ca2+-evoked transmitter release via acting on both Munc13 and protein kinase C." *J Neurosci* 28(33): 8257-8267.
- Lou, X., V. Scheuss and R. Schneggenburger (2005). "Allosteric modulation of the presynaptic Ca2+ sensor for vesicle fusion." *Nature* 435(7041): 497-501.
- Loy, K., O. Welzel, J. Kornhuber and T. W. Groemer (2014). "Common strength and localization of spontaneous and evoked synaptic vesicle release sites." *Mol Brain* 7: 23.
- Lu, J., H. Li, Y. Wang, T. C. Sudhof and J. Rizo (2005). "Solution structure of the RIM1alpha PDZ domain in complex with an ELKS1b C-terminal peptide." *J Mol Biol* 352(2): 455-466.
- Lu, J., M. Machius, I. Dulubova, H. Dai, T. C. Sudhof, D. R. Tomchick and J. Rizo (2006). "Structural basis for a Munc13-1 homodimer to Munc13-1/RIM heterodimer switch." *PLoS Biol* 4(7): e192.
- Lucchesi, O., M. C. Ruete, M. A. Bustos, M. F. Quevedo and C. N. Tomes (2016). "The signaling module cAMP/Epac/Rap1/PLCepsilon/IP3 mobilizes acrosomal calcium during sperm exocytosis." *Biochim Biophys Acta* 1863(4): 544-561.
- Lucic, V., T. Yang, G. Schweikert, F. Forster and W. Baumeister (2005). "Morphological characterization of molecular complexes present in the synaptic cleft." *Structure* 13(3): 423-434.
- Lujan, R., R. Shigemoto, A. Kulik and J. M. Juiz (2004). "Localization of the GABAB receptor 1a/b subunit relative to glutamatergic synapses in the dorsal cochlear nucleus of the rat." *J Comp Neurol* 475(1): 36-46.
- Luo, F., T. Bacaj and T. C. Sudhof (2015). "Synaptotagmin-7 Is Essential for Ca2+-Triggered Delayed Asynchronous Release

- But Not for Ca²⁺-Dependent Vesicle Priming in Retinal Ribbon Synapses." *J Neurosci* 35(31): 11024-11033.
- Lupica, C. R., J. A. Bell, A. F. Hoffman and P. L. Watson (2001). "Contribution of the hyperpolarization-activated current (I_h) to membrane potential and GABA release in hippocampal interneurons." *J Neurophysiol* 86(1): 261-268.
- Luscher, C. and R. C. Malenka (2012). "NMDA receptor-dependent long-term potentiation and long-term depression (LTP/LTD)." *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4(6).
- Ma, C., W. Li, Y. Xu and J. Rizo (2011). "Munc13 mediates the transition from the closed syntaxin-Munc18 complex to the SNARE complex." *Nat Struct Mol Biol* 18(5): 542-549.
- Ma, C., L. Su, A. B. Seven, Y. Xu and J. Rizo (2013). "Reconstitution of the vital functions of Munc18 and Munc13 in neurotransmitter release." *Science* 339(6118): 421-425.
- Ma, N., T. Abel and P. J. Hernandez (2009). "Exchange protein activated by cAMP enhances long-term memory formation independent of protein kinase A." *Learn Mem* 16(6): 367-370.
- Macek, T. A., H. Schaffhauser and P. J. Conn (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(16): 6138-6146.
- Macek, T. A., D. G. Winder, R. W. t. Gereau, C. O. Ladd and P. J. Conn (1996). "Differential involvement of group II and group III mGluRs as autoreceptors at lateral and medial perforant path synapses." *J Neurophysiol* 76(6): 3798-3806.
- Macinnes, N. and S. Duty (2008). "Group III metabotropic glutamate receptors act as hetero-receptors modulating evoked GABA release in the globus pallidus in vivo." *Eur J Pharmacol* 580(1-2): 95-99.
- MacInnes, N., M. J. Messenger and S. Duty (2004). "Activation of group III metabotropic glutamate receptors in selected regions of the basal ganglia alleviates akinesia in the reserpine-treated rat." *Br J Pharmacol* 141(1): 15-22.
- Magiera, M. M., M. Gupta, C. J. Rundell, N. Satish, I. Ernens and S. J. Yarwood (2004). "Exchange protein directly activated by cAMP (EPAC) interacts with the light chain (LC) 2 of MAP1A." *Biochem J* 382(Pt 3): 803-810.
- Magnelli, V., M. Nobile and E. Maestroni (1992). "K⁺ channels in PC12 cells are affected by propofol." *Pflugers Arch* 420(3-4): 393-398.
- Maillet, M., S. J. Robert, M. Cacquevel, M. Gastineau, D. Vivien, J. Bertoglio, J. L. Zugaza, R. Fischmeister and F. Lezoualc'h (2003). "Crosstalk between Rap1 and Rac regulates secretion of sAPP α ." *Nat Cell Biol* 5(7): 633-639.
- Maione, S., L. Cristino, A. L. Migliozzi, A. L. Georgiou, K. Starowicz, T. E. Salt and V. Di Marzo (2009). "TRPV1 channels control synaptic plasticity in the developing superior colliculus." *J Physiol* 587(Pt 11): 2521-2535.
- Manahan-Vaughan, D. and K. G. Reymann (1995). "Regional and developmental profile of modulation of hippocampal synaptic transmission and LTP by AP4-sensitive mGluRs in vivo." *Neuropharmacology* 34(8): 991-1001.
- Manzoni, O., J. M. Michel and J. Bockaert (1997). "Metabotropic glutamate receptors in the rat nucleus accumbens." *Eur J Neurosci* 9(7): 1514-1523.
- Manzoni, O., L. Prezeau, F. Sladeczek and J. Bockaert (1992). "Trans-ACPD inhibits cAMP formation via a pertussis toxin-sensitive G-protein." *Eur J Pharmacol* 225(4): 357-358.
- Manzoni, O. J., F. Finiels-Marlier, I. Sasseti, J. Bockaert, C. le Peuch and F. A. Sladeczek (1990). "The glutamate receptor of the Qp-type activates protein kinase C and is regulated by protein kinase C." *Neurosci Lett* 109(1-2): 146-151.
- Mao, L., M. Guo, D. Jin, B. Xue and J. Q. Wang (2013). "Group III metabotropic glutamate receptors and drug addiction." *Front Med* 7(4): 445-451.
- Mao, L., Y. S. Lau and J. Q. Wang (2000). "Activation of group III metabotropic glutamate receptors inhibits basal and amphetamine-stimulated dopamine release in rat dorsal striatum: an in vivo microdialysis study." *Eur J Pharmacol* 404(3): 289-297.
- Mao, L. and J. Q. Wang (2000). "Distinct inhibition of acute cocaine-stimulated motor activity following microinjection of a group III metabotropic glutamate receptor agonist into the dorsal striatum of rats." *Pharmacol Biochem Behav* 67(1): 93-101.
- Marabese, I., V. de Novellis, E. Palazzo, L. Mariani, D. Siniscalco, L. Rodella, F. Rossi and S. Maione (2005). "Differential roles of mGlu8 receptors in the regulation of glutamate and gamma-aminobutyric acid release at periaqueductal grey level." *Neuropharmacology* 49 Suppl 1: 157-166.
- Marabese, I., F. Rossi, E. Palazzo, V. de Novellis, K. Starowicz, L. Cristino, D. Vita, L. Gatta, F. Guida, V. Di Marzo, F. Rossi and S. Maione (2007). "Periaqueductal gray metabotropic glutamate receptor subtype 7 and 8 mediate opposite effects on amino acid release, rostral ventromedial medulla cell activities, and thermal nociception." *J Neurophysiol* 98(1): 43-53.
- Marino, M. J., O. Valenti, J. A. O'Brien, D. L. Williams, Jr. and P. J. Conn (2003). "Modulation of inhibitory transmission in the rat globus pallidus by activation of mGluR4." *Ann N Y Acad Sci* 1003: 435-437.
- Marino, M. J., D. L. Williams, Jr., J. A. O'Brien, O. Valenti, T. P. McDonald, M. K. Clements, R. Wang, A. G. DiLella, J. F. Hess, G. G. Kinney and P. J. Conn (2003). "Allosteric modulation of group III metabotropic glutamate receptor 4: a potential approach to Parkinson's disease treatment." *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(23): 13668-13673.
- Marks, B. and H. T. McMahon (1998). "Calcium triggers calcineurin-dependent synaptic vesicle recycling in mammalian nerve terminals." *Curr Biol* 8(13): 740-749.
- Marra, V., J. J. Burden, J. R. Thorpe, I. T. Smith, S. L. Smith, M. Hausser, T. Branco and K. Staras (2012). "A preferentially segregated recycling vesicle pool of limited size supports neurotransmission in native central synapses." *Neuron* 76(3): 579-589.
- Martin, R., D. Bartolome-Martin, M. Torres and J. Sanchez-Prieto (2011). "Non-additive potentiation of glutamate release by phorbol esters and metabotropic mGlu7 receptor in cerebrocortical nerve terminals." *J Neurochem* 116(4): 476-485.

- Martin, R., T. Durroux, F. Ciruela, M. Torres, J. P. Pin and J. Sanchez-Prieto (2010). "The metabotropic glutamate receptor mGlu7 activates phospholipase C, translocates munc-13-1 protein, and potentiates glutamate release at cerebrocortical nerve terminals." *J Biol Chem* 285(23): 17907-17917.
- Martin, R., C. Ladera, D. Bartolome-Martin, M. Torres and J. Sanchez-Prieto (2008). "The inhibition of release by mGlu7 receptors is independent of the Ca²⁺ channel type but associated to GABAB and adenosine A1 receptors." *Neuropharmacology* 55(4): 464-473.
- Martin, R., M. Torres and J. Sanchez-Prieto (2007). "mGluR7 inhibits glutamate release through a PKC-independent decrease in the activity of P/Q-type Ca²⁺ channels and by diminishing cAMP in hippocampal nerve terminals." *Eur J Neurosci* 26(2): 312-322.
- Martin, T. F. (2015). "PI(4,5)P(2)-binding effector proteins for vesicle exocytosis." *Biochim Biophys Acta* 1851(6): 785-793.
- Mateos, J. M., J. Azkue, R. Benitez, R. Sarria, J. Losada, F. Conquet, F. Ferraguti, R. Kuhn, T. Knopfel and P. Grandes (1998). "Immunocytochemical localization of the mGluR1b metabotropic glutamate receptor in the rat hypothalamus." *J Comp Neurol* 390(2): 225-233.
- Mathew, S. S. and J. J. Hablitz (2008). "Calcium release via activation of presynaptic IP3 receptors contributes to kainate-induced IPSC facilitation in rat neocortex." *Neuropharmacology* 55(1): 106-116.
- Matsui, T. and H. Kita (2003). "Activation of group III metabotropic glutamate receptors presynaptically reduces both GABAergic and glutamatergic transmission in the rat globus pallidus." *Neuroscience* 122(3): 727-737.
- Matveev, V., R. S. Zucker and A. Sherman (2004). "Facilitation through buffer saturation: constraints on endogenous buffering properties." *Biophys J* 86(5): 2691-2709.
- Maximov, A., O. H. Shin, X. Liu and T. C. Sudhof (2007). "Synaptotagmin-12, a synaptic vesicle phosphoprotein that modulates spontaneous neurotransmitter release." *J Cell Biol* 176(1): 113-124.
- Maximov, A. and T. C. Sudhof (2005). "Autonomous function of synaptotagmin 1 in triggering synchronous release independent of asynchronous release." *Neuron* 48(4): 547-554.
- Maximov, A., J. Tang, X. Yang, Z. P. Pang and T. C. Sudhof (2009). "Complexin controls the force transfer from SNARE complexes to membranes in fusion." *Science* 323(5913): 516-521.
- Mayer, A., W. Wickner and A. Haas (1996). "Sec18p (NSF)-driven release of Sec17p (alpha-SNAP) can precede docking and fusion of yeast vacuoles." *Cell* 85(1): 83-94.
- McCool, B. A., J. P. Pin, P. F. Brust, M. M. Harpold and D. M. Lovinger (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(4): 912-922.
- McCool, B. A., J. P. Pin, M. M. Harpold, P. F. Brust, K. A. Stauderman and D. M. Lovinger (1998). "Rat group I metabotropic glutamate receptors inhibit neuronal Ca²⁺ channels via multiple signal transduction pathways in HEK 293 cells." *J Neurophysiol* 79(1): 379-391.
- McMahon, H. T. and D. G. Nicholls (1991). "Transmitter glutamate release from isolated nerve terminals: evidence for biphasic release and triggering by localized Ca²⁺." *J Neurochem* 56(1): 86-94.
- McPhee, I., L. C. Gibson, J. Kewney, C. Darroch, P. A. Stevens, D. Spinks, A. Cooreman and S. J. MacKenzie (2005). "Cyclic nucleotide signalling: a molecular approach to drug discovery for Alzheimer's disease." *Biochem Soc Trans* 33(Pt 6): 1330-1332.
- Mei, F. C. and X. Cheng (2005). "Interplay between exchange protein directly activated by cAMP (Epac) and microtubule cytoskeleton." *Mol Biosyst* 1(4): 325-331.
- Mellor, J. and R. A. Nicoll (2001). "Hippocampal mossy fiber LTP is independent of postsynaptic calcium." *Nat Neurosci* 4(2): 125-126.
- Mellor, J., R. A. Nicoll and D. Schmitz (2002). "Mediation of hippocampal mossy fiber long-term potentiation by presynaptic Ih channels." *Science* 295(5552): 143-147.
- Menegon, A., D. Bonanomi, C. Albertinazzi, F. Lotti, G. Ferrari, H. T. Kao, F. Benfenati, P. Baldelli and F. Valtorta (2006). "Protein kinase A-mediated synapsin I phosphorylation is a central modulator of Ca²⁺-dependent synaptic activity." *J Neurosci* 26(45): 11670-11681.
- Mercier, J. F., A. Salahpour, S. Angers, A. Breit and M. Bouvier (2002). "Quantitative assessment of beta 1- and beta 2-adrenergic receptor homo- and heterodimerization by bioluminescence resonance energy transfer." *J Biol Chem* 277(47): 44925-44931.
- Mercier, M. S. and D. Lodge (2014). "Group III metabotropic glutamate receptors: pharmacology, physiology and therapeutic potential." *Neurochem Res* 39(10): 1876-1894.
- Mercier, M. S., D. Lodge, G. Fang, C. S. Nicolas, V. J. Collett, D. E. Jane, G. L. Collingridge and Z. A. Bortolotto (2013). "Characterisation of an mGlu8 receptor-selective agonist and antagonist in the lateral and medial perforant path inputs to the dentate gyrus." *Neuropharmacology* 67: 294-303.
- Middeldorp, C. M., J. M. Vink, J. M. Hetteema, E. J. de Geus, K. S. Kandler, G. Willemsen, M. C. Neale, D. I. Boomsma and X. Chen (2010). "An association between Epac-1 gene variants and anxiety and depression in two independent samples." *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 153B(1): 214-219.
- Miesenbock, G., D. A. De Angelis and J. E. Rothman (1998). "Visualizing secretion and synaptic transmission with pH-sensitive green fluorescent proteins." *Nature* 394(6689): 192-195.
- Millan, C., E. Castro, M. Torres, R. Shigemoto and J. Sanchez-Prieto (2003). "Co-expression of metabotropic glutamate receptor 7 and N-type Ca²⁺ channels in single cerebrocortical nerve terminals of adult rats." *J Biol Chem* 278(26): 23955-23962.
- Millan, C., R. Lujan, R. Shigemoto and J. Sanchez-Prieto (2002). "The inhibition of glutamate release by metabotropic glutamate receptor 7 affects both [Ca²⁺]_i and cAMP: evidence for a strong reduction of Ca²⁺ entry in single nerve terminals." *J Biol Chem* 277(16): 14092-14101.

- Millan, C., R. Lujan, R. Shigemoto and J. Sanchez-Prieto (2002). "Subtype-specific expression of group III metabotropic glutamate receptors and Ca²⁺ channels in single nerve terminals." *J Biol Chem* 277(49): 47796-47803.
- Millan, C., M. Torres and J. Sanchez-Prieto (2003). "Co-activation of PKA and PKC in cerebrotal nerve terminals synergistically facilitates glutamate release." *J Neurochem* 87(5): 1101-1111.
- Mineff, E. and J. Valtchanoff (1999). "Metabotropic glutamate receptors 2 and 3 expressed by astrocytes in rat ventrobasal thalamus." *Neurosci Lett* 270(2): 95-98.
- Miranda, M. I., R. T. LaLumiere, T. V. Buen, F. Bermudez-Rattoni and J. L. McGaugh (2003). "Blockade of noradrenergic receptors in the basolateral amygdala impairs taste memory." *Eur J Neurosci* 18(9): 2605-2610.
- Mistry, R., S. Dennis, M. Frerking and J. R. Mellor (2011). "Dentate gyrus granule cell firing patterns can induce mossy fiber long-term potentiation in vitro." *Hippocampus* 21(11): 1157-1168.
- Misura, K. M., R. H. Scheller and W. I. Weis (2000). "Three-dimensional structure of the neuronal-Sec1-syntaxin 1a complex." *Nature* 404(6776): 355-362.
- Mittelstaedt, T., E. Alvarez-Baron and S. Schoch (2010). "RIM proteins and their role in synapse function." *Biol Chem* 391(6): 599-606.
- Mohrmann, R., H. de Wit, M. Verhage, E. Neher and J. B. Sorensen (2010). "Fast vesicle fusion in living cells requires at least three SNARE complexes." *Science* 330(6003): 502-505.
- Moldrich, R. X., P. M. Beart, D. E. Jane, A. G. Chapman and B. S. Meldrum (2001). "Anticonvulsant activity of 3,4-dicarboxyphenylglycines in DBA/2 mice." *Neuropharmacology* 40(5): 732-735.
- Moldrich, R. X., A. G. Chapman, G. De Sarro and B. S. Meldrum (2003). "Glutamate metabotropic receptors as targets for drug therapy in epilepsy." *Eur J Pharmacol* 476(1-2): 3-16.
- Monastyrskaya, K., K. Lundstrom, D. Plahl, G. Acuna, C. Schweitzer, P. Malherbe and V. Mutel (1999). "Effect of the umami peptides on the ligand binding and function of rat mGlu4a receptor might implicate this receptor in the monosodium glutamate taste transduction." *Br J Pharmacol* 128(5): 1027-1034.
- Moody, T. D., M. J. Thomas, M. Makhinson and T. J. O'Dell (1998). "5-Hz stimulation of CA3 pyramidal cell axons induces a beta-adrenergic modulated potentiation at synapses on CA1, but not CA3, pyramidal cells." *Brain Res* 794(1): 75-79.
- Morgans, C. W., R. L. Brown and R. M. Duvoisin (2010). "TRPM1: the endpoint of the mGluR6 signal transduction cascade in retinal ON-bipolar cells." *Bioessays* 32(7): 609-614.
- Moulder, K. L., X. Jiang, C. Chang, A. A. Taylor, A. M. Benz, A. C. Conti, L. J. Muglia and S. Mennerick (2008). "A specific role for Ca²⁺-dependent adenylyl cyclases in recovery from adaptive presynaptic silencing." *J Neurosci* 28(20): 5159-5168.
- Moulder, K. L., X. Jiang, A. A. Taylor, J. W. Olney and S. Mennerick (2006). "Physiological activity depresses synaptic function through an effect on vesicle priming." *J Neurosci* 26(24): 6618-6626.
- Muller, M., K. S. Liu, S. J. Sigrist and G. W. Davis (2012). "RIM controls homeostatic plasticity through modulation of the readily-releasable vesicle pool." *J Neurosci* 32(47): 16574-16585.
- Munoz-Cuevas, J., H. Vara and A. Colino (2004). "Characterization of release-independent short-term depression in the juvenile rat hippocampus." *J Physiol* 558(Pt 2): 527-548.
- Murray, A. J. and D. A. Shewan (2008). "Epac mediates cyclic AMP-dependent axon growth, guidance and regeneration." *Mol Cell Neurosci* 38(4): 578-588.
- Muto, T., D. Tsuchiya, K. Morikawa and H. Jingami (2007). "Structures of the extracellular regions of the group II/III metabotropic glutamate receptors." *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(10): 3759-3764.
- Myoga, M. H. and W. G. Regehr (2011). "Calcium microdomains near R-type calcium channels control the induction of presynaptic long-term potentiation at parallel fiber to purkinje cell synapses." *J Neurosci* 31(14): 5235-5243.
- Nagy, G., J. H. Kim, Z. P. Pang, U. Matti, J. Rettig, T. C. Sudhof and J. B. Sorensen (2006). "Different effects on fast exocytosis induced by synaptotagmin 1 and 2 isoforms and abundance but not by phosphorylation." *J Neurosci* 26(2): 632-643.
- Nagy, G., K. Reim, U. Matti, N. Brose, T. Binz, J. Rettig, E. Neher and J. B. Sorensen (2004). "Regulation of releasable vesicle pool sizes by protein kinase A-dependent phosphorylation of SNAP-25." *Neuron* 41(3): 417-429.
- Naie, K., S. Gundimi, H. Siegmund, U. Heinemann and D. Manahan-Vaughan (2006). "Group III metabotropic glutamate receptor-mediated, chemically induced long-term depression differentially affects cell viability in the hippocampus." *Eur J Pharmacol* 535(1-3): 104-113.
- Naie, K. and D. Manahan-Vaughan (2005). "Investigations of the protein synthesis dependency of mGluR-induced long-term depression in the dentate gyrus of freely moving rats." *Neuropharmacology* 49 Suppl 1: 35-44.
- Nakajima, Y., H. Iwakabe, C. Akazawa, H. Nawa, R. Shigemoto, N. Mizuno and S. Nakanishi (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(16): 11868-11873.
- Nakashima, S., Y. Banno, T. Watanabe, Y. Nakamura, T. Mizutani, H. Sakai, Y. Zhao, Y. Sugimoto and Y. Nozawa (1995). "Deletion and site-directed mutagenesis of EF-hand domain of phospholipase C-delta 1: effects on its activity." *Biochem Biophys Res Commun* 211(2): 365-369.
- Neher, E. and T. Sakaba (2008). "Multiple roles of calcium ions in the regulation of neurotransmitter release." *Neuron* 59(6): 861-872.
- Neugebauer, V., N. B. Keele and P. Shinnick-Gallagher (1997). "Epileptogenesis in vivo enhances the sensitivity of inhibitory presynaptic metabotropic glutamate receptors in basolateral amygdala neurons in vitro." *J Neurosci* 17(3): 983-995.
- Neugebauer, V., N. B. Keele and P. Shinnick-Gallagher (1997). "Loss of long-lasting potentiation mediated by group III mGluRs

- in amygdala neurons in kindling-induced epileptogenesis." *J Neurophysiol* 78(6): 3475-3478.
- Neugebauer, V., F. Zinebi, R. Russell, J. P. Gallagher and P. Shinnick-Gallagher (2000). "Cocaine and kindling alter the sensitivity of group II and III metabotropic glutamate receptors in the central amygdala." *J Neurophysiol* 84(2): 759-770.
- Nevian, T. and B. Sakmann (2006). "Spine Ca²⁺ signaling in spike-timing-dependent plasticity." *J Neurosci* 26(43): 11001-11013.
- Newton, A. C. (2001). "Protein kinase C: structural and spatial regulation by phosphorylation, cofactors, and macromolecular interactions." *Chem Rev* 101(8): 2353-2364.
- Nguyen Truong, C. Q., D. Nestvogel, O. Ratai, C. Schirra, D. R. Stevens, N. Brose, J. Rhee and J. Rettig (2014). "Secretory vesicle priming by CAPS is independent of its SNARE-binding MUN domain." *Cell Rep* 9(3): 902-909.
- Ni, Y., X. Zhao, G. Bao, L. Zou, L. Teng, Z. Wang, M. Song, J. Xiong, Y. Bai and G. Pei (2006). "Activation of beta2-adrenergic receptor stimulates gamma-secretase activity and accelerates amyloid plaque formation." *Nat Med* 12(12): 1390-1396.
- Nicholas, A. P., V. A. Pieribone and T. Hokfelt (1993). "Cellular localization of messenger RNA for beta-1 and beta-2 adrenergic receptors in rat brain: an in situ hybridization study." *Neuroscience* 56(4): 1023-1039.
- Nicholls, D. G. (1989). "Release of glutamate, aspartate, and gamma-aminobutyric acid from isolated nerve terminals." *J Neurochem* 52(2): 331-341.
- Nicholls, D. G., T. S. Sihra and J. Sanchez-Prieto (1987). "Calcium-dependent and -independent release of glutamate from synaptosomes monitored by continuous fluorometry." *J Neurochem* 49(1): 50-57.
- Nicoll, R. A. and D. Schmitz (2005). "Synaptic plasticity at hippocampal mossy fibre synapses." *Nat Rev Neurosci* 6(11): 863-876.
- Nielson, K. A. and R. A. Jensen (1994). "Beta-adrenergic receptor antagonist antihypertensive medications impair arousal-induced modulation of working memory in elderly humans." *Behav Neural Biol* 62(3): 190-200.
- Niimura, M., T. Miki, T. Shibasaki, W. Fujimoto, T. Iwanaga and S. Seino (2009). "Critical role of the N-terminal cyclic AMP-binding domain of Epac2 in its subcellular localization and function." *J Cell Physiol* 219(3): 652-658.
- Nijholt, I. M., A. M. Dolga, A. Ostroveanu, P. G. Luiten, M. Schmidt and U. L. Eisel (2008). "Neuronal AKAP150 coordinates PKA and Epac-mediated PKB/Akt phosphorylation." *Cell Signal* 20(10): 1715-1724.
- Nili, U., H. de Wit, A. Gulyas-Kovacs, R. F. Toonen, J. B. Sorensen, M. Verhage and U. Ashery (2006). "Munc18-1 phosphorylation by protein kinase C potentiates vesicle pool replenishment in bovine chromaffin cells." *Neuroscience* 143(2): 487-500.
- Niswender, C. M. and P. J. Conn (2010). "Metabotropic glutamate receptors: physiology, pharmacology, and disease." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 50: 295-322.
- Niswender, C. M., K. A. Johnson, Q. Luo, J. E. Ayala, C. Kim, P. J. Conn and C. D. Weaver (2008). "A novel assay of Gi/o-linked G protein-coupled receptor coupling to potassium channels provides new insights into the pharmacology of the group III metabotropic glutamate receptors." *Mol Pharmacol* 73(4): 1213-1224.
- Nojiri, M., K. M. Loyet, V. A. Klenchin, G. Kabachinski and T. F. Martin (2009). "CAPS activity in priming vesicle exocytosis requires CK2 phosphorylation." *J Biol Chem* 284(28): 18707-18714.
- Nomura, A., R. Shigemoto, Y. Nakamura, N. Okamoto, N. Mizuno and S. Nakanishi (1994). "Developmentally regulated postsynaptic localization of a metabotropic glutamate receptor in rat rod bipolar cells." *Cell* 77(3): 361-369.
- Nonet, M. L., J. E. Staunton, M. P. Kilgard, T. Fergestad, E. Hartweg, H. R. Horvitz, E. M. Jorgensen and B. J. Meyer (1997). "Caenorhabditis elegans rab-3 mutant synapses exhibit impaired function and are partially depleted of vesicles." *J Neurosci* 17(21): 8061-8073.
- Nyiri, G., C. Cserep, E. Szabadits, K. Mackie and T. F. Freund (2005). "CB1 cannabinoid receptors are enriched in the perisynaptic annulus and on preterminal segments of hippocampal GABAergic axons." *Neuroscience* 136(3): 811-822.
- O'Connor, V., O. El Far, E. Bofill-Cardona, C. Nanoff, M. Freissmuth, A. Karschin, J. M. Airas, H. Betz and S. Boehm (1999). "Calmodulin dependence of presynaptic metabotropic glutamate receptor signaling." *Science* 286(5442): 1180-1184.
- O'Dell, T. J., S. A. Connor, J. N. Gelinis and P. V. Nguyen (2010). "Viagra for your synapses: Enhancement of hippocampal long-term potentiation by activation of beta-adrenergic receptors." *Cell Signal* 22(5): 728-736.
- O'Dell, T. J., S. A. Connor, R. Guglietta and P. V. Nguyen (2015). "beta-Adrenergic receptor signaling and modulation of long-term potentiation in the mammalian hippocampus." *Learn Mem* 22(9): 461-471.
- Oestreich, E. A., H. Wang, S. Malik, K. A. Kaproth-Joslin, B. C. Blaxall, G. G. Kelley, R. T. Dirksen and A. V. Smrcka (2007). "Epac-mediated activation of phospholipase C(epsilon) plays a critical role in beta-adrenergic receptor-dependent enhancement of Ca²⁺ mobilization in cardiac myocytes." *J Biol Chem* 282(8): 5488-5495.
- O'Hara, P. J., P. O. Sheppard, H. Thogersen, D. Venezia, B. A. Haldeman, V. McGrane, K. M. Houamed, C. Thomsen, T. L. Gilbert and E. R. Mulvihill (1993). "The ligand-binding domain in metabotropic glutamate receptors is related to bacterial periplasmic binding proteins." *Neuron* 11(1): 41-52.
- Ohishi, H., C. Akazawa, R. Shigemoto, S. Nakanishi and N. Mizuno (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(4): 555-570.
- Ohno-Shosaku, T. and M. Kano (2014). "Endocannabinoid-mediated retrograde modulation of synaptic transmission." *Curr Opin Neurobiol* 29: 1-8.
- Ohtsuka, T., E. Takao-Rikitsu, E. Inoue, M. Inoue, M. Takeuchi, K. Matsubara, M. Deguchi-Tawarada, K. Satoh, K. Morimoto, H.

- Nakanishi and Y. Takai (2002). "Cast: a novel protein of the cytomatrix at the active zone of synapses that forms a ternary complex with RIM1 and munc13-1." *J Cell Biol* 158(3): 577-590.
- Okamoto, N., S. Hori, C. Akazawa, Y. Hayashi, R. Shigemoto, N. Mizuno and S. Nakanishi (1994). "Molecular characterization of a new metabotropic glutamate receptor mGluR7 coupled to inhibitory cyclic AMP signal transduction." *J Biol Chem* 269(2): 1231-1236.
- Okamoto, P. M., J. S. Herskovits and R. B. Vallee (1997). "Role of the basic, proline-rich region of dynamin in Src homology 3 domain binding and endocytosis." *J Biol Chem* 272(17): 11629-11635.
- Oliet, S. H., R. Piet and D. A. Poulain (2001). "Control of glutamate clearance and synaptic efficacy by glial coverage of neurons." *Science* 292(5518): 923-926.
- Olivera, B. M., G. P. Miljanich, J. Ramachandran and M. E. Adams (1994). "Calcium channel diversity and neurotransmitter release: the omega-conotoxins and omega-agatoxins." *Annu Rev Biochem* 63: 823-867.
- Omote, H., T. Miyaji, N. Juge and Y. Moriyama (2011). "Vesicular neurotransmitter transporter: bioenergetics and regulation of glutamate transport." *Biochemistry* 50(25): 5558-5565.
- O'Neill, J. S., E. S. Maywood, J. E. Chesham, J. S. Takahashi and M. H. Hastings (2008). "cAMP-dependent signaling as a core component of the mammalian circadian pacemaker." *Science* 320(5878): 949-953.
- Orenbuch, A., L. Shalev, V. Marra, I. Sinai, Y. Lavy, J. Kahn, J. J. Burden, K. Staras and D. Gitler (2012). "Synapsin selectively controls the mobility of resting pool vesicles at hippocampal terminals." *J Neurosci* 32(12): 3969-3980.
- Ostroveanu, A., E. A. van der Zee, U. L. Eisel, M. Schmidt and I. M. Nijholt (2010). "Exchange protein activated by cyclic AMP 2 (Epac2) plays a specific and time-limited role in memory retrieval." *Hippocampus* 20(9): 1018-1026.
- Ouyang, M., L. Zhang, J. J. Zhu, F. Schwede and S. A. Thomas (2008). "Epac signaling is required for hippocampus-dependent memory retrieval." *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(33): 11993-11997.
- Ozaki, N., T. Shibasaki, Y. Kashima, T. Miki, K. Takahashi, H. Ueno, Y. Sunaga, H. Yano, Y. Matsuura, T. Iwanaga, Y. Takai and S. Seino (2000). "cAMP-GEFII is a direct target of cAMP in regulated exocytosis." *Nat Cell Biol* 2(11): 805-811.
- Palazzo, E., Y. Fu, G. Ji, S. Maione and V. Neugebauer (2008). "Group III mGluR7 and mGluR8 in the amygdala differentially modulate nocifensive and affective pain behaviors." *Neuropharmacology* 55(4): 537-545.
- Palazzo, E., I. Marabese, L. Luongo, S. Boccella, G. Bellini, M. E. Giordano, F. Rossi, M. Scafuro, V. Novellis and S. Maione (2013). "Effects of a metabotropic glutamate receptor subtype 7 negative allosteric modulator in the periaqueductal grey on pain responses and rostral ventromedial medulla cell activity in rat." *Mol Pain* 9: 44.
- Palazzo, E., I. Marabese, M. Soukupova, L. Luongo, S. Boccella, C. Giordano, V. de Novellis, F. Rossi and S. Maione (2011). "Metabotropic glutamate receptor subtype 8 in the amygdala modulates thermal threshold, neurotransmitter release, and rostral ventromedial medulla cell activity in inflammatory pain." *J Neurosci* 31(12): 4687-4697.
- Palucha, A., E. Tatarczynska, P. Branski, B. Szweczyk, J. M. Wieronska, K. Klak, E. Chojnacka-Wojcik, G. Nowak and A. Pilc (2004). "Group III mGlu receptor agonists produce anxiolytic- and antidepressant-like effects after central administration in rats." *Neuropharmacology* 46(2): 151-159.
- Panatier, A., D. A. Poulain and S. H. Oliet (2004). "Regulation of transmitter release by high-affinity group III mGluRs in the supraoptic nucleus of the rat hypothalamus." *Neuropharmacology* 47(3): 333-341.
- Pang, Z. P., T. Bacaj, X. Yang, P. Zhou, W. Xu and T. C. Sudhof (2011). "Doc2 supports spontaneous synaptic transmission by a Ca(2+)-independent mechanism." *Neuron* 70(2): 244-251.
- Pang, Z. P., E. Melicoff, D. Padgett, Y. Liu, A. F. Teich, B. F. Dickey, W. Lin, R. Adachi and T. C. Sudhof (2006). "Synaptotagmin-2 is essential for survival and contributes to Ca2+ triggering of neurotransmitter release in central and neuromuscular synapses." *J Neurosci* 26(52): 13493-13504.
- Pang, Z. P., O. H. Shin, A. C. Meyer, C. Rosenmund and T. C. Sudhof (2006). "A gain-of-function mutation in synaptotagmin-1 reveals a critical role of Ca2+-dependent soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor complex binding in synaptic exocytosis." *J Neurosci* 26(48): 12556-12565.
- Pang, Z. P. and T. C. Sudhof (2010). "Cell biology of Ca2+-triggered exocytosis." *Curr Opin Cell Biol* 22(4): 496-505.
- Paoletti, P. and J. Neyton (2007). "NMDA receptor subunits: function and pharmacology." *Curr Opin Pharmacol* 7(1): 39-47.
- Paquet, M. and Y. Smith (2003). "Group I metabotropic glutamate receptors in the monkey striatum: subsynaptic association with glutamatergic and dopaminergic afferents." *J Neurosci* 23(20): 7659-7669.
- Parelkar, N. K. and J. Q. Wang (2008). "Upregulation of metabotropic glutamate receptor 8 mRNA expression in the rat forebrain after repeated amphetamine administration." *Neurosci Lett* 433(3): 250-254.
- Park, J. H., S. J. Kim, S. H. Park, D. G. Son, J. H. Bae, H. K. Kim, J. Han and D. K. Song (2012). "Glucagon-like peptide-1 enhances glucokinase activity in pancreatic beta-cells through the association of Epac2 with Rim2 and Rab3A." *Endocrinology* 153(2): 574-582.
- Park, K., J. H. Yi, H. Kim, K. Choi, S. J. Kang and K. S. Shin (2011). "HCN channel activity-dependent modulation of inhibitory synaptic transmission in the rat basolateral amygdala." *Biochem Biophys Res Commun* 404(4): 952-957.
- Parsaud, L., L. Li, C. H. Jung, S. Park, N. M. Saw, S. Park, M. Y. Kim and S. Sugita (2013). "Calcium-dependent activator protein for secretion 1 (CAPS1) binds to syntaxin-1 in a distinct mode from Munc13-1." *J Biol Chem* 288(32): 23050-23063.
- Paschalis, A., L. Churchill, N. Marina, V. Kasymov, A. Gourine and G. Ackland (2009). "beta1-Adrenoceptor distribution in the rat brain: an immunohistochemical study." *Neurosci Lett* 458(2): 84-88.

- Pekhletski, R., R. Gerlai, L. S. Overstreet, X. P. Huang, N. Agopyan, N. T. Slater, W. Abramow-Newerly, J. C. Roder and D. R. Hampson (1996). "Impaired cerebellar synaptic plasticity and motor performance in mice lacking the mGluR4 subtype of metabotropic glutamate receptor." *J Neurosci* 16(20): 6364-6373.
- Pelkey, K. A., G. Lavezzi, C. Racca, K. W. Roche and C. J. McBain (2005). "mGluR7 is a metaplastic switch controlling bidirectional plasticity of feedforward inhibition." *Neuron* 46(1): 89-102.
- Pelkey, K. A., L. Topolnik, J. C. Lacaillle and C. J. McBain (2006). "Compartmentalized Ca(2+) channel regulation at divergent mossy-fiber release sites underlies target cell-dependent plasticity." *Neuron* 52(3): 497-510.
- Pelkey, K. A., L. Topolnik, X. Q. Yuan, J. C. Lacaillle and C. J. McBain (2008). "State-dependent cAMP sensitivity of presynaptic function underlies metaplasticity in a hippocampal feedforward inhibitory circuit." *Neuron* 60(6): 980-987.
- Perin, M. S., V. A. Fried, G. A. Mignery, R. Jahn and T. C. Sudhof (1990). "Phospholipid binding by a synaptic vesicle protein homologous to the regulatory region of protein kinase C." *Nature* 345(6272): 260-263.
- Perlini, L. E., F. Botti, E. F. Fornasiero, M. Giannandrea, D. Bonanomi, M. Amendola, L. Naldini, F. Benfenati and F. Valtorta (2011). "Effects of phosphorylation and neuronal activity on the control of synapse formation by synapsin I." *J Cell Sci* 124(Pt 21): 3643-3653.
- Perroy, J., O. El Far, F. Bertaso, J. P. Pin, H. Betz, J. Bockaert and L. Fagni (2002). "PICK1 is required for the control of synaptic transmission by the metabotropic glutamate receptor 7." *EMBO J* 21(12): 2990-2999.
- Perroy, J., L. Prezeau, M. De Waard, R. Shigemoto, J. Bockaert and L. Fagni (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(21): 7896-7904.
- Petralia, R. S., Y. X. Wang, A. S. Niedzielski and R. J. Wenthold (1996). "The metabotropic glutamate receptors, mGluR2 and mGluR3, show unique postsynaptic, presynaptic and glial localizations." *Neuroscience* 71(4): 949-976.
- Pfenninger, K., K. Akert, H. Moor and C. Sandri (1972). "The fine structure of freeze-fractured presynaptic membranes." *J Neurocytol* 1(2): 129-149.
- Piccinin, S., C. Cinque, L. Calo, G. Molinaro, G. Battaglia, L. Maggi, F. Nicoletti, D. Melchiorri, F. Eusebi, P. V. Massey and Z. I. Bashir (2010). "Interaction between Ephrins and mGlu5 metabotropic glutamate receptors in the induction of long-term synaptic depression in the hippocampus." *J Neurosci* 30(8): 2835-2843.
- Piet, R., L. Vargova, E. Sykova, D. A. Poulain and S. H. Oliet (2004). "Physiological contribution of the astrocytic environment of neurons to intersynaptic crosstalk." *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(7): 2151-2155.
- Pin, J. P., T. Galvez and L. Prezeau (2003). "Evolution, structure, and activation mechanism of family 3/C G-protein-coupled receptors." *Pharmacol Ther* 98(3): 325-354.
- Pin, J. P., C. Joly, S. F. Heinemann and J. Bockaert (1994). "Domains involved in the specificity of G protein activation in phospholipase C-coupled metabotropic glutamate receptors." *EMBO J* 13(2): 342-348.
- Pisani, A., P. Calabresi, D. Centonze and G. Bernardi (1997). "Activation of group III metabotropic glutamate receptors depresses glutamatergic transmission at corticostriatal synapse." *Neuropharmacology* 36(6): 845-851.
- Pisani, A., P. Gubellini, P. Bonsi, F. Conquet, B. Picconi, D. Centonze, G. Bernardi and P. Calabresi (2001). "Metabotropic glutamate receptor 5 mediates the potentiation of N-methyl-D-aspartate responses in medium spiny striatal neurons." *Neuroscience* 106(3): 579-587.
- Poirier, M. A., W. Xiao, J. C. Macosko, C. Chan, Y. K. Shin and M. K. Bennett (1998). "The synaptic SNARE complex is a parallel four-stranded helical bundle." *Nat Struct Biol* 5(9): 765-769.
- Ponsioen, B., M. Gloerich, L. Ritsma, H. Rehmann, J. L. Bos and K. Jalink (2009). "Direct spatial control of Epac1 by cyclic AMP." *Mol Cell Biol* 29(10): 2521-2531.
- Poskanzer, K. E., K. W. Marek, S. T. Sweeney and G. W. Davis (2003). "Synaptotagmin I is necessary for compensatory synaptic vesicle endocytosis in vivo." *Nature* 426(6966): 559-563.
- Pothecary, C. A., D. E. Jane and T. E. Salt (2002). "Reduction of excitatory transmission in the retino-collicular pathway via selective activation of mGlu8 receptors by DCPG." *Neuropharmacology* 43(2): 231-234.
- Powell, C. M., S. Schoch, L. Monteggia, M. Barrot, M. F. Matos, N. Feldmann, T. C. Sudhof and E. J. Nestler (2004). "The presynaptic active zone protein RIM1alpha is critical for normal learning and memory." *Neuron* 42(1): 143-153.
- Pozzi, D., S. Condliffe, Y. Bozzi, M. Chikhaldze, C. Grumelli, V. Proux-Gillardeaux, M. Takahashi, S. Franceschetti, C. Verderio and M. Matteoli (2008). "Activity-dependent phosphorylation of Ser187 is required for SNAP-25-negative modulation of neuronal voltage-gated calcium channels." *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(1): 323-328.
- Prezeau, L., J. Carrette, B. Helpap, K. Curry, J. P. Pin and J. Bockaert (1994). "Pharmacological characterization of metabotropic glutamate receptors in several types of brain cells in primary cultures." *Mol Pharmacol* 45(4): 570-577.
- Prezeau, L., O. Manzoni, V. Homburger, F. Sladeczek, K. Curry and J. Bockaert (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(17): 8040-8044.
- Pyott, S. J. and C. Rosenmund (2002). "The effects of temperature on vesicular supply and release in autaptic cultures of rat and mouse hippocampal neurons." *J Physiol* 539(Pt 2): 523-535.
- Rainnie, D. G. and P. Shinnick-Gallagher (1992). "Trans-ACPD and L-APB presynaptically inhibit excitatory glutamatergic transmission in the basolateral amygdala (BLA)." *Neurosci Lett* 139(1): 87-91.

- Ramirez, D. M., M. Khvotchev, B. Trauterman and E. T. Kavalali (2012). "Vti1a identifies a vesicle pool that preferentially recycles at rest and maintains spontaneous neurotransmission." *Neuron* 73(1): 121-134.
- Ramirez-Franco, J., B. Alonso, D. Bartolome-Martin, J. Sanchez-Prieto and M. Torres (2013). "Studying synaptic efficiency by post-hoc immunolabelling." *BMC Neurosci* 14: 127.
- Ramirez-Franco, J., D. Bartolome-Martin, B. Alonso, M. Torres and J. Sanchez-Prieto (2014). "Cannabinoid type 1 receptors transiently silence glutamatergic nerve terminals of cultured cerebellar granule cells." *PLoS One* 9(2): e88594.
- Ramos, B. P., L. Colgan, E. Nou, S. Ovadia, S. R. Wilson and A. F. Arnsten (2005). "The beta-1 adrenergic antagonist, betaxolol, improves working memory performance in rats and monkeys." *Biol Psychiatry* 58(11): 894-900.
- Rasmussen, S. G., B. T. DeVree, Y. Zou, A. C. Kruse, K. Y. Chung, T. S. Kobilka, F. S. Thian, P. S. Chae, E. Pardon, D. Calinski, J. M. Mathiesen, S. T. Shah, J. A. Lyons, M. Caffrey, S. H. Gellman, J. Steyaert, G. Skiniotis, W. I. Weis, R. K. Sunahara and B. K. Kobilka (2011). "Crystal structure of the beta2 adrenergic receptor-Gs protein complex." *Nature* 477(7366): 549-555.
- Rathore, S. S., E. G. Bend, H. Yu, M. Hammarlund, E. M. Jorgensen and J. Shen (2010). "Syntaxin N-terminal peptide motif is an initiation factor for the assembly of the SNARE-Sec1/Munc18 membrane fusion complex." *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(52): 22399-22406.
- Ratnayaka, A., V. Marra, D. Bush, J. J. Burden, T. Branco and K. Staras (2012). "Recruitment of resting vesicles into recycling pools supports NMDA receptor-dependent synaptic potentiation in cultured hippocampal neurons." *J Physiol* 590(7): 1585-1597.
- Rebecchi, M. J. and S. N. Pentylala (2000). "Structure, function, and control of phosphoinositide-specific phospholipase C." *Physiol Rev* 80(4): 1291-1335.
- Regehr, W. G. (2012). "Short-term presynaptic plasticity." *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4(7): a005702.
- Rehmann, H. (2012). "Epac2: a sulfonyleurea receptor?" *Biochem Soc Trans* 40(1): 6-10.
- Rehmann, H. (2013). "Epac-inhibitors: facts and artefacts." *Sci Rep* 3: 3032.
- Rehmann, H., B. Prakash, E. Wolf, A. Rueppel, J. de Rooij, J. L. Bos and A. Wittinghofer (2003). "Structure and regulation of the cAMP-binding domains of Epac2." *Nat Struct Biol* 10(1): 26-32.
- Rehmann, H., A. Rueppel, J. L. Bos and A. Wittinghofer (2003). "Communication between the regulatory and the catalytic region of the cAMP-responsive guanine nucleotide exchange factor Epac." *J Biol Chem* 278(26): 23508-23514.
- Rehmann, H., F. Schwede, S. O. Doskeland, A. Wittinghofer and J. L. Bos (2003). "Ligand-mediated activation of the cAMP-responsive guanine nucleotide exchange factor Epac." *J Biol Chem* 278(40): 38548-38556.
- Reim, K., M. Mansour, F. Varoquaux, H. T. McMahon, T. C. Sudhof, N. Brose and C. Rosenmund (2001). "Complexins regulate a late step in Ca²⁺-dependent neurotransmitter release." *Cell* 104(1): 71-81.
- Ren, W., E. Palazzo, S. Maione and V. Neugebauer (2011). "Differential effects of mGluR7 and mGluR8 activation on pain-related synaptic activity in the amygdala." *Neuropharmacology* 61(8): 1334-1344.
- Renden, R., H. Taschenberger, N. Puente, D. A. Rusakov, R. Duvoisin, L. Y. Wang, K. P. Lehre and H. von Gersdorff (2005). "Glutamate transporter studies reveal the pruning of metabotropic glutamate receptors and absence of AMPA receptor desensitization at mature calyx of Held synapses." *J Neurosci* 25(37): 8482-8497.
- Rhee, J. S., A. Betz, S. Pyott, K. Reim, F. Varoquaux, I. Augustin, D. Hesse, T. C. Sudhof, M. Takahashi, C. Rosenmund and N. Brose (2002). "Beta phorbol ester- and diacylglycerol-induced augmentation of transmitter release is mediated by Munc13s and not by PKCs." *Cell* 108(1): 121-133.
- Rhee, S. G. (2001). "Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C." *Annu Rev Biochem* 70: 281-312.
- Richmond, J. E., W. S. Davis and E. M. Jorgensen (1999). "UNC-13 is required for synaptic vesicle fusion in *C. elegans*." *Nat Neurosci* 2(11): 959-964.
- Richmond, J. E., R. M. Weimer and E. M. Jorgensen (2001). "An open form of syntaxin bypasses the requirement for UNC-13 in vesicle priming." *Nature* 412(6844): 338-341.
- Riedel, G., B. Platt and J. Micheau (2003). "Glutamate receptor function in learning and memory." *Behav Brain Res* 140(1-2): 1-47.
- Ringheim, G. E. and S. S. Taylor (1990). "Dissecting the domain structure of the regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase I and elucidating the role of MgATP." *J Biol Chem* 265(9): 4800-4808.
- Rizo, J., X. Chen and D. Arac (2006). "Unraveling the mechanisms of synaptotagmin and SNARE function in neurotransmitter release." *Trends Cell Biol* 16(7): 339-350.
- Rizzoli, S. O. and W. J. Betz (2005). "Synaptic vesicle pools." *Nat Rev Neurosci* 6(1): 57-69.
- Robbins, M. J., K. R. Starr, A. Honey, E. M. Soffin, C. Rourke, G. A. Jones, F. M. Kelly, J. Strum, R. A. Melarange, A. J. Harris, M. Rocheville, T. Rupniak, P. R. Murdock, D. N. Jones, J. N. Kew and P. R. Maycox (2007). "Evaluation of the mGlu8 receptor as a putative therapeutic target in schizophrenia." *Brain Res* 1152: 215-227.
- Robert, S., M. Maillet, E. Morel, J. M. Launay, R. Fischmeister, L. Mercken and F. Lezoualc'h (2005). "Regulation of the amyloid precursor protein ectodomain shedding by the 5-HT₄ receptor and Epac." *FEBS Lett* 579(5): 1136-1142.
- Rodriguez-Castaneda, F., M. Maestre-Martinez, N. Coudeville, K. Dimova, H. Junge, N. Lipstein, D. Lee, S. Becker, N. Brose, O. Jahn, T. Carlomagno and C. Griesinger (2010). "Modular architecture of Munc13/calmodulin complexes: dual regulation by Ca²⁺ and possible function in short-term synaptic plasticity." *EMBO J* 29(3): 680-691.
- Rodriguez-Moreno, A., A. Banerjee and O. Paulsen (2010). "Presynaptic NMDA Receptors and Spike Timing-Dependent Depression at Cortical Synapses." *Front Synaptic Neurosci* 2: 18.

- Rodriguez-Moreno, A., O. Herreras and J. Lerma (1997). "Kainate receptors presynaptically downregulate GABAergic inhibition in the rat hippocampus." *Neuron* 19(4): 893-901.
- Rodriguez-Moreno, A. and J. Lerma (1998). "Kainate receptor modulation of GABA release involves a metabotropic function." *Neuron* 20(6): 1211-1218.
- Rodriguez-Moreno, A., A. Sistiaga, J. Lerma and J. Sanchez-Prieto (1998). "Switch from facilitation to inhibition of excitatory synaptic transmission by group I mGluR desensitization." *Neuron* 21(6): 1477-1486.
- Rondard, P., J. Liu, S. Huang, F. Malhaire, C. Vol, A. Pinault, G. Labesse and J. P. Pin (2006). "Coupling of agonist binding to effector domain activation in metabotropic glutamate-like receptors." *J Biol Chem* 281(34): 24653-24661.
- Rosahl, T. W., D. Spillane, M. Missler, J. Herz, D. K. Selig, J. R. Wolff, R. E. Hammer, R. C. Malenka and T. C. Sudhof (1995). "Essential functions of synapsins I and II in synaptic vesicle regulation." *Nature* 375(6531): 488-493.
- Rosenbrock, H., G. Kramer, S. Hobson, E. Koros, M. Grundl, M. Grauert, K. G. Reymann and U. H. Schroder (2010). "Functional interaction of metabotropic glutamate receptor 5 and NMDA-receptor by a metabotropic glutamate receptor 5 positive allosteric modulator." *Eur J Pharmacol* 639(1-3): 40-46.
- Rosenmund, C., A. Sigler, I. Augustin, K. Reim, N. Brose and J. S. Rhee (2002). "Differential control of vesicle priming and short-term plasticity by Munc13 isoforms." *Neuron* 33(3): 411-424.
- Rozas, J. L., L. Gomez-Sanchez, J. Mircheski, P. Linares-Clemente, J. L. Nieto-Gonzalez, M. E. Vazquez, R. Lujan and R. Fernandez-Chacon (2012). "Motorneurons require cysteine string protein-alpha to maintain the readily releasable vesicular pool and synaptic vesicle recycling." *Neuron* 74(1): 151-165.
- Ruete, M. C., O. Lucchesi, M. A. Bustos and C. N. Tomes (2014). "Epac, Rap and Rab3 act in concert to mobilize calcium from sperm's acrosome during exocytosis." *Cell Commun Signal* 12: 43.
- Rusakov, D. A., A. Wuerz and D. M. Kullmann (2004). "Heterogeneity and specificity of presynaptic Ca²⁺ current modulation by mGluRs at individual hippocampal synapses." *Cereb Cortex* 14(7): 748-758.
- Sabatini, B. L. and W. G. Regehr (1996). "Timing of neurotransmission at fast synapses in the mammalian brain." *Nature* 384(6605): 170-172.
- Sabbatini, M. E., X. Chen, S. A. Ernst and J. A. Williams (2008). "Rap1 activation plays a regulatory role in pancreatic amylase secretion." *J Biol Chem* 283(35): 23884-23894.
- Sahara, Y. and G. L. Westbrook (1993). "Modulation of calcium currents by a metabotropic glutamate receptor involves fast and slow kinetic components in cultured hippocampal neurons." *J Neurosci* 13(7): 3041-3050.
- Saito, N., U. Kikkawa, Y. Nishizuka and C. Tanaka (1988). "Distribution of protein kinase C-like immunoreactive neurons in rat brain." *J Neurosci* 8(2): 369-382.
- Sakaba, T. and E. Neher (2001). "Calmodulin mediates rapid recruitment of fast-releasing synaptic vesicles at a calyx-type synapse." *Neuron* 32(6): 1119-1131.
- Sakaba, T. and E. Neher (2001). "Preferential potentiation of fast-releasing synaptic vesicles by cAMP at the calyx of Held." *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(1): 331-336.
- Sakaba, T. and E. Neher (2003). "Direct modulation of synaptic vesicle priming by GABA(B) receptor activation at a glutamatergic synapse." *Nature* 424(6950): 775-778.
- Sakurai, M. (1987). "Synaptic modification of parallel fibre-Purkinje cell transmission in in vitro guinea-pig cerebellar slices." *J Physiol* 394: 463-480.
- Salt, T. E. and S. A. Eaton (1995). "Distinct presynaptic metabotropic receptors for L-AP4 and CCG1 on GABAergic terminals: pharmacological evidence using novel alpha-methyl derivative mGluR antagonists, MAP4 and MCCG, in the rat thalamus in vivo." *Neuroscience* 65(1): 5-13.
- Sanchez-Prieto, J., T. S. Sihra and D. G. Nicholls (1987). "Characterization of the exocytotic release of glutamate from guinea-pig cerebral cortical synaptosomes." *J Neurochem* 49(1): 58-64.
- Sankaranarayanan, S., D. De Angelis, J. E. Rothman and T. A. Ryan (2000). "The use of pHluorins for optical measurements of presynaptic activity." *Biophys J* 79(4): 2199-2208.
- Sansig, G., T. J. Bushell, V. R. Clarke, A. Rozov, N. Burnashev, C. Portet, F. Gasparini, M. Schmutz, K. Klebs, R. Shigemoto, P. J. Flor, R. Kuhn, T. Knoepfel, M. Schroeder, D. R. Hampson, V. J. Collett, C. Zhang, R. M. Duvoisin, G. L. Collingridge and H. van Der Putten (2001). "Increased seizure susceptibility in mice lacking metabotropic glutamate receptor 7." *J Neurosci* 21(22): 8734-8745.
- Santulli, G. and G. Iaccarino (2013). "Pinpointing beta adrenergic receptor in ageing pathophysiology: victim or executioner? Evidence from crime scenes." *Immun Ageing* 10(1): 10.
- Sara, S. J., P. Roulet and J. Przybylski (1999). "Consolidation of memory for odor-reward association: beta-adrenergic receptor involvement in the late phase." *Learn Mem* 6(2): 88-96.
- Sarkar, S., B. Ravikumar, R. A. Floto and D. C. Rubinsztein (2009). "Rapamycin and mTOR-independent autophagy inducers ameliorate toxicity of polyglutamine-expanded huntingtin and related proteinopathies." *Cell Death Differ* 16(1): 46-56.
- Saugstad, J. A., T. P. Segerson and G. L. Westbrook (1996). "Metabotropic glutamate receptors activate G-protein-coupled inwardly rectifying potassium channels in *Xenopus* oocytes." *J Neurosci* 16(19): 5979-5985.
- Saugstad, J. A., S. Yang, J. Pohl, R. A. Hall and P. J. Conn (2002). "Interaction between metabotropic glutamate receptor 7 and alpha tubulin." *J Neurochem* 80(6): 980-988.
- Saunders, C. M., M. G. Larman, J. Parrington, L. J. Cox, J. Royse, L. M. Blayney, K. Swann and F. A. Lai (2002). "PLC zeta: a sperm-specific trigger of Ca(2+) oscillations in eggs and embryo development." *Development* 129(15): 3533-3544.
- Scanziani, M., P. A. Salin, K. E. Vogt, R. C. Malenka and R. A. Nicoll (1997). "Use-dependent increases in glutamate concentration activate presynaptic metabotropic glutamate receptors." *Nature* 385(6617): 630-634.

- Scarpace, P. J. and I. B. Abrass (1988). "Alpha- and beta-adrenergic receptor function in the brain during senescence." *Neurobiol Aging* 9(1): 53-58.
- Schaffhauser, H., J. Cartmell, R. Jakob-Rotne and V. Mutel (1997). "Pharmacological characterization of metabotropic glutamate receptors linked to the inhibition of adenylate cyclase activity in rat striatal slices." *Neuropharmacology* 36(7): 933-940.
- Scheuss, V., R. Schneggenburger and E. Neher (2002). "Separation of presynaptic and postsynaptic contributions to depression by covariance analysis of successive EPSCs at the calyx of Held synapse." *J Neurosci* 22(3): 728-739.
- Schluter, O. M., J. Basu, T. C. Sudhof and C. Rosenmund (2006). "Rab3 superprimers synaptic vesicles for release: implications for short-term synaptic plasticity." *J Neurosci* 26(4): 1239-1246.
- Schluter, O. M., E. Schnell, M. Verhage, T. Tzonopoulos, R. A. Nicoll, R. Janz, R. C. Malenka, M. Geppert and T. C. Sudhof (1999). "Rabphilin knock-out mice reveal that rabphilin is not required for rab3 function in regulating neurotransmitter release." *J Neurosci* 19(14): 5834-5846.
- Schmeichel, B. E. and C. W. Berridge (2013). "Wake-promoting actions of noradrenergic alpha1 - and beta-receptors within the lateral hypothalamic area." *Eur J Neurosci* 37(6): 891-900.
- Schmidt, M., F. J. Dekker and H. Maarsingh (2013). "Exchange protein directly activated by cAMP (epac): a multidomain cAMP mediator in the regulation of diverse biological functions." *Pharmacol Rev* 65(2): 670-709.
- Schmidt, M., S. Evellin, P. A. Weernink, F. von Dorp, H. Rehmann, J. W. Lomasney and K. H. Jakobs (2001). "A new phospholipase-C-calcium signalling pathway mediated by cyclic AMP and a Rap GTPase." *Nat Cell Biol* 3(11): 1020-1024.
- Schmitz, D., J. Mellor and R. A. Nicoll (2001). "Presynaptic kainate receptor mediation of frequency facilitation at hippocampal mossy fiber synapses." *Science* 291(5510): 1972-1976.
- Schneggenburger, R. and E. Neher (2005). "Presynaptic calcium and control of vesicle fusion." *Curr Opin Neurobiol* 15(3): 266-274.
- Schoch, S., P. E. Castillo, T. Jo, K. Mukherjee, M. Geppert, Y. Wang, F. Schmitz, R. C. Malenka and T. C. Sudhof (2002). "RIM1alpha forms a protein scaffold for regulating neurotransmitter release at the active zone." *Nature* 415(6869): 321-326.
- Schoch, S. and E. D. Gundelfinger (2006). "Molecular organization of the presynaptic active zone." *Cell Tissue Res* 326(2): 379-391.
- Schoch, S., T. Mittelstaedt, P. S. Kaeser, D. Padgett, N. Feldmann, V. Chevaleyre, P. E. Castillo, R. E. Hammer, W. Han, F. Schmitz, W. Lin and T. C. Sudhof (2006). "Redundant functions of RIM1alpha and RIM2alpha in Ca(2+)-triggered neurotransmitter release." *EMBO J* 25(24): 5852-5863.
- Schoepp, D., J. Bockaert and F. Sladeczek (1990). "Pharmacological and functional characteristics of metabotropic excitatory amino acid receptors." *Trends Pharmacol Sci* 11(12): 508-515.
- Schoepp, D. D., D. E. Jane and J. A. Monn (1999). "Pharmacological agents acting at subtypes of metabotropic glutamate receptors." *Neuropharmacology* 38(10): 1431-1476.
- Schoepp, D. D. and B. G. Johnson (1993). "Metabotropic glutamate receptor modulation of cAMP accumulation in the neonatal rat hippocampus." *Neuropharmacology* 32(12): 1359-1365.
- Schollmeier, Y., J. M. Krause, S. Kreye, J. Malsam and T. H. Sollner (2011). "Resolving the function of distinct Munc18-1/SNARE protein interaction modes in a reconstituted membrane fusion assay." *J Biol Chem* 286(35): 30582-30590.
- Schonn, J. S., A. Maximov, Y. Lao, T. C. Sudhof and J. B. Sorensen (2008). "Synaptotagmin-1 and -7 are functionally overlapping Ca2+ sensors for exocytosis in adrenal chromaffin cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(10): 3998-4003.
- Schoppa, N. E. and G. L. Westbrook (1997). "Modulation of mEPSCs in olfactory bulb mitral cells by metabotropic glutamate receptors." *J Neurophysiol* 78(3): 1468-1475.
- Schrader, L. A. and J. G. Tasker (1997). "Presynaptic modulation by metabotropic glutamate receptors of excitatory and inhibitory synaptic inputs to hypothalamic magnocellular neurons." *J Neurophysiol* 77(2): 527-536.
- Schulz, H. L., H. Stohr and B. H. Weber (2002). "Characterization of three novel isoforms of the metabotropic glutamate receptor 7 (GRM7)." *Neurosci Lett* 326(1): 37-40.
- Schutsky, K., M. Ouyang and S. A. Thomas (2011). "Xamoterol impairs hippocampus-dependent emotional memory retrieval via Gi/o-coupled beta2-adrenergic signaling." *Learn Mem* 18(9): 598-604.
- Schwartz, N. E. and S. Alford (2000). "Physiological activation of presynaptic metabotropic glutamate receptors increases intracellular calcium and glutamate release." *J Neurophysiol* 84(1): 415-427.
- Scott, I. D. and D. G. Nicholls (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(1): 21-33.
- Sedej, S., T. Rose and M. Rupnik (2005). "cAMP increases Ca2+-dependent exocytosis through both PKA and Epac2 in mouse melanotrophs from pituitary tissue slices." *J Physiol* 567(Pt 3): 799-813.
- Sehrawat, S., T. Hernandez, X. Cullere, M. Takahashi, Y. Ono, Y. Komarova and T. N. Mayadas (2011). "AKAP9 regulation of microtubule dynamics promotes Epac1-induced endothelial barrier properties." *Blood* 117(2): 708-718.
- Seino, S. and T. Shibasaki (2005). "PKA-dependent and PKA-independent pathways for cAMP-regulated exocytosis." *Physiol Rev* 85(4): 1303-1342.
- Sekiya, F., B. Poulin, Y. J. Kim and S. G. Rhee (2004). "Mechanism of tyrosine phosphorylation and activation of phospholipase C-gamma 1. Tyrosine 783 phosphorylation is not sufficient for lipase activation." *J Biol Chem* 279(31): 32181-32190.

- Semyanov, A. and D. M. Kullmann (2000). "Modulation of GABAergic signaling among interneurons by metabotropic glutamate receptors." *Neuron* 25(3): 663-672.
- Serra-Pages, C., Q. G. Medley, M. Tang, A. Hart and M. Streuli (1998). "Liprins, a family of LAR transmembrane protein-tyrosine phosphatase-interacting proteins." *J Biol Chem* 273(25): 15611-15620.
- Servitja, J. M., R. Masgrau, E. Sarri and F. Picatoste (1999). "Group I metabotropic glutamate receptors mediate phospholipase D stimulation in rat cultured astrocytes." *J Neurochem* 72(4): 1441-1447.
- Sessler, F. M., W. Liu, M. L. Kirifides, R. D. Mouradian, R. C. Lin and B. D. Waterhouse (1995). "Noradrenergic enhancement of GABA-induced input resistance changes in layer V regular spiking pyramidal neurons of rat somatosensory cortex." *Brain Res* 675(1-2): 171-182.
- Sharma, M., J. Burre, P. Bronk, Y. Zhang, W. Xu and T. C. Sudhof (2012). "CSPalpha knockout causes neurodegeneration by impairing SNAP-25 function." *EMBO J* 31(4): 829-841.
- Sharma, M., J. Burre and T. C. Sudhof (2011). "CSPalpha promotes SNARE-complex assembly by chaperoning SNAP-25 during synaptic activity." *Nat Cell Biol* 13(1): 30-39.
- Shen, J., D. C. Tareste, F. Paumet, J. E. Rothman and T. J. Melia (2007). "Selective activation of cognate SNAREpins by Sec1/Munc18 proteins." *Cell* 128(1): 183-195.
- Shenoy, S. K. and R. J. Lefkowitz (2011). "beta-Arrestin-mediated receptor trafficking and signal transduction." *Trends Pharmacol Sci* 32(9): 521-533.
- Shepherd, G. M. and K. M. Harris (1998). "Three-dimensional structure and composition of CA3->CA1 axons in rat hippocampal slices: implications for presynaptic connectivity and compartmentalization." *J Neurosci* 18(20): 8300-8310.
- Shi, A., O. Liu, S. Koenig, R. Banerjee, C. C. Chen, S. Eimer and B. D. Grant (2012). "RAB-10-GTPase-mediated regulation of endosomal phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate." *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(35): E2306-2315.
- Shi, L., Q. T. Shen, A. Kiel, J. Wang, H. W. Wang, T. J. Melia, J. E. Rothman and F. Pincet (2012). "SNARE proteins: one to fuse and three to keep the nascent fusion pore open." *Science* 335(6074): 1355-1359.
- Shibuki, K. and D. Okada (1992). "Cerebellar long-term potentiation under suppressed postsynaptic Ca²⁺ activity." *Neuroreport* 3(3): 231-234.
- Shigemoto, R., A. Kinoshita, E. Wada, S. Nomura, H. Ohishi, M. Takada, P. J. Flor, A. Neki, T. Abe, S. Nakanishi and N. Mizuno (1997). "Differential presynaptic localization of metabotropic glutamate receptor subtypes in the rat hippocampus." *J Neurosci* 17(19): 7503-7522.
- Shigemoto, R., A. Kulik, J. D. Roberts, H. Ohishi, Z. Nusser, T. Kaneko and P. Somogyi (1996). "Target-cell-specific concentration of a metabotropic glutamate receptor in the presynaptic active zone." *Nature* 381(6582): 523-525.
- Shin, O. H., J. Lu, J. S. Rhee, D. R. Tomchick, Z. P. Pang, S. M. Wojcik, M. Camacho-Perez, N. Brose, M. Machius, J. Rizo, C. Rosenmund and T. C. Sudhof (2010). "Munc13 C2B domain is an activity-dependent Ca²⁺ regulator of synaptic exocytosis." *Nat Struct Mol Biol* 17(3): 280-288.
- Shinomura, T., E. del Rio, K. C. Breen, C. P. Downes and M. McLaughlin (2000). "Activation of phospholipase D by metabotropic glutamate receptor agonists in rat cerebrocortical synaptosomes." *Br J Pharmacol* 131(5): 1011-1018.
- Shoji-Kasai, Y., M. Itakura, M. Kataoka, S. Yamamori and M. Takahashi (2002). "Protein kinase C-mediated translocation of secretory vesicles to plasma membrane and enhancement of neurotransmitter release from PC12 cells." *Eur J Neurosci* 15(8): 1390-1394.
- Shpetner, H. S. and R. B. Vallee (1989). "Identification of dynamin, a novel mechanochemical enzyme that mediates interactions between microtubules." *Cell* 59(3): 421-432.
- Shu, Y., X. Liu, Y. Yang, M. Takahashi and K. D. Gillis (2008). "Phosphorylation of SNAP-25 at Ser187 mediates enhancement of exocytosis by a phorbol ester in INS-1 cells." *J Neurosci* 28(1): 21-30.
- Shupliakov, O., P. Low, D. Grabs, H. Gad, H. Chen, C. David, K. Takei, P. De Camilli and L. Brodin (1997). "Synaptic vesicle endocytosis impaired by disruption of dynamin-SH3 domain interactions." *Science* 276(5310): 259-263.
- Sihra, T. S. and A. Rodriguez-Moreno (2013). "Presynaptic kainate receptor-mediated bidirectional modulatory actions: mechanisms." *Neurochem Int* 62(7): 982-987.
- Siksou, L., P. Rostaing, J. P. Lechère, T. Boudier, T. Ohtsuka, A. Fejtova, H. T. Kao, P. Greengard, E. D. Gundelfinger, A. Triller and S. Marty (2007). "Three-dimensional architecture of presynaptic terminal cytomatrix." *J Neurosci* 27(26): 6868-6877.
- Siksou, L., F. Varoqueaux, O. Pascual, A. Triller, N. Brose and S. Marty (2009). "A common molecular basis for membrane docking and functional priming of synaptic vesicles." *Eur J Neurosci* 30(1): 49-56.
- Silinsky, E. M. and T. J. Searl (2003). "Phorbol esters and neurotransmitter release: more than just protein kinase C?" *Br J Pharmacol* 138(7): 1191-1201.
- Simonyi, A., L. A. Miller and G. Y. Sun (2000). "Region-specific decline in the expression of metabotropic glutamate receptor 7 mRNA in rat brain during aging." *Brain Res Mol Brain Res* 82(1-2): 101-106.
- Simsek-Duran, F., D. J. Linden and G. Lonart (2004). "Adapter protein 14-3-3 is required for a presynaptic form of LTP in the cerebellum." *Nat Neurosci* 7(12): 1296-1298.
- Simsek-Duran, F. and G. Lonart (2008). "The role of RIM1alpha in BDNF-enhanced glutamate release." *Neuropharmacology* 55(1): 27-34.
- Singh, P., J. Jorgacevski, M. Kreft, V. Grubisic, R. F. Stout, Jr., M. Potokar, V. Parpura and R. Zorec (2014). "Single-vesicle architecture of synaptobrevin2 in astrocytes." *Nat Commun* 5: 3780.
- Sinha, R., S. Ahmed, R. Jahn and J. Klingauf (2011). "Two synaptobrevin molecules are sufficient for vesicle fusion in central nervous system synapses." *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(34): 14318-14323.

- Sistiaga, A. and J. Sanchez-Prieto (2000). "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(4): 1566-1574.
- Sistiaga, A. and J. Sanchez-Prieto (2000). "Protein phosphatase 2B inhibitors mimic the action of arachidonic acid and prolong the facilitation of glutamate release by group I mGlu receptors." *Neuropharmacology* 39(9): 1544-1553.
- Sivakumaran, S., M. H. Mohajerani and E. Cherubini (2009). "At immature mossy-fiber-CA3 synapses, correlated presynaptic and postsynaptic activity persistently enhances GABA release and network excitability via BDNF and cAMP-dependent PKA." *J Neurosci* 29(8): 2637-2647.
- Sjostrom, P. J., G. G. Turrigiano and S. B. Nelson (2003). "Neocortical LTD via coincident activation of presynaptic NMDA and cannabinoid receptors." *Neuron* 39(4): 641-654.
- Smith, C., T. Moser, T. Xu and E. Neher (1998). "Cytosolic Ca²⁺ acts by two separate pathways to modulate the supply of release-competent vesicles in chromaffin cells." *Neuron* 20(6): 1243-1253.
- Smrcka, A. V., J. H. Brown and G. G. Holz (2012). "Role of phospholipase Cepsilon in physiological phosphoinositide signaling networks." *Cell Signal* 24(6): 1333-1343.
- Snead, O. C., 3rd, P. K. Banerjee, M. Burnham and D. Hampson (2000). "Modulation of absence seizures by the GABA(A) receptor: a critical role for metabotropic glutamate receptor 4 (mGluR4)." *J Neurosci* 20(16): 6218-6224.
- Sollner, T., M. K. Bennett, S. W. Whiteheart, R. H. Scheller and J. E. Rothman (1993). "A protein assembly-disassembly pathway in vitro that may correspond to sequential steps of synaptic vesicle docking, activation, and fusion." *Cell* 75(3): 409-418.
- Sollner, T., S. W. Whiteheart, M. Brunner, H. Erdjument-Bromage, S. Geromanos, P. Tempst and J. E. Rothman (1993). "SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion." *Nature* 362(6418): 318-324.
- Somogyi, P., Y. Dalezios, R. Lujan, J. D. Roberts, M. Watanabe and R. Shigemoto (2003). "High level of mGluR7 in the presynaptic active zones of select populations of GABAergic terminals innervating interneurons in the rat hippocampus." *Eur J Neurosci* 17(12): 2503-2520.
- Song, J. Y., K. Ichtchenko, T. C. Sudhof and N. Brose (1999). "Neurologin 1 is a postsynaptic cell-adhesion molecule of excitatory synapses." *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(3): 1100-1105.
- Sorensen, J. B., R. Fernandez-Chacon, T. C. Sudhof and E. Neher (2003). "Examining synaptotagmin 1 function in dense core vesicle exocytosis under direct control of Ca²⁺." *J Gen Physiol* 122(3): 265-276.
- Southan, A. P., N. P. Morris, G. J. Stephens and B. Robertson (2000). "Hyperpolarization-activated currents in presynaptic terminals of mouse cerebellar basket cells." *J Physiol* 526 Pt 1: 91-97.
- Srivastava, D. P., K. A. Jones, K. M. Woolfrey, J. Burgdorf, T. A. Russell, A. Kalmbach, H. Lee, C. Yang, M. M. Bradberry, D. Wokosin, J. R. Moskal, M. F. Casanova, J. Waters and P. Penzes (2012). "Social, communication, and cortical structural impairments in Epac2-deficient mice." *J Neurosci* 32(34): 11864-11878.
- Srivastava, D. P., K. M. Woolfrey, K. A. Jones, C. T. Anderson, K. R. Smith, T. A. Russell, H. Lee, M. V. Yasvoina, D. L. Wokosin, P. H. Ozdinler, G. M. Shepherd and P. Penzes (2012). "An autism-associated variant of Epac2 reveals a role for Ras/Epac2 signaling in controlling basal dendrite maintenance in mice." *PLoS Biol* 10(6): e1001350.
- Stachowicz, K., P. Branski, K. Klak, H. van der Putten, J. F. Cryan, P. J. Flor and P. Andrzej (2008). "Selective activation of metabotropic G-protein-coupled glutamate 7 receptor elicits anxiolytic-like effects in mice by modulating GABAergic neurotransmission." *Behav Pharmacol* 19(5-6): 597-603.
- Stachowicz, K., A. Klodzinska, A. Palucha-Poniewiera, S. Schann, P. Neuville and A. Pilc (2009). "The group III mGlu receptor agonist ACPT-I exerts anxiolytic-like but not antidepressant-like effects, mediated by the serotonergic and GABA-ergic systems." *Neuropharmacology* 57(3): 227-234.
- Stanika, R. I., N. B. Pivovarova, C. A. Brantner, C. A. Watts, C. A. Winters and S. B. Andrews (2009). "Coupling diverse routes of calcium entry to mitochondrial dysfunction and glutamate excitotoxicity." *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(24): 9854-9859.
- Stanika, R. I., I. Villanueva, G. Kazanina, S. B. Andrews and N. B. Pivovarova (2012). "Comparative impact of voltage-gated calcium channels and NMDA receptors on mitochondria-mediated neuronal injury." *J Neurosci* 32(19): 6642-6650.
- Staras, K., T. Branco, J. J. Burden, K. Pozo, K. Darcy, V. Marra, A. Ratnayaka and Y. Goda (2010). "A vesicle superpool spans multiple presynaptic terminals in hippocampal neurons." *Neuron* 66(1): 37-44.
- Stein, A., T. W. Soong and T. P. Snutch (1995). "Determinants of PKC-dependent modulation of a family of neuronal calcium channels." *Neuron* 15(4): 929-940.
- Stefani, A., F. Spadoni and G. Bernardi (1996). "L-AP4 inhibits high voltage-activated Ca²⁺ currents in pyramidal cortical neurones." *Neuroreport* 7(2): 421-424.
- Stefani, A., F. Spadoni and G. Bernardi (1998). "Group III metabotropic glutamate receptor agonists modulate high voltage-activated Ca²⁺ currents in pyramidal neurons of the adult rat." *Exp Brain Res* 119(2): 237-244.
- Stefani, M. R. and B. Moghaddam (2010). "Activation of type 5 metabotropic glutamate receptors attenuates deficits in cognitive flexibility induced by NMDA receptor blockade." *Eur J Pharmacol* 639(1-3): 26-32.
- Stefanis, L. (2012). "alpha-Synuclein in Parkinson's disease." *Cold Spring Harb Perspect Med* 2(2): a009399.
- Steinberg, S. F. (2008). "Structural basis of protein kinase C isoform function." *Physiol Rev* 88(4): 1341-1378.
- Stenovec, M., E. Lasic, M. Bozic, S. T. Bobnar, R. F. Stout, Jr., V. Grubisic, V. Parpura and R. Zorec (2015). "Ketamine Inhibits ATP-Evoked Exocytotic Release of Brain-Derived Neurotrophic Factor from Vesicles in Cultured Rat Astrocytes." *Mol Neurobiol*.

- Ster, J., F. de Bock, F. Bertaso, K. Abitbol, H. Daniel, J. Bockaert and L. Fagni (2009). "Epac mediates PACAP-dependent long-term depression in the hippocampus." *J Physiol* 587(1): 101-113.
- Ster, J., F. De Bock, N. C. Guerineau, A. Janossy, S. Barrere-Lemaire, J. L. Bos, J. Bockaert and L. Fagni (2007). "Exchange protein activated by cAMP (Epac) mediates cAMP activation of p38 MAPK and modulation of Ca²⁺-dependent K⁺ channels in cerebellar neurons." *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(7): 2519-2524.
- Sternberg, D. B., K. R. Isaacs, P. E. Gold and J. L. McGaugh (1985). "Epinephrine facilitation of appetitive learning: attenuation with adrenergic receptor antagonists." *Behav Neural Biol* 44(3): 447-453.
- Stevens, C. F. and J. F. Wesseling (1999). "Augmentation is a potentiation of the exocytotic process." *Neuron* 22(1): 139-146.
- Stevens, D. R., Z. X. Wu, U. Matti, H. J. Junge, C. Schirra, U. Becherer, S. M. Wojcik, N. Brose and J. Rettig (2005). "Identification of the minimal protein domain required for priming activity of Munc13-1." *Curr Biol* 15(24): 2243-2248.
- Stigloher, C., H. Zhan, M. Zhen, J. Richmond and J. L. Bessereau (2011). "The presynaptic dense projection of the *Caenorhabditis elegans* cholinergic neuromuscular junction localizes synaptic vesicles at the active zone through SYD-2/liprin and UNC-10/RIM-dependent interactions." *J Neurosci* 31(12): 4388-4396.
- Stoop, R., S. Epiney, E. Meier and E. Pralong (2000). "Modulation of epileptiform discharges in the rat limbic system in vitro by noradrenergic agents." *Neurosci Lett* 287(1): 5-8.
- Stowell, J. N. and A. M. Craig (1999). "Axon/dendrite targeting of metabotropic glutamate receptors by their cytoplasmic carboxy-terminal domains." *Neuron* 22(3): 525-536.
- Sudhof, T. C. (2012). "The presynaptic active zone." *Neuron* 75(1): 11-25.
- Sudhof, T. C. (2013). "Neurotransmitter release: the last millisecond in the life of a synaptic vesicle." *Neuron* 80(3): 675-690.
- Sudhof, T. C. and J. Rizo (2011). "Synaptic vesicle exocytosis." *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3(12).
- Suh, P. G., J. I. Park, L. Manzoli, L. Cocco, J. C. Peak, M. Katan, K. Fukami, T. Kataoka, S. Yun and S. H. Ryu (2008). "Multiple roles of phosphoinositide-specific phospholipase C isozymes." *BMB Rep* 41(6): 415-434.
- Suh, Y. H., K. A. Pelkey, G. Lavezzari, P. A. Roche, R. L. Huganir, C. J. McBain and K. W. Roche (2008). "Corequirement of PICK1 binding and PKC phosphorylation for stable surface expression of the metabotropic glutamate receptor mGluR7." *Neuron* 58(5): 736-748.
- Summers, R. J., M. Papaioannou, S. Harris and B. A. Evans (1995). "Expression of beta 3-adrenoceptor mRNA in rat brain." *Br J Pharmacol* 116(6): 2547-2548.
- Sun, J., Z. P. Pang, D. Qin, A. T. Fahim, R. Adachi and T. C. Sudhof (2007). "A dual-Ca²⁺-sensor model for neurotransmitter release in a central synapse." *Nature* 450(7170): 676-682.
- Sun, L., M. A. Bittner and R. W. Holz (2003). "Rim, a component of the presynaptic active zone and modulator of exocytosis, binds 14-3-3 through its N terminus." *J Biol Chem* 278(40): 38301-38309.
- Sun, M. K. and D. L. Alkon (2006). "Protein kinase C pharmacology: perspectives on therapeutic potentials as antidementic and cognitive agents." *Recent Pat CNS Drug Discov* 1(2): 147-156.
- Sutherland, C. A. and D. Amin (1982). "Relative activities of rat and dog platelet phospholipase A2 and diglyceride lipase. Selective inhibition of diglyceride lipase by RHC 80267." *J Biol Chem* 257(23): 14006-14010.
- Sutton, R. B., D. Fasshauer, R. Jahn and A. T. Brunger (1998). "Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 Å resolution." *Nature* 395(6700): 347-353.
- Suzuki, E. and T. Okada (2010). "Group I metabotropic glutamate receptors are involved in TEA-induced long-term potentiation at mossy fiber-CA3 synapses in the rat hippocampus." *Brain Res* 1313: 45-52.
- Suzuki, G., N. Tsukamoto, H. Fushiki, A. Kawagishi, M. Nakamura, H. Kurihara, M. Mitsuya, M. Ohkubo and H. Ohta (2007). "In vitro pharmacological characterization of novel isoxazopyridone derivatives as allosteric metabotropic glutamate receptor 7 antagonists." *J Pharmacol Exp Ther* 323(1): 147-156.
- Suzuki, K., N. Mori, H. Kittaka, Y. Iwata, Y. Yamada, K. Osonoe and S. Niwa (1996). "Anticonvulsant action of metabotropic glutamate receptor agonists in kindled amygdala of rats." *Neurosci Lett* 204(1-2): 41-44.
- Swandulla, D. and C. M. Armstrong (1989). "Calcium channel block by cadmium in chicken sensory neurons." *Proc Natl Acad Sci U S A* 86(5): 1736-1740.
- Swanson, C. J., M. Bures, M. P. Johnson, A. M. Linden, J. A. Monn and D. D. Schoepp (2005). "Metabotropic glutamate receptors as novel targets for anxiety and stress disorders." *Nat Rev Drug Discov* 4(2): 131-144.
- Swartz, K. J. (1993). "Modulation of Ca²⁺ channels by protein kinase C in rat central and peripheral neurons: disruption of G protein-mediated inhibition." *Neuron* 11(2): 305-320.
- Tabb, J. S., P. E. Kish, R. Van Dyke and T. Ueda (1992). "Glutamate transport into synaptic vesicles. Roles of membrane potential, pH gradient, and intravesicular pH." *J Biol Chem* 267(22): 15412-15418.
- Takahashi, T., I. D. Forsythe, T. Tsujimoto, M. Barnes-Davies and K. Onodera (1996). "Presynaptic calcium current modulation by a metabotropic glutamate receptor." *Science* 274(5287): 594-597.
- Takamori, S., M. Holt, K. Stenius, E. A. Lemke, M. Gronborg, D. Riedel, H. Urlaub, S. Schenck, B. Brugger, P. Ringler, S. A. Muller, B. Rammner, F. Grater, J. S. Hub, B. L. De Groot, G. Mieskes, Y. Moriyama, J. Klingauf, H. Grubmüller, J. Heuser, F. Wieland and R. Jahn (2006). "Molecular anatomy of a trafficking organelle." *Cell* 127(4): 831-846.
- Takao-Rikitsu, E., S. Mochida, E. Inoue, M. Deguchi-Tawarada, M. Inoue, T. Ohtsuka and Y. Takai (2004). "Physical and functional interaction of the active zone proteins, CAST, RIM1,

- and Bassoon, in neurotransmitter release." *J Cell Biol* 164(2): 301-311.
- Tanabe, Y., M. Masu, T. Ishii, R. Shigemoto and S. Nakanishi (1992). "A family of metabotropic glutamate receptors." *Neuron* 8(1): 169-179.
- Tanabe, Y., A. Nomura, M. Masu, R. Shigemoto, N. Mizuno and S. Nakanishi (1993). "Signal transduction, pharmacological properties, and expression patterns of two rat metabotropic glutamate receptors, mGluR3 and mGluR4." *J Neurosci* 13(4): 1372-1378.
- Tang, E., P. K. Yip, A. G. Chapman, D. E. Jane and B. S. Meldrum (1997). "Prolonged anticonvulsant action of glutamate metabotropic receptor agonists in inferior colliculus of genetically epilepsy-prone rats." *Eur J Pharmacol* 327(2-3): 109-115.
- Tang, J., A. Maximov, O. H. Shin, H. Dai, J. Rizo and T. C. Sudhof (2006). "A complexin/synaptotagmin 1 switch controls fast synaptic vesicle exocytosis." *Cell* 126(6): 1175-1187.
- Tang, Y. and R. S. Zucker (1997). "Mitochondrial involvement in post-tetanic potentiation of synaptic transmission." *Neuron* 18(3): 483-491.
- Tang, Z., O. El Far, H. Betz and A. Scheschonka (2005). "Pias1 interaction and sumoylation of metabotropic glutamate receptor 8." *J Biol Chem* 280(46): 38153-38159.
- Tatarczynska, E., A. Klodzinska, B. Krocza, E. Chojnacka-Wojcik and A. Pilc (2001). "The antianxiety-like effects of antagonists of group I and agonists of group II and III metabotropic glutamate receptors after intrahippocampal administration." *Psychopharmacology (Berl)* 158(1): 94-99.
- Taylor, S. J., H. Z. Chae, S. G. Rhee and J. H. Exton (1991). "Activation of the beta 1 isozyme of phospholipase C by alpha subunits of the Gq class of G proteins." *Nature* 350(6318): 516-518.
- Thomas, M. J., T. D. Moody, M. Makhinson and T. J. O'Dell (1996). "Activity-dependent beta-adrenergic modulation of low frequency stimulation induced LTP in the hippocampal CA1 region." *Neuron* 17(3): 475-482.
- Thomsen, C. (1996). "Metabotropic glutamate receptor subtype 1A activates adenylate cyclase when expressed in baby hamster kidney cells." *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 20(4): 709-726.
- Thomsen, C., R. Pekhletski, B. Haldeman, T. A. Gilbert, P. O'Hara and D. R. Hampson (1997). "Cloning and characterization of a metabotropic glutamate receptor, mGluR4b." *Neuropharmacology* 36(1): 21-30.
- Tibbs, G. R., A. P. Barrie, F. J. Van Mieghem, H. T. McMahon and D. G. Nicholls (1989). "Repetitive action potentials in isolated nerve terminals in the presence of 4-aminopyridine: effects on cytosolic free Ca²⁺ and glutamate release." *J Neurochem* 53(6): 1693-1699.
- Tizzano, J. P., K. I. Griffey and D. D. Schoepp (1995). "Induction or protection of limbic seizures in mice by mGluR subtype selective agonists." *Neuropharmacology* 34(8): 1063-1067.
- Tokuoka, H. and Y. Goda (2006). "Myosin light chain kinase is not a regulator of synaptic vesicle trafficking during repetitive exocytosis in cultured hippocampal neurons." *J Neurosci* 26(45): 11606-11614.
- Tolchard, S., G. Clarke, G. L. Collingridge and S. M. Fitzjohn (2000). "Modulation of synaptic transmission in the rat ventral septal area by the pharmacological activation of metabotropic glutamate receptors." *Eur J Neurosci* 12(5): 1843-1847.
- Tomioka, N. H., H. Yasuda, H. Miyamoto, M. Hatayama, N. Morimura, Y. Matsumoto, T. Suzuki, M. Odagawa, Y. S. Odaka, Y. Iwayama, J. Won Um, J. Ko, Y. Inoue, S. Kaneko, S. Hirose, K. Yamada, T. Yoshikawa, K. Yamakawa and J. Aruga (2014). "Elfn1 recruits presynaptic mGluR7 in trans and its loss results in seizures." *Nat Commun* 5: 4501.
- Toonen, R. F., K. Wierda, M. S. Sons, H. de Wit, L. N. Cornelisse, A. Brussaard, J. J. Plomp and M. Verhage (2006). "Munc18-1 expression levels control synapse recovery by regulating readily releasable pool size." *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(48): 18332-18337.
- Torrealla, F. and M. A. Carrasco (2004). "A review on electron microscopy and neurotransmitter systems." *Brain Res Brain Res Rev* 47(1-3): 5-17.
- Torres, G. E., R. R. Gainetdinov and M. G. Caron (2003). "Plasma membrane monoamine transporters: structure, regulation and function." *Nat Rev Neurosci* 4(1): 13-25.
- Trimbuch, T. and C. Rosenmund (2016). "Should I stop or should I go? The role of complexin in neurotransmitter release." *Nat Rev Neurosci* 17(2): 118-125.
- Trinquet, E., M. Fink, H. Bazin, F. Grillet, F. Maurin, E. Bourrier, H. Ansanay, C. Leroy, A. Michaud, T. Durroux, D. Maurel, F. Malhaire, C. Goudet, J. P. Pin, M. Naval, O. Hernout, F. Chretien, Y. Chapleur and G. Mathis (2006). "D-myo-inositol 1-phosphate as a surrogate of D-myo-inositol 1,4,5-tris phosphate to monitor G protein-coupled receptor activation." *Anal Biochem* 358(1): 126-135.
- Trombley, P. Q. and G. L. Westbrook (1992). "L-AP4 inhibits calcium currents and synaptic transmission via a G-protein-coupled glutamate receptor." *J Neurosci* 12(6): 2043-2050.
- Tronel, S., M. G. Feenstra and S. J. Sara (2004). "Noradrenergic action in prefrontal cortex in the late stage of memory consolidation." *Learn Mem* 11(4): 453-458.
- Tsalkova, T., A. V. Gribenko and X. Cheng (2011). "Exchange protein directly activated by cyclic AMP isoform 2 is not a direct target of sulfonylurea drugs." *Assay Drug Dev Technol* 9(1): 88-91.
- Tsalkova, T., F. C. Mei, S. Li, O. G. Chepurny, C. A. Leech, T. Liu, G. G. Holz, V. L. Woods, Jr. and X. Cheng (2012). "Isoform-specific antagonists of exchange proteins directly activated by cAMP." *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(45): 18613-18618.
- Tsvetanova, N. G., R. Irannejad and M. von Zastrow (2015). "G protein-coupled receptor (GPCR) signaling via heterotrimeric G proteins from endosomes." *J Biol Chem* 290(11): 6689-6696.
- Tsvetanova, N. G. and M. von Zastrow (2014). "Spatial encoding of cyclic AMP signaling specificity by GPCR endocytosis." *Nat Chem Biol* 10(12): 1061-1065.
- Turner, J. P. and T. E. Salt (1999). "Group III metabotropic glutamate receptors control corticothalamic synaptic

- transmission in the rat thalamus in vitro." *J Physiol* 519 Pt 2: 481-491.
- Turner, J. P. and T. E. Salt (2003). "Group II and III metabotropic glutamate receptors and the control of the nucleus reticularis thalami input to rat thalamocortical neurones in vitro." *Neuroscience* 122(2): 459-469.
- Turner, T. J. and K. Dunlap (1995). "Pharmacological characterization of presynaptic calcium channels using subsecond biochemical measurements of synaptosomal neurosecretion." *Neuropharmacology* 34(11): 1469-1478.
- Tyler, E. C. and D. M. Lovinger (1995). "Metabotropic glutamate receptor modulation of synaptic transmission in corticostriatal co-cultures: role of calcium influx." *Neuropharmacology* 34(8): 939-952.
- Tzounopoulos, T., R. Janz, T. C. Sudhof, R. A. Nicoll and R. C. Malenka (1998). "A role for cAMP in long-term depression at hippocampal mossy fiber synapses." *Neuron* 21(4): 837-845.
- Uchida, N., Y. Honjo, K. R. Johnson, M. J. Wheelock and M. Takeichi (1996). "The catenin/cadherin adhesion system is localized in synaptic junctions bordering transmitter release zones." *J Cell Biol* 135(3): 767-779.
- Ueno, H., T. Shibasaki, T. Iwanaga, K. Takahashi, Y. Yokoyama, L. M. Liu, N. Yokoi, N. Ozaki, S. Matsukura, H. Yano and S. Seino (2001). "Characterization of the gene EPAC2: structure, chromosomal localization, tissue expression, and identification of the liver-specific isoform." *Genomics* 78(1-2): 91-98.
- Ugolini, A., C. H. Large and M. Corsi (2008). "AMN082, an allosteric mGluR7 agonist that inhibits afferent glutamatergic transmission in rat basolateral amygdala." *Neuropharmacology* 55(4): 532-536.
- Ulucan, C., X. Wang, E. Baljinnyam, Y. Bai, S. Okumura, M. Sato, S. Minamisawa, S. Hirotsu and Y. Ishikawa (2007). "Developmental changes in gene expression of Epac and its upregulation in myocardial hypertrophy." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293(3): H1662-1672.
- Uriu, Y., S. Kiyonaka, T. Miki, M. Yagi, S. Akiyama, E. Mori, A. Nakao, A. M. Beedle, K. P. Campbell, M. Wakamori and Y. Mori (2010). "Rab3-interacting molecule gamma isoforms lacking the Rab3-binding domain induce long lasting currents but block neurotransmitter vesicle anchoring in voltage-dependent P/Q-type Ca²⁺ channels." *J Biol Chem* 285(28): 21750-21767.
- Vaithianathan, T., G. Zanazzi, D. Henry, W. Akmentin and G. Matthews (2013). "Stabilization of spontaneous neurotransmitter release at ribbon synapses by ribbon-specific subtypes of complexin." *J Neurosci* 33(19): 8216-8226.
- Valenti, O., G. Mannaioni, G. R. Seabrook, P. J. Conn and M. J. Marino (2005). "Group III metabotropic glutamate-receptor-mediated modulation of excitatory transmission in rodent substantia nigra pars compacta dopamine neurons." *J Pharmacol Exp Ther* 313(3): 1296-1304.
- Valenti, O., M. J. Marino, M. Wittmann, E. Lis, A. G. DiLella, G. G. Kinney and P. J. Conn (2003). "Group III metabotropic glutamate receptor-mediated modulation of the striatopallidal synapse." *J Neurosci* 23(18): 7218-7226.
- Vallée, R. B. and H. S. Shpetner (1993). "Cell biology. Dynamin in synaptic dynamics." *Nature* 365(6442): 107-108.
- van Hooren, K. W., E. L. van Agtmaal, M. Fernandez-Borja, J. A. van Mourik, J. Voorberg and R. Bierings (2012). "The Epac-Rap1 signaling pathway controls cAMP-mediated exocytosis of Weibel-Palade bodies in endothelial cells." *J Biol Chem* 287(29): 24713-24720.
- van Waarde, A., W. Vaalburg, P. Doze, F. J. Bosker and P. H. Elsinga (2004). "PET imaging of beta-adrenoceptors in human brain: a realistic goal or a mirage?" *Curr Pharm Des* 10(13): 1519-1536.
- Vandenberg, R. J. and R. M. Ryan (2013). "Mechanisms of glutamate transport." *Physiol Rev* 93(4): 1621-1657.
- Vanhoose, A. M. and D. G. Winder (2003). "NMDA and beta1-adrenergic receptors differentially signal phosphorylation of glutamate receptor type 1 in area CA1 of hippocampus." *J Neurosci* 23(13): 5827-5834.
- Vargas, R., F. Cifuentes and M. A. Morales (2011). "Role of presynaptic and postsynaptic IP3-dependent intracellular calcium release in long-term potentiation in sympathetic ganglion of the rat." *Synapse* 65(5): 441-448.
- Varoqueaux, F., A. Sigler, J. S. Rhee, N. Brose, C. Enk, K. Reim and C. Rosenmund (2002). "Total arrest of spontaneous and evoked synaptic transmission but normal synaptogenesis in the absence of Munc13-mediated vesicle priming." *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(13): 9037-9042.
- Vasudevan, N. T., M. L. Mohan, S. K. Goswami and S. V. Naga Prasad (2011). "Regulation of beta-adrenergic receptor function: an emphasis on receptor resensitization." *Cell Cycle* 10(21): 3684-3691.
- Vazquez, E. and J. Sanchez-Prieto (1997). "Presynaptic modulation of glutamate release targets different calcium channels in rat cerebrocortical nerve terminals." *Eur J Neurosci* 9(10): 2009-2018.
- Vera, G. and R. Tapia (2012). "Activation of group III metabotropic glutamate receptors by endogenous glutamate protects against glutamate-mediated excitotoxicity in the hippocampus in vivo." *J Neurosci Res* 90(5): 1055-1066.
- Verhage, M., A. S. Maia, J. J. Plomp, A. B. Brussaard, J. H. Heeroma, H. Vermeer, R. F. Toonen, R. E. Hammer, T. K. van den Berg, M. Missler, H. J. Geuze and T. C. Sudhof (2000). "Synaptic assembly of the brain in the absence of neurotransmitter secretion." *Science* 287(5454): 864-869.
- Verstegen, A. M., E. Tagliatti, G. Lignani, A. Marte, T. Stoloro, M. Atias, A. Corradi, F. Valtorta, D. Gitler, F. Onofri, A. Fassio and F. Benfenati (2014). "Phosphorylation of synapsin I by cyclin-dependent kinase-5 sets the ratio between the resting and recycling pools of synaptic vesicles at hippocampal synapses." *J Neurosci* 34(21): 7266-7280.
- Vliem, M. J., B. Ponsioen, F. Schwede, W. J. Pannekoek, J. Riedl, M. R. Kooistra, K. Jalink, H. G. Genieser, J. L. Bos and H. Rehmann (2008). "8-pCPT-2'-O-Me-cAMP-AM: an improved Epac-selective cAMP analogue." *Chembiochem* 9(13): 2052-2054.
- Vogt, K. E. and R. A. Nicoll (1999). "Glutamate and gamma-aminobutyric acid mediate a heterosynaptic depression at

- mossy fiber synapses in the hippocampus." *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(3): 1118-1122.
- von Gersdorff, H., R. Schneggenburger, S. Weis and E. Neher (1997). "Presynaptic depression at a calyx synapse: the small contribution of metabotropic glutamate receptors." *J Neurosci* 17(21): 8137-8146.
- von Zastrow, M. and J. T. Williams (2012). "Modulating neuromodulation by receptor membrane traffic in the endocytic pathway." *Neuron* 76(1): 22-32.
- Wada, E., R. Shigemoto, A. Kinoshita, H. Ohishi and N. Mizuno (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(4): 493-504.
- Wadel, K., E. Neher and T. Sakaba (2007). "The coupling between synaptic vesicles and Ca²⁺ channels determines fast neurotransmitter release." *Neuron* 53(4): 563-575.
- Wahl-Schott, C. and M. Biel (2009). "HCN channels: structure, cellular regulation and physiological function." *Cell Mol Life Sci* 66(3): 470-494.
- Walling, S. G., D. J. Nutt, M. D. Lales and C. W. Harley (2004). "Orexin-A infusion in the locus ceruleus triggers norepinephrine (NE) release and NE-induced long-term potentiation in the dentate gyrus." *J Neurosci* 24(34): 7421-7426.
- Wang, C., Y. Gu, G. W. Li and L. Y. Huang (2007). "A critical role of the cAMP sensor Epac in switching protein kinase signalling in prostaglandin E₂-induced potentiation of P2X₃ receptor currents in inflamed rats." *J Physiol* 584(Pt 1): 191-203.
- Wang, D. and L. Maler (1998). "Differential roles of Ca²⁺/calmodulin-dependent kinases in posttetanic potentiation at input selective glutamatergic pathways." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(12): 7133-7138.
- Wang, D. and Y. K. Xiang (2011). "beta-adrenergic receptor, amyloid beta-peptide, and Alzheimer's disease." *Curr Top Membr* 67: 205-228.
- Wang, J., K. Ono, D. L. Dickstein, I. Arrieta-Cruz, W. Zhao, X. Qian, A. Lamparello, R. Subnani, M. Ferruzzi, C. Pavlides, L. Ho, P. R. Hof, D. B. Teplow and G. M. Pasinetti (2011). "Carvedilol as a potential novel agent for the treatment of Alzheimer's disease." *Neurobiol Aging* 32(12): 2321 e2321-2312.
- Wang, J. K., S. I. Walaas, T. S. Sihra, A. Aderem and P. Greengard (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(7): 2253-2256.
- Wang, Q., L. Chang, M. J. Rowan and R. Anwyl (2007). "Developmental dependence, the role of the kinases p38 MAPK and PKC, and the involvement of tumor necrosis factor-R1 in the induction of mGlu-5 LTD in the dentate gyrus." *Neuroscience* 144(1): 110-118.
- Wang, T., L. Dowal, M. R. El-Maghrabi, M. Rebecchi and S. Scarlata (2000). "The pleckstrin homology domain of phospholipase C-beta(2) links the binding of gbetagamma to activation of the catalytic core." *J Biol Chem* 275(11): 7466-7469.
- Wang, T., S. Pentyala, M. J. Rebecchi and S. Scarlata (1999). "Differential association of the pleckstrin homology domains of phospholipases C-beta 1, C-beta 2, and C-delta 1 with lipid bilayers and the beta gamma subunits of heterotrimeric G proteins." *Biochemistry* 38(5): 1517-1524.
- Wang, X., G. Chen, W. Gao and T. Ebner (2009). "Long-term potentiation of the responses to parallel fiber stimulation in mouse cerebellar cortex in vivo." *Neuroscience* 162(3): 713-722.
- Wang, X., B. Hu, A. Zieba, N. G. Neumann, M. Kasper-Sonnenberg, A. Honsbein, G. Hultqvist, T. Conze, W. Witt, C. Limbach, M. Geitmann, H. Danielson, R. Kolarow, G. Niemann, V. Lessmann and M. W. Kilimann (2009). "A protein interaction node at the neurotransmitter release site: domains of Aczonin/Piccolo, Bassoon, CAST, and rim converge on the N-terminal domain of Munc13-1." *J Neurosci* 29(40): 12584-12596.
- Wang, Y., M. Okamoto, F. Schmitz, K. Hofmann and T. C. Sudhof (1997). "Rim is a putative Rab3 effector in regulating synaptic-vesicle fusion." *Nature* 388(6642): 593-598.
- Wang, Y. and T. C. Sudhof (2003). "Genomic definition of RIM proteins: evolutionary amplification of a family of synaptic regulatory proteins." *Genomics* 81(2): 126-137.
- Wang, Y., S. Sugita and T. C. Sudhof (2000). "The RIM/NIM family of neuronal C2 domain proteins. Interactions with Rab3 and a new class of Src homology 3 domain proteins." *J Biol Chem* 275(26): 20033-20044.
- Watabe, A. M., M. Nagase, A. Hagiwara, Y. Hida, M. Tsuji, T. Ochiai, F. Kato and T. Ohtsuka (2016). "SAD-B kinase regulates pre-synaptic vesicular dynamics at hippocampal Schaffer collateral synapses and affects contextual fear memory." *J Neurochem* 136(1): 36-47.
- Watanabe, S., B. R. Rost, M. Camacho-Perez, M. W. Davis, B. Sohl-Kielczynski, C. Rosenmund and E. M. Jorgensen (2013). "Ultrafast endocytosis at mouse hippocampal synapses." *Nature* 504(7479): 242-247.
- Waterhouse, B. D., H. C. Moises, H. H. Yeh and D. J. Woodward (1982). "Norepinephrine enhancement of inhibitory synaptic mechanisms in cerebellum and cerebral cortex: mediation by beta adrenergic receptors." *J Pharmacol Exp Ther* 221(2): 495-506.
- Weimer, R. M., E. O. Gracheva, O. Meyrignac, K. G. Miller, J. E. Richmond and J. L. Bessereau (2006). "UNC-13 and UNC-10/rim localize synaptic vesicles to specific membrane domains." *J Neurosci* 26(31): 8040-8047.
- Wettschureck, N. and S. Offermanns (2005). "Mammalian G proteins and their cell type specific functions." *Physiol Rev* 85(4): 1159-1204.
- White, W. F., J. V. Nadler and C. W. Cotman (1979). "The effect of acidic amino acid antagonists on synaptic transmission in the hippocampal formation in vitro." *Brain Res* 164: 177-194.
- Wierda, K. D., R. F. Toonen, H. de Wit, A. B. Brussaard and M. Verhage (2007). "Interdependence of PKC-dependent and PKC-independent pathways for presynaptic plasticity." *Neuron* 54(2): 275-290.

- Wigmore, M. A. and M. G. Lacey (1998). "Metabotropic glutamate receptors depress glutamate-mediated synaptic input to rat midbrain dopamine neurones in vitro." *Br J Pharmacol* 123(4): 667-674.
- Wilhelm, B. G., T. W. Groemer and S. O. Rizzoli (2010). "The same synaptic vesicles drive active and spontaneous release." *Nat Neurosci* 13(12): 1454-1456.
- Williams, R. L. (1999). "Mammalian phosphoinositide-specific phospholipase C." *Biochim Biophys Acta* 1441(2-3): 255-267.
- Winder, D. G., P. S. Ritch, R. W. t. Gereau and P. J. Conn (1996). "Novel glial-neuronal signalling by coactivation of metabotropic glutamate and beta-adrenergic receptors in rat hippocampus." *J Physiol* 494 (Pt 3): 743-755.
- Wittmann, M., M. J. Marino, S. R. Bradley and P. J. Conn (2001). "Activation of group III mGluRs inhibits GABAergic and glutamatergic transmission in the substantia nigra pars reticulata." *J Neurophysiol* 85(5): 1960-1968.
- Wong, D. L., T. C. Tai, D. C. Wong-Faull, R. Claycomb, E. G. Meloni, K. M. Myers, W. A. Carlezon, Jr. and R. Kvetnansky (2012). "Epinephrine: a short- and long-term regulator of stress and development of illness : a potential new role for epinephrine in stress." *Cell Mol Neurobiol* 32(5): 737-748.
- Woodhall, G. L., G. Ayman and R. S. Jones (2007). "Differential control of two forms of glutamate release by group III metabotropic glutamate receptors at rat entorhinal synapses." *Neuroscience* 148(1): 7-21.
- Woolfrey, K. M., D. P. Srivastava, H. Photowala, M. Yamashita, M. V. Barbolina, M. E. Cahill, Z. Xie, K. A. Jones, L. A. Quilliam, M. Prakriya and P. Penzes (2009). "Epac2 induces synapse remodeling and depression and its disease-associated forms alter spines." *Nat Neurosci* 12(10): 1275-1284.
- Wu, L. G. and J. G. Borst (1999). "The reduced release probability of releasable vesicles during recovery from short-term synaptic depression." *Neuron* 23(4): 821-832.
- Wu, L. G., R. E. Westenbroek, J. G. Borst, W. A. Catterall and B. Sakmann (1999). "Calcium channel types with distinct presynaptic localization couple differentially to transmitter release in single calyx-type synapses." *J Neurosci* 19(2): 726-736.
- Wu, M. N., K. L. Schulze, T. E. Lloyd and H. J. Bellen (2001). "The ROP-syntaxin interaction inhibits neurotransmitter release." *Eur J Cell Biol* 80(2): 196-199.
- Wu, S., R. A. Wright, P. K. Rockey, S. G. Burgett, J. S. Arnold, P. R. Rosteck, Jr., B. G. Johnson, D. D. Schoepp and R. M. Belagaje (1998). "Group III human metabotropic glutamate receptors 4, 7 and 8: molecular cloning, functional expression, and comparison of pharmacological properties in RGT cells." *Brain Res Mol Brain Res* 53(1-2): 88-97.
- Wu, X. S., B. D. McNeil, J. Xu, J. Fan, L. Xue, E. Melicoff, R. Adachi, L. Bai and L. G. Wu (2009). "Ca(2+) and calmodulin initiate all forms of endocytosis during depolarization at a nerve terminal." *Nat Neurosci* 12(8): 1003-1010.
- Xi, Z. X., H. Shen, D. A. Baker and P. W. Kalivas (2003). "Inhibition of non-vesicular glutamate release by group III metabotropic glutamate receptors in the nucleus accumbens." *J Neurochem* 87(5): 1204-1212.
- Xu, J., K. D. Brewer, R. Perez-Castillejos and J. Rizo (2013). "Subtle Interplay between synaptotagmin and complexin binding to the SNARE complex." *J Mol Biol* 425(18): 3461-3475.
- Xu, J., T. Mashimo and T. C. Sudhof (2007). "Synaptotagmin-1, -2, and -9: Ca(2+) sensors for fast release that specify distinct presynaptic properties in subsets of neurons." *Neuron* 54(4): 567-581.
- Xu, J., Z. P. Pang, O. H. Shin and T. C. Sudhof (2009). "Synaptotagmin-1 functions as a Ca2+ sensor for spontaneous release." *Nat Neurosci* 12(6): 759-766.
- Yang, B., M. Steegmaier, L. C. Gonzalez, Jr. and R. H. Scheller (2000). "nSec1 binds a closed conformation of syntaxin1A." *J Cell Biol* 148(2): 247-252.
- Yang, J. and R. W. Tsien (1993). "Enhancement of N- and L-type calcium channel currents by protein kinase C in frog sympathetic neurons." *Neuron* 10(2): 127-136.
- Yang, X., Y. J. Kaeser-Woo, Z. P. Pang, W. Xu and T. C. Sudhof (2010). "Complexin clamps asynchronous release by blocking a secondary Ca(2+) sensor via its accessory alpha helix." *Neuron* 68(5): 907-920.
- Yang, Y. and N. Calakos (2010). "Acute in vivo genetic rescue demonstrates that phosphorylation of RIM1alpha serine 413 is not required for mossy fiber long-term potentiation." *J Neurosci* 30(7): 2542-2546.
- Yang, Y. and N. Calakos (2011). "Munc13-1 is required for presynaptic long-term potentiation." *J Neurosci* 31(33): 12053-12057.
- Yang, Y. and N. Calakos (2013). "Presynaptic long-term plasticity." *Front Synaptic Neurosci* 5: 8.
- Yang, Y., T. J. Craig, X. Chen, L. F. Ciufo, M. Takahashi, A. Morgan and K. D. Gillis (2007). "Phosphomimetic mutation of Ser-187 of SNAP-25 increases both syntaxin binding and highly Ca2+-sensitive exocytosis." *J Gen Physiol* 129(3): 233-244.
- Yang, Y., X. Shu, D. Liu, Y. Shang, Y. Wu, L. Pei, X. Xu, Q. Tian, J. Zhang, K. Qian, Y. X. Wang, R. S. Petralia, W. Tu, L. Q. Zhu, J. Z. Wang and Y. Lu (2012). "EPAC null mutation impairs learning and social interactions via aberrant regulation of miR-124 and Zif268 translation." *Neuron* 73(4): 774-788.
- Yang, Y. R., M. Y. Follo, L. Cocco and P. G. Suh (2013). "The physiological roles of primary phospholipase C." *Adv Biol Regul* 53(3): 232-241.
- Yao, I., H. Takagi, H. Ageta, T. Kahyo, S. Sato, K. Hatanaka, Y. Fukuda, T. Chiba, N. Morone, S. Yuasa, K. Inokuchi, T. Ohtsuka, G. R. Macgregor, K. Tanaka and M. Setou (2007). "SCRAPPER-dependent ubiquitination of active zone protein RIM1 regulates synaptic vesicle release." *Cell* 130(5): 943-957.
- Yao, J., J. D. Gaffaney, S. E. Kwon and E. R. Chapman (2011). "Doc2 is a Ca2+ sensor required for asynchronous neurotransmitter release." *Cell* 147(3): 666-677.
- Yeckel, M. F., A. Kapur and D. Johnston (1999). "Multiple forms of LTP in hippocampal CA3 neurons use a common postsynaptic mechanism." *Nat Neurosci* 2(7): 625-633.
- Yeh, H. H. and D. J. Woodward (1983). "Beta-1 adrenergic receptors mediate noradrenergic facilitation of Purkinje cell

- responses to gamma-aminobutyric acid in cerebellum of rat." *Neuropharmacology* 22(5): 629-639.
- Yin, S., M. J. Noetzel, K. A. Johnson, R. Zamorano, N. Jalan-Sakrikar, K. J. Gregory, P. J. Conn and C. M. Niswender (2014). "Selective actions of novel allosteric modulators reveal functional heteromers of metabotropic glutamate receptors in the CNS." *J Neurosci* 34(1): 79-94.
- Yokoi, M., K. Kobayashi, T. Manabe, T. Takahashi, I. Sakaguchi, G. Katsuura, R. Shigemoto, H. Ohishi, S. Nomura, K. Nakamura, K. Nakao, M. Katsuki and S. Nakanishi (1996). "Impairment of hippocampal mossy fiber LTD in mice lacking mGluR2." *Science* 273(5275): 645-647.
- Yu, C. R., J. Power, G. Barnea, S. O'Donnell, H. E. Brown, J. Osborne, R. Axel and J. A. Gogos (2004). "Spontaneous neural activity is required for the establishment and maintenance of the olfactory sensory map." *Neuron* 42(4): 553-566.
- Yu, H., S. S. Rathore, J. A. Lopez, E. M. Davis, D. E. James, J. L. Martin and J. Shen (2013). "Comparative studies of Munc18c and Munc18-1 reveal conserved and divergent mechanisms of Sec1/Munc18 proteins." *Proc Natl Acad Sci U S A* 110(35): E3271-3280.
- Yu, J. T., L. Tan, J. R. Ou, J. X. Zhu, K. Liu, J. H. Song and Y. P. Sun (2008). "Polymorphisms at the beta2-adrenergic receptor gene influence Alzheimer's disease susceptibility." *Brain Res* 1210: 216-222.
- Yu, J. T., N. D. Wang, T. Ma, H. Jiang, J. Guan and L. Tan (2011). "Roles of beta-adrenergic receptors in Alzheimer's disease: implications for novel therapeutics." *Brain Res Bull* 84(2): 111-117.
- Yu, N. N., X. X. Wang, J. T. Yu, N. D. Wang, R. C. Lu, D. Miao, Y. Tian and L. Tan (2010). "Blocking beta2-adrenergic receptor attenuates acute stress-induced amyloid beta peptide production." *Brain Res* 1317: 305-310.
- Yuan, L. L., J. P. Adams, M. Swank, J. D. Sweatt and D. Johnston (2002). "Protein kinase modulation of dendritic K⁺ channels in hippocampus involves a mitogen-activated protein kinase pathway." *J Neurosci* 22(12): 4860-4868.
- Zaldua, N., M. Gastineau, M. Hoshino, F. Lezoualc'h and J. L. Zugaza (2007). "Epac signaling pathway involves STEF, a guanine nucleotide exchange factor for Rac, to regulate APP processing." *FEBS Lett* 581(30): 5814-5818.
- Zamponi, G. W., E. Bourinet, D. Nelson, J. Nargeot and T. P. Snutch (1997). "Crosstalk between G proteins and protein kinase C mediated by the calcium channel alpha1 subunit." *Nature* 385(6615): 442-446.
- Zhai, J., M. T. Tian, Y. Wang, J. L. Yu, A. Koster, M. Baez and E. S. Nisenbaum (2002). "Modulation of lateral perforant path excitatory responses by metabotropic glutamate 8 (mGlu8) receptors." *Neuropharmacology* 43(2): 223-230.
- Zhang, C. L., M. Katoh, T. Shibasaki, K. Minami, Y. Sunaga, H. Takahashi, N. Yokoi, M. Iwasaki, T. Miki and S. Seino (2009). "The cAMP sensor Epac2 is a direct target of antidiabetic sulfonylurea drugs." *Science* 325(5940): 607-610.
- Zhang, C. S., F. Bertaso, V. Eulenburg, M. Lerner-Natoli, G. A. Herin, L. Bauer, J. Bockaert, L. Fagni, H. Betz and A. Scheschonka (2008). "Knock-in mice lacking the PDZ-ligand motif of mGluR7a show impaired PKC-dependent autoinhibition of glutamate release, spatial working memory deficits, and increased susceptibility to pentylenetetrazol." *J Neurosci* 28(34): 8604-8614.
- Zhang, G. C., K. Vu, N. K. Parelkar, L. M. Mao, I. M. Stanford, E. E. Fibuch and J. Q. Wang (2009). "Acute administration of cocaine reduces metabotropic glutamate receptor 8 protein expression in the rat striatum in vivo." *Neurosci Lett* 449(3): 224-227.
- Zhao, K., R. Wen, X. Wang, L. Pei, Y. Yang, Y. Shang, N. Bazan, L. Q. Zhu, Q. Tian and Y. Lu (2013). "EPAC inhibition of SUR1 receptor increases glutamate release and seizure vulnerability." *J Neurosci* 33(20): 8861-8865.
- Zhong, N., V. Beaumont and R. S. Zucker (2001). "Roles for mitochondrial and reverse mode Na⁺/Ca²⁺ exchange and the plasmalemma Ca²⁺ ATPase in post-tetanic potentiation at crayfish neuromuscular junctions." *J Neurosci* 21(24): 9598-9607.
- Zhong, N. and R. S. Zucker (2005). "cAMP acts on exchange protein activated by cAMP/cAMP-regulated guanine nucleotide exchange protein to regulate transmitter release at the crayfish neuromuscular junction." *J Neurosci* 25(1): 208-214.
- Zhou, F., B. Hongmin, Z. Xiang and L. Enyu (2003). "Changes of mGluR4 and the effects of its specific agonist L-AP4 in a rodent model of diffuse brain injury." *J Clin Neurosci* 10(6): 684-688.
- Zhou, H. C., Y. Y. Sun, W. Cai, X. T. He, F. Yi, B. M. Li and X. H. Zhang (2013). "Activation of beta2-adrenoceptor enhances synaptic potentiation and behavioral memory via cAMP-PKA signaling in the medial prefrontal cortex of rats." *Learn Mem* 20(5): 274-284.
- Zhou, P., Z. P. Pang, X. Yang, Y. Zhang, C. Rosenmund, T. Bacaj and T. C. Sudhof (2013). "Syntaxin-1 N-peptide and Habc-domain perform distinct essential functions in synaptic vesicle fusion." *EMBO J* 32(1): 159-171.
- Zsiros, V. and G. Maccaferri (2008). "Noradrenergic modulation of electrical coupling in GABAergic networks of the hippocampus." *J Neurosci* 28(8): 1804-1815.
- Zuber, B., I. Nikonenko, P. Klauser, D. Muller and J. Dubochet (2005). "The mammalian central nervous synaptic cleft contains a high density of periodically organized complexes." *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(52): 19192-19197.
- Zucker, R. S. and W. G. Regehr (2002). "Short-term synaptic plasticity." *Annu Rev Physiol* 64: 355-405.