

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular IV



**EXPRESIÓN Y REGULACIÓN DE LOS RECEPTORES
AMPA EN NEURONAS GRANULARES DE CEREBELO**

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

**Bajo la dirección de la doctora
Magdalena Torres**

Madrid, 2013

©Salvatore Incontro, 2013

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE VETERINARIA

Departamento de Bioquímica y Biología molecular IV



**Expresión y regulación de los receptores AMPA
en neuronas granulares de cerebelo**

Tesis Doctoral
Salvatore Incontro
Madrid, 2012

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE VETERINARIA

Departamento de Bioquímica y Biología molecular IV

**Expresión y regulación de los receptores AMPA
en neuronas granulares de cerebelo**

**Memoria presentada por Salvatore Incontro
para optar al grado de Doctor
Directora de la Tesis: Magdalena Torres
Madrid, 2012**

Vº Bº Directora

Magdalena Torres

LISTA DE ABREVIATURAS

AC1: adenilato ciclasa 1.

ADN: ácido desoxirribonucleico.

AMPA: ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico.

AMPAR: receptor AMPA.

AMPC: adenosina-3':5'-monofosfato cíclico.

ARNm: ácido ribonucleico mensajero.

BDNF: factor neurotrófico derivado del cerebro.

CaMKII: calmodulina quinasa dependiente de calcio de tipo II.

CaMKIV: calmodulina quinasa dependiente de calcio de tipo IV.

cGKI: proteína quinasa dependiente de GMPc de tipo I.

cGKII: proteína quinasa dependiente de GMPc de tipo II.

CNGC: canales iónicos sensibles a GMPc.

CP-AMPA: receptores AMPA permeables a calcio.

DAPI: 4'-6-Diamidino-2-fenilindol.

DIV: días in vitro.

EGL: capa granular externa (external granule layer).

FIC: células recién aisladas.

GABA: ácido γ -aminobutírico.

GCs: guanilato ciclasa soluble.

GFAP: proteína fibrilar ácida de la glía.

GMPc: guanosina-3':5'-monofosfato cíclico.

GTP: guanosina 5'-trifosfato.

HBM: medio tamponado con HEPES.

HEPES: ácido 4-(2-hidroxietil) piperacín-1-etanosulfónico.

IGL: capa granular interna (internal granule layer).

JSTX: toxina de *Joro spider*.

LDH: lactato deshidrogenasa.

LTD: depresión duradera.

LTP: potenciación duradera.

mGluR: receptor metabotrópico de glutamato.

NASPM: 1-naftil-acetil-espermina.

Abreviaturas

NBQX: 2,3-dihidroxi-6-nitro-7-sulfamoil-benzo[f]quinoxalina-2,3-dione.

NDS: suero normal de burro.

NGS: suero normal de cabra.

NMDA: ácido N-metil-D-aspartico

NMDAR: receptor NMDA

NO: óxido nítrico.

NOS I: óxido nítrico sintasa tipo I ó neuronal.

NOS II: óxido nítrico sintasa tipo II ó inducible.

NSF: proteína sensible a la N-Etilmaleimida.

PCL: capa de células de Purkinje (Purkinje cells layer).

PDE: fosfodiesterasa.

PICK1: proteína que interacciona con la proteína quinasa C.

PKA: proteína quinasa dependiente de AMPc.

PKC: proteína quinasa C.

PSD: densidad post-sináptica.

RIM1a: proteína de interacción con Rab3A.

Shh: Sonic hedgehog.

TARPs: proteínas transmembrana reguladoras de los receptores AMPA.

TES: 2-[[2-hidroxi-1,1 bis(hidroximetil)etil]amino]etanosulfónico.

TTX: tetrodotoxina.

VGCC: canales de calcio dependientes de voltaje (voltage gated calcium channels).

ω-Aga-IVA: ω-agatoxina-IVA.

ω-CoTx-GVIA: ω-conotoxina-GVIA.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
1. El cerebelo.....	3
1.1 Estructura y función.....	3
1.2 Las neuronas granulares de cerebelo.....	6
2. Neurotransmisión glutamatérgica	9
2.1 Receptores ionotrópicos del glutamato tipo AMPA (ácido- α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propionato).....	11
2.1.1 Biogénesis y síntesis de los receptores AMPA	11
2.1.2 Tráfico y función fisiológica de los receptores AMPA.....	14
2.1.3 Función de los receptores AMPA permeables a calcio	17
2.1.4 Regulación homeostática de los receptores AMPA.....	20
2.2 El receptor NMDA de glutamato.	22
2.2.1 Función fisiológica y alteraciones patológicas	25
3. La vía de señalización NO/cGMP	27
3.1 Óxido nítrico sintasas.....	28
3.1.1 Óxido nítrico sintasa neural (NOS I).....	29
3.2 Guanilato ciclasa	31
3.3 Sistemas efectores del GMPc.....	33
3.3.1 Proteínas quinasas dependientes de GMPc.....	33
3.3.2 Fosfodiesterasas	36
3.3.3 Canales iónicos activados por nucleótidos cíclicos	37
3.4 Función de la vía NO/cGMP en las células granulares de cerebelo.....	38
II. OBJETIVOS	43
III. MATERIALES Y MÉTODOS	47
1. - MATERIALES	49
1.1 Material Biológico.....	49
1.2 Material de cultivo.....	49
1.3 Anticuerpos primarios y secundarios.....	50

1.4 Reactivos	51
2. MÉTODOS	52
2.1 El cultivo de neuronas granulares como modelo de estudio de las sinapsis glutamatérgicas.....	52
2.2 Obtención de las células granulares de cerebelo de rata	53
2.3 Ensayo de viabilidad celular	56
2.4 Inmunocitoquímica	57
2.4.1 Método de inmunodetección postfijación.....	57
2.4.2 Método de inmunodetección en células vivas	60
2.4.3 Análisis.....	61
2.5 Determinación de las concentraciones de Ca ²⁺ intracelular mediante micro-fluorimetria	63
2.5.1 Determinación de Ca ²⁺ intracelular en poblaciones de neuronas granulares de cerebelo de 7 DIV.....	63
2.5.2 Determinación de Ca ²⁺ intracelular en neuronas granulares individuales de 7 DIV	65
2.6 Inmunohistoquímica	68
2.7 Protocolo de silenciamiento de proteínas mediante siRNAs específicos..	69
2.8 Experimentos de PCR simple y cuantitativa	70
2.8.1 - Extracción de ARN	70
2.8.2- Reacciones de Transcripción Inversa (RT) y Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	71
2.8.2.1 Reacciones de Transcripción inversa	71
2.8.2.2 Reacciones de PCR	72
2.8.3 RT y PCR cuantitativa: método de sondas Taqman	73
2.9. Detección de proteínas mediante Inmunotransferencia.....	76
2.9.1 Fraccionamiento subcelular de cerebelos de ratones de 14 días.....	80
2.9.2 Experimentos de coimmunoprecipitación	81
2.10 Ensayo de edición del ARNm de GluA2.....	84
IV.RESULTADOS	87
1. Regulación homeostática de la expresión de los receptores AMPA en células granulares de cerebelo.....	89

1.1 Expresión de las subunidades de los receptores AMPA en neuronas granulares de cerebelo en cultivo.....	91
1.2 Expresión de las subunidades de los receptores AMPA en cerebelo de ratas de 14 días y adultas.....	94
1.3 Variación en la expresión de las subunidades de los receptores AMPA en función del nivel de despolarización de la membrana plasmática	98
1.4 El incremento en la expresión de los ARNm se refleja en la cantidad de proteínas de GluA1 y GluA4.....	101
1.5 La expresión total en dendritas de las subunidades GluA2 y GluA3 no varía	105
1.6 La localización nuclear de p-CaMKIV en células desarrolladas en un medio con alto potasio contribuye a la inhibición de la expresión de las subunidades de AMPA.....	108
1.7 La reducción crónica de la actividad neuronal favorece la inserción en la membrana plasmática de receptores AMPA	111
1.8 La persistente inhibición de actividad neuronal favorece la inserción de receptores AMPA permeables a calcio	115
1.9 La reducción crónica de la actividad neuronal no afecta al grado de edición del ARNm de la subunidad GluA2.....	119
2. Regulación del tráfico de la subunidad GluA1 por la cascada de señalización del NO	122
2.1 La proteína quinasa dependiente de GMPc de tipo II fosforila la subunidad GluA1 en la Ser845	123
2.2 Los niveles de GluA1 y pGluA1 están disminuidos en las fracciones sinápticas de cerebelo obtenidas a partir de un ratón de 14 días que no expresa cGKII	126
2.3 Co-inmunoprecipitación de las proteínas cGKII y GluA1 en extractos de cerebelo de ratas de 14 días	127
2.4 El silenciamiento de la cGKII provoca la disminución de la expresión de GluA1 en la membrana plasmática.....	129
2.5 La activación de la cGKII incrementa los niveles de GluA1 en la membrana en sitios extra-sinápticos.....	131
2.6 El análisis de la respuesta de Ca ²⁺ inducida por AMPA, evidencia la formación de receptores AMPA permeables a calcio.....	136

V. DISCUSIÓN.....	141
1. Regulación de la expresión de los receptores AMPA dependiente de la despolarización de la membrana.....	143
1.1 Expresión de las cuatro subunidades en neuronas granulares de cerebelo en cultivo.....	143
1.2 Variaciones en la expresión de las cuatro subunidades como respuesta homeostática a cambios de la actividad neuronal. Aumento de AMPARs en la membrana	145
1.3 El aumento de las subunidades de los AMPARs en la membrana se traduce en una mayor entrada de calcio debido a la formación de receptores permeables a calcio.....	150
2. La proteína quinasa dependiente de GMPc de tipo II (cGKII) regula los niveles de la subunidad GluA1 en la membrana plasmática de células granulares de cerebelo.....	154
2.1 La cGKII fosforila la subunidad GluA1 en la Ser845 y aumenta su expresión en membrana.....	154
2.2 El aumento de la fosforilación se refleja en un aumento de la subunidad GluA1 en sitios extra-sinápticos	157
2.3 La activación de cGKII se traduce en la formación de receptores permeables a calcio (CP-AMPARs).....	158
VI. CONCLUSIONES	163
VII. BIBLIOGRAFÍA.....	167

I. INTRODUCCIÓN

1. El cerebelo

El cerebelo constituye sólo el 10% del volumen total del cerebro, sin embargo contiene más de la mitad de todas sus neuronas. Su estructura está organizada de forma altamente regular con las neuronas agrupadas en unidades. Cada región recibe vías aferentes desde distintas partes del cerebro y desde la medula, y proyecta a distintos centros motores.

El cerebelo es capaz de ajustar el movimiento que está siendo ejecutado al que debería realizarse, y de esta forma alcanzar un alto grado de precisión, almacenando las habilidades motoras como memoria permanente. De hecho, la parte del cerebelo estudiada más recientemente (el **neocerebelo**), recibe las aferencias provenientes de la corteza cerebral, la cual regula la actividad del cerebelo a través de tres circuitos; 1) el cortico-pontino-cerebeloso, 2) el córtico-olivo-cerebeloso y 3) el córtico-retículo-cerebeloso. Puesto que conecta con regiones corticales implicadas en el aprendizaje, la percepción sensorial y las emociones, el cerebelo se contempla hoy como una estructura especializada no sólo en la regulación de las funciones motoras, posturales y de equilibrio, sino también, en la modulación de diversas funciones sensoriales o cognitivas generadas en otras regiones del sistema nervioso. De hecho en patologías como el autismo o la esquizofrenia se han detectado lesiones cerebelosas (Piven y col., 1997), que podrían sugerir un papel del cerebelo en procesos de carácter perceptivo y cognitivo.

1.1 Estructura y función

La complejidad de la función cerebelosa contrasta con su simplicidad anatómica. El cerebelo es una estructura histológicamente muy sencilla que consiste en una zona externa de materia gris denominada **corteza cerebelosa**, una zona más interna de materia blanca y tres pares de núcleos profundos denominados **dentado**, **fastigial** e **interpuesto**. Está conectado con los núcleos basales a través de tres tractos simétricos llamados pedúnculos (inferior, medio

y superior). El pedúnculo superior contiene la mayoría de las proyecciones eferentes.

La organización del cerebelo es fundamental para la transmisión de la información desde la médula o los músculos periféricos a la corteza y viceversa. Se puede pensar en el cerebelo, como un filtro de información interpuesto entre la corteza cerebral y la médula con la función de afinar los movimientos, y también de almacenarlos como aprendizaje a lo largo de la vida. En el procesamiento de esta información es fundamental la organización de la corteza cerebelosa, en la que las neuronas se disponen en tres capas: la *molecular*, la de las *células de Purkinje* y la de las *células granulares*. La más externa, la *capa molecular* contiene dos tipos de interneuronas inhibitorias, las células estrelladas y las células en cesta, dispersas entre los axones excitatorios de las células granulares (fibras paralelas) y de las dendritas de las células de Purkinje (Fig.1).

Debajo de la *capa molecular*, se encuentra la *capa de células de Purkinje* que consiste en una única capa donde se encuentran los somas de estas células. Las dendritas se arborizan hacia la *capa molecular*, mientras que sus axones proyectan hacia la sustancia blanca para establecer sinapsis con los núcleos cerebelosos o vestibulares, algunas colaterales de estos axones establecen contacto sináptico con las células en cesta, con las estrelladas y otras neuronas de Purkinje. Estos contactos son siempre inhibitorios mediados por la liberación del ácido γ -aminobutírico (GABA). Los núcleos cerebelosos, a su vez, proyectan hacia el tronco cerebral y al diencefalo a través de diversos circuitos que transcurren por el pedúnculo cerebeloso superior.

La *capa de células granulares* contiene el mayor número de neuronas de todo el cerebro (10^{11} neuronas), las células granulares. Estas células establecen sinapsis excitatorias con la principal vía aferente del cerebelo, las *fibras musgosas* (del inglés *mossy fibers*). Además se encuentran algunas neuronas tipo Golgi (interneuronas inhibitorias) que arborizan sus dendritas en la capa molecular y cuyos axones terminan estableciendo sinapsis con las dendritas de las células granulares (Fig.2).

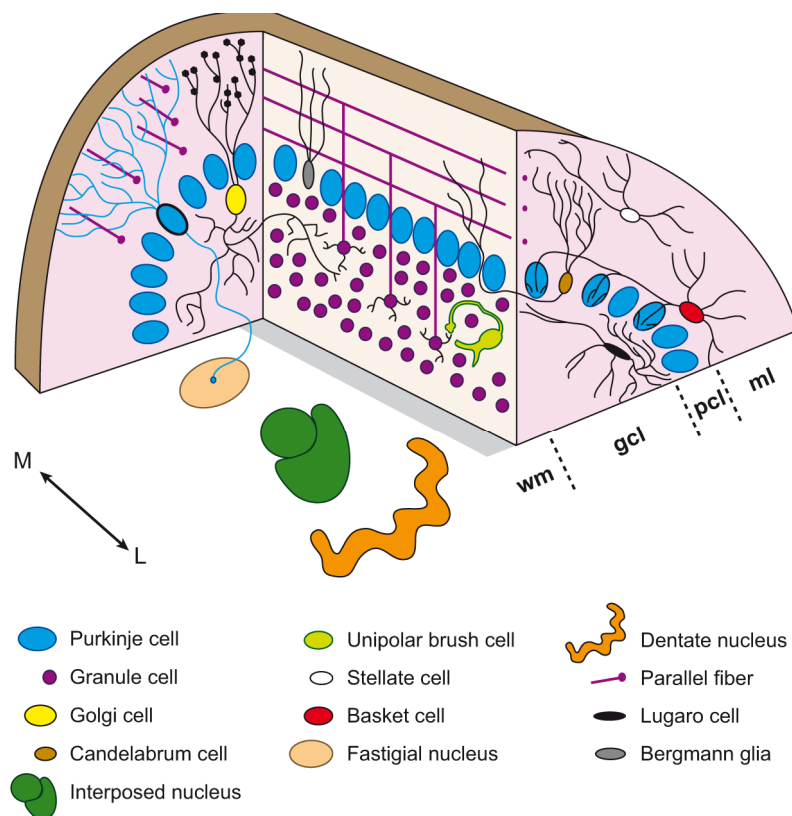


Figura 1: Estructura de la corteza cerebelosa. La sección vertical de la corteza cerebelosa, muestra la presencia de los 5 tipos neuronales y las principales vías aferentes y eferentes (adaptada de Chedotal, 2010).

En la sustancia blanca se encuentran tres grupos de fibras: **intrínsecas**, **aferentes** y **eferentes**. Las fibras intrínsecas no abandonan el cerebelo y conectan diferentes regiones tanto ipsilateralmente como contralateralmente. Las fibras aferentes forman la inmensa mayoría de las fibras del cerebelo penetrando por los pedúnculos cerebelosos. Todas estas fibras terminan en la corteza formando las fibras musgosas, que sinaptan con las células granulares, o las fibras trepadoras, que sinaptan con las neuronas de Purkinje (D'Angelo y cols. 2009). Las fibras eferentes constituyen la salida de toda la actividad del cerebelo (Ito y cols. 1984), son los axones de los núcleos intracerebelosos que proyectan, a través del pedúnculo cerebeloso superior, hacia el tálamo y núcleo rojo del lado opuesto.

Como en el resto de las estructuras encefálicas, en el cerebelo encontramos todos los tipos de células gliales: astrocitos, entre los que destaca

un tipo exclusivo del cerebelo de tipo radial, *la glia de Bergmann*, microglia y oligodendrocitos.

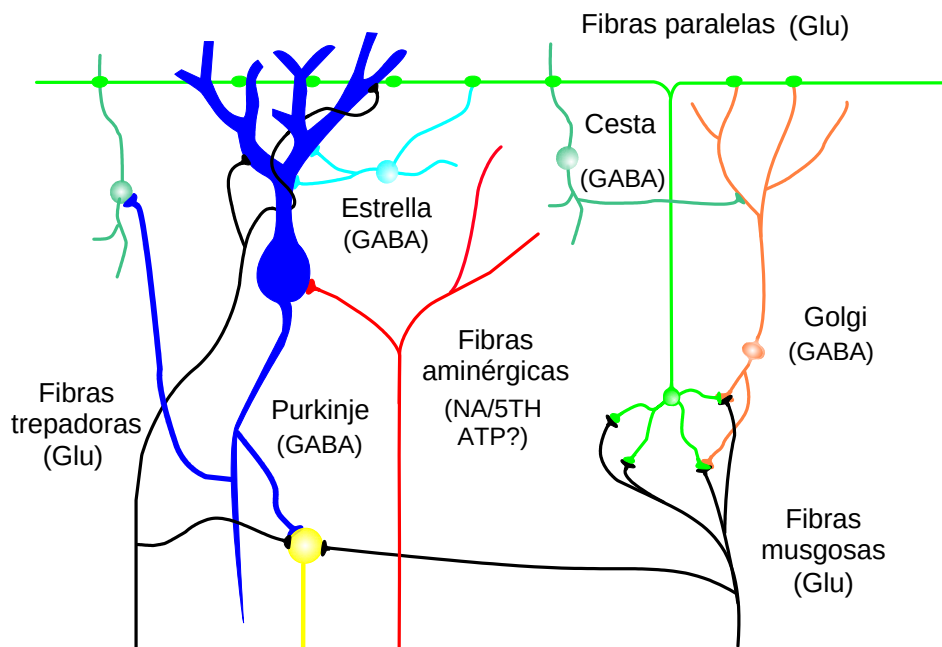


Figura 2: Circuito y neuroquímica general de la corteza cerebelosa. Representación de las principales sinapsis del cerebelo con su respectivo neurotransmisor.

1.2 Las neuronas granulares de cerebelo

Las **células granulares** son neuronas glutamatérgicas, que constituyen el elemento más numeroso de la corteza cerebelosa, llegando a representar entre un 90 ó 95 por ciento del total de las células que componen el cerebelo. Los axones de las células granulares carecen de recubrimiento de mielina y ascienden desde la capa granular interna hasta la superficie ó capa molecular. Estas células pueden ser redondeadas o polimorfas de pequeño tamaño (8-10 μm de diámetro), presentan un gran núcleo y escaso citoplasma. Las neuronas granulares sufren cambios importantes a lo largo del desarrollo, cuando migran desde la superficie de la corteza cerebelosa hasta capas mas internas.

Una vez terminada la fase mitótica (alrededor del día 10 o 12 embrionario), desde el día 15 embrionario las neuronas granulares residen en la

capa granular externa (EGL – external granule layer), que desaparecerá hacia la tercera semana de vida (Ramon y Cajal 1911; Ryder y Cepko 1994), cuando las neuronas migran hacia el interior.

Posteriormente, las neuronas granulares migran en dirección radial y tangencial, de forma altamente regulada, para situarse en la **capa granular interna** (IGL- internal granular layer). Normalmente se alternan periodos de migración con periodos de pausa (Gilthorpe y cols. 2002), que coinciden con la emisión de neuritas implicadas en la detección de señales relacionadas con la supervivencia y el desarrollo (Wolf y cols. 1997). Son estas señales guía las que empujan a las neuronas granulares a través de la capa molecular hacia la capa granular interna (Komuro y cols. 1998a; Chedotal y cols. 2010) (Fig.3).

Las proyecciones emitidas por las neuronas granulares detienen su crecimiento al alcanzar la **capa de las neuronas de Purkinje**, sin embargo los somas continúan su descenso hasta la capa granular interna. La supervivencia de las neuronas granulares *in vivo* depende, en gran medida, de la presencia de su principal diana, las neuronas de Purkinje, que liberan una serie de proteínas de la familia Sonic hedgehog (Shh), que actúan incrementando la proliferación de los precursores de las neuronas granulares y que promueven la diferenciación de la glía de Bergmann, esencial para la migración de estas neuronas (Smeyne y cols. 1995; Dahmane y Ruiz-Altaba 1999; Kenney y Rowitch 2000).

El proceso migratorio se facilita por las fibras de la glía de Bergmann, que actúa como guía de las fibras paralelas (Rakic 1971; Komuro y Rakic 1998a). El factor BDNF (del inglés, Brain Derived Neurotrophic Factor), liberado por las células gliales, actúa como señal que guía el movimiento entre la capa granular externa y la interna. Las neuronas acceden a la capa granular interna a partir de los días 10 y 12 postnatales. A partir del día 15 postnatal ya están totalmente diferenciadas, aunque el complejo sináptico continúa evolucionando hasta el día 21 después del nacimiento (Altman y cols. 1997; Borghesani y cols. 2002).

Durante su migración a través de la corteza cerebelosa, en momentos puntuales, las neuronas granulares presentan una expresión diferencial de genes (Komuro y Yacubova 2003). En el transcurso de la migración y el

desarrollo de estas células se modifica la expresión de receptores de moléculas de adhesión celular (Kuhar y cols. 1993; Zheng y cols. 1999), canales de calcio dependientes de voltaje, proteínas G (Komuro y Rakic 1998b; Hatten 1999), receptores de glutamato, y receptores de GABA (Mellor y cols. 1998). Estos mecanismos parecen ser esenciales para que se produzca este proceso migratorio. Se ha observado que la potenciación de la actividad de canales de calcio de tipo N y/o de los receptores ionotrópicos de glutamato de tipo NMDA acelera el movimiento de las neuronas granulares, mientras que su reducción lo ralentiza (Komuro y Rakic 1993; Chadderton y cols. 2004). La expresión diferencial y la activación de los distintos receptores de NMDA también deben jugar un papel importante durante el desarrollo, ya que las células granulares inmaduras expresan mayoritariamente la subunidad GluN2B de los receptores NMDA mientras que en las neuronas granulares del cerebelo adulto se sustituyen por GluN2A, GluN2C y GluN2D (Resink y col. 1995; Watanabe y cols. 1995). La composición de subunidades de los receptores NMDA influye en la cantidad de calcio que entra a la célula a través de esos receptores y los cambios en la concentración intracelular de calcio son determinantes en la regulación de la migración y diferenciación de estas células.

En las distintas fases del proceso migratorio de las células granulares, se acelera o decelera la velocidad de migración en respuesta a las fluctuaciones internas de calcio (Komuro y Rakic 1992). Las fibras musgosas y las células de Golgi liberan neurotransmisores (glutamato y GABA, respectivamente) que, mediante la regulación de los niveles intracelulares de calcio en las células granulares, coordinan el modo y la duración del proceso migratorio (Rossi y Slater 1993; Behar y cols. 1996).

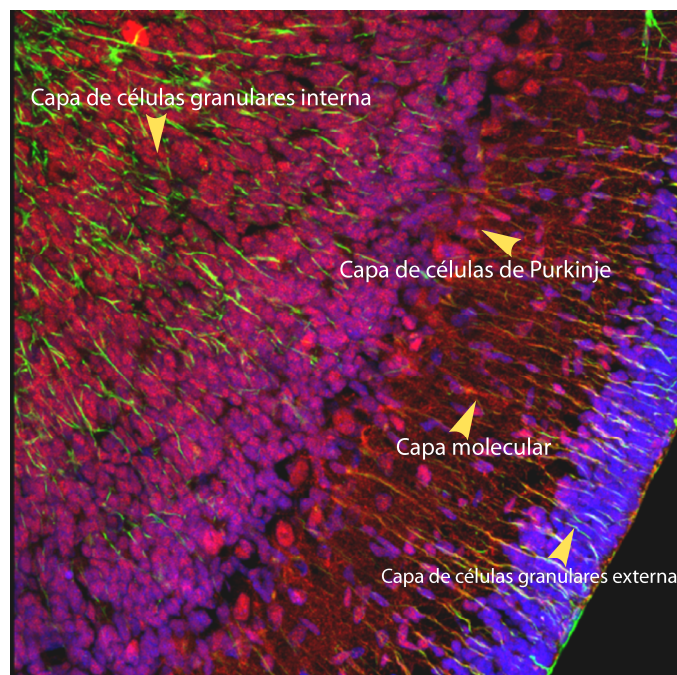


Figura 3. Migración de las cGC durante el desarrollo del cerebelo. En la migración de las células granulares desde la capa granular externa a la interna se distinguen dos tipos de movimientos: radial y tangencial. La inmunohistoquímica de rodajas de cerebelo de rata de 14 días post-natales marcada con anticuerpos anti-GluA4 (subunidad AMPA, roja); anti GFAP (marcador de glía, verde) y DAPI (marcador de núcleos, azul), muestra claramente este proceso de migración.

2. Neurotransmisión glutamatérgica

La unión del L-glutamato, el neurotransmisor excitatorio más común en el SNC de los vertebrados, a sus receptores ionotrópicos (NMDA, AMPA y Kainato) (Olverman y cols. 1984; Traynelis y cols. 2010) y metabotrópicos (mGluRI, mGluRII y mGluRIII) (Anwyl y cols. 1995; Gregory y cols. 2011), es esencial para que tengan lugar procesos tales como: liberación de neurotransmisores, plasticidad sináptica, migración y supervivencia celular.

Las sinapsis glutamatérgicas constituyen el principal sistema de neurotransmisión excitatoria del sistema nervioso central. Si bien los cambios duraderos en la transmisión sináptica glutamatérgica tienen un papel esencial en los procesos de aprendizaje y memoria cerebrales, su desregulación puede dar lugar a patologías asociadas a la isquemia cerebral o a procesos

neurodegenerativos (como la enfermedad de Alzheimer, Parkinson, Huntington o esclerosis lateral amiotrófica), dependiendo de si dicha desregulación presenta un curso temporal agudo o crónico.

La transmisión sináptica glutamatérgica depende de la liberación del neurotransmisor desde la terminación nerviosa presináptica, su difusión en la hendidura sináptica y su unión a los receptores de la célula postsináptica, provocando la despolarización de la misma, con el consecuente incremento de calcio. Por tanto la regulación del impulso nervioso se puede dar tanto a nivel presináptico, con el control de la liberación del neurotransmisor, como a nivel postsináptico mediante la modificación de la actividad o el número de receptores (Fig. 4).

En este trabajo hemos estudiado la expresión de los receptores AMPA (AMPA_Rs) en neuronas granulares de cerebelo, así como la **regulación** de su expresión y tráfico en diferentes condiciones experimentales, incluida la estimulación de receptores NMDA.

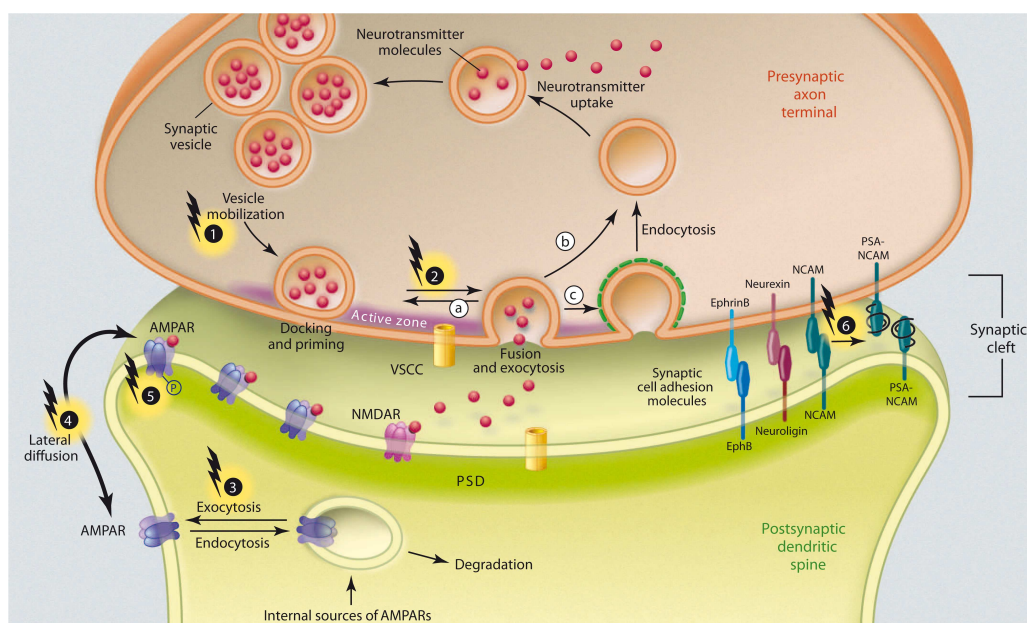


Figura 4: Esquema simplificado de la neurotransmisión glutamatérgica (adaptado desde Ho y cols. 2011).

2.1 Receptores ionotrópicos del glutamato tipo AMPA (ácido- α -amino-3-hidroxil-5-metil-4-isoxazol-propionato).

Los AMPARs representan una de las familias de receptores ionotrópicos para el glutamato, y son de los receptores postsinápticos excitatorios más abundantes del sistema nervioso central. Su particular estructura de canal permeable a iones (Na^+ y Ca^{2+}) (Traynelis y cols. 2010), permite una regulación muy precisa de la función sináptica en distintos procesos fisiológicos tales como el **aprendizaje** y la **memoria** (Eccles 1964; Alkon y Nelson 1990; Kandel 1997). La presencia de estos receptores en sinapsis funcionales se modifica en estados patológicos, como enfermedades neurodegenerativas y en procesos de adicción (Lüscher y Malenka 2011; Bassani y cols. 2012).

La asociación entre actividad sináptica y organización molecular, ha llevado a la interpretación de los fenómenos de **plasticidad sináptica LTP** (del inglés: long term potentiation) y **LTD** (del inglés: long term depression) y ha puesto de manifiesto la participación de los receptores AMPA en dichos mecanismos. Además, estos receptores también se han asociado a otros tipos de regulación de la actividad sináptica a más largo plazo (**plasticidad homeostática**).

2.1.1 Biogénesis y síntesis de los receptores AMPA

Los AMPARs consisten en cuatro subunidades **GluA1-4** que se combinan con diferentes estequiometrías, generando canales iónicos tetraméricos, homoméricos o heteroméricos, con distintas propiedades electrofisiológicas (Hollmann y Heinemann 1994; Malinow y Malenka 2002).

El ensamblaje de los AMPARs ocurre como la formación de un dímero de dímeros, y en la mayoría de las regiones del cerebro los AMPARs que predominan son heterotetrameros compuestos de dímeros GluA1 y dímeros GluA2 (Traynelis y cols. 2010). Los receptores se sintetizan en el retículo endoplasmático, posteriormente son procesados en el aparato del Golgi y

finalmente se incorporan a las membranas plasmáticas. Una vez en la superficie celular, pueden localizarse en zonas sinápticas y contribuir a la neurotransmisión (Greger y cols. 2006).

Cada subunidad está formada por tres dominios transmembrana M1, M3 y M4, un lazo re-entrante M2, un dominio extracelular amino-terminal (**N-terminal**) y un dominio intracelular carboxi-terminal (**C-terminal**). Existe una gran homología en las regiones extracelular y transmembrana de las diferentes subunidades, pero varían mucho sus dominios citoplasmáticos C-terminales. Las subunidades GluA1 y GluA4 y una forma alternativa de GluA2 (GluA2L) tienen dominios citoplasmáticos C-terminales largos. Sin embargo, la forma predominante de GluA2 tiene un dominio C-terminal más corto, así como GluA3 y una forma alternativa de GluA4 (GluA4S), presente en células granulares de cerebelo (Coombs y Cull-Candy 2009). Además los ARNm de las cuatro subunidades sufren dos tipos de procesamiento alternativo, dando lugar a dos isoformas denominadas *flip* y *flop* (Sommer y cols. 1990), en las que varía parte del dominio de unión al ligando extracelular (LBD - del inglés ligand binding-domain). Este diferente procesamiento determina las propiedades farmacológicas y cinéticas del canal (Monyer y cols. 1991; Weimin y cols. 2009). En respuesta al glutamato las isoformas *flop*, generalmente, se desensibilizan mucho más rápidamente que las *flip* y son menos sensibles al agente farmacológico *ciclotiazida*, que previene la desensibilización de estos receptores (Sommer y cols. 1990; Tomiyam y cols. 2002). Las isoformas *flop* predominan en estadios maduros del desarrollo, mientras que en los inmaduros predominan las isoformas *flip* (Zheng y cols. 2012; Fig.5).

La subunidad GluA2 está regulada por una “**edición**” del ARNm, un proceso en el que se produce la desaminación enzimática de ribonucleótidos de adenina en los ARNm previamente procesados (Bass 2002). La edición de la subunidad GluA2 consiste en una conversión de un codón que codifica para glutamina en un codón que codifica para arginina (*Q/R editing*) en la región del poro del canal (Fig. 5). Esta modificación post-transcripcional, confiere al canal que contiene GluA2 propiedades importantes como la **impermeabilidad a calcio**, la modificación de la rectificación de las corrientes de entrada (relación

lineal) e insensibilidad a poliaminas (Greger y cols. 2002; Malinow y Malenka 2002; Liu y Zukin 2007). La presencia de la subunidad GluA2 en los AMPARs también afecta al tráfico intracelular de estos receptores. La cola C-terminal de GluA2 tiene un dominio PDZ (*PSD 95, discs large, zonula occludens*) que interacciona con varios dominios PDZ de otras proteínas como la PICK1 (*proteína asociada a la PKC 1*) (Dev y cols. 1999; Perez y cols. 2001), que está relacionada con la salida de GluA2 del retículo endoplasmático (Greger y cols. 2002).

La mayoría de los ARNm que codifican para los AMPARs se encuentran en los somas de las células, y esto ha hecho pensar que la síntesis pueda ocurrir en zonas lejanas a las sinapsis. El transporte de los receptores AMPA a lo largo de las dendritas depende de los microtúbulos del citoesqueleto que dirigen el tráfico hacia las espinas dendríticas, protuberancias de las dendritas donde ocurren la mayoría de los fenómenos sinápticos (Hering y cols. 2002).

Proteínas como la **kinesina** y la **dineína** participan activamente en este transporte mediante la interacción con **GRIP1/ABP** (glutamate receptor interacting protein 1/ AMPAR binding protein), proteínas asociadas a los dominios PDZ de las subunidades GluA2 y GluA3 (Setou y cols. 2002). En las espinas dendríticas los microtúbulos son sustituidos por filamentos de actina, altamente flexibles durante los procesos de tráfico de receptores a la membrana (Fischer y cols. 1998). Por tanto, las vesículas que contienen los AMPARs, se trasfieren desde los microtúbulos al citoesqueleto de actina para su incorporación final a la sinapsis. De hecho, tratamientos farmacológicos que causan la despolimerización de la actina provocan la retirada de los AMPARs de la sinapsis (Kim y Lisman 2001) y de las espinas dendríticas (Allison y cols. 1998).

Entre los mecanismos que controlan el transporte de las subunidades **GluA1** y **GluA4** hacia las espinas dendríticas, uno de los más importantes es el mecanismo en el que participa la proteína adaptadora **4.1N**. Esta proteína interacciona con las subunidades **GluA1** (Shen y cols. 2000) y **GluA4** (Coleman y cols. 2003) a través de la región C-terminal, y es muy importante para la expresión de estas subunidades en la membrana.

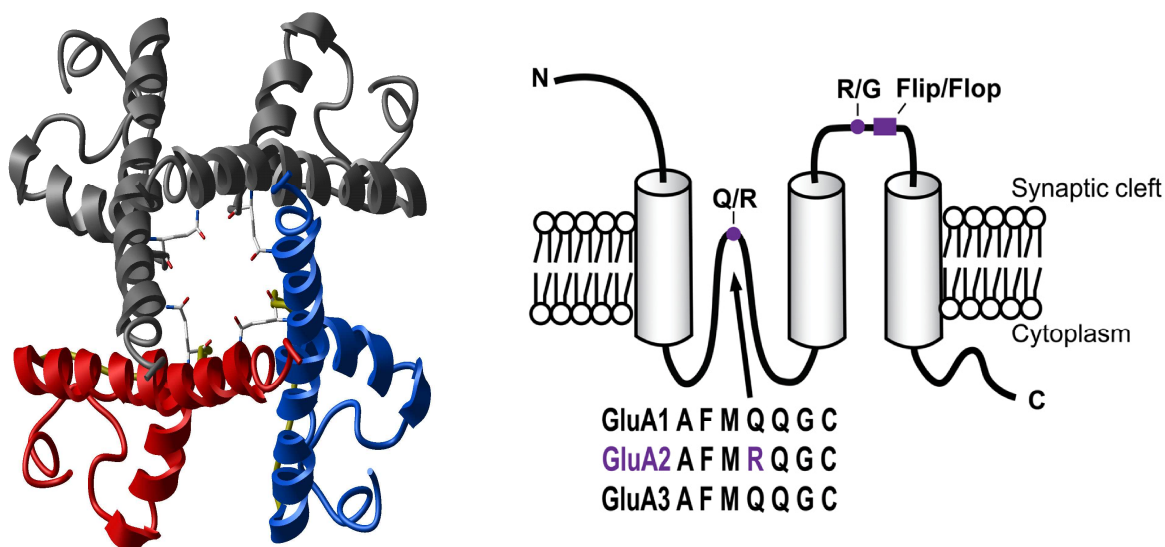


Figura 5: Modelo de un receptor AMPA. A la izquierda, la típica estructura de canal, con el poro formado por una cadena aminoacídica que condiciona la permeabilidad a calcio mediante la presencia de la subunidad GluA2 editada. A la derecha, ejemplo de la estructura de una subunidad, con el extremo N-terminal extracelular, los dominios transmembrana, y la región C-terminal intracelular, que contiene los sitios de fosforilación que regulan el tráfico de las diferentes subunidades. También se indica, el sitio de edición Q/R de la subunidad GluA2.

2.1.2 Tráfico y función fisiológica de los receptores AMPA

La función fisiológica de los AMPARs se ha estudiado durante años analizando la distribución sináptica de las cuatro subunidades que los constituyen. Dicha distribución es altamente dinámica, como se ha puesto de manifiesto en estudios recientes (Borgdoff y Choquet 2002; Heine y cols. 2008; Czöndör y cols. 2012), y permite una fina regulación de la transmisión sináptica.

Los receptores que contienen las subunidades **GluA2** y **GluA3**, reciclan constitutivamente dentro y fuera de las sinapsis, preservando el número total de AMPARs, de forma independiente de la actividad sináptica (Malinow y cols. 2000; Passafaro y cols. 2001; Shi y cols. 2011). Sin embargo, los receptores que contienen las subunidades **GluA1** y **GluA4** se incorporan a la sinapsis de forma dependiente de la actividad, en la mayoría de los casos siguiendo a la activación de los receptores NMDA (Hayashi y cols. 2000; Esteban y cols. 2003). En el caso de los heterómeros GluA2/GluA3, la cola C-terminal de la subunidad GluA2

interacciona con la proteína **NSF** (N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein) (Nishimune y cols. 1998; Osten y cols. 1998), que regula la incorporación rápida de GluA2 en los sitios sinápticos (Beretta y cols. 2005). El mecanismo de regulación de los AMPARs por NSF se ha relacionado con la cascada de señalización del **óxido nítrico (NO)** (Sossa y cols. 2007). La entrada de calcio por los canales NMDA activa la síntesis del NO, que favorece la S-nitrosilación de la proteína NSF y su asociación con la subunidad GluA2. Esto causa la separación de la proteína **PICK1** (*proteína asociada a la PKC 1*) (Hanley y cols. 2002) que, mediante su asociación con los dominios PDZ de GluA2, mantiene un reservorio intracelular de subunidades listas para ser incorporadas a la membrana (Sommer y cols. 1991; Dev y cols. 1999; Steinberg y cols. 2004; Liu y Cull-Candy 2005). PICK1 favorece la interacción entre GluA2 y la proteína quinasa C (PKC α), que fosforila la serina 880 de GluA2 (Chung y cols. 2000; Matsuda y cols. 2000; Perez y cols. 2001). Esta fosforilación es fundamental en el desarrollo de la depresión a largo plazo (LTD), sobre todo en cerebelo e hipocampo (Chung y cols. 2000; Matsuda y cols. 2000).

A pesar de este claro papel de PICK1 en la depresión sináptica, hay casos en los que esta proteína parece estar implicada en el reciclaje de la subunidad GluA2 (Daw y cols. 2000; Ehlers y cols. 2000). Se ha demostrado la interacción entre PICK1 y otra proteína estructural, la **ABP** (AMPA receptor binding protein) / **GRIP1 o 2** (Glutamate receptor interacting protein) (Lu y Ziff 2005), que pone de manifiesto el papel de la fosforilación de Ser880 en el reciclaje bidireccional de la subunidad GluA2.

El tráfico de la subunidad GluA1 es dependiente de la actividad sináptica, su acumulación en la zona activa está relacionada con la potenciación a largo plazo (LTP) y está regulada por diversas proteínas quinasas.

La **fosforilación** de los receptores ionotrópicos, es el mecanismo molecular más importante de regulación funcional de la plasticidad sináptica (Raymond y cols. 1993; Swope y cols. 1999). Inicialmente, en neuronas de hipocampo, se estudió el papel de la proteína quinasa A (PKA, proteína dependiente de AMPc), demostrando que su inhibición deprimía significativamente las corrientes postsinápticas mediadas por AMPA

(Greengard y cols. 1991; Rosenmund y cols. 1994). Además, se demostró que la perfusión de calmodulina quinasa II (CaMKII) constitutivamente activa, o de PKM (forma constitutivamente activa de la PKC) aumentaba las corrientes mediadas por AMPARs (McGlade-McCulloh y cols. 1993; Wang y cols. 1994). No obstante, no quedaba del todo claro si estas quinasas actuaban directamente fosforilando el AMPAR o indirectamente mediante la fosforilación de otras proteínas sinápticas.

Numerosos estudios han demostrado que la CaMKII fosforila directamente la subunidad GluA1 en la **serina 831** (Ser831) (Barria y cols. 1997; Mammen y cols. 1997), incrementando la conductancia de los AMPARs (Benke y cols. 1998). Otro sitio fundamental para la regulación del tráfico de la subunidad GluA1 es la **serina 845** (Ser845), su fosforilación por la proteína quinasa A (PKA) es un evento crítico en la incorporación de esta proteína a las membranas sinápticas (Esteban y cols. 2003; Oh y cols. 2006; Man y cols. 2007; He y cols. 2009), aunque esta fosforilación es necesaria pero no suficiente para la incorporación de GluA1 en sitios sinápticos (Esteban y cols. 2003). La fosforilación de la **Ser845** puede inducir la inserción de GluA1 en zonas extra sinápticas de la membrana y la posterior fosforilación de Ser831 por CaMKII facilitará su incorporación en las sinapsis (Man y cols. 2007; Henley y cols 2011; Opazo y cols. 2010; Fig. 6). Otro residuo importante en el tráfico de GluA1 es la **Ser818**, cuya fosforilación por diferentes proteínas quinasas (PKC, CaMKII o PKA) puede, por sí sola, inducir la incorporación en la membrana sináptica de la subunidad GluA1 y la potenciación de esa sinapsis, probablemente facilitando la difusión lateral desde sitios extrasinápticos (Malenka y cols. 1986; Frey y cols. 1993; Pettit y cols. 1994; Lledo y cols. 1995; Boehm y cols. 2006). El tráfico de la subunidad GluA1 está, por tanto, controlado por varios procesos de fosforilación en diferentes residuos de su dominio C-terminal (Passafaro 2002). La movilidad de los AMPARs, mediante difusión lateral, es otro proceso de tráfico de receptores dependiente de actividad (Borgdoff y Choquet 2002; Ehlers y cols. 2007). La continua difusión lateral de GluA1 permite una recuperación muy rápida de la depresión sináptica, mediante el intercambio

entre receptores desensibilizados y el reservorio de receptores extra sinápticos activos (Heine y cols. 2008).

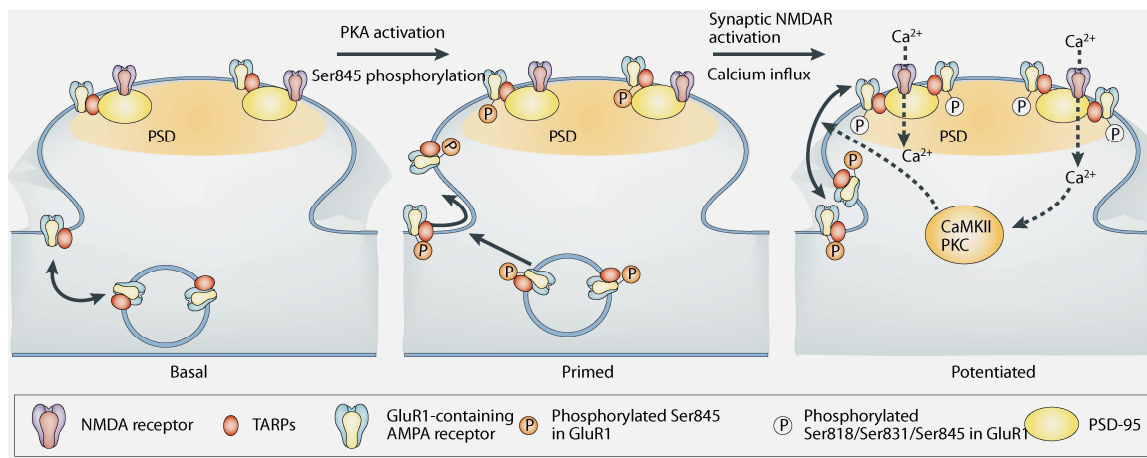


Figura 6. Tráfico de los receptores AMPA en las sinapsis. *Izquierda*, condiciones basales, hay un reciclamiento constitutivo de los AMPARs desde y a la membrana plasmática bajo la dirección de la subunidad GluA2 y las proteínas transmembrana reguladoras (TARPs). *Centro*, la PKA fosforila la Ser845 de la subunidad GluA1 incrementando la inserción de los receptores en sitios extra-sinápticos y la translocación a las espinas de forma CaMKII dependiente, por fosforilación de Ser831. *Derecha*, la potenciación requiere el tráfico de estos receptores extra-sinápticos hacia la sinapsis mediante la entrada de calcio por los canales NMDA activación de PKC o CaMKII y fosforilación de Ser818. (Adaptado de Derkach 2007).

2.1.3 Función de los receptores AMPA permeables a calcio

La permeabilidad a calcio de los AMPARs carentes de la subunidad GluA2 (en inglés GluA2-lacking AMPARs), hace de ellos atractivos candidatos como mediadores de la plasticidad sináptica, ofreciendo una ruta de entrada de calcio independiente de los receptores NMDA o los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje. Efectivamente, la activación de los AMPARs permeables a calcio (**CP-AMPARs**; del inglés calcium permeables AMPA receptors) parece estar relacionada con la potenciación (LTP) o la inhibición (LTD) a largo plazo independiente de NMDA en las interneuronas de la amígdala basolateral (Mahanty y Sah 1998) y en el hipocampo (Laezza y cols.

1999; Lei y McBain 2002), respectivamente. Sorprendentemente, un estudio reciente sugiere que los CP-AMPARs juegan un papel crucial en la LTP convencional dependiente de NMDA en células piramidales de CA1 (Cornu Ammonis area 1) en hipocampo. Como consecuencia de la inducción de LTP, los CP-AMPARs se incorporan de forma transitoria en las sinapsis. La entrada de Ca^{2+} a través de estos receptores resulta importante para la subsiguiente inserción de nuevos AMPARs impermeables a calcio y, por consiguiente, de la consolidación de la LTP (Plant y cols. 2008).

La **inactividad** sináptica también influye en la composición de las subunidades de AMPARs y su permeabilidad a calcio. La inactividad inducida por el bloqueante de canales de sodio tetrodotoxina (TTX), y los bloqueantes de AMPA (en rodajas o cultivo), incrementa la expresión de CP-AMPARs en células estrelladas y granulares de cerebelo (Kamboj y cols. 2000; Liu y cols. 2000, 2002), y en células de la corteza visual y el hipocampo (Bai y cols. 2003; Ju y cols. 2004; Thiagarajan y cols. 2005). Por el contrario, la potenciación sináptica incrementa la proporción de los AMPARs con GluA2, en espinas dendríticas de cultivos organotípicos de rodajas de hipocampo (Bagal y cols. 2005). Finalmente, los CP-AMPARs también pueden mediar el silenciamiento dependiente de actividad de las sinapsis CA3-CA1 en hipocampo (Xiao y cols. 2004). Otro estudio, utilizando el paradigma de condicionamiento por miedo (en inglés fear conditioning), ha evidenciado un papel muy importante de los CP-AMPARs en la **metaplasticidad** (cambios rápidos en la plasticidad en base a la actividad de una neurona) (McKernan y Shinnick-Gallagher 1997; Rogan y cols. 1997). El incremento de las respuestas excitatorias durante los primeros días de entrenamiento, se revierten con bloqueantes específicos de los CP-AMPARs (NASPM – toxina procedente de Joro spider); sin embargo en una segunda fase mas tardía (una semana) estos efectos desaparecen. Estos resultados demuestran la necesidad de estos receptores durante la fase de expresión del condicionamiento por miedo, pero no en el mantenimiento y en la consolidación de la memoria (Bear y Abraham 1997).

La dinámica de los CP-AMPARs, evidente en varias formas de plasticidad sináptica, es también relevante en diferentes condiciones

neuropatológicas. Los CP-AMPARs pueden alterar las propiedades sinápticas, cascadas dependientes de calcio o inducir daño en neuronas selectivas más vulnerables a calcio o en células gliales (von Lewinsky y cols. 2005; Matute y cols. 2006).

Uno de los descubrimientos recientes más importantes sobre el papel de los CP-AMPARs, es el efecto de la cocaína en su distribución sináptica (Malenka y Lüscher 2011). Las drogas de adicción tienen efectos a largo plazo en los circuitos del cerebro, pero también pueden producir cambios rápidos en la distribución sináptica de receptores después de una sola administración. En el área ventral tegmental (*VTA – ventral tegmental area*) de los ganglios basales del cerebro, las neuronas dopaminérgicas son las principales mediadoras de las respuestas de recompensa a determinadas drogas. El suministro de una sola dosis de cocaína incrementa la relación AMPARs/NMDARs significativamente, que se mantiene durante una semana después de la inyección (Ungless y cols. 2001). Cuando el suministro es prolongado el incremento de dicha relación se mantiene durante meses. Estos incrementos se traducen en cambios en las propiedades de rectificación de corrientes de calcio (Bellone y Lüscher 2006), sugiriendo la presencia de AMPARs carentes de la subunidad GluA2. El bloqueo de estas corrientes por NASPM confirma un aumento de los CP-AMPARs. Además, los CP-AMPARs pueden inducir muerte neuronal por permitir la entrada excesiva de calcio (Noh y cols. 2005).

Por último, también hay que señalar otro papel importante de los CP-AMPARs relacionado con la diferenciación neuronal como lo demuestra un estudio relativamente reciente (Whitney y cols. 2008).

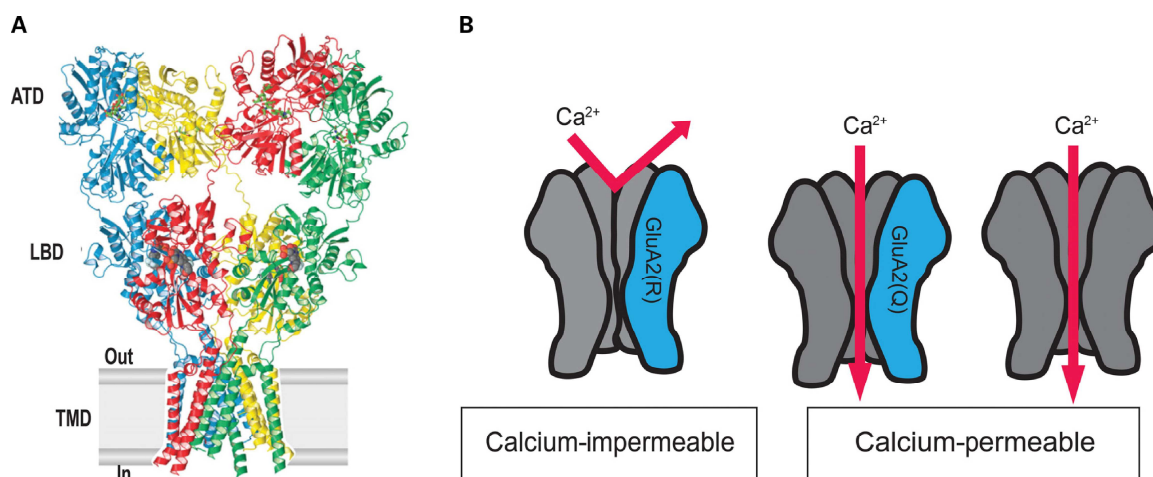


Figura 7. Esquema de la estructura de los receptores AMPA permeables a calcio. A) estructura tridimensional de los receptores AMPA permeables a calcio. **B)** Los tres modelos de receptores AMPA. La permeabilidad a calcio puede deberse a la no-edición de la subunidad GluA2 o a la formación de monómeros de GluA1 (Adaptado de Wright y Vissel 2012).

2.1.4 Regulación homeostática de los receptores AMPA

El concepto de **plasticidad homeostática** está bien establecido en numerosos sistemas, aunque todavía no se conocen en profundidad los mecanismos que la inducen y las condiciones en las que se manifiesta. Los niveles medios de actividad neuronal se mantienen gracias a un conjunto de mecanismos que son capaces de detectar cualquier cambio en la actividad y ajustar de forma dinámica la “fuerza” sináptica en la dirección correcta para retornar a la estabilidad. Por ejemplo, las neuronas centrales responden a un periodo prolongado de inactividad, incrementando su propia capacidad sináptica (*scaling up*) mediante la incorporación de nuevos receptores glutamatérgicos post-sinápticos (Lissin y cols. 1998; O’Brien y cols. 1998; Turrigiano y cols. 1998; Moulder y cols. 2003), sin que se produzcan cambios significativos en la probabilidad de liberación del neurotransmisor.

Sin embargo, otros estudios han evidenciado efectos también en presinapsis, como el aumento de la expresión de la proteína vesicular VGLUT1

(De Gois y cols. 2005; Erickson y cols. 2006). Estos resultados aparentemente contradictorios, pueden explicarse en base a los diferentes sistemas utilizados para el estudio. Además, en algunas circunstancias puede haber cooperación entre probabilidad de liberación del neurotransmisor y número de receptores glutamatérgicos (Murthy y cols. 2001; Burrone y cols. 2002; Wierenga y cols. 2006). Las manipulaciones de la actividad inducen cambios bidireccionales compensatorios (Turrigiano y cols. 2000), y esto permite a los circuitos neuronales adaptarse durante los periodos de plasticidad dependientes de la experiencia o en algunos estados patológicos (epilepsia) (Turrigiano y cols. 2004).

El principal mecanismo de regulación del “*scaling*” sináptico es la variación en la acumulación de AMPARs en la membrana sináptica (Lissin y cols. 1998; O’Brien y cols. 1998; Turrigiano y cols. 1998; Malenka y Bear 2004). Las cuestiones que se plantean son: 1) ¿qué subunidades contribuyen más a este proceso? y 2) ¿qué proteínas regulan la expresión o el tráfico de estas subunidades? Se ha demostrado que los cambios homeostáticos se producen principalmente en AMPARs dotados de subunidad GluA2 (Ju y cols. 2004; Sutton y cols. 2006; Ibata y cols. 2008). No obstante, la inhibición local de los receptores NMDA y la incubación con TTX inducen incrementos selectivos de la subunidad GluA1 (Thiagarajan y cols. 2005; Sutton y cols. 2006). La presencia de la subunidad GluA2 afecta a la permeabilidad a calcio, a los índices de rectificación y a las cinéticas de señalización. Como consecuencia, los cambios homeostáticos dependientes de actividad pueden afectar a la función y a la plasticidad de las sinapsis (Frank y cols. 2006; Isaac y cols. 2007; Fig. 8).

Entre todos los posibles responsables de la regulación del tráfico de los AMPARs, el sensor de Ca^{2+} la **CaMKIV** (Calcio-calmodulina quinasa IV) contribuye de forma importante a dicha regulación. La disminución de la actividad de esta proteína, induce la transcripción de factores que contribuyen a la incorporación de AMPARs en la membrana (Davis 2006; Ibata y cols. 2008), aunque no se conoce todavía la identidad de estos factores. La CaMKIV actuaría, por tanto, como un regulador negativo de la expresión de factores que favorecen el tráfico de los AMPARs a la membrana (Ibata y cols. 2008).

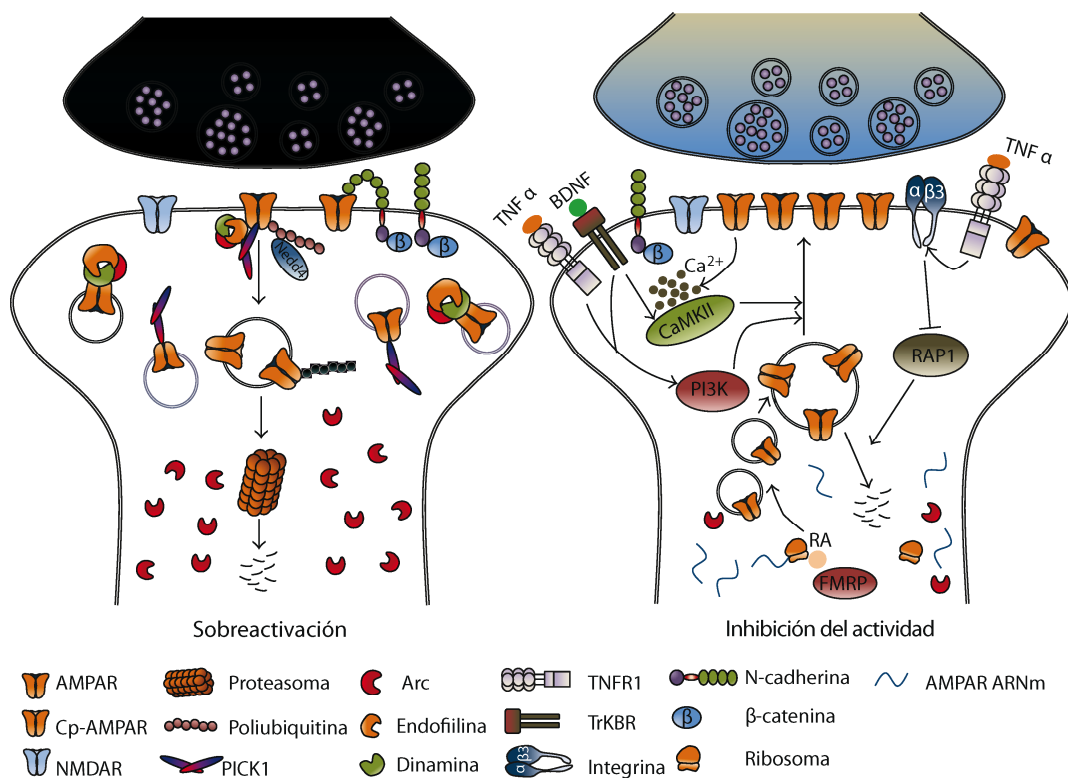


Figura 8. Esquema de los procesos y las proteínas implicadas en el fenómeno de la homeoplasticidad. El aumento de la actividad sináptica favorece un alejamiento de los receptores AMPA de la zona activa. Por el contrario, una inhibición en la transmisión sináptica favorece la inserción de AMPARs en la membrana, con la consecuente adaptación al nuevo “set point” de actividad neuronal. (Adaptado de Wang y cols. 2012).

2.2 El receptor NMDA de glutamato.

Este receptor ionotrópico de glutamato es selectivo para el compuesto N-metil-D-aspartato (NMDA), y se encuentra en la mayoría de las neuronas, en células gliales del SNC, y en otros tejidos como en las células de la retina (Baptiste y cols. 2002). Estos receptores están implicados en mecanismos de plasticidad sináptica, excitotoxicidad, enfermedades neurodegenerativas y desórdenes psiquiátricos (Lau y Zukin 2007).

Los receptores NMDA consisten en combinaciones tetraméricas de las subunidades GluN1, GluN2 (GluN2A, B, C y D) y GluN3 (A y B) (Cull-Candy y Leszkiewicz 2004; Paoletti y Neyton 2007). En cada subunidad se distinguen

tres dominios transmembrana M1, M3 y M4, un lazo re-entrante M2, un dominio extracelular N-terminal y un largo dominio intracelular C-terminal.

Los lazos extracelulares S1 y S2 forman un dominio de interacción para las dos moléculas co-agonistas, glicina y D-serina para GluN1 y GluN3 y el glutamato para la subunidad GluN2. Los receptores funcionales, están compuestos por dos subunidades GluN1 y una combinación de GluN2 y/o GluN3 y son permeables a Na^+ , Ca^{2+} y K^+ . El poro del canal, está bloqueado por iones Mg^{2+} de forma dependiente de voltaje. En el dominio C-terminal existen numerosos sitios de interacción con otras proteínas y sitios de fosforilación, que regulan la localización y actividad de dichos receptores (Chen y cols. 2006; Chen y Roche 2009). En las neuronas granulares de cerebelo se han descrito numerosas interacciones con proteínas del tipo PSD, como PSD95, PSD93/chapsina-110, SAP97/hdgl, SAP102 (Friedman y cols. 2000).

Los receptores NMDA se incorporan al compartimento sináptico a través de vesículas procedentes del retículo endoplasmático (Wenthold y cols. 2003; Newpher y Ehlers 2008; Stephenson y cols. 2008). La inserción en la membrana plasmática o la internalización de estos receptores está regulada por exocitosis o endocitosis (Tovar y Westbrook 2002; Groc y cols. 2006; Zhao y cols. 2008; Bard y cols. 2010).

En sinapsis inmaduras, el tráfico de los receptores NMDA está altamente regulado de forma dependiente de la subunidad. En sinapsis nacientes, de neuronas hipocampales en cultivo, los receptores están formados por heterodímeros GluN1-GluN2B y están constitutivamente intercambiándose con receptores extra sinápticos (Groc y cols. 2004; Zhao y cols. 2008). La fosforilación es un mecanismo de regulación del tráfico de receptores y en el caso de los receptores NMDA existe evidencia de que la PKA y la PKC fosforilan diferentes residuos de serina (Ser897 y Ser890 y 896, respectivamente) de la subunidad GluN1 promoviendo el tráfico de nuevos receptores NMDA a la membrana plasmática en una escala temporal de minutos (Lan y cols. 2001; Scott y cols. 2001; Scott y Ehlers 2003; Lin y cols. 2006;).

En neuronas de mamífero, los receptores NMDA se endocitan mediante un mecanismo mediado por *clatrina* (Yaka y cols. 2002; Prybylowski y cols.

2005). La endocitosis también está muy regulada de forma dependiente de subunidad. Por ejemplo, la estabilización de la subunidad GluN2A en la superficie celular, depende de la fosforilación de residuos de tirosina (Tyr) y su defosforilación promueve su internalización (Vissel y cols. 2001). El co-agonista *glicina* actúa de otra forma, cebando el sistema para la endocitosis mediada por *clatrina*, que sólo tendrá lugar cuando estos receptores también unan glutamato (Nong y cols. 2003). La activación simultánea de receptores metabotrópicos de glutamato (mGluRs) y receptores NMDA durante una actividad sináptica intensa puede conducir a la endocitosis selectiva de los receptores NMDA situados en las regiones extrasinápticas o perisinápticas (Joshi y cols 2002).

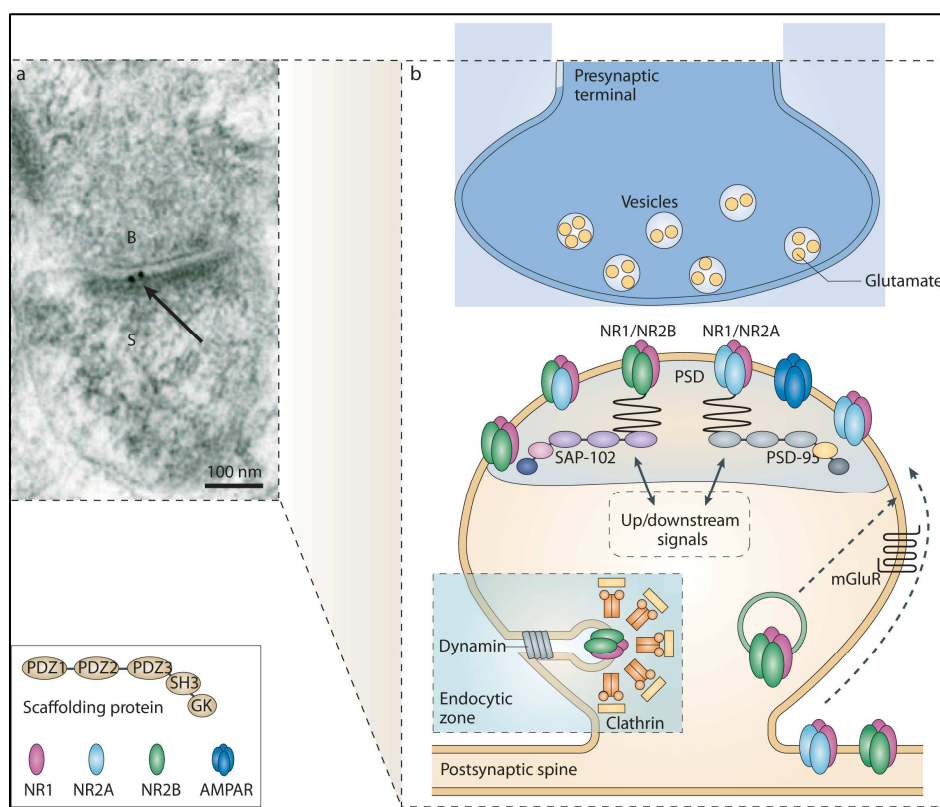


Figura 9. Esquema de la organización de las subunidades de NMDA en sinapsis de neuronas piramidales de hipocampo (adaptado de Lau y Zukin 2007). A. Las micrografías de microscopio electrónico muestran la localización de las subunidades GluN2A en la densidad post-sináptica (PSD) en las espinas dendríticas (S) en la región CA1 de hipocampo de ratón. Las flechas indican las moléculas de GluN2A inmunomarcadas con partículas de oro. B. Los NMDARs y los AMPARs están localizados en la PSD (área gris), en donde están estructuralmente relacionadas con otras proteínas implicadas en la señalización. Por ejemplo los mGluRs, que están

localizadas en las zonas peri-sinápticas. En neuronas adultas, el tráfico de los NMDARs es regulado por proteínas quinasas y proteínas de la maquinaria endocitótica (dinamina y clatrina).

2.2.1 Función fisiológica y alteraciones patológicas

Numerosos estudios demuestran que el tráfico dependiente de actividad de los receptores NMDA es un potente y dinámico mecanismo de regulación de la eficacia sináptica. Los receptores NMDA juegan un papel fundamental en procesos de plasticidad a largo plazo como LTP y LTD. La función de los receptores NMDA está relacionada con la alteración en el número, estado de fosforilación (Malinow y Malenka 2002; Collingridge y cols. 2005; Derkach y cols. 2007) y/o composición de las subunidades (Liu y Zukin 2007) de los otros receptores ionotrópicos de glutamato, los AMPA.

En hipocampo, en la LTP mediada por receptores NMDA, tras la **despolarización** de la membrana y la liberación del bloqueo por iones Mg^{2+} de los receptores NMDA se produce un aumento de la actividad de proteínas quinasas (CaMKII, PKA, PKC, MAPK) y fosfatasas (Grosshans y cols. 2002; Watt y cols. 2004). Por ejemplo, la CaMKII activada, fosforila la subunidad GluA1 de los AMPARs, promoviendo la inserción de nuevos AMPARs (que contienen GluA1) en la membrana, incrementando así la conductancia de estos canales (Malenka y Nicoll 1999; Lisman y cols. 2002; Collingridge y cols. 2005; Lisman y cols. 2012). Por el contrario, la LTD y despontenciación, está relacionada con una defosforilación de la subunidad GluA1 y la salida de los AMPARs de los sitios sinápticos (Malenka y Nicoll 1999; Groth y cols. 2010).

En **células granulares de cerebelo**, la estimulación del receptor NMDA es muy importante en procesos de desarrollo neuronal, incluida la regulación de la supervivencia o la apoptosis de algunas poblaciones de neuronas en estadios específicos de la neurogénesis. Estudios *in vivo*, en cerebelo de rata, han demostrado la acción “trófica” de los receptores NMDA. El bloqueo de los receptores NMDA mediante la administración sistémica de un antagonista competitivo (el CGP 39551), da como resultado un incremento de la eliminación apoptótica de las neuronas granulares, en particular en la capa granular interna,

al final de la migración (Contestabile 2000). En cultivos de células granulares la supervivencia dependiente de la entrada de calcio a través de los receptores NMDA, tiene una ventana temporal específica, ya que en los primeros estadios se produce una apoptosis masiva en ausencia de altas concentraciones intracelulares de calcio. Por esta razón, la concentración de cloruro potásico en el medio de cultivo es alta (25 mM) para simular las condiciones fisiológicas del cerebelo *in vivo*, los estímulos excitatorios procedentes de las fibras musgosas (Gallo y cols. 1987; Balazs y cols. 1988). La entrada de calcio a través de los canales de calcio de tipo L es uno de los mecanismos fundamentales para la supervivencia de las neuronas granulares (See y cols. 2001). El calcio activa diferentes calmodulinas quínasas: la II relacionada con el tráfico de los receptores ionotrópicos (AMPA y NMDA); la IV, que fosforila y activa factores de transcripción como CREB, fundamental para la supervivencia celular (See y cols. 2001). También se ha demostrado que la actividad de CREB aumenta cuando las células granulares se estimulan con el agonista NMDA durante un tiempo prolongado (Jurado y cols. 2004). La actividad de CREB está relacionada con la síntesis de factores de crecimiento como la neurotrofina, BDNF, y múltiples neuropéptidos fundamentales para el desarrollo y la supervivencia de las neuronas.

Uno de los sistemas efectores de los receptores NMDA en cerebelo es la **oxido nítrico sintasa de tipo I o neuronal** (NOS I o nNOS), presente en el complejo proteico asociado a los receptores NMDA ya que interacciona con los dominios **PDZ** de **PSD-95** (Garthwaite y cols. 1995). Además la expresión de las enzimas nNOS y **guanilato ciclase** soluble (GCs) aumenta a lo largo del desarrollo y bajo estimulación del receptor NMDA (Flint y cols. 1997; El Hussein y cols. 2000; Collingridge y cols. 2005).

La importancia de los receptores NMDA no sólo se refleja en el funcionamiento normal de las redes neuronales, sino también en situaciones fisiopatológicas.

3. La vía de señalización NO/cGMP

Esta vía de señalización celular se asocia a numerosos procesos fisiopatológicos en una gran variedad de tejidos (Moncada 1991). Tanto la ausencia como las concentraciones elevadas del NO pueden originar desórdenes y efectos adversos. Por ejemplo, se ha descrito que el NO inhibe enzimas tales como las ribonucleótido reductasa (Kwon y cols. 1991; Leipovre y cols. 1991) e inhibe los complejos I y II de la cadena respiratoria mitocondrial (Welsh y cols. 1991). También, induce la ADP-ribosilación y la inhibición de otras enzimas como la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (Brune y cols. 1994). Por otra parte el NO daña directamente el ADN induciendo la desaminación de sus bases (Nguyen y cols. 1992; Winger y cols. 2005). Además el NO se ha relacionado con los daños neuronales provocados por la isquemia (Bruhwylter y cols. 1993), toxicidad neuronal mediada por glutamato (Dawson y cols. 1991) e inflamación.

Sin embargo, se ha demostrado la participación del NO en otros muchos procesos fisiológicos en el sistema nervioso, tales como: proliferación neuronal, supervivencia y diferenciación, transmisión sináptica y plasticidad, aprendizaje y memoria y regulación de los ciclos circadianos (Lev-Ram y cols. 1997; Contestabile 2000; Canosa y cols. 2001; Monfort y cols. 2002; Steinert y cols. 2008).

La diana, por excelencia, cuando el NO se sintetiza por las isoformas constitutivas de la oxido nítrico sintasa (NOS), es la unión al grupo hemo de la guanilato ciclasa soluble (GCs) y su activación (Ignarro y cols. 1981; Waldman y cols. 1986). La GCs cataliza la conversión de GTP en GMPc que regula la fisiología celular por: 1) activación de proteínas quinasas (Johnson y cols. 1986; Nawy y Jahr 1990); 2) alteración de los niveles de nucleótidos cíclicos por regulación de fosfodiesterasas (PDEs); 3) apertura de canales iónicos sensibles a nucleótidos cíclicos (Marchesi y cols. 2012; Nache y cols. 2012).

3.1 Óxido nítrico sintasas

Las óxido nítrico sintasas (NOS) (L-Arginina, NADPH-O₂ óxidoreductasa) son las enzimas responsables de la síntesis del NO *in vivo*. De estas, se han descrito tres isoformas: NOS I o **neural**, NOS II o **inducible** y NOS III o **endotelial**. La NOS I y la NOS III son enzimas constitutivas, mientras que la isoforma NOS II se expresa de forma inducida por diferentes citocinas, por lo que recibe el nombre de inducible.

Estas enzimas catalizan la oxidación de uno de los grupos amidino equivalentes de L-arginina en una reacción que produce, como producto final, la liberación de una molécula de L-citrulina (Fig.10). Como consecuencia de la transferencia de 5 electrones en una reacción de oxidación de estequiometría impar se genera un radical libre, el NO• (Schmidt y cols. 1993; Förstermann y cols. 1994).

Aunque cada isoforma posee características propias, todas son proteínas homodiméricas que presentan un alto grado de homología. Las subunidades que constituyen los dímeros de las diferentes isoformas son proteínas idénticas de peso molecular entre 130-150 KDa y poseen un dominio reductasa en la región C-terminal, y un dominio oxigenasa en la región N-terminal. Los sitios de unión para el cofactor tetrahidrobiopterina, el sustrato L-arginina, el grupo hemo y la proteína moduladora calmodulina, se encuentran en el dominio N-terminal (Bredt y cols. 1991), mientras que los sitios de unión para los cofactores de óxido-reducción (NADPH, FAD y FMN) se encuentran en el C-terminal.

La clasificación de los tres tipos, se basa en las propiedades físicas y bioquímicas de las enzimas purificadas, regulación por el Ca²⁺ libre y su localización celular. Todas las isoformas de NOS unen calmodulina de manera dependiente de Ca²⁺ (NOS I y NOS III) o independiente (NOS II). En el caso de las isoformas constitutivas (NOS I y NOS III), están inactivas a bajas concentraciones de calcio (≤ 100 nM) y no unen calmodulina, mientras que una elevación de la concentración de Ca²⁺ (≥ 500 nM), por ejemplo por la entrada a través de los receptores NMDA o canales de calcio, provoca la unión de la calmodulina con la consecuente activación de la enzima.

Las tres isoformas de la NOS están presentes en el SNC (Alderton y cols. 2001), pero en las neuronas granulares del cerebelo (el modelo neuronal utilizado en este trabajo de investigación) la NOS I es la isoforma que se expresa mayoritariamente (Minc-Golomb y Schwartz 1994; Contestabile 2012).

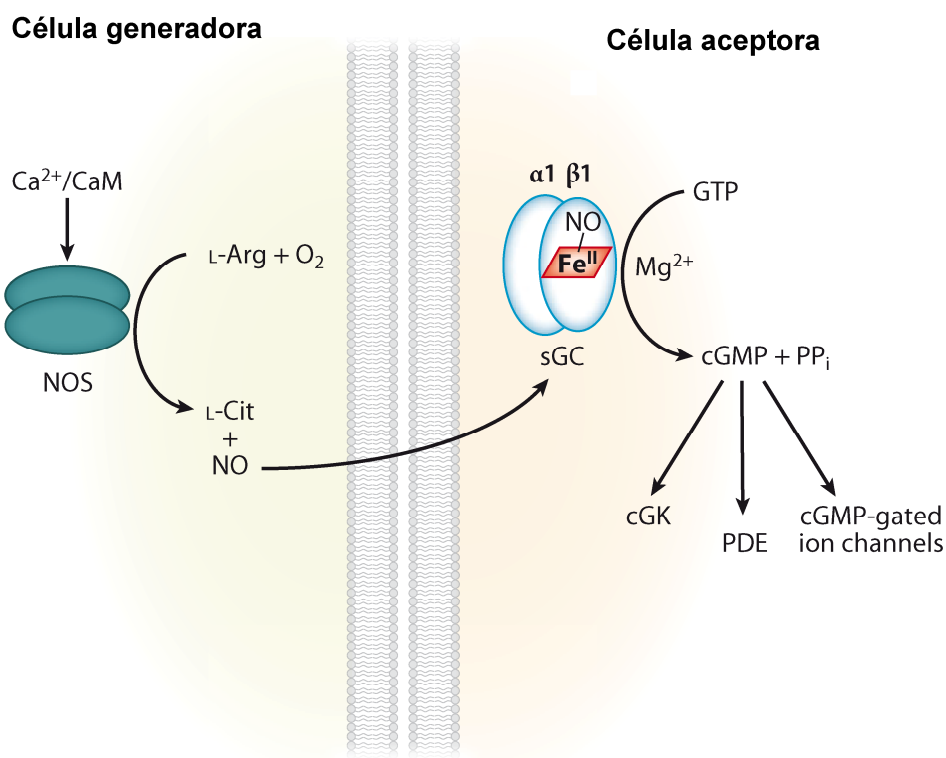


Figura 10: Esquema de la cascada de señalización NO/GMPc. El complejo Ca^{2+} /calmodulina (CaM) se une a la óxido nítrico sintasa (NOS). NOS cataliza la oxidación de la L-arginina a L-citrulina y NO. NO se une al Fe^{2+} -hemo de la GCs. Esto lleva a un aumento del GMPc que se une y activa a las proteínas quinasas cGKs, las fosfodiesterasas (PDEs) y los canales iónicos activados por nucleótidos cíclicos. (Adaptado de Derbyshire y Marletta 2012)

3.1.1 Óxido nítrico sintasa neural (NOS I)

Se localiza en la fracción citosólica soluble y tiene una masa molecular de 150-160 kDa. Se ha detectado en varias zonas del cerebro y de forma abundante en el cerebelo (Bredt y cols. 1990; Dawson y cols. 1991). Su activación se asocia a la entrada de Ca^{2+} a través de receptores ionotrópicos o a canales iónicos. En cuanto a su activación por la entrada de calcio a través del receptor NMDA se ha demostrado en distintos tipos neuronales (Contestabile y cols. 2000; Jurado y

cols. 2006). En esta isoforma se han identificado dominios del tipo PDZ, que le permiten interactuar con numerosas proteínas, entre las que se encuentra la PSD-95 (Brenman y cols. 1996). Estas interacciones permiten la localización postsináptica de la NOS I junto a los receptores NMDA (Craven y Bredt 1998; Sheng y Pak 2000) y canales de Ca^{2+} , permitiendo así una activación rápida y eficaz. La NOS I es sustrato de numerosas proteínas quinasas, incluyendo PKA y cGKs (Bredt y cols. 1992; Dinerman y cols. 1994), que disminuyen su actividad, actuando como mecanismo de retroinhibición de la ruta de señalización NO/cGMP.

Aunque la mayor parte de los estudios asignan a la NOS I una localización principalmente postsináptica (Burette y cols. 2002; Sunico y cols. 2005; Hardingham y Fox 2006), en determinadas regiones cerebrales, como la corteza, también se ha observado en una localización presináptica (Rodrigo y cols. 2001). Además, también se ha podido detectar la liberación de NO por las fibras paralelas de las neuronas granulares (Shibuki y Kimura 1997).

Además de la regulación de la actividad, también se han descrito mecanismos que regulan los niveles de expresión de esta proteína. En células granulares de cerebelo, se ha demostrado que la activación de los receptores NMDA regula la expresión de esta proteína (Baader y Schilling 1996; Virgili y cols. 1998). En estas células, la expresión de la NOS I se regula durante el desarrollo, aumentando significativamente a lo largo de los días de cultivo (Viani y cols. 1997; Jurado y cols. 2004) de manera similar a lo que ocurre en el cerebelo *in vivo* (Wang y cols. 1998; Jurado y cols. 2005).

El NO sintetizado por la NOS I está implicado en numerosos procesos, tanto fisiológicos como patofisiológicos. Por una parte, se conoce desde hace años que la producción de elevadas concentraciones de NO es tóxica y puede producir efectos neurodegenerativos en las neuronas (Dawson y cols. 1991). Por otra parte, también se conoce el papel fundamental que el NO desempeña en el desarrollo del SNC (Haase y Bicker 2003; Cserép y cols. 2011; Dachtler y cols. 2011).

El NO participa en la inducción de la muerte celular programada del excedente neuronal en los primeros estadios del desarrollo (Contestabile 2000).

En neuronas granulares de cerebelo la inhibición de la NOS I induce apoptosis (Virgili y cols. 1998), y en otros tipos de neuronas, los donadores de NO favorecen el crecimiento y la diferenciación (Tegenge y Bicker 2009; Luo y cols. 2010) evidenciando un papel muy importante de esta enzima en la supervivencia celular.

En neuronas granulares en cultivo, la inhibición de NOS I induce apoptosis mediante la disminución de la actividad de CREB y de la cascada de señalización de Akt/PKB (Ciani y cols. 2002). Estas acciones del NO promoviendo la supervivencia y diferenciación neuronal están mediadas por el GMPc sintetizado por la GCs, principal diana fisiológica del NO.

3.2 Guanilato ciclasa

Esta enzima cataliza la conversión de GTP en GMPc y en ella se distinguen dos familias de proteínas: 1) particulada y 2) soluble. La guanilato ciclasa **particulada** se encuentra en la membrana plasmática. Presenta una estructura diferente a la guanilato ciclasa soluble, y diferente mecanismo de activación. Se han identificado siete isoformas distintas (GC-A hasta GC-G) distribuidas en numerosos tejidos y que se han clasificado según su especificidad por diferentes ligandos. Las isoformas GC-A y GC-B son receptores de los péptidos natriuréticos (ANP, BNP y CNP), GC-C es receptor de péptidos intestinales (guanilina, uroguanilina y linfoguanilina) y el resto (GC-D, GC-E, GC-E y GCF) son receptores de péptidos de diferente naturaleza (Müller y cols. 2009; Potter 2011). De todas ellas, la GC-B es la más abundante en cerebro (Lowe y cols. 1989; Brackmann y cols. 2005; Müller y cols. 2010)

Todas las isoformas presentan una estructura homodimérica que, básicamente, consiste en un dominio extracelular N-terminal donde se encuentra el sitio de unión a ligandos, un dominio transmembrana y un dominio citoplasmático C-terminal, donde se localiza el centro activo de la enzima (Derbyshire y Marletta 2012). El dominio catalítico presenta una gran homología con el dominio catalítico de la guanilato ciclasa soluble y con el dominio catalítico de la adenilato ciclasa (Hulko y cols. 2006).

Las formas **solubles** de guanilato ciclasa son hemoproteínas heterodiméricas compuestas por una subunidad α y una β , siendo necesaria la expresión de las dos subunidades para la actividad catalítica (Harteneck y cols. 1991; Buechler y cols. 1999). Esta enzima se encuentra en, prácticamente, todas las células de los mamíferos y participa en una gran variedad de procesos fisiológicos, tales como la inhibición de la agregación plaquetaria, la vasodilatación, la transmisión de señales neuronales, y la inmunomodulación (Potter 2011; Derbyshire y Marletta 2012).

Existen dos isoformas de cada una de las subunidades, α y β , que constituyen la GCs activa, α_1 y α_2 y β_1 y β_2 , respectivamente (Zabel y cols. 2002; Russwurm y cols. 2004; Derbyshire y Marletta 2012). Las isoformas α_1 y α_2 forman heterodímeros activos con β_1 , con idénticas propiedades cinéticas y farmacológicas (Russwurm y cols. 2001). Cada subunidad posee un dominio regulador en el extremo N-terminal, donde se une el grupo hemo, un dominio central de dimerización y un dominio catalítico en el C-terminal (Russwurm y Koesling 2004). El grupo hemo se sitúa en un bolsillo hidrofóbico formado por aminoácidos de las dos subunidades y se une mediante un enlace de coordinación entre el Fe^{2+} y un residuo de His (105) de la subunidad β_1 (Winger y Marletta 2005; Derbyshire y Marletta 2012).

Para que el NO se una al grupo hemo y active a la GCs, el hierro tiene que estar en estado reducido (ferroso, Fe^{2+}). El NO se une a la sexta posición de coordinación del Fe^{2+} , que está unido en su quinta posición de coordinación a la His 105 de la subunidad β_1 (Munzel y cols. 2003). La formación de este enlace, provoca la ruptura del enlace entre el Fe^{2+} y la histidina, induciendo un cambio conformacional y la activación de la enzima (Koesling y cols. 2004).

Al igual que sucede en otras células, en las neuronas se ha sugerido que la localización subcelular de la GCs podría estar relacionada con distintos aspectos de la actividad neuronal. La subunidad α_2 , con una elevada expresión en cerebro, puede interaccionar con proteínas que poseen dominios PDZ, a través de su región C-terminal (Russwurm y cols. 2001), por lo que la presencia de esta isoforma puede determinar la localización subcelular de la GCs. Tanto en hipocampo como en corteza de cerebro de rata se ha observado una

localización sináptica de esta isoforma (Burette y cols. 2002; Ding y Weinberg 2006).

Diferentes estudios para determinar la distribución subcelular de la subunidad β_1 han puesto de manifiesto la presencia de esta proteína tanto en el soma como en las neuritas (axones y dendritas) de diferentes tipos de neuronas, sugiriendo también una localización sináptica (Burette y cols. 2002; Ding y Weinberg 2006; López-Jiménez y cols. 2009).

3.3 Sistemas efectores del GMPc

Las respuestas celulares al incremento en GMPc están mediadas por diferentes proteínas efectoras: la activación de proteínas quinasas dependientes de GMPc, la activación ó inhibición de fosfodiesterasas dependientes de nucleótidos cíclicos, y la apertura de canales iónicos activados por nucleótidos cíclicos.

3.3.1 Proteínas quinasas dependientes de GMPc

Una de las dianas intracelulares para el incremento intracelular de GMPc son las **proteínas quinasas dependientes de GMPc** (cGK; Gallo y cols. 1987; Serulle y cols. 2007). Estas enzimas son proteínas serina/treonina quinasas de las cuales se han descrito dos subtipos en tejidos de mamíferos, cGK tipo I, localizada en citosol, y cGK de tipo II, asociada a membranas (Hofmann y cols. 1992; Butt y cols. 1994; Francis y Corbin 1999; Contestabile y cols. 2011).

La cGKI es un dímero compuesto de dos subunidades idénticas de 76 KDa, de la que se conocen dos isoformas (denominadas cGKI α y cGKI β) productos de un procesamiento de corte y empalme alternativo de un mismo gen. La expresión de estas isoformas es abundante en plaquetas, músculo liso y en las células de Purkinje (Kleppisch y cols. 1999). Su expresión en cerebelo y, concretamente en células granulares disminuye a lo largo del desarrollo (Jurado y cols. 2004).

La **cGKII** es un dímero compuesto por dos subunidades iguales de 86 KDa cada una (Gamm y cols. 1995), y su papel como modulador de la actividad sináptica se ha descrito recientemente (Serulle y cols. 2007). Se expresa en varias

zonas del cerebro, y en el cerebelo, en donde se ha encontrado localizada en células gliales y en las terminaciones neuronales (Van Staveren y cols. 2004).

Existe un alto grado de homología entre estas proteínas, su secuencia aminoacídica (de cada subunidad) se divide en seis dominios, de los cuales el 2º y el 3º son sitios de unión a GMPc de distinta afinidad. Los dos sitios de unión presentan cooperatividad positiva y se diferencian entre sí por sus parámetros cinéticos: mientras que uno de ellos, denominado lento, presenta mayor afinidad por el ligando, y se disocia más lentamente de este, el otro denominado rápido, posee menor afinidad y se disocia más rápidamente. Además de los dominios de unión a GMPc, estas enzimas presentan un dominio de dimerización en el extremo N-terminal, un dominio catalítico, uno autoinhibitorio y un sitio de autofosforilación (Schuman y Madison 1991; Lu y cols. 1999). En la cGKI α la autofosforilación incrementa la disociación del GMPc del sitio de unión de alta afinidad, incrementando la afinidad de este sitio por el AMPc, favoreciendo un fenómeno de activación cruzada entre GMPc y AMPc (Butt y cols. 1994; Inceoglu y cols. 2011).

El papel del NO como **mensajero retrógrado** en la plasticidad sináptica, implica la activación de cGK en la inducción de la LTP, y los inhibidores de la cGKI bloquean la LTP (Zhuo y cols. 1994; Arancio y cols. 1995; Micheva y cols. 2003). De hecho, se ha observado una alta expresión de cGKI en las neuronas piramidales de hipocampo, apoyando la idea del papel de esta proteína en los fenómenos de LTP. Otros efectos de cGK en la neurotransmisión son la regulación de corrientes de Ca²⁺ neuronales (Meriney y cols. 1994), de la liberación de neurotransmisores (Pineda y cols. 1996; Takita. 1997) y de la activación de canales de K⁺ (Gragasin y cols. 2004).

Varios estudios han demostrado la implicación de las cGKs en neuroplasticidad (Schuman y Madison 1991; O'Dell y cols. 1994; Lu y cols. 1999; Feil y cols. 2005; Paul y cols. 2008) como mediador de la acumulación del factor de transcripción CREB (cAMP response element-binding protein) (Gallo y Iadecola 2011). De hecho la importancia de las cGKs en la regulación de la expresión génica se ha demostrado en diferentes tipos celulares, incluidas las neuronas (Gudi y cols. 1996; Fujiwara y cols. 2002; L'Etoile y cols. 2002; Pilz y

Broderick 2005). Así la cGK fosforila CREB en células granulares de cerebelo después de la activación de los receptores NMDA (Jurado y cols. 2006) evidenciando un papel importante de estas proteínas en la regulación de la actividad de factores de transcripción en cerebelo.

El papel de cGKII en mecanismos de potenciación sináptica se ha demostrado en hipocampo (Serulle y cols. 2007). En ausencia de GMPc, el sitio catalítico de la cGKII está unido al dominio autoinhibitorio (AI) de la quinasa, inactivándola. La activación de la cGKII por GMPc induce un cambio de conformación, que causa la autofosforilación del dominio autoinhibitorio, disminuyendo su afinidad por el dominio catalítico (Fig. 11) (Wall y cols. 2003). Esta forma activa de la cGKII interacciona con la subunidad GluA1 de los AMPARs, facilitando la fosforilación de la serina 845 y su incorporación a la membrana.

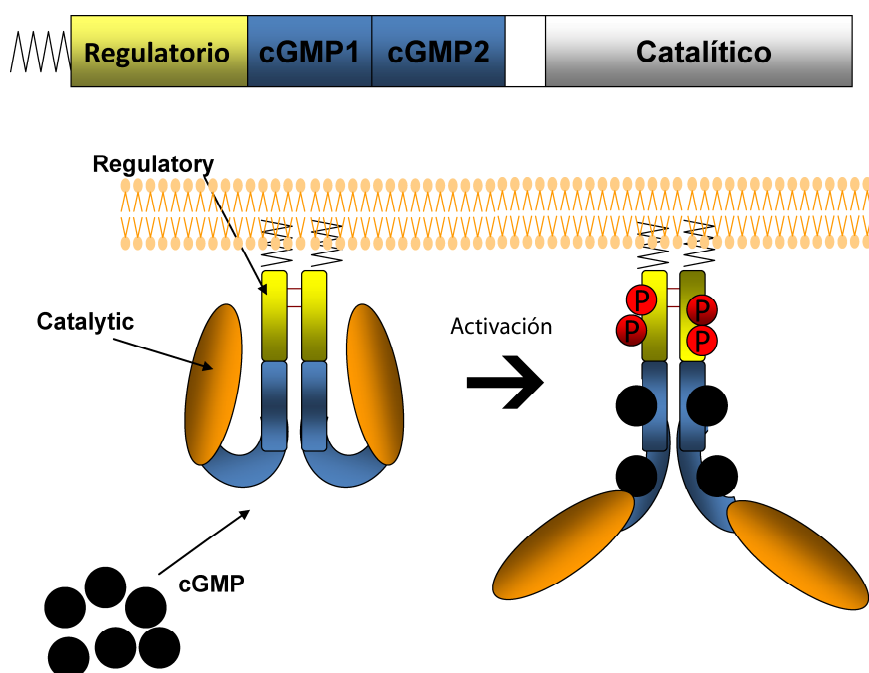


Figura 11: Esquema de la estructura de la proteína quinasa dependiente de GMPc de tipo II. El GMPc se une a la cGKII provocando una autofosforilación y la consecuente activación. El cambio conformacional favorece la actividad de la enzima, provocada por una mayor facilidad de acceso de los dominios catalíticos.

3.3.2 Fosfodiesterasas

Las **fosfodiesterasas** (PDEs) reguladas por GMPc regulan las concentraciones celulares de nucleótidos cíclicos. En mamíferos se han identificado 11 familias diferentes de PDEs. Cada miembro de estas familias contiene un dominio catalítico conservado de unos 270 aminoácidos en el dominio C-terminal. Este dominio rompe el enlace fosfodiéster, hidrolizando el nucleótido cíclico a su correspondiente nucleótido 5'-monofosfato (McAllister-Lucas y cols. 1995). Todas las PDEs contienen dominios reguladores heterogeneos y funcionan como dímeros.

Las familias 1, 2, 3, 10 y 11 hidrolizan tanto GMPc como AMPc, mientras que las familias 5, 6 y 9 hidrolizan específicamente GMPc. La actividad de estas enzimas es crucial para la señalización celular, puesto que regulan la concentración intracelular de los nucleótidos cíclicos. En muchas células estas proteínas están compartimentalizadas, pudiendo regular, así, los niveles de nucleótidos cíclicos en los diferentes compartimentos subcelulares (Inceoglu y cols. 2011; Chan y Yan 2011).

La PDE2 que se activa por GMPc, está ampliamente distribuida en los diferentes tejidos. El GMPc se une a los sitios alostéricos estimulando su hidrólisis y actuando, por tanto, como un mecanismo de retroinhibición que regula los niveles intracelulares de GMPc. Igualmente, el GMPc aumenta la degradación de AMPc, regulando de forma cruzada la señalización mediada por AMPc (McAllister-Lucas y cols. 1993; Zaccolo y Movsesian 2007; Reiersen y cols. 2011). Por el contrario, las PDE3 se inhiben por GMPc provocando una acumulación de AMPc, principal sustrato de esta enzima, poniendo de manifiesto el entrecruzamiento de las vías de señalización de los dos nucleótidos cíclicos (Maurice 2005; Zaccolo y cols. 2007). De hecho algunas de las acciones fisiológicas del GMPc están mediadas por un incremento de AMPc y una activación de PKA.

Las PDEs tipo 5 hidrolizan el GMPc de forma específica y se expresan de forma abundante en las neuronas de Purkinje en el cerebelo y también en hipocampo, incluyendo tanto las neuronas piramidales de la zonas CA1, CA2 y

CA3, como el giro dentado (Van Staveren y cols. 2004). Las PDE de tipo 6, en un principio se estudiaron sólo en la retina; sin embargo, también se ha encontrado la expresión del ARNm que codifica para esta proteína en hipocampo de ratón (Jarnaess y cols. 2007). La expresión de las PDE tipo 9 es abundante en células granulares de cerebelo y en el bulbo olfatorio (Andreeva y cols. 2001), esta proteína presenta una gran afinidad por el GMPc, mayor que cualquier otra PDE. Por esta razón, se considera que pueda ser esta fosfodiesterasa la más importante en la regulación de los procesos que activan la cascada de señalización NO/GMPc (Burlet y cols. 1999; Cudeiro y cols. 2000).

Estudios recientes han demostrado que la inhibición de las fosfodiesterasas, en particular las PDE2, PDE4 y PDE5, puede mejorar las capacidades cognitivas en modelos animales, como consecuencia del aumento en las concentraciones de AMPc o GMPc (Blokland y cols. 2006 y 2012). En particular la PDE4, que hidroliza el AMPc, está implicada en procesos de adquisición y consolidación de la memoria. Su inhibición ha permitido obtener importantes resultados en modelos de Alzheimer, Huntington, depresión y esquizofrenia (Burgin y cols. 2010). La PDE5 que hidroliza el GMPc, está implicada en procesos de consolidación de la memoria (Puzzo y cols. 2008; Reneerkens y cols. 2012). Los inhibidores de la PDE2 incrementan tanto las concentraciones de AMPc como las de GMPc, y en un estudio reciente se ha demostrado que pueden ser fármacos prometedores en la nueva estrategia de cura de la enfermedad de Alzheimer (Sierksma y cols. 2012). Por último, cabe destacar que nuevos estudios sobre nuevas isoformas de las PDE y su distribución en el cerebro, han permitido especular sobre la posibilidad de sintetizar inhibidores específicos de estas fosfodiesterasas y optimizar, así, la función de estos fármacos.

3.3.3 Canales iónicos activados por nucleótidos cíclicos

Por último, los canales iónicos sensibles a GMPc (CNGC) constituyen otro de los sistemas efectores, que pueden mediar las respuestas celulares, desencadenadas por un incremento de GMPc, mediante la regulación de

corrientes iónicas. Los CNGC son canales iónicos, permeables a Ca^{2+} fundamentalmente, que se activan por la unión de los nucleótidos cíclicos (Kaupp y Seifert 2002), y una vez abiertos permiten la entrada de Ca^{2+} y Na^+ a la célula. Los CNGCs son heterotetrámeros formados por subunidades tipo A (CNGA1-A4) y tipo B (CNGB1 y CNGB3; Kaupp y Seifert 2002; Matulef y Zagotta 2003).

Aunque los CNGCs se detectaron originalmente en neuronas sensoriales, como fotorreceptores de la retina y neuronas del epitelio olfativo, también están presentes en otros muchos tipos de neuronas no sensoriales (Kingston y cols. 1996, 1999; López-Jiménez y cols. 2012). A pesar de su amplia distribución en el SNC, todavía no se conoce bien la función de estos canales en las neuronas, aunque debido a su elevada permeabilidad a Na^+ y Ca^{2+} se cree que pueden influir en numerosos aspectos de la fisiología neuronal, incluyendo la excitabilidad y mecanismos intracelulares dependientes de Ca^{2+} (Leinders-Zufall y col. 1997).

En el cerebelo se expresan diferentes subunidades de los CNGCs (Strijbos y cols. 1999), y en neuronas granulares nuestro grupo de investigación ha demostrado la presencia de las subunidades CNGA1 y CNGB1 y de canales funcionales sensibles a GMPc (López-Jiménez y cols. 2012).

3.4 Función de la vía NO/cGMP en las células granulares de cerebelo

De las tres isoformas de enzimas que producen NO convirtiendo la arginina en citrulina, las dos isoformas constitutivas de óxido nítrico sintasa dependientes de Ca^{2+} , neuronal y endotelial (tipo I y tipo II), se expresan abundantemente en cerebelo (Ihara y cols. 2006; Campese y cols. 2007), la forma inducible (iNOS), está muy poco expresada en condiciones normales y su expresión aumenta en estados patológicos (Rodrigo y cols. 2001; Suarez y cols. 2005). La NOS I es la isoforma que más se expresa en cerebelo, siendo su nivel superior al detectado en cualquier otra área del cerebro (Su y cols. 2010). A nivel neuronal, esta proteína se expresa en neuronas granulares maduras y en

interneuronas de la capa molecular, células en cesta y estrelladas (Reiersen y cols. 2011)

En las neuronas granulares la expresión de la NOS I aumenta a lo largo del desarrollo de forma lenta durante la primera semana postnatal y solamente muestran unos niveles detectables de inmunoreactividad cuando estas células han alcanzado la capa granular interna (Ciani y cols. 2006). Estudios realizados en cultivos primarios de neuronas granulares apoyan los resultados obtenidos *in vivo*. Se ha visto que la expresión de NOS I aumenta de forma significativa en los días 7-9 en cultivo, cuando las neuronas empiezan a alcanzar un estado de madurez funcional (Contestabile 2002; Jurado y cols. 2004).

El principal receptor para el NO, la guanilato ciclasa soluble, también está presente en las neuronas granulares, habiéndose detectado las dos isoformas activas, $\alpha_1\beta_1$ o $\alpha_2\beta_1$ (Jurado y cols. 2003; Garthwaite y cols. 2005; Wykes y cols. 2004; Martin y cols. 2006). Estos dímeros presentan diferencias en su localización subcelular, encontrándose la $\alpha_1\beta_1$ más abundante en el citosol, aunque puede asociarse a la membrana en determinadas condiciones (Zabel y cols. 2002; Jones y cols. 2008). El dímero $\alpha_2\beta_1$ puede interaccionar con proteínas que presentan dominios PDZ, facilitando su localización en la membrana (Russwurm y cols. 2001).

En las neuronas granulares de cerebelo la expresión de las subunidades α_2 y β_1 aumenta con el desarrollo siguiendo un patrón similar al de la NOS I, mientras que la expresión de la subunidad α_1 disminuye (Jurado y cols. 2003). Con técnicas inmunocitoquímicas, utilizando un anticuerpo frente a la subunidad β_1 , se ha demostrado la presencia de esta enzima tanto en los somas como en las fibras de la neuronas granulares (López-Jiménez y cols. 2009). Por otra parte, la acumulación de GMPc en respuesta a una estimulación con NMDA también se observa tanto en el soma como en las fibras, indicando la presencia de guanilato ciclasa funcional. Además, mediante técnicas de doble marcaje, se observa un alto grado de colocación del GMPc con la proteína Bassoon, una proteína presináptica, sugiriendo que en los botones sinápticos también tiene lugar la síntesis de GMPc (Jurado y cols. 2004; López-Jiménez y cols. 2009).

El óxido nítrico es un importante modulador de la proliferación celular y de la neurogénesis (Peunova y cols. 1995; Villalobo 2006; Peña-Altamira y cols. 2010). De hecho, se ha demostrado que el NO actúa fisiológicamente como un factor que inhibe la proliferación de los precursores neuronales del cerebelo y favorece tanto la diferenciación como la maduración neuronal (Ciani y cols. 2004, 2006).

Por otra parte, varios estudios han demostrado que la expresión de la vía NO/cGMP es muy importante para la supervivencia y la adquisición del fenotipo maduro de las neuronas granulares (Contestabile 2002; López-Jiménez y cols. 2009). La expresión de NOS I y GCs aumenta durante el desarrollo de las células granulares *in vitro*, así como en cerebelo (Jurado y cols. 2003, 2006). Además, la estimulación del receptor NMDA, que es esencial para la supervivencia y la diferenciación de las neuronas granulares *in vivo*, incrementa la expresión de estas proteínas (Contestabile 2000; Jurado y cols. 2003). La actividad de GCs juega un papel fundamental tanto en la regulación del crecimiento de neuritas y la formación de sinapsis como en la maduración funcional de las mismas (Lopez-Jimenez y cols. 2009).

La vía NO/cGMP también es importante para procesos de plasticidad sináptica en neuronas granulares de cerebelo y para procesos de aprendizaje (Holscher 1997; Feil y cols. 2008; Kleppisch y cols. 2009). Sobre todo, en la sinapsis entre las fibras paralelas y las dendritas de las células de Purkinje, el NO es fundamental para el desarrollo de la LTD (Ito y cols. 2001; Reynolds y Hartell 2002). Este mecanismo está implicado en el silenciamiento selectivo de señales motoras aferentes desde las neuronas granulares, a través de las fibras paralelas (Ito y cols. 2001; Reynolds y Hartell 2002). El modelo aceptado es que el NO producido por las fibras paralelas, difunde a través del espacio sináptico a las células del Purkinje donde estimula a la GCs y se activa la cGK, contribuyendo al incremento de la fosforilación de las subunidades GluA2 de los receptores AMPA. El resultado es la endocitosis de estos receptores, que provoca la disminución de la respuesta al glutamato (Shibuki y cols. 1997; Launey y cols. 2004; Kleppisch y cols. 2009). La alternancia entre LTD y LTP es importante para la función de una sinapsis. En el caso de las sinapsis entre

fibras paralelas y células de Purkinje, el NO producido presinápticamente es el mensajero retrogrado necesario y suficiente para la inducción de la LTD cuando coincide con una elevación de Ca^{2+} , sin embargo también puede inducir LTP cuando las concentraciones de Ca^{2+} sean bajas (Lev-Ram y cols. 2003). Esto confirma un papel fundamental del NO producido por las células granulares en el aprendizaje del cerebelo relacionado con el control motor.

Por último, en las sinapsis entre las fibras musgosas y las dendritas de las neuronas granulares la producción de NO se relaciona con la LTP de dichas sinapsis. Se ha demostrado que, durante estímulos de alta frecuencia, el NO alcanza concentraciones suficientes para producir una activación plena de la GCs, la síntesis de GMPc en la presinapsis incrementa la liberación de neurotransmisor, mediante un mecanismo todavía desconocido (Maffei y cols. 2003). No se descartan efectos postsinápticos y todavía se desconoce si la regulación de la expresión de los receptores AMPA en la membrana, como la descrita en este trabajo de investigación, puede estar relacionada con el establecimiento de la LTP en estas sinapsis.

II. OBJETIVOS

Durante los últimos años se ha progresado enormemente en el conocimiento del desarrollo y diferenciación neuronal y las neuronas granulares del cerebelo en cultivo es uno de los modelos mas utilizado para dichos estudios. En estas neuronas se expresan las distintas proteínas implicadas en la vía de señalización NO/GMPc de forma dependiente con el desarrollo y existe una localización sináptica de muchas de ellas. Los mecanismos bioquímicos iniciados por el óxido nítrico y su principal molécula efectora, el GMPc, forman parte de un complejo mecanismo, que ha acaparado un enorme interés científico en las dos últimas décadas, que regula diferentes procesos fisiológicos del SNC. El papel de esta vía de transducción en fenómenos de plasticidad sináptica a largo plazo, supervivencia y desarrollo neuronal aún sigue siendo objeto de análisis en numerosos laboratorios de investigación. En algunos de estos procesos también están implicados los AMPARs, cuya densidad en membrana y composición de subunidades determina, en gran manera, las diferentes respuestas celulares desencadenadas por la activación de estos receptores. Por tanto, conocer la expresión de estos receptores en el desarrollo y su regulación, tanto por el nivel de actividad del cultivo como por la activación de receptores NMDA y la vía del NO/GMPc podría aportar nuevos datos sobre los mecanismos de plasticidad que tienen lugar durante el desarrollo. El presente trabajo de investigación se fijó los siguientes objetivos:

- 1.- Estudiar la expresión de las cuatro subunidades de los AMPARs durante el desarrollo de las neuronas granulares de cerebelo de rata tanto *in vitro* (células en cultivo) como *in vivo* (rodajas de cerebelo).
- 2.- Analizar la regulación de la expresión y de la localización en membrana de las cuatro subunidades, en respuesta a diferentes grados de despolarización de la membrana, debido a la presencia de distintas concentraciones de KCl en el medio de cultivo, y al bloqueo de los canales de calcio de tipo L.

- 3.- Dilucidar el posible mecanismo molecular implicado y, mediante experimentos funcionales de imagen de calcio, el tipo de AMPARs (permeables o impermeables a calcio) presentes en la superficie.
- 4.- Estudiar la fosforilación en Ser845 de la subunidad GluA1 y de su inserción en membrana por la activación de los NMDARs y la implicación de la cGKII en este mecanismo.
- 5.- Analizar, mediante imagen de calcio, la posible formación de CP-AMPARs en las dendritas de las neuronas granulares de 7DIV.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. - MATERIALES

1.1 Material Biológico

Para la preparación de los cultivos primarios se han utilizado ratas albinas de la cepa Wistar (machos o hembras) de 7 días postnatales, criadas y suministradas por el animalario de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid. Los animales se mantuvieron con la madre hasta el momento del sacrificio.

Para los estudios de inmunohistoquímica y co-inmunoprecipitación se han utilizado ratas Wistar de 14 días, 21 días o adultas. Las ratas estuvieron estabuladas en la Universidad Autónoma de Madrid y mantenidas en régimen de alternancia de 12 horas de luz y oscuridad con libre acceso a comida y bebida.

Para la preparación de extractos de cerebelo se utilizaron ratones C57/BL de una cepa salvaje y otros modificados genéticamente que no expresan la cGKII (suministrados por el Dr. Franz Hofmann de la Universidad de Munich). Estos animales se utilizaron en el laboratorio del Dr. Edward Ziff en la Universidad de Nueva York (donde se hizo parte de este trabajo).

Todos los procedimientos empleados en este trabajo, tanto el manejo como de el sacrificio de los animales, se llevaron a cabo de acuerdo con las directrices de la Comisión Europea (86/609/CEE) y fueron aprobados por el Comité de Experimentación animal de la Universidad Complutense, así como el comité de la NYU.

1.2 Material de cultivo

El kit de disociación del tejido con papaina (Papain Dissociation System) se adquirió de Worthington (Lakewood NJ, EE.UU.); el medio Neurobasal, el B-27 y el suplemento de glutamina de degradación lenta glutamax, se adquirieron

de Invitrogen (Life Technologies, España). La poli-L-lisina se adquirió en Biochrom AG (Berlin, Alemania).

1.3 Anticuerpos primarios y secundarios.

Los anticuerpos utilizados para detectar las distintas subunidades de los receptores AMPA fueron: anti-GluA1 (monoclonal de conejo específico para el dominio C-terminal), anti-fosfo-GluA1 (monoclonal de conejo, que reconoce específicamente la forma fosforilada en la Ser845 del dominio C-terminal), anti GluA1 (policlonal de conejo, que reconoce específicamente el dominio N-terminal extracelular), anti-GluA2 (monoclonal de ratón específico para el dominio N-terminal extracelular), anti-GluA3 (monoclonal de ratón específico para el dominio N-terminal extracelular), anti-GluA4 (monoclonal de conejo, para el dominio C-terminal) y el anticuerpo que reconoce la subunidad $\alpha 6$ del receptor GABA(A) (policlonal de conejo) fueron suministrados por Millipore (Merck-Millipore, España). El anticuerpo que reconoce la forma fosforilada y activa de la calmodulina quinasa IV (anti-pCAMKIV, monoclonal de conejo) así como el péptido control, se adquirieron de Santa-Cruz Biotechnology (Santa Cruz, Heidelberg, Alemania). Los anticuerpos frente a β -tubulina y α -actina y el anticuerpo frente a la proteína fibrilar ácida de la glía (anti-GFAP, monoclonal de conejo), se adquirieron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE.UU.).

Los anticuerpos anti-sinapsina (monoclonal de ratón), anti-bassoon (policlonal de cobaya) se compraron a Synaptic System (Göttingen, Alemania). El suero normal de cabra (NGS) y de burro (NDS) se compraron a Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA, USA).

Los anticuerpos secundarios anti-ratón o anti-conejo generados en cabra o burro y conjugados con los fluorocromos Cy2 o Cy3 se compraron a Jackson ImmunoResearch Laboratories; los anticuerpos secundarios generados en cabra o burro (anti-ratón, anti-conejo, anti-cobaya) conjugados con diversos fluorocromos Alexa (488, 555 y 594) se adquirieron de Molecular Probes (Life Technologies, España).

Los anticuerpos secundarios anti-ratón y anti-conejo conjugados con fluoróforos para detectarse con excitación infrarroja (IRDye® 800CW Infrared

Dye, y IRDye® 680CW Infrared dye) se compraron a Li-Cor biotechnology (Lincoln, USA).

1.4 Reactivos

Los reactivos utilizados en este trabajo de tesis, fueron suministrados por las distintas casas comerciales que a continuación se indican:

Life Technologies, España: el kit comercial “Prolong Antifade with DAPI” para el marcaje de los nucleos; las sondas permeables (formas acetoxi metil éster) para calcio: Fura 2-AM y Fluo-4AM.

Abcam biochemicals (Bristol, Inglaterra): el agonista específico de los receptores AMPA, (S)-AMPA, así como su modulador alostérico positivo, ciclotiazida; el bloqueador de canales de calcio de tipo L, nifedipino.

Tocris (Bristol, Inglaterra): el antagonista específico de los receptores AMPA, NBQX.

Bio-Rad España: todo el material para electroforesis e inmunotransferencia: solución de acrilamida al 40%, SDS purificado, TEMED, amonio persulfato (APS), Tris-HCl purificado, membranas de nitrocelulosa, β -mercaptoetanol, glicina, patrones de peso molecular (rango 10-250 kDa) y el reactivo de Bradford para la determinación de proteínas.

Li-Cor biotechnology (Lincoln, EE.UU.): anticuerpos secundarios anti-ratón y anti-conejo conjugados con fluoróforos excitables a longitudes de onda del espectro infrarrojo (Irdye technology) para revelar las membranas con el sistema Odissey.

Thermo Fisher scientific (Rockford, EE.UU.): el kit de inhibidores de proteasas y fosfatasas, así como el tampón de extracción de proteínas totales “RIPA”. También el ARN de interferencia que silencia la expresión de cGKII (Dharmacon) fue adquirido de esta casa comercial.

Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE.UU.): el detergente Tween-20, NASPM (1-Naftil-acetil espermina trihidrocloruro, toxina de Joro spider) antagonista selectivo de los receptores AMPA permeables a Ca^{2+} , el cloruro de cadmio, el agonista específico del receptor NMDA N-metil-D-aspartico, el antagonista de los receptores NMDA dependiente de actividad MK-801.

Peptide Institute INC. (Osaka, Japón): las toxinas de canales de calcio voltaje dependientes, conotoxina-GVIA bloqueante de los canales de tipo N y ω -agatoxina-IVA bloqueante de los canales de tipo P/Q.

Calbiochem (Bionova Científica, Madrid): el inhibidor de las proteínas quinasas dependientes de GMP cíclico (cGK), KT5823.

Biolog (Bremen, Alemania): el análogo de GMP cíclico, 8Br-cGMP (8-Bromoguanosine- 3', 5'- cyclic monophosphate).

Menzel-Gläser (Braunschweig, Alemania): los cubreobjetos y los portaobjetos.

2. MÉTODOS

2.1 El cultivo de neuronas granulares como modelo de estudio de las sinapsis glutamatérgicas

Las células granulares son las neuronas mas abundantes del cerebelo, migran desde la capa externa a la interna durante el desarrollo. Establecen sinapsis con las células de Purkinje a través de sus axones (fibras paralelas), y con las fibras musgosas ("mossy fibers") a través de sus dendritas. Las fibras musgosas son fibras nerviosas que proceden de los núcleos basales del cerebro, proporcionan abundantes estímulos excitatorios a las neuronas granulares, necesarios para la viabilidad y el desarrollo de estas células. La adición de KCl a los medios de cultivo a una concentración de 20-25 mM produce una despolarización de la membrana de estas células y la entrada del Ca^{2+} necesario para la supervivencia de las mismas, mimetizando, en cierto modo, la estimulación excitatoria que reciben de las fibras musgosas *in vivo*, hecho demostrado por primera vez en 1987 por Gallo y cols.

La activación de proteínas dependientes de calcio parece estar relacionada con la los procesos de diferenciación mediada por actividad de estas células. Por este motivo, una de las características principales del cultivo de neuronas granulares respecto a otros modelos de cultivo primarios, es el empleo de un medio suplementado con altas concentraciones de KCl (25 mM).

Las neuronas granulares poseen toda la maquinaria bioquímica necesaria para acoplar la despolarización de la membrana plasmática a la entrada de iones Ca^{2+} y a la liberación de neurotransmisores. A nivel post-sináptico, la mayoría poseen receptores glutamatérgicos, cuya expresión puede variar a lo largo del desarrollo. *In vivo* las neuronas granulares forman sinapsis con las fibras musgosas, con las neuronas de Purkinje y con interneuronas. *In vitro* forman sinapsis consigo mismas.

2.2 Obtención de las células granulares de cerebelo de rata

Las células granulares se obtuvieron a partir de cerebelos de ratas Wistar de siete días postnatales (P7) mediante digestión enzimática con papaina y purificación en gradiente de inhibidor de tripsina conjugado con BSA (Ovomucoide) según el método descrito por Pons y Martí (2001), con oportunas modificaciones.

Una vez extraídos los cerebelos, se dispusieron en una placa petri con medio de aislamiento EBSS estéril (**Tabla I**) y se eliminaron restos de vasos sanguíneos y estructuras no cerebelosas como las meninges.

Una vez limpios, los cerebelos se trituraron con tijeras de acero quirúrgico estériles y se transfirieron a un tubo Falcon de 50 ml con 65 U/ml de papaina suplementada con 100 U de DNAasa I, 2 mM de CaCl_2 y 2 mM de MgCl_2 . La mezcla se incubó a 37° C en agitación a 250xg durante 55 minutos, para facilitar la disgregación química del tejido.

Una vez transcurrido este tiempo se procedió a la disgregación mecánica de los restos de tejido no digeridos, pasando la solución 10 veces por una pipeta de 10 ml. A continuación, se procedió a una primera centrifugación durante 5 minutos a 110xg a 20° C, se eliminó el sobrenadante y se recogió el precipitado en medio EBSS más ovomucoide. El medio con las células se adicionó sobre una disolución de ovomucoide (10 mg/ml) previamente agitado y se centrifugó a 110xg a 20°C durante 5 minutos. El precipitado se resuspendió en 3 ml de medio de cultivo Neurobasal™ - A suplementado (**Tabla II**), y se

procedió al conteo de las células en una cámara de Neubauer que posteriormente se sembraron a las siguientes densidades:

- 10^6 células/ml para las placas de 6 pocillos (Electroforesis e inmunotransferencia)
- 100.000 células/cubreobjeto para los cubreobjetos de 15mm.
- 100.000 células/pocillo para las placas de 96 pocillos.

Para el conteo se preparó una dilución 1:20 de las células (180 μ l de medio de cultivo + 20 μ l de medio con células), y se mezcló con Azul Tripán (1:1).

$\text{N}^\circ \text{ de células/ml} = \text{N}^\circ \text{ células contadas} \times 10^4 \times \text{dilución}$

Sólo se contaron las células vivas capaces de excluir el colorante. Una vez terminado el conteo, se procedió a la siembra en las placas y los cubreobjetos, previamente tratados con poli-L-lisina 0,1 mg/ml.

Para crear la matriz de poli-L-lisina, el día anterior al cultivo, los cubreobjetos de cristal se trataron con ácido clorhídrico 1,5 M durante 20-30 minutos para crear una superficie electrostática que favoreciera la homogénea distribución de la poli-L-lisina. A continuación, después de haber lavado 3 veces con agua estéril, se trataron los cubreobjetos y las placas con la poli-L-lisina, durante 3 horas a 37° C. Finalmente se lavaron otras tres veces con agua estéril para eliminar el exceso de poli-L-lisina.

Para evitar la proliferación de células gliales, a las 24 horas se cambió el medio de cultivo y se añadió citosina arabinofuranósido hasta conseguir una concentración final de 10 μ M.

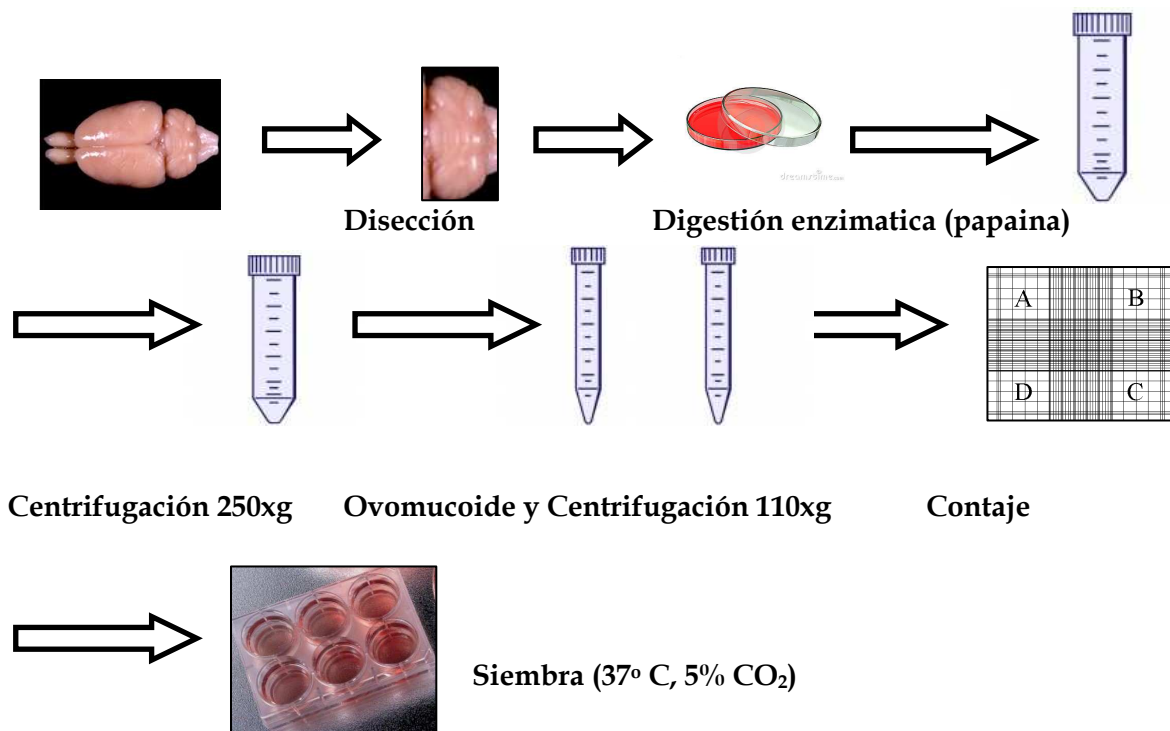
Tabla I: Composición del medio de aislamiento (EBSS).

Compuesto	Concentraciones
KCl	5,30 mM
NaCl	117 mM
NaHCO ₃	26 mM
NaH ₂ PO ₄	1 mM
Glucosa	5,6 mM

Tabla II: Composición del medio de cultivo de neuronas granulares.

El medio Neurobasal™-A se suplementaba con los siguientes compuestos:

Compuesto	Concentraciones
Mezcla antibiótica-antimitótica 100x	1% (v/v)
Suplemento B-27 50x	2% (v/v)
KCl	25 mM
Glutamax 100x	1% (v/v)

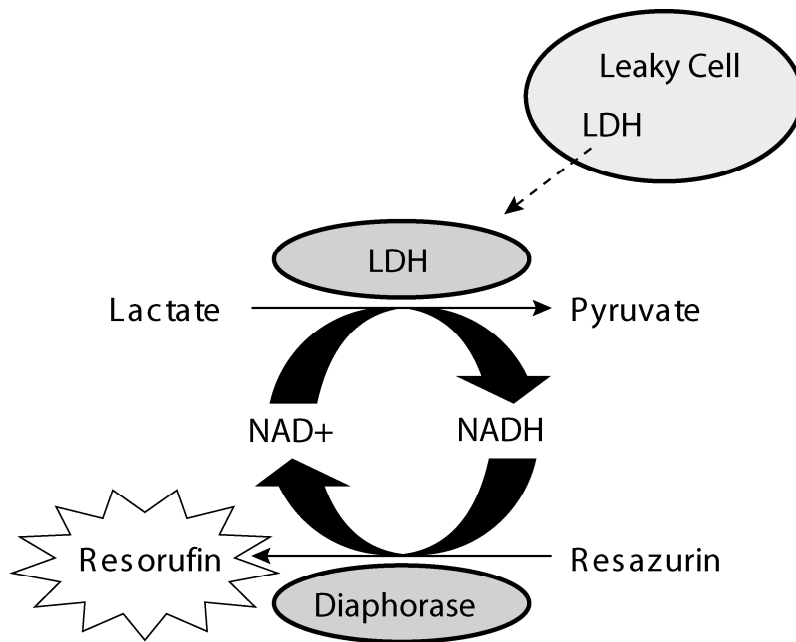


Esquema 1: Esquema de las diferentes etapas del cultivo de neuronas granulares de cerebelo.

2.3 Ensayo de viabilidad celular

Este ensayo se hizo para comprobar que las diferentes condiciones experimentales no afectaran la integridad celular. Cuando las células pierden la integridad de su membrana plasmática, liberan lactato deshidrogenasa (LDH) al medio de cultivo; por esta razón, el hecho de medir los niveles de LDH es un método rápido y fiable de análisis de la citotoxicidad. El kit Cyto-Tox-ONE (Promega, Woods Hollow, EEUU), permite relacionar la fluorescencia con el número de células no viables. La enzima LDH cataliza la conversión del lactato a piruvato, con la concomitante producción de NADH. El reactivo CytoTox-One, contiene un exceso de sustratos (lactato y NAD⁺) para forzar la reacción de LDH y producir NADH. Este último, se utiliza por la diaforasa para reducir la resazurina y transformarla en resorufina, compuesto fluorescente (**Esquema 2**). Si las células son viables, no se producirá una reducción significativa de resazurina. Como control, el kit dispone de un control positivo (exceso de LDH), y un control negativo (el tampón en el que se lleva a cabo la reacción).

Las células se cultivaron en placas de 96 pocillos a la densidad de 100.000 células/pocillo, en un volumen final de medio de 100 µl. El día del experimento, las placas se dejaron equilibrar a temperatura ambiente, se añadió el reactivo CytoTox-ONE™ y se dejó incubar durante 10 minutos a 22° C. Se utilizó un control positivo (lisado de células) como máximo valor de LDH, un control negativo sin células y el control de células en condiciones normales de cultivo (sin tratamientos). Finalmente se añadió la solución “Stop” que para la reacción, y se midió la señal de fluorescencia a 560 nm de excitación y 590 nm de emisión en un lector de placas FLUOstar (BMG labtech; Alemania).



Esquema 2: Reacción de la LDH que permite medir el nivel de integridad celular de forma indirecta.

2.4 Inmunocitoquímica

Dependiendo del objetivo que se quiso alcanzar, se utilizaron distintos protocolos para la detección de proteínas mediante técnicas inmunocitoquímicas.

2.4.1 Método de inmunodetección postfijación.

Las células cultivadas en cubreobjetos tratados con poly-L-lisina, se lavaron con tampón PBS (**Tabla III**), se fijaron durante 15 minutos a temperatura ambiente con paraformaldehído (PFA) al 4% diluido en PBS y, tras dos lavados, se permeabilizaron utilizando una solución de PBS con Triton X-100 al 0,2% durante 6 minutos en agitación. Posteriormente se incubaron durante 1 hora a 37° C, con PBS, al que se añadió: Triton X-100 al 0,05% y suero normal de burro (NDS) al 10% para bloquear los posibles sitios inespecíficos de unión de los anticuerpos.

Tabla III. Composición PBS 1x:

Compuesto	Concentración (mmol/L)	Concentración (g/L)
NaCl	137	8,01
KCl	2,7	0,20
Na ₂ HPO ₄ • 2 H ₂ O	10	1,78
KH ₂ PO ₄	2,0	0,27
pH	7,4	7,4

Tras este periodo, las células se incubaron durante toda la noche a 4° C con los anticuerpos primarios (**Tabla V**) correspondientes diluidos en TBS, con Triton X-100 al 0,05% y NDS al 1%. Tras tres lavados de 10 minutos con TBS, las células se incubaron durante una hora a 37° C con los correspondientes anticuerpos secundarios.

Tabla IV. Composición TBS 1x:

Compuesto	Concentración (mmol/L)	Concentración (g/L)
NaCl	150	8,76
Tris-HCl	50	6,05
pH	7,4	7,4

Tabla V. Anticuerpos empleados en este estos experimentos:

	ANTICUERPO PRIMARIO	ANTICUERPO SECUNDARIO
GluA1	- <i>C-terminal</i> - Millipore -conejo 1:300.	Alexa Fluor 594 anti-conejo - Life Technologies - 1:200.
GluA2	<i>N-terminal</i> - Chemicon (Millipore, ratón) 1:200.	Alexa Fluor 488 anti-ratón - 1:200.
GluA3	<i>N-terminal</i> - Chemicon (Millipore, ratón) 1:200.	Alexa Fluor 488 anti-ratón - 1:200.
GluA4	<i>C-terminal</i> - Upstate (Millipore, conejo) 1:200.	Alexa Fluor 594 anti-conejo - 1:200.
MAP2	Alexa Fluor 488 conjugated - Chemicon (Millipore, ratón) 1:1000.	
Na⁺/K⁺ ATPase β1	Millipore (conejo) 1:500.	Alexa Fluor 594 anti-conejo - 1:200.
Bassoon	Synaptic Systems (cobaya) 1:500.	Alexa Fluor 555 anti- cobaya - 1:200.
pCaMKIV (Thr 196)	Santa Cruz Biotechnology, (conejo) 1:200.	Alexa Fluor 488 anti-ratón - 1:200.

Después de varios lavados de 10 minutos con TBS los cubreobjetos se montaron utilizando el líquido de montaje prolong anti-fade (Invitrogen). Cuando se quisieron detectar sólo proteínas de la membrana plasmática, la incubación con los anticuerpos primarios (generados frente a epitopos extracelulares) se realizó antes de la permeabilización de las células.

2.4.2 Método de inmunodetección en células vivas

Células granulares de 7 DIV (días *in vitro*), sujetas a diferentes tratamientos, se incubaron durante 20 minutos con el anticuerpo primario (policlonal de conejo anti GluA1 NT, 10 µg/ml) a 37° C en medio de cultivo. El anticuerpo reconoce el dominio N-terminal de la subunidad GluA1 expuesto al medio extracelular. Después de varios lavados con medio HBM (**Tabla VI**) atemperado y con PBS, las células se fijaron con PFA al 4% disuelto en PBS durante 15 minutos a temperatura ambiente. Tras varios lavados con PBS, se incubaron con PBS que contenía suero de burro al 10% durante 1 hora a temperatura ambiente y se incubaron con el correspondiente anticuerpo secundario durante 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente, las células se permeabilizaron con una solución de PBS con Triton X-100 al 0,2% durante 6 minutos, y se incubaron con el anticuerpo anti-sinapsina I durante 1 hora a 37° C. Tras varios lavados con PBS/Triton X-100 al 0,1% y PBS solo, se incubaron 1 hora a 37° con el correspondiente anticuerpo secundario. Después de tres lavados de 10 minutos con PBS y uno con agua ultrapura para eliminar restos de sales, los cubreobjetos se montaron utilizando el líquido de montaje prolong anti-fade (Invitrogen).

Tabla VI. Composición del medio HBM (KCl 5mM):

Compuesto	Concentración (mmol/L)	Concentración (g/L)
NaCl	140	8,18
KCl	5	0,373
NaHCO ₃	5	0,42
NaH ₂ PO ₄	1.2	0,166
MgCl ₂	1	0,2
Glucosa	10	1,8
HEPES	10	2,38
CaCl ₂	1.33	0,196
pH	7,4	7,4

Tabla VII. Anticuerpos empleados en este estos experimentos:

	ANTICUERPO PRIMARIO	ANTICUERPO SECUNDARIO
GluA1	<i>-N-terminal</i> (Calbiochem, Conejo) 10 µg/ml.	Alexa Fluor 594 anti-conejo – Life Technologies – 1:200.
Sinapsina I	Synaptic Systems (ratón) 1:500.	Alexa Fluor 488 anti-ratón – 1:200.

2.4.3 Análisis

Con objeto de correlacionar la intensidad de marcaje con la cantidad de la proteína inmuno-detectada en las diferentes condiciones experimentales, todas las imágenes se adquirieron con las mismas condiciones de brillo y contraste. Las imágenes se analizaron con el software de análisis de imagen ImageJ. En primer lugar, la imagen se convirtió en una imagen de 8-bit en escala de grises. Para la creación de una máscara que permitiera la cuantificación de las regiones de interés se utilizó el programa informático Igor Pro 6, estableciendo unos parámetros que permitieran seleccionar sólo las regiones de interés, y quitando oportunamente las regiones que no pasaran el parámetro de calidad establecido. Como parametro de calidad, se establecieron unos valores estándar de fluorescencia 2 veces superiores a los valores de fluorescencia del fondo El programa, selecciona automáticamente los valores de fluorescencia establecidos por el criterio de calidad y crea una máscara en valores binarios (blanco y negro). La máscara se utilizó para medir la intensidad de fluorescencia, mediante el programa ImageJ, obteniendo valores de intensidad integrada o intensidad media de fluorescencia. La sustracción de fondo se hizo manualmente mediante la selección de regiones con fluorescencia más baja que las zonas inmunomarcadas. Se utilizó la máscara de los GluA para medir los valores de las mismas subunidades y también de MAP-2. Los resultados se representaron como la relación entre los valores de intensidad integrada de GluA y los de MAP-2. Se descartaron aquellos experimentos en los

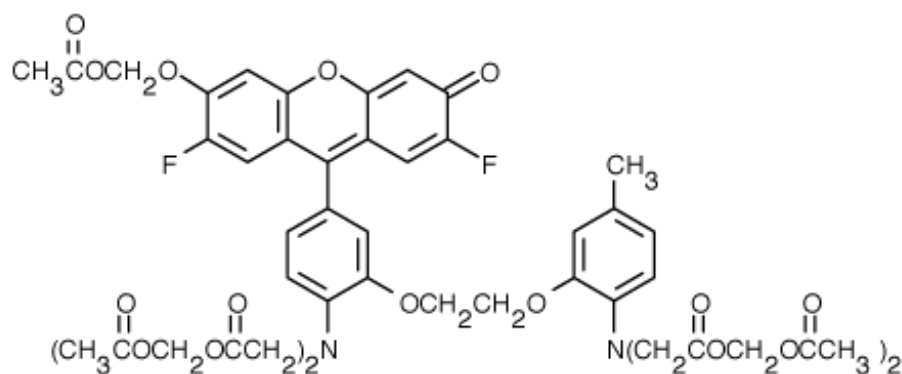
que la fluorescencia de MAP-2 no se mantuvo estable en las diferentes condiciones experimentales analizadas. Las imágenes se presentaron con el respectivo color detectado por los filtros de rodamina (rojo) o fluoresceína (verde).

Para determinar la densidad de receptores en la membrana plasmática, se cuantificó el número de clusters de GluA1 en cada campo con Igor Pro 6 y posteriormente se determinó la longitud de las fibras mediante el programa ImageJ, con una opción llamada NeuronJ, que permite medir la longitud total de las fibras nerviosas en cada campo. Para el cálculo de las micras, se estableció una equivalencia entre pixel y micras en función del objetivo utilizado. En este caso, utilizando un objetivo 100x, la conversión se hizo teniendo en cuenta que 1 pixel corresponde a 0,213 μm . La densidad para cada campo analizado (30 campos para cada condición) se calculó dividiendo el número total de clusters entre la longitud total de fibras y se expresa en n° de clusters/ μm .

Además, para conocer el porcentaje de subunidades enfrentadas a Sinapsina I, se obtuvieron las máscaras en valores binarios de las regiones de interés mediante el programa ImageJ, lo cual permitió establecer un umbral del área y la intensidad de luz que pareció más oportuna para seleccionar fielmente sólo las regiones específicas. Una vez obtenidas las máscaras, se sobrepuso la máscara de GluA1 a la de Sinapsina I, considerando enfrentadas, aquellas regiones que tuvieran al menos 1 pixel de coincidencia (Mondin y cols. 2011).

Los incrementos en las concentraciones de calcio en poblaciones se determinaron utilizando un lector de placa FLUOstar OMEGA, equipado con dos inyectores (BMG LabTechnologies, Offenburg, Alemania) y la sonda fluorescente de calcio Fluo-4 AM.

Se requiere la desacetilación de los dos grupos carboxilos presentes en la molécula de Fluo-4-AM (**Fig.1**), al igual que en el caso del Fura-2 AM (**Fig.4**) para que se una al catión Ca^{2+} y emita fluorescencia. En el caso del Fluo-4 la unión al Ca^{2+} no produce un desplazamiento en el máximo de su espectro de excitación. La excitación máxima de la molécula se consigue con luz de 485 nm y la emisión se registra a 520 nm. La K_d (constante de disociación) del Fluo-4 para el Ca^{2+} es mayor que la del Fura-2 por lo que el Ca^{2+} se disocia con una cinética más rápida.



Las neuronas granulares, mantenidas en cultivo durante 7 días *in vitro*, y sembradas en placas de 96 pocillos a una densidad de 100.000 células por pocillo, se incubaron con la sonda de fluorescencia Fluo-4 AM (5 μ M), en un medio TES (**Tabla VIII**), durante 45 minutos a 37° C.

Tabla VIII. Composición del medio tamponado con TES:

Compuesto	Concentración (mmol/L)	Concentración (g/L)
NaCl	140	8,8
KCl	5	0,373
CaCl ₂	1,33	0,196
MgCl ₂	1	0,2
Glucosa	10	1,8
TES	10	2,29
pH	7,4	7,4

Posteriormente, se lavaron con medio fresco y se incubaron durante otros 15 minutos para facilitar la desacetilación de la sonda. Todos los experimentos se hicieron a una temperatura de 37° C, y los datos se registraron en intervalos de 0,5 o 1 segundo. Las condiciones de lectura se fijaron seleccionando el filtro de excitación (485 nm) y de emisión (520 nm). Para medir las respuestas de Ca²⁺ en las células, se midió la fluorescencia basal durante 4 segundos y, posteriormente, las células se estimularon con AMPA (50 µM) y ciclotiazida (10 µM) durante 10 segundos. Como control positivo, las células se estimularon con KCl 30 mM durante 25 segundos (**Fig. 2**). Los resultados se expresaron como el valor de la fluorescencia en cada tiempo (F) dividido por el valor de las fluorescencias iniciales (F₀).

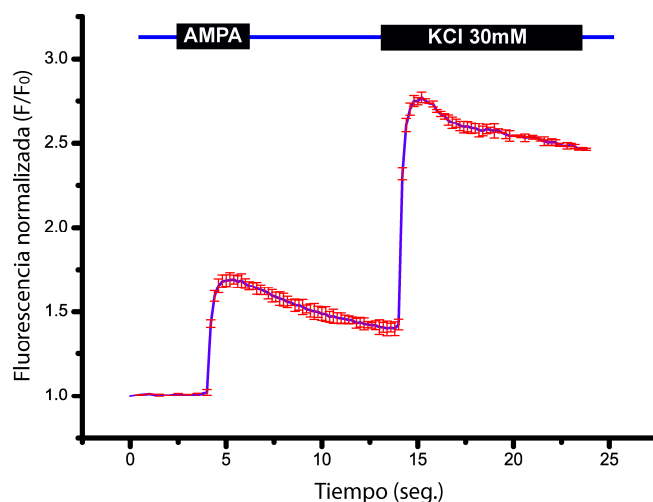


Figura 2. Determinación de la $[Ca^{2+}]$ intracelular con la sonda fluorescente Fluo-4, en poblaciones de neuronas estimuladas con AMPA + ciclotiazida y con KCl 30mM.

2.5.2 Determinación de Ca^{2+} intracelular en neuronas granulares individuales de 7 DIV

Para la determinación de las variaciones intracelulares de calcio en neuronas individuales se utilizó la sonda fluorescente Fura-2 AM. Este compuesto es suficientemente lipofílico para atravesar la membrana plasmática y alcanzar el interior celular, donde las esterasas citosólicas rompen el enlace éster. El Fura-2 liberado queda confinado en el citosol donde se une al Ca^{2+} libre para formar el complejo Ca^{2+} - Fura, que da lugar a una emisión fluorescente cuyo máximo se registra a una longitud de onda de 510 nm, produciéndose además un desplazamiento en el máximo de su espectro de excitación de 380 nm a 350 nm (**Fig. 4**).

Las neuronas granulares de cerebelo sembradas en cubreobjetos tratados con poly-L-lisina a una densidad de 100.000 células por cubreobjeto se mantuvieron en cultivo durante 7 días *in vitro*. Las células se incubaron con Fura-2 AM (3 μ M) durante 55 minutos a 37° C, en medio TES, y se lavaron para eliminar el exceso de sonda. Posteriormente los cubreobjetos con las células se montaron en una cámara de perfusión sobre la platina de un microscopio Nikon equipado con un objetivo de fluorescencia de inmersión en aceite 40x1.3

(NA). La excitación se realizó mediante un monocromador a 350 nm y 380 nm de forma alternativa y la luz emitida se capturó a través de un filtro centrado a 510 nm. Las imágenes se capturaron mediante una cámara iXonEM + EMCDD (ANDOR Technology) operando a 16-bits, y se almacenaron mediante un programa de imagen computerizada (Andor Software).

Dependiendo del experimento, se utilizaron distintos protocolos cuya duración fue de 6 minutos. A las células se les aplicó una perfusión continua de medio HBM suplementado con glucosa 10 mM y Ca^{2+} 1.33 mM. Se realizaron tres estimulaciones a 1 minuto, a 2 minutos y 40 segundos, y a 4 minutos y 20 segundos (**Fig. 3**). Para la perfusión de los medios con las distintas drogas se utilizó un sistema de perfusión con cambio automático de vía, atemperado a 37° C (Harvard instruments, Boston, USA), fijando un flujo continuo de 1ml/min.

Para el análisis se utilizó el programa de libre acceso ImageJ versión 1.39f (MacBiophotonics). Dependiendo del tipo de experimento, el procesamiento se hizo seleccionando regiones de los somas o de las dendritas como regiones de interés. Los registros que se muestran en este trabajo corresponden a relación existente entre la fluorescencia a 350 nm y a 380 nm (F_{350}/F_{380}) en función del tiempo. Antes de calcular la razón existente entre las dos longitudes de onda, se sustrajo el valor de fluorescencia de fondo a la sucesión de imágenes obtenidas con cada una de las longitudes de onda. El valor del fondo se estableció seleccionando la zona de menor fluorescencia y calculando el valor de su intensidad media.

Los resultados del análisis, como valores de intensidad media, se trasladaron al programa de gestión de datos Origin pro (versión 8) para su posterior análisis.

Los valores de fluorescencia de cada región analizada se normalizaron a los valores de la fluorescencia inicial. Se representan como $\Delta(F_{350/380}/F_{0350/380})$.

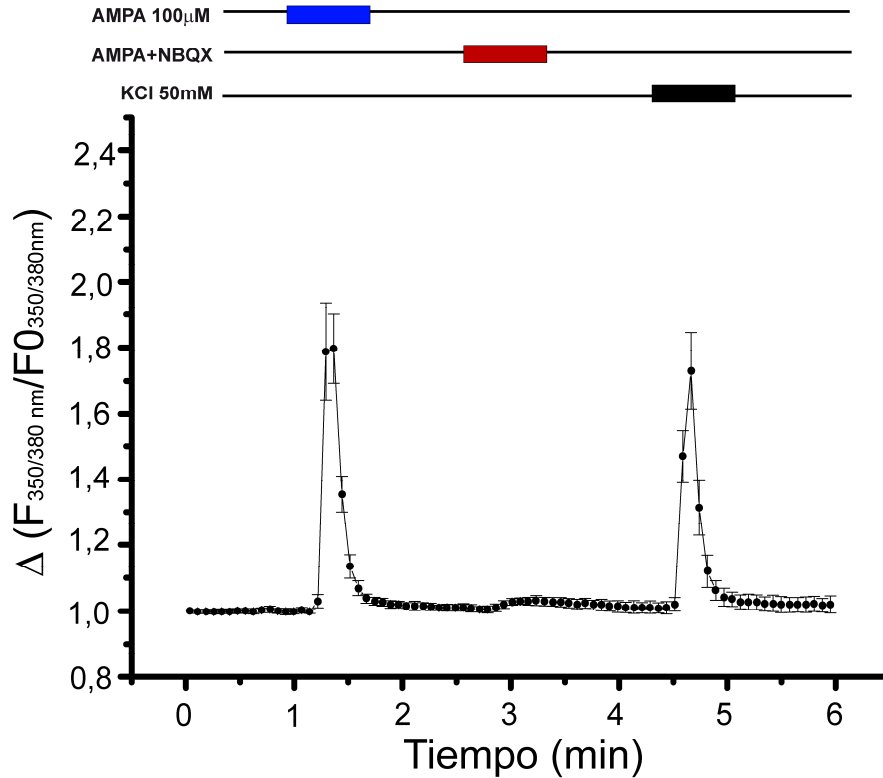


Figura 3. Ejemplo de la determinación de Ca^{2+} intracelular mediante Fura-2 AM, en neuronas individuales estimuladas con agonista específico de los receptores AMPA (S-AMPA), con AMPA más el antagonista específico NBQX y con KCl 50 mM.

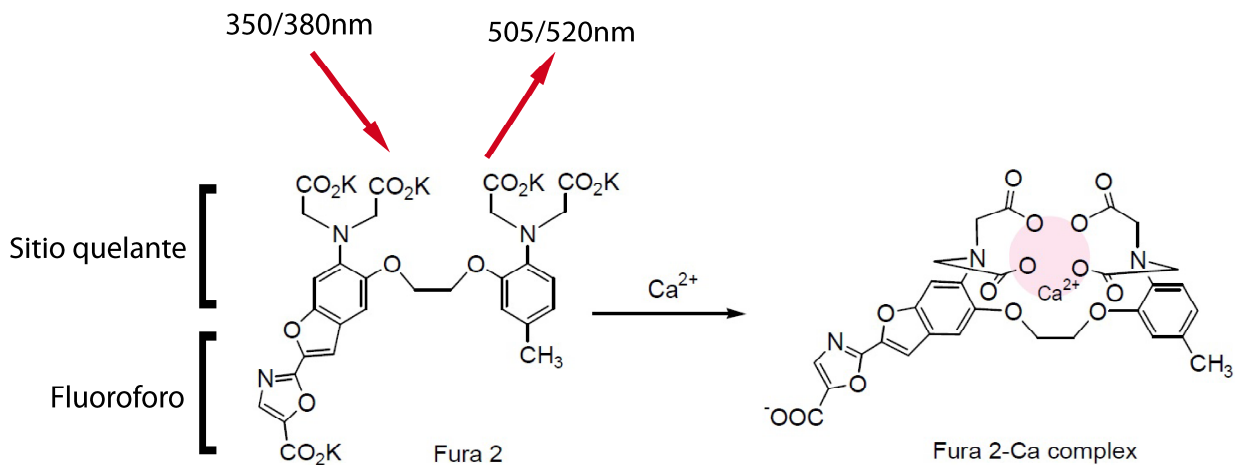


Figura 4. Estructura química del indicador de calcio Fura-2, excitable a luz ultravioleta (350/380nm). Su máximo de emisión se sitúa entre 502 y 520 nm. La interacción con el calcio produce un aumento en la emisión de fluorescencia y un desplazamiento del máximo de excitación.

2.6 Inmunohistoquímica

Según el estudio efectuado, ratas de 14 días o adultas, se anestesiaron inyectando ketamina/xilacina (40/5 mg/kg) por vía intraperitoneal. Posteriormente, se procedió a la perfusión cardiaca con solución salina (NaCl al 0.9%) heparinizada durante 5 minutos para eliminar la sangre y paraformaldehído al 4% durante 10 minutos para fijar los tejidos. Se extrajo el cerebro entero y se postfijo en solución de PFA al 4% en PB, durante toda la noche a 4° C. Al día siguiente se pasó a una solución crioprotectora de sacarosa al 30% (peso/volumen). Entonces, se procedió al corte sagital mediante vibratomo, recogiendo las secciones en PB 0,1 M pH=7,3 o en solución crioprotectora. Después de 3 lavados en PB 0,1 M se procedió al protocolo de inmunohistoquímica haciendo todas las incubaciones en PBS o PBS con detergente Triton X-100.

La incubación con los diferentes anticuerpos primarios (**Tabla IX**) se realizó en PBS con Triton X-100 al 0,3% y 1% de suero normal de cabra durante toda la noche a 4° C en agitación suave. Tras la incubación, se hicieron 4 lavados de 10 minutos en PBS con Tween al 0,2% y se incubó con los anticuerpos secundarios correspondientes en PBS con Triton X-100 al 0,3% y 1% suero normal de cabra durante 2 horas a temperatura ambiente en agitación suave. Después de 4 lavados en PBS Tween al 0,2% se transfirieron todas las secciones a PBS para facilitar el montaje en portas pretratados con poly-L-lysina haciendo uso de un pincel. Una vez montadas se aclararon todas las secciones con agua ultrapura para eliminar los excesos de sales, y se puso una gota de liquido de montaje con DAPI, poniendo un cubre encima de cada sección.

Tabla IX. Anticuerpos empleados en los experimento de inmunohistoquímica:

	ANTICUERPO PRIMARIO	ANTICUERPO SEGUNDARIO
GluA1	C-terminal - Millipore conejo 1:200.	Alexa Fluor 594 anti-conejo - Life Technologies - 1:200.
GluA2	N-terminal - Millipore - rabbit 1:300.	Alexa Fluor 488 anti-ratón - Life technologies - 1:200.
GluA3	N-terminal - Millipore - ratón 1:200.	Alexa Fluor 488 anti-ratón - Life technologies - 1:200.
GluA4	C-terminal - Millipore - ratón 1:200.	Alexa Fluor 594 anti-conejo - Life Technologies - 1:200.
GABA α6	Millipore - conejo 1:500.	Alexa Fluor 594 anti-conejo - Life Technologies 1:200.
GFAP	Sigma-Aldrich - ratón 1:400.	Alexa Fluor 488 anti-ratón - Life technologies - 1:200.

2.7 Protocolo de silenciamiento de proteínas mediante siRNAs específicos

Las células se transfectaron, a los cuatro días *in vitro* (4DIV), con un siRNA diseñado para suprimir la expresión de una proteína determinada (cGKII o CaMKIV) o con un control negativo (siRNA de secuencia aleatoria que no produce el silenciamiento de ninguna proteína). Para determinar la eficiencia de la transfección se utilizaron siRNAs fluorescentes, cuya incorporación a las células se analizó mediante microscopía de epifluorescencia (Fig.5).

En el caso de la CaMKIV (Santa Cruz Biotechnology, EEUU), la eficacia del silenciamiento se confirmó mediante inmunocitoquímica con un anticuerpo que reconoce la forma activa de la CaMKIV. Para verificar el silenciamiento de la cGKII se midieron o bien los niveles de ARNm 24 horas después de la transfección mediante PCR cuantitativa utilizando sondas TaqMan según el

método que se describe en la continuación. Se utilizaron unos oligonucleótidos y sondas TaqMan prediseñados por Applied Biosystems utilizando GADPH como control endógeno (Rn00435938_ml para cGKII y Rn01775763 para GADPH).

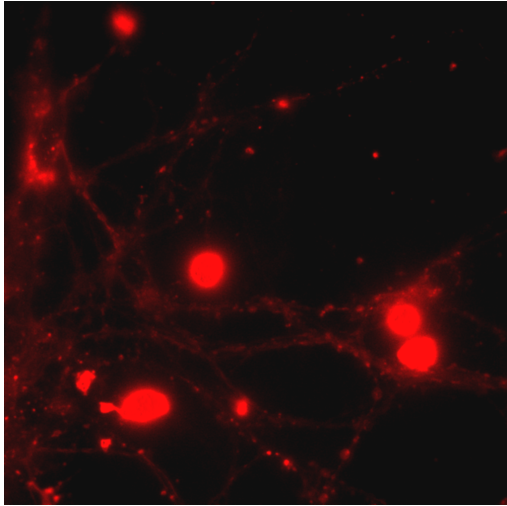


Figura 5. Eficiencia de transfección utilizando siRNAs fluorescentes.

2.8 Experimentos de PCR simple y cuantitativa

2.8.1 – Extracción de ARN

Todo el material empleado en la extracción fue tratado con DEPC, para eliminar las ARNasas, y evitar posibles problemas de degradación de las muestras por la actividad de estas enzimas. Para la extracción del ARN, se utilizaron células granulares de cerebelo en cultivo en placas de 6 pocillos, sembradas a una densidad de 3×10^6 células/pocillo. Se utilizó el kit (RNAeasy Mini kit, Quiagen Iberia S.L., Madrid) de Quiagen, basado en la capacidad de unión del ARN a una membrana de gel de sílice en presencia de una elevada concentración de sales. Para levantar las células se emplearon raspadores estériles y se utilizaron 600 μ l de tampón desnaturante que contiene isotiocianato de guanidina y β -mercaptoetanol (10 μ l/mL) para homogenizar las células. Las muestras, una vez disgregadas, se pasaron varias veces a través de agujas estériles de tamaño 20-G (0,9 mm diámetro) para completar la homogeneización y disminuir la viscosidad del lisado.

A continuación, se añadió un volumen igual de etanol al 70%, para conseguir las condiciones óptimas de unión, y las muestras se centrifugaron a $\geq 8000 \times g$ en columnas que contenían la membrana de silicagel a la que se unen, por absorción, moléculas de ARN mayores de 200 nucleótidos. Por tanto los ARN 5S, 8S, 5S y de transferencia quedaron en el eluido. Tras una serie de lavados se extrajo el ARN en agua libre de RNasas.

La concentración de ARN en las muestras se determinó mediante el kit de Molecular Probes, RiboGreen RNA Quantitation Reagent. El RiboGreen unido al ARN tiene un máximo de excitación a 500 nm y el de emisión a 525 nm.

2.8.2- Reacciones de Transcripción Inversa (RT) y Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

2.8.2.1 Reacciones de Transcripción inversa

Las reacciones de RT-PCR simple se llevaron a cabo en dos pasos empleando el kit TaqMan Probe de Applied Biosystems. La reacción de RT se realizó, en un tampón apropiado, 3,125 U/ μ L de transcriptasa inversa MultiScribe, 0,5 U/ μ L de inhibidor de RNasa, 5,5 mM de $MgCl_2$, la mezcla de dATP/dCTP/dGTP/dUTP (0.5 mM cada uno), hexanucleótidos (2,5 μ M) y 1 μ g de ARN, para un volumen final de 50 μ L por tubo. Las condiciones de reacción se resumen en el siguiente esquema:

10 min, 25° C $\rightarrow$ **Incubación**; 45 min, 48° C $\rightarrow$ **Transcripción inversa**; 5 min, 95° C $\rightarrow$ **Inactivación de la enzima**.

Los oligonucleótidos específicos para las 4 subunidades de los receptores AMPA se diseñaron utilizando el programa Primer Express (Applied Biosystems) y las secuencias publicadas en el GeneBank para estos ARNm y están resumidos en la **tabla X**:

Tabla X. Oligonucleótidos diseñados para las cuatro subunidades de los receptores AMPA.

	Número de acceso	Cebador sentido: número de base y secuencia	Cebador anti-sentido: número de base y secuencia	Amplicón (pb)
GluA 1	NM_031608	2612, 5`TGTGGCAGGCGTGTCTCA CA3`	2762, 5`CCGTATGGCTTCATTGATG GA3`	151
GluA 2	NM_017261	2003, 5`ATCAAGAAGCCTCAGAAG TCCAAA3`	2103, 5`CTGACCCCAATGTAGGCA AA3`	101
GluA 3	NM_032990	1800, 5`GAAGAACCTCGTGACCCA CAA3`	1950, 5`ACCAAACCCCTCCAACAAT G3`	151
GluA 4	NM_017263	1775, 5`CTTCTTGGACCTCTGGCC TAT3`	1925, 5`CTGGTCACTGGGTCCTTCC TT3`	151

2.8.2.2 Reacciones de PCR

Para las reacciones de PCR se emplearon 5 µL de producto de RT para un volumen final de 50 µL. Las reacciones se llevaron a cabo en el tampón requerido y se añadieron los oligonucleótidos a una concentración de 300 nM, 5,5 mM de MgCl₂, 200 µM de dATP, 200 µM dCPT, 200 µM dGTP, 400 µM dUTP, y 0,025 U/µL de la enzima AmpliTaq Gold de Applied Biosystems. La reacción se realizó en un termociclador Mastercycler personal de Eppendorf (Alemania) y los productos de PCR se resolvieron en geles de agarosa al 2% con 0,1µM SYBR safe DNA gel stain (Molecular Probes), a 100 V. La reacción de PCR se desarrolló según el siguiente esquema:

10 min, 95° C	40 ciclos	7 min, 68° C
Activación	40s, 94° C desnaturalización 30s, 60° C hibridación 45s, 68° C elongación	Elongación

2.8.3 RT y PCR cuantitativa: método de sondas Taqman

Para cuantificar el nivel de expresión de los diferentes ARNm, se utilizó la técnica de PCR cuantitativa que permite detectar la aparición de un producto de PCR mientras la reacción en cadena de la polimerasa se está desarrollando. La cuantificación se basa en la detección del producto de ADN molde amplificado, siendo su aparición directamente proporcional al nivel de expresión. El ADN molde es un cADN obtenido de una reacción de transcripción inversa a partir de ARNm, por tanto la aparición de un amplicón esta relacionada con la cantidad de ARNm codificante para el gen objeto de estudio.

En este trabajo se han utilizado sondas Taqman, que consisten en oligonucleótidos, complementarios a una secuencia de la región amplificada, unidos a dos fluoróforos en sus extremos 5' (FAM o VIC) y 3' (TAMRA). Cuando ambos están unidos a la molécula no emiten fluorescencia. Sin embargo cuando la sonda Taqman se degrada, en el transcurso de la reacción de amplificación, el fluoróforo FAM emitirá fluorescencia. Para llevar a cabo la cuantificación es necesario emplear para la reacción de PCR una polimerasa con actividad 5'-exonucleasa, en nuestros experimentos se usó la polimerasa AmpliTaq®Gold de la casa Applied Biosystems, capaz de eliminar todos los desoxirribonucleótidos en el extremo 5' del oligonucleótido. Tal y como se esquematiza en la Figura 6, durante el desarrollo de la PCR se excita la mezcla de reacción con una luz láser, luz de alta energía, como consecuencia de esta excitación el fluoróforo FAM emite luz de una longitud de onda que es absorbida por la molécula enmascaradora TAMRA mientras se encuentren lo suficientemente próximos. Al actuar la polimerasa con actividad 5'-exonucleasa se libera el fluoróforo y la distancia entre las moléculas fluorescentes aumenta impidiendo que TAMRA absorba con eficacia la emisión fluorescente de FAM.

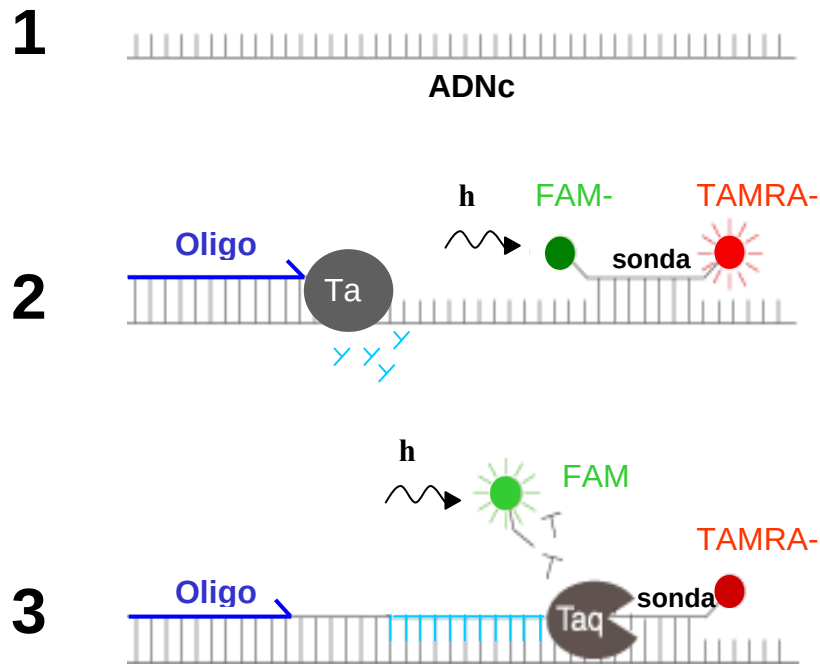


Figura 6. Esquema de la detección de los productos de PCR mediante el empleo de sondas Taqman.

En el momento en que FAM es liberado comienza a detectarse emisión fluorescente de la longitud de onda correspondiente a este fluoróforo, sin embargo es necesario que la concentración de amplicón alcance un valor umbral para que la fluorescencia detectada sea significativamente distinta a la fluorescencia basal. Esta acumulación de producto suficiente se produce al alcanzar la fase exponencial, en donde la eficiencia de la PCR es máxima e idéntica en todos los pocillos que contienen las muestras. En este punto de la reacción se ha de escoger el valor umbral o “threshold” que determinará el valor de C_T (Fig. 7) para cada uno de los amplicones y que permite posteriormente la cuantificación de ARNm.

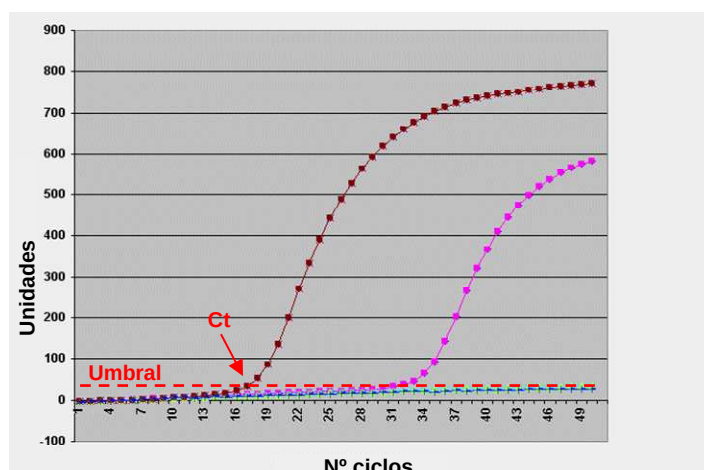


Figura 7. Modelo de las curvas de amplificación obtenidas tras el análisis con el programa SDS de Applied Biosystem.

La flecha muestra el punto considerado como el valor de C_T , este valor coincide con el de número de ciclos de amplificación en la reacción de PCR necesarios para iniciarse el incremento exponencial de fluorescencia.

En este tipo de ensayos es necesario que, paralelamente a las muestras de interés, se analice también la expresión de otro gen distinto, que desempeñe las funciones de control interno, de esta forma se evita que problemas de pipeteo o imprecisiones en la cuantificación del ARN afecten a la cuantificación posterior. Los genes empleados como referencia o “housekeeping” deben ser genes cuya expresión sea estable en el tiempo y en respuesta a los tratamientos farmacológicos cuyos efectos se quieran analizar. En nuestro caso el gen de referencia elegido fue el de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH). Para su cuantificación se usó un kit de Applied Biosystems que incluye la pareja de oligonucleótidos específicos y la sonda Taqman correspondiente, marcada en el extremo 5' con el fluoróforo VIC y en el extremo 3' con la molécula que actúa como enmascaradora TAMRA. En cada uno de los ADNc que se analiza se determina el valor de C_t del gen GAPDH, este valor ha de ser similar en todas las muestras para que la cuantificación pueda considerarse fiable ya que las variaciones en la concentración del gen de referencia en la mayor parte de los casos son debidas a una distinta cantidad de ADNc empleado como molde. Los valores de C_t obtenidos para las muestras se

normalizan respecto a los de la GAPDH cuando éstos son similares, lo que permite corregir los problemas derivados de pequeñas variaciones en el ADNc de partida.

Para realizar estas reacciones se utilizó una mezcla comercial Taqman Universal Master Mix que contenía: 5,0 mM MgCl₂, 200 µM dATP, 200 µM dGTP, 400 µM de cada uno de los oligonucleótidos específicos y 300 nM de la sonda Taqman. La reacción se inició añadiendo los 5 µl de ADNc hasta alcanzar un volumen final de 25 µl. Las condiciones en las que se desarrolló la reacción se resumen en el siguiente cuadro:

2 min, 50 ° C	10 min, 95°C	40 ciclos	4 ° C
Activación de la Amperasa	Activación de la AmpliTaq Gold	15 s, 95°C desnaturalización 1min, 60°C hibridación y elongación	∞

2.9. Detección de proteínas mediante Inmunotransferencia

Se utilizaron distintos protocolos de extracción de proteínas dependiendo de si se quería analizar extractos celulares totales o correspondientes a alguna fracción subcelular determinada. Para la detección de cambios en la expresión de los receptores AMPA en membrana, se utilizó un protocolo que permite la separación de la fracción de membrana. Las células mantenidas en cultivo en placas de 6 pocillos a una densidad de 3 x 10⁶ se homogenizaron con 20 mM Tris-HCl (pH=7,4) que contenía 300 µL de tampón 150 mM NaCl, 10 mM EDTA e inhibidores de proteasas (Pierce). El homogenizado se centrifugó a 800xg durante 10 minutos a 4°C, recogiendo el sobrenadante. Este último se centrifugó a 30.000xg durante 40 minutos para obtener la fracción enriquecida en membrana, y el precipitado se resuspendió en una disolución tamponada de 10 mM Tris-HCl (pH=7,4) que contenía: 2 mM EDTA, 10 mM CHAPS e inhibidores de proteasas.

En otros experimentos se procedió a la extracción total de proteínas. Las células en cultivo a 7-8 DIV, tras un lavado con PBS atemperado, se homogenizaron durante 15 minutos en agitación constante con un medio RIPA (**Tabla XI**) (Thermo scientific). Después las muestras se centrifugaron a 14.000xg durante 10 minutos, se guardó el sobrenadante y se descartó el precipitado.

Tabla XI. Composición del tampón RIPA:

Compuesto	Concentración
Tris-HCl (pH 7.4)	50 mM
NaCl	100 mM
Deoxicolato sódico	0,5%
SDS	0,2%
EDTA	1mM
Inhibidor de proteasas	1:100

La concentración de proteínas de las diferentes muestras se determinó mediante el método de Bradford, midiendo absorbancia a 595 nm. Las muestras se diluyeron oportunamente para evitar que los diferentes detergentes pudieran interferir en la determinación.

A las diferentes muestras se añadió una solución 5 veces concentrada del tampón de carga de electroforesis (concentraciones finales: 10% (v/v) glicerol; 5% (v/v) β -mercaptoetanol; 2% (p/v) dodecilsulfato sódico (SDS); 0,0005% azul de bromofenol; 62,5 mM Tris-HCl). Con objeto de desnaturalizar las proteínas, las muestras se sometieron a 100°C durante 5 minutos en un multibloque. Los diferentes extractos proteicos se analizaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato sódico (Laemmli 1970). 10-15 μ g de mezcla de proteínas se cargaron en pocillos de geles de acrilamida a un porcentaje (p/v) variable según las necesidades de cada experimento en el sistema de electroforesis mini PROTEAN Tetra cell (Bio Rad) y la electroforesis se desarrolló a 4°C en tampón Tris/SDS (**Tabla XII**) a un amperaje constante de 20 mA/gel. Uno de los pocillos del gel se reservó para una mezcla de patrones

proteicos coloreados de peso molecular (rango 10-250 KDa) (Bio Rad). Tras el proceso electroforético, los geles se equilibraron durante 5 minutos en tampón de transferencia (**Tabla XIII**) y se transfirieron a una membrana de celulosa (previamente hidratada en agua ultrapura, y equilibrada en tampón de transferencia) durante 1 hora y media a amperaje constante de 250 mA en el sistema mini PROTEAN de Bio-Rad.

Tabla XII. Composición del tampón de electrofóresis:

Compuesto	Concentración mmol/L	Concentración g/L
Tris-HCl	25	3.03
SDS	1%	1
Glicina	200	15
pH	7.4	7.4

Tabla XIII. Composición del tampón de transferencia:

Compuesto	Concentración mmol/L	Concentración g/L
Tris-HCl	25	3.03
Metanol	0.1%	200ml
Glicina	192	14.4
pH	7.4	7.4

Finalizada la transferencia, las membranas se incubaron con solución de bloqueo (Li-Cor biosciences) durante 1 hora y media en agitación constante y a temperatura ambiente, para bloquear las interacciones inespecíficas con los diferentes anticuerpos primarios empleados (**Tabla XIV**). A continuación, se realizó la incubación con el anticuerpo primario en el tampón de bloqueo, empleando las diluciones necesarias para cada caso, durante toda la noche a 4°C con agitación orbital continua. Tras la eliminación del exceso de anticuerpo, lavando con PBS que contenía 0,1% Tween-20, se realizó la incubación con el anticuerpo secundario IRD (Li-Cor biosciences) a temperatura ambiente

durante 1 hora, y en ambiente protegido de la luz visible. Tras 4 lavados con tampón PBS que contenía 0,1% Tween-20 y un último lavado con PBS solo, una vez seca, la membrana se analizó en un sistema Odyssey. En cada membrana se realizó la detección de la proteína de interés y la de una proteína utilizada como control de carga (ej. β -tubulina). Posteriormente, las imágenes se analizaron mediante el software Odyssey 2.0. Los valores de densitometría a de las proteínas de interés se normalizaron con los valores de densitometría de los controles de carga.

Tabla XIV. Anticuerpos empleados en experimentos de Inmunotransferencia:

	ANTICUERPO PRIMARIO	ANTICUERPO SECUNDARIO
GluA1	- C-terminal- Millipore conejo 1:1000 . - N-terminal – Calbiochem- conejo 5 μg/ml .	Li-Cor- IRDye 800CW Goat anti-conejo – 1:15000
PO-SER845-GluA1	Millipore -conejo – 1:2000 .	Li-Cor- IRDye 800CW Goat anti-conejo – 1:15000
GluA4	C-terminal – Upstate (Millipore) -conejo – 1:1000 .	Li-Cor- IRDye 800CW Goat anti-conejo – 1:15000
Na⁺/K⁺ ATPase β1	Millipore -conejo – 1:5000 .	Li-Cor- IRDye 680RD Goat anti-conejo – 1:15000
β-Tubulina	Sigma-Aldrich- ratón – 1:5000 .	Li-Cor- IRDye 680RD Goat anti-ratón – 1:15000
β-Actina	Life technologies- ratón – 1:5000 .	Li-Cor- IRDye 680RD Goat anti-ratón – 1:15000

2.9.1 Fraccionamiento subcelular de cerebelos de ratones de 14 días

Los ratones se adquirieron en el animalario del Skirball Institute de la New York University; los ratones carentes de la proteína cGKII fueron generados por Pfeifer y cols. (1996), y mediante el cruce de parejas de heterocigotos, obtuvimos ratones homocigotos tanto para el gen normal de la proteína cGKII (+/+) como para la deficiencia del mismo (-/-). La edad de los ratones usados para nuestros experimentos fue de 14 días.

Se siguió el protocolo descrito por Jordan y cols. (2004) con ligeras modificaciones. Los cerebelos se utilizaron recién aislados o conservados en nitrógeno líquido inmediatamente después de la disección y mantenidos a -80° C hasta el día del fraccionamiento. Todas las centrifugaciones y los pasos del fraccionamiento, se desarrollaron a 4° C. El primer paso fue la homogenización de los cerebelos en 1 ml de solución A (0,32 mM Sacarosa, 1 mM NaHCO₃, 1 mM MgCl₂, 0,5 mM) con inhibidores de proteasas y fosfatasas. Una alícuota del homogenado se guardó como fracción total. Los homogenados se diluyeron 10x (peso/volumen) con la solución A y se centrifugaron a 1000xg durante 10 minutos. El sobrenadante se guardó, y el precipitado se re-homogeneizó en solución A y se centrifugó a 1000xg durante 10min. Posteriormente, la muestra se sometió a una centrifugación a 150.000xg durante 30 minutos para obtener la fracción P2 cruda. El precipitado, se resuspendió en solución B (0,32 M Sacarosa, 1 mM NaHCO₃). Durante este tiempo, se prepararon gradientes de sacarosa (5,5 ml de 1 M sacarosa arriba; 5,5 ml de 1,2 M sacarosa abajo), y 1 ml de cada muestra se depositó sobre cada gradiente. Los gradientes se centrifugaron a 82.500xg durante 2 horas. La función del gradiente es la de permitir una separación de la fracción de sinaptoneurosomas. Tras la primera centrifugación, los precipitados se diluyeron (5x) en solución B (v/v) y se centrifugaron a 150.000xg durante 30 minutos, al fin de obtener la fracción de sinaptoneurosomas, que representan la fracción enriquecida en terminales sinápticos. Parte del precipitado se resuspendió en una solución de Tris HCl/SDS (12 mM/4%) y se puso en agitación durante 30 minutos, se conservó

80

como fracción de sinaptoneurosomas. La otra parte se resuspendió en una solución compuesta por Triton X-100 al 1%, 0,32M sacarosa y 12 mM Tris HCl para obtener la fracción de densidad post-sináptica llamada PSD ("post synaptic density"). La muestra se sometió a una centrifugación de 15000xg durante 30 minutos a 4° C, y se resuspendió la fracción de PSDs en solución de Tris/SDS (12 mM Tris HCl; 4% SDS).

Las proteínas se separaron mediante electroforesis en gel de acrilamida y se transfirieron utilizando el mismo método descrito anteriormente. Finalmente, la presencia de GluA1 y su forma fosforilada en Ser845 en las diferentes fracciones se analizó mediante los anticuerpos anti-GluA1 y anti Ser845-PO₄ GluA1 (Millipore). La cuantificación se hizo, normalizando al control de carga (β -actina, Life Technologies S.A.) y a la cantidad de proteína en los homocigotos cGKII (+/+).

2.9.2 Experimentos de coimmunoprecipitación

Los extractos de cerebelo de rata de 14 días se homogenizaron en una solución salina y se sometieron a una centrifugación a 20.000xg con el fin de aislar las membranas. El precipitado, se resuspendió en un tampón RIPA durante 30 minutos a 4° C. Una vez solubilizadas, las suspensiones (1mg/ml) se centrifugaron durante media hora a 13.000xg y los sobrenadantes se inmunoprecipitaron durante toda la noche a 4° C en rotación constante con los siguientes anticuerpos: anticuerpo policlonal de conejo dirigido contra la proteína cGKII (Antibodies-online GmbH, Aachen, Germany); anticuerpo de ratón contra el dominio N-terminal de GluA1 (Millipore); monoclonal de conejo contra el dominio N-terminal de GluA1 (Calbiochem). Como control negativo de los anticuerpos de ratón y conejo se usaron anticuerpos obtenidos en estos animales dirigidos contra una proteína que no se encuentra en nuestra preparación, el polipéptido sintético Flag. Todos los anticuerpos utilizados se emplearon a una concentración de (2 μ g/ml). A la mañana siguiente, las muestras se incubaron durante 60 minutos (a 4° y en rotación constante) con las esferas de inmunoprecipitación (20% v/v) True-Blot (ebioscience) para ratón o

conejo. Tras la incubación, se realizaron dos lavados con tampón RIPA refrigerado, otras dos con RIPA diluido 1:10 en TBS (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 100 mM NaCl) y un último con TBS. Las muestras se centrifugaron a 10.000xg (1 minuto) y los precipitados se mezclaron suavemente (por inversión) con el tampón añadido cada vez. Finalmente, se eliminó el sobrenadante mediante aspiración con una jeringuilla de calibre 28 y se añadieron 100 µl de tampón de carga Laemmly (0,125 M Tris-HCl pH 6,8, 4% SDS, 20% glicerol, 0,004% azul de bromfenol). A continuación, se disociaron los inmunocomplejos añadiendo DTT 50 mM recién preparado y calentando la muestra a 100° C con agitación fuerte durante 10 minutos.

Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 10.000xg durante 3 minutos y se recogieron los sobrenadantes (evitando recoger las esferas) para cargarlos en un gel de poliacrilamida al 7,5%. Tras la electroforesis (PAGE-SDS) a voltaje constante (150 V) durante 1 hora y media, las proteínas se transfirieron a membranas de polivinilidenfluoruro (PVDF) previamente tratadas con metanol 100%, mediante un sistema de transferencia en semiseco (tampón del ánodo: Tris-Base 0,3 M y metanol al 20 %; tampón del cátodo: ácido 6-amino caproico 40 mM y metanol al 20 %).

A continuación, para evitar la unión inespecífica de los anticuerpos primarios a la membrana, ésta se bloqueó durante 1 hora en PBS suplementado con Tween al 0,05 % y leche desnatada liofilizada al 5 %. Las membranas se incubaron con el respectivo anticuerpo primario (anti-cGKII o anti-GluA1) a 4° C durante toda la noche en agitación constante. A la mañana siguiente, la membrana se lavó 3 veces con tampón PBS suplementado con Tween al 0,05 % durante 5 minutos para, posteriormente, ser incubada en presencia del anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa de rábano.

Como los anticuerpos primarios usados para la inmunoprecipitación de cGKII y los utilizados en la inmunodetección de GluA1 son de conejo, es posible que el anticuerpo secundario anti-conejo se una tanto a las inmunoglobulinas correspondientes al anticuerpo primario usado en la inmunodetección como a las inmunoglobulinas residuales correspondientes al anticuerpo primario usado en la inmunoprecipitación que hayan sido cargadas

en el gel junto con las proteínas inmunoprecipitadas. Para evitar este fenómeno, la unión no deseada, se usó el anticuerpo secundario del sistema TrueBlot (1:1000; diluído en tampón de bloqueo con leche desnatada al 5 %), que se une específicamente a las inmunoglobulinas de conejo pertenecientes a los anticuerpos primarios usados en la inmunotransferencia, que no han sido sometidas a desnaturalización, pero no a las inmunoglobulinas residuales procedentes de la inmunoprecipitación, ya que estas últimas sí han sido desnaturalizados mediante DTT, SDS y calor; de este modo, se evita que el marcaje correspondiente a las inmunoglobulinas residuales de la inmunoprecipitación interfiera con el de las proteínas de interés. Finalizada la incubación de 1 hora con el anticuerpo secundario TrueBlot (en oscuridad, temperatura ambiente y agitación constante), se realizaron tres lavados de 5 minutos en PBS con Tween al 0,05 % para, a continuación, llevar a cabo el revelado del anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa de rábano unido a la membrana mediante el kit de revelado Supersignal West Pico Chemiluminescent Substrate (ThermoScientific). Este kit, contiene una mezcla de peróxido de hidrógeno, sustrato quimioluminiscente, Luminol, y un potenciador de quimioluminiscencia (Pierce); de este modo, al entrar en contacto con esta mezcla, la peroxidasa de rábano (mediante el peróxido de hidrógeno) oxida al luminol dando lugar a una quimioluminiscencia que va a estar incrementada por el potenciador de quimioluminiscencia y que, finalmente, tras un tiempo de revelado de entre 5 y 10 minutos (dependiendo de la intensidad y grado de saturación de la señal) detectamos con un equipo de imagen LAS-3000 de Fujifilm Life Science.

Tabla XV. Anticuerpos empleados en los experimentos de co-IP:

	ANTICUERPO PRIMARIO	ANTICUERPO SECUNDARIO
GluA1	- <i>N-terminal</i> - Calbiochem conejo 1µg/ml . - <i>N-terminal</i> - Millipore - anti-ratón 1µg/ml .	-horseradish-peroxidase (HRP)-conjugated anti-conejo (eBioscience, San Diego, CA, USA) o anti-ratón IgG (Trueblot) - 1:1000 .
cGKII	Antibodiesonline - conejo - 1µg/ml .	- horseradish-peroxidase (HRP)-conjugated anti-conejo - 1:1000 .

2.10 Ensayo de edición del ARNm de GluA2

Para analizar el grado de edición del ARNm que codifica para la subunidad GluA2, se hizo primero una RT-PCR utilizando los siguientes oligonucleótidos (**Tabla XVI**), para amplificar una región de 351 pares de bases del ARNm que contiene el sitio de edición Q/R.

Tabla XVI: Secuencias de bases utilizadas para amplificar un fragmento que contiene el sitio de edición de GluA2.

	Número de acceso	Cebador sentido: número de base y secuencia	Cebador anti-sentido: número de base y secuencia	Amplicón (pb)
GluA2 (Q/R)	NM_017261	2003, 5' ATCAAGAAGCCTCAGAAGTC CAAA3'.	2353, 5'TAAGTTAGCCGTGTAG GAGGAGATTAT3'.	351

Después de la amplificación con RT-PCR del ARN total (94° C, 10 minutos para activar la polimerasa y 40 ciclos de 95° C 15 segundos, 62° 1 minuto; seguido de 7 minutos a 72° C), el producto de PCR se purificó mediante un kit QIAquick PCR purification kit (Quiagen), según las instrucciones de la

casa comercial. Una alícuota de la muestra, se incubó con la enzima BbvI para evaluar la relación de las formas editada/no editada, dado que la conversión A en G en la secuencia editada del ARNm de GluA2, elimina el sitio de restricción para la enzima BbvI presente en la forma no editada. Como control positivo se utilizó el plásmido pBR322, que tiene varios sitios de restricción para la enzima BbvI. Otra alícuota del producto de PCR, se incubó con la enzima AclI, que digiere específicamente la forma editada generando dos fragmentos de ADN de 250 y 100 pdb.

Los fragmentos de ADN se resolvieron en gel de agarosa al 2% en TAE (**Tabla XVII**) con 0.1 µl/ml de SYBR safe DNA gel stain (Molecular Probes) a 100 V.

Tabla XVII. Composición del tampón TAE:

Compuesto	Concentración 50x	Concentración 1x
Tris-HCl	2M	40mM
EDTA	50mM	1mM
pH	8.0	8.0

IV. RESULTADOS

1. Regulación homeostática de la expresión de los receptores AMPA en células granulares de cerebelo

Las respuestas fisiológicas de los receptores AMPA pueden regularse mediante la expresión diferencial de las cuatro subunidades, la diferente combinación entre ellas, así como por su número en la superficie celular (Lu y cols. 2009). Las propiedades específicas de los receptores AMPA dependen de la naturaleza de las subunidades que los componen. Por ejemplo, la inclusión de una o más subunidades GluA2 confiere impermeabilidad a Ca^{2+} (Seeburg 1996; Rozov y cols. 2012). La expresión de las cuatro subunidades de estos receptores está regulada de forma dependiente con el desarrollo (Sans y cols. 2000), y su número en la superficie sináptica es el resultado del reciclaje entre la membrana plasmática y las membranas de los orgánulos intracelulares (Moulder y cols. 2003; Greger y Esteban 2007). Además, *in vitro*, se ha demostrado que la expresión de los receptores AMPA, bien a nivel transcripcional o traduccional, está regulada por el ambiente extracelular, y la despolarización inducida por altas concentraciones de K^+ afecta a la expresión de distintas proteínas tanto a nivel transcripcional como a nivel de síntesis proteica (Gallo y cols. 1987).

El balance entre actividad sináptica excitatoria e inhibitoria gobierna la función de una neurona controlando las fluctuaciones del potencial de membrana. Las formas de plasticidad sináptica más estudiadas como la LTP presentan el problema teórico de la estabilidad neuronal. De hecho la LTP consiste en el incremento pre- y postsináptico de los estímulos excitatorios. La continúa actividad de retroalimentación positiva llevaría a la saturación del sistema (Turrigiano y Nelson 2000). La homeostasis tiene el papel de refrenar y estabilizar la actividad neuronal (Burrone y Murthy 2003). Las respuestas homeostáticas bidireccionales compensan la perturbación causada por la actividad (exceso o defecto) en las neuronas. Así la inhibición de los receptores en la postsinapsis desencadena el incremento de la liberación de neurotransmisor desde el terminal presináptico para restablecer el nivel de despolarización (Davis 2006; Frank y cols. 2006). Por otra parte, en neuronas de

hipocampo, el bloqueo de la red induce cambios compensatorios en pre- y postsinapsis (O'Brien y cols. 1998; Turrigiano y cols. 1998; Murthy y cols. 2001; Thiagarajan y cols. 2005).

Estos sistemas homeostáticos, necesitan moléculas sensores de Ca^{2+} que puedan detectar estos cambios de actividad. La CaMKIV es una de las principales candidatas para desempeñar la función de sensor de cambios homeostáticos por su localización citoplasmática y nuclear (Nakamura y cols. 1995; Bito y cols. 1996). Se ha visto que la forma activa de la CaMKIV migra al núcleo y regula negativamente la expresión de diferentes factores de transcripción que, mediante la regulación de la expresión de otras proteínas, favorecen la incorporación de receptores AMPA a la membrana. En estudios anteriores se ha puesto de manifiesto que el bloqueo del potencial postsináptico, en neuronas corticales, inducía la modulación homeostática mediante la reducción de la activación de la CaMKIV y un, consecuente, incremento en la transcripción de genes que regulan el tráfico a membrana de las subunidades de los AMPARs (Ibata y cols. 2008). Por otro lado, se ha demostrado recientemente que la entrada de calcio a través de los canales de calcio dependientes de voltaje de tipo L es necesaria en un modelo de respuesta homeostática para el control de la expresión de receptores AMPA en la membrana (Goold y Nicoll 2010).

Con estos precedentes, y en vista de la escasa información sobre la expresión de las cuatro subunidades de los AMPARs en células granulares de cerebelo en cultivo, y su regulación a lo largo del desarrollo y el grado de despolarización de la membrana plasmática, nos pareció interesante estudiar su expresión en diferentes estadios de desarrollo y comprobar si modificando el nivel de despolarización de la membrana se modificaba, a su vez, la expresión de estas subunidades y su presencia en la membrana.

1.1 Expresión de las subunidades de los receptores AMPA en neuronas granulares de cerebelo en cultivo

En trabajos previos de nuestro grupo se había demostrado que las neuronas granulares de cerebelo de rata cultivadas en medio Neurobasal™-A suplementado con B-27 y 25 mM KCl, como se indica en el apartado de Materiales y Métodos, se desarrollan y se mantienen funcionales durante varias semanas. Se considera que estas células a las dos semanas *in vitro* están completamente diferenciadas y son neuronas maduras. Uno de los objetivos de este trabajo fue analizar la expresión de las diferentes subunidades de los AMPARs. Para ello, y en primer lugar, utilizando la técnica de PCR convencional analizamos si los mensajeros que codifican para las cuatro subunidades (GluA1-GluA4) se expresaban en células granulares de cerebelo de 7 días en cultivo (7 DIV). Tal y como se muestra en la **Figura 1A** las neuronas granulares de 7 DIV expresan los ARNm de las cuatro subunidades de los receptores AMPA.

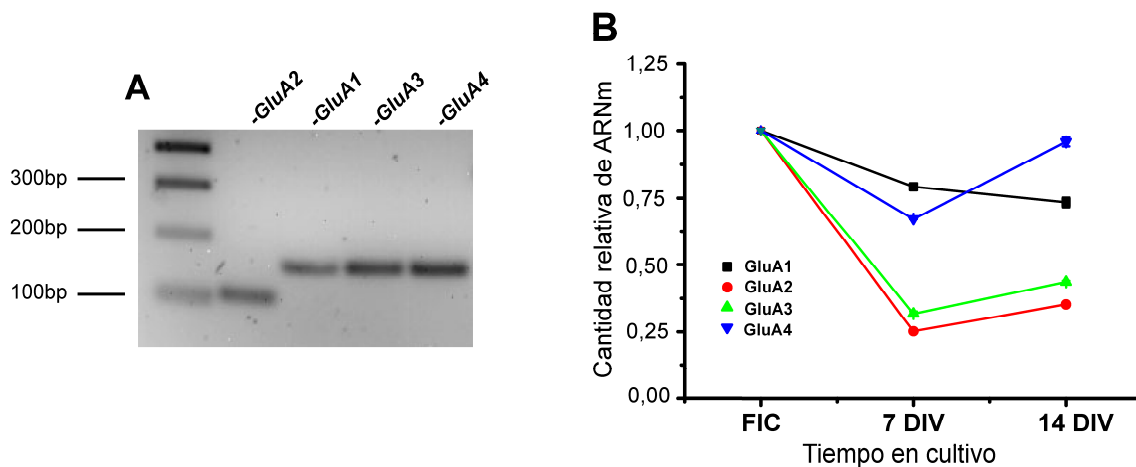


Figura 1. Expresión de los ARNm que codifican para las cuatro subunidades de los receptores AMPA en neuronas granulares de cerebelo. (A) Imagen de un gel de agarosa en el que se muestra la amplificación por RT-PCR de regiones específicas de cada subunidad a partir del ARN extraído de células mantenidas 7 días en cultivo (7 DIV). Calle 1: marcador de peso molecular. Calle 2: GluA2. Calle 3: GluA1. Calle 4: GluA3. Calle 5: GluA4. (B) Cantidades relativas de ARNm de las cuatro subunidades en tres estadios de desarrollo. Los valores se normalizaron al contenido de cada ARNm de células recién aisladas (FIC).

Mediante PCR cuantitativa se midieron los niveles de expresión de estos mensajeros en tres estadios de desarrollo de estas células: recientemente aisladas de ratas de 7 días postnatales (FIC), 7 DIV y 14 DIV. Como se observa en la **Figura 1B**, las cuatro subunidades se expresan en los tres estadios analizados. Cuando el nivel de expresión de cada subunidad se normalizó a su valor en FIC, se observa que a los 7 DIV todas disminuyen, aunque las subunidades GluA2 y GluA3 lo hacen de manera más significativa (60 %). A 14 DIV, se incrementa la expresión de GluA2, GluA3 y, fundamentalmente, GluA4, mientras que la de GluA1 sigue disminuyendo.

La eficiencia (η) de la PCR, calculada para cada una de las cuatro reacciones de PCR ($\eta=[10^{-(1/\text{pendiente})}]-1$) fue similar para todas ellas (88% para GluA1, 87,4% para GluA2, 86% para GluA3 y 83% para GluA4), hecho que nos ha permitido comparar el nivel de expresión de las cuatro subunidades en los tres estadios de diferenciación analizados. En la **Figura 2** se muestran los niveles de expresión de las cuatro subunidades en células FIC (**Fig. 2 A**), células 7 DIV (**Fig. 2 B**) y células 14 DIV (**Fig. 2 C**), expresados como $50-\Delta C_T$. En los tres estadios, los mensajeros más abundantes son los que codifican para GluA1 y para GluA4, mientras que el menos abundante es el que codifica para GluA3. Aquí también se aprecia tanto la disminución en el nivel de expresión de las cuatro subunidades en células de 7 DIV, como el aumento de expresión de GluA2, GluA3 y GluA4 en células de 14 DIV.

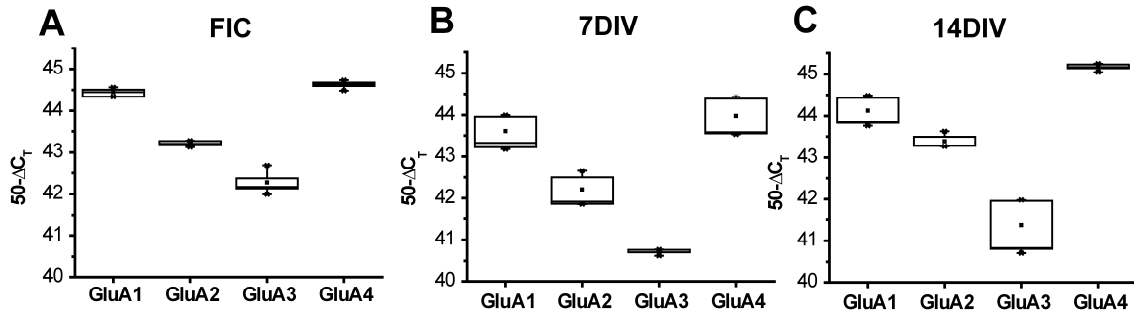


Figura 2. Cantidad de ARNm para las cuatro subunidades, en células recién aisladas FIC (A), a 7 DIV (B) y a 14 DIV (C). Los resultados están expresados como $50-\Delta C_T$, donde ΔC_T para cada subunidad es la diferencia entre su C_T y el C_T de GADPH, utilizado como control interno. Las cajas representan la media y la dispersión de los datos obtenidos de 12 determinaciones con cuatro cultivos diferentes. La significación estadística se calculó comparando la condición control con las otras dos mediante el test de la t de student (* $p < 0,01$).

Experimentos de inmunocitoquímica en células 7 DIV, pusieron de manifiesto la expresión de las cuatro subunidades a nivel de proteínas (**Fig. 3**).

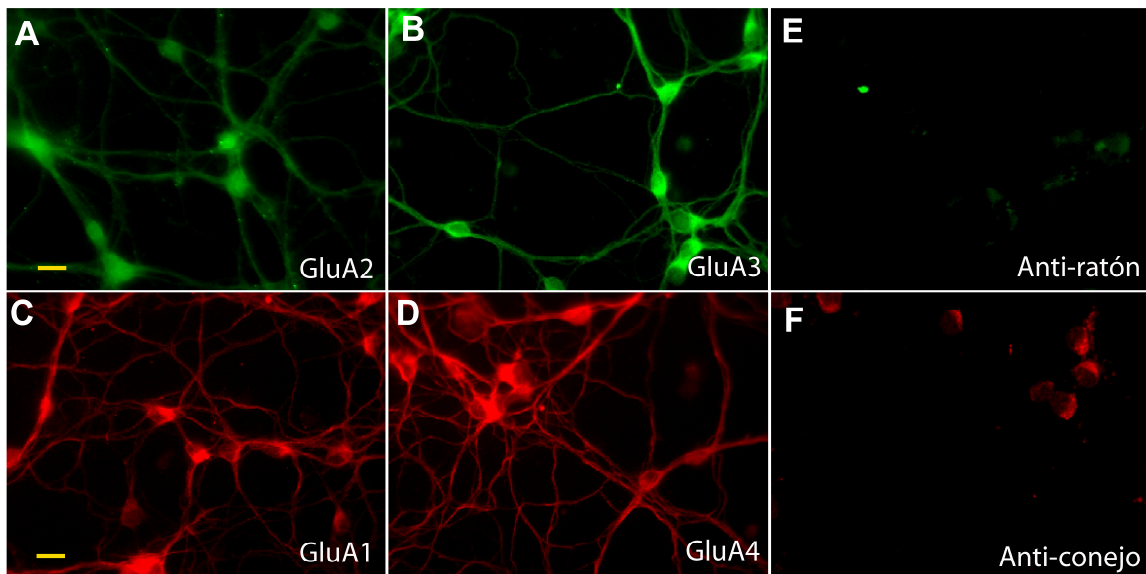


Figura 3. Inmunomarcaje específico de células granulares de cerebelo en cultivo (7DIV) (soma y dendritas) con anticuerpos anti-GluA2 (A), anti-GluA3 (B), anti-GluA1 (C) y anti-GluA4 (D), control para el anticuerpo secundario anti-ratón (E) y control para el anticuerpo secundario anti-conejo (F). Escala 10μm (objetivo 40x).

En un análisis más detallado de la expresión de estas proteínas en las fibras y realizando experimentos de doble marcaje con un marcador pre-sináptico, la proteína Bassoon, se observa un alto grado de co-localización, indicando su localización sináptica (Fig. 4).

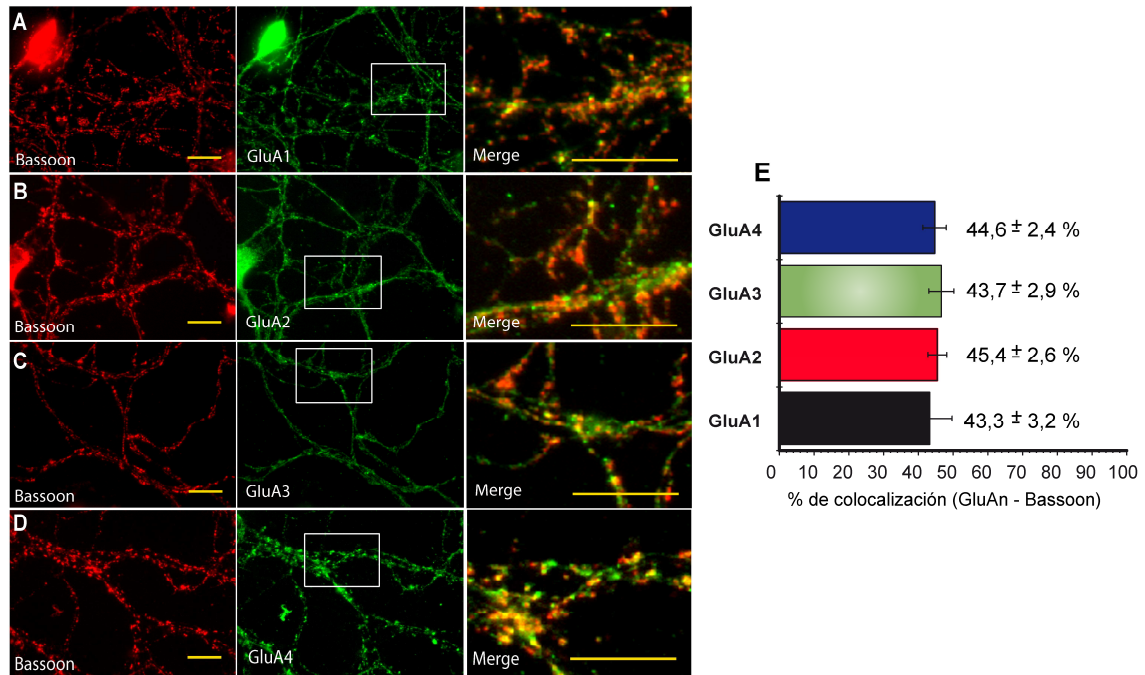


Figura 4. Inmunocitoquímica de las células granulares con anticuerpos contra las cuatro subunidades AMPA y la proteína presináptica Bassoon. (A-D) Imágenes representativas del inmunomarcaje y ampliación de zonas dendríticas que muestran el nivel de co-localización. (E) Análisis de la co-localización GluAn - Bassoon para las cuatro subunidades. Escala 10 μm (objetivo 100x).

1.2 Expresión de las subunidades de los receptores AMPA en cerebelo de ratas de 14 días y adultas

Debido a la escasa y contradictoria información que se tiene sobre la expresión de las cuatro subunidades de los receptores AMPA durante el desarrollo del cerebelo, y, puesto que las cuatro subunidades se expresaban en

neuronas granulares en cultivo de diferentes estadios de desarrollo, decidimos realizar estudios de inmunohistoquímica, con los anticuerpos específicos de las cuatro subunidades, en rodajas de cerebelo de ratas de 14 días postnatales y adultas, para analizar la expresión de estas proteínas *in vivo*.

En las rodajas de cerebelo de rata de 14 días postnatales el marcaje de DAPI (**Fig. 5 A-E-I-M**) se puede observar en la capa granular interna (IGL), en la capa de células de Purkinje, que todavía no se distingue del todo de la IGL, y en la capa granular externa (EGL), que es característica de estadios tempranos de desarrollo. También se observan núcleos en la capa molecular, que pueden corresponder a interneuronas ó a los núcleos de las células granulares que migran a través de la capa molecular hacia la capa granular interna. El inmunomarcaje de la GFAP (**Fig. 5 B-N**) fue evidente en las fibras de la glía de Bergmann (BF) dispuestas en paralelo y dirigidas hacia la cara exterior de la capa molecular. La inmunoreactividad de la subunidad GluA1 (**Fig. 5 C**) y GluA4 (**Fig. 5 O**) fue evidente en la capa granular interna, que resultó específicamente marcada con el anticuerpo contra la subunidad $\alpha 6$ del receptor GABA_A (**Fig. 5 F y J**), marcador de la diferenciación terminal de las células granulares.

La inmunoreactividad de GluA2 y GluA3 en la capa granular interna fue muy tenue (**Fig. 5 G**), mientras que se observó un marcaje mucho más evidente en las células de Purkinje (PC) y en la capa granular externa (EGL). Estos resultados confirman, de forma indirecta, los resultados obtenidos en los experimentos de PCR cuantitativa, ya que aquí también se observa una baja expresión de GluA2 y GluA3 y una mayor expresión de GluA1 y GluA4 en neuronas granulares de cerebelo de rata de 14 días.

En rodajas de cerebelo de rata adulta (**Fig. 6**), el marcaje con DAPI (**Fig. 6 A, E, I y M**) revela que la capa granular externa ha desaparecido y el número de núcleos teñidos en la capa molecular (ML) disminuye muy significativamente, indicando que la migración de las neuronas granulares se ha completado. Se observa una expresión más difusa de GluA1 en la capa granular interna (**Fig. 6 C**) y se evidencia el aumento de la expresión de la subunidad GluA2 en dicha

capa (**Fig. 6 G**). También se observa una fuerte expresión de GluA2 en células de Purkinje y en fibras de la capa molecular. Con respecto a GluA3, se observa una disminución en la IGL, un marcaje más intenso de las células de Purkinje y marcaje de la capa molecular. Se sigue observando marcaje de GluA4 en la IGL, células de Purkinje y fibras de la capa molecular (**Fig. 6 C y O**).

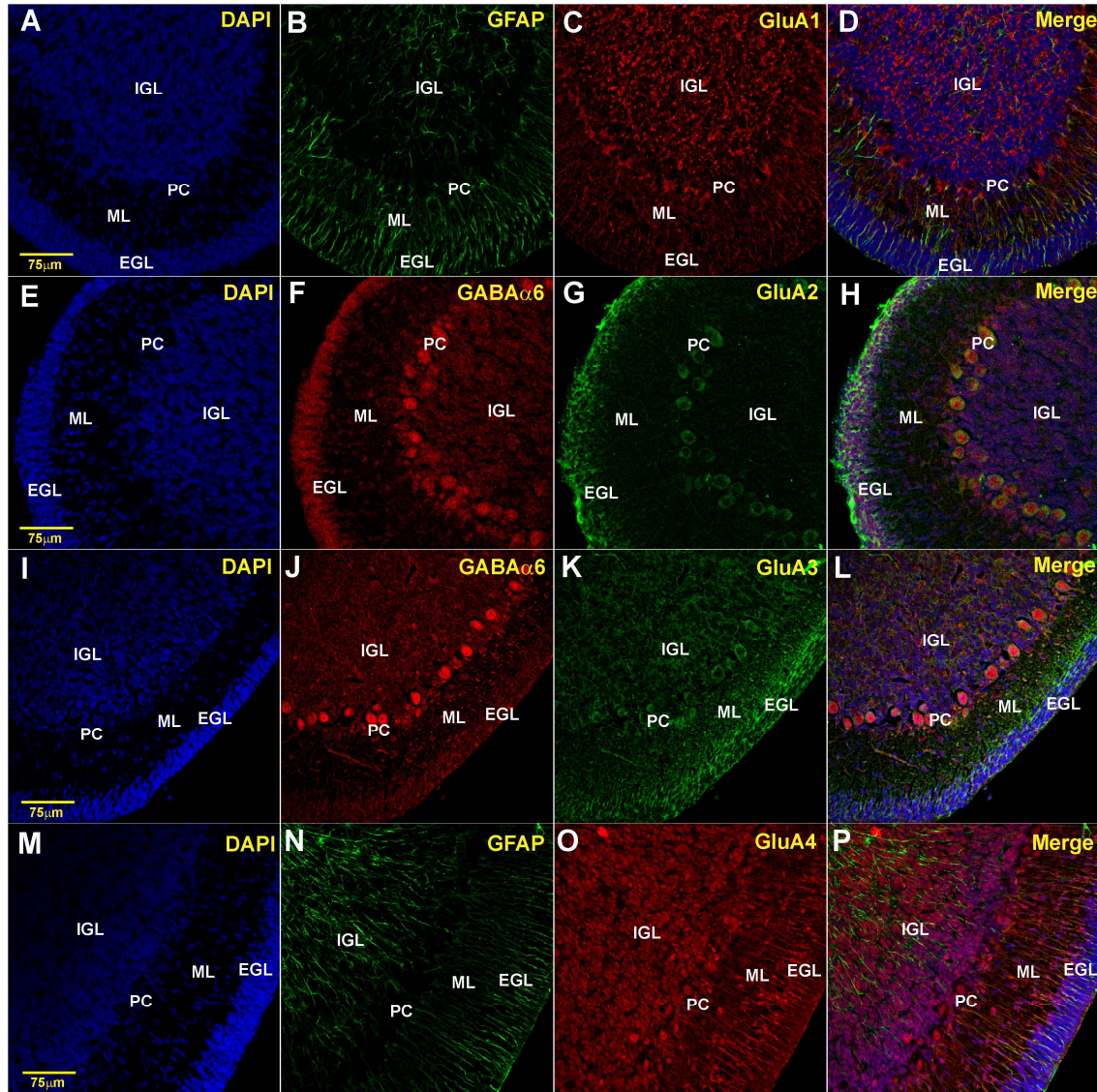


Figura 5. Micrografías de inmunohistoquímica confocal de las subunidades AMPA expresadas en cerebelo de ratas de 14 días (P14). Laminas de cerebelo marcadas con DAPI (paneles A, E, I, M) e inmunomarcaje con anticuerpo contra la subunidad $\alpha 6$ del receptor GABA_A (paneles F y J). Marcaje con los anticuerpos específicos para las subunidades: GluA1 (panel C), GluA2 (panel G), GluA3 (panel K) o GluA4 (panel O). Imágenes de triple marcaje combinadas de DAPI, GABA_A $\alpha 6$ y GluA2 (panel H). Imágenes combinadas de DAPI, GFAP y GluA3 (panel L) o de DAPI, GFAP y GluA4 (panel P). Escala 75 μ m. EGL: external granule layer. IGL: internal granule layer. ML: molecular layer y PC: Purkinje cell layer.

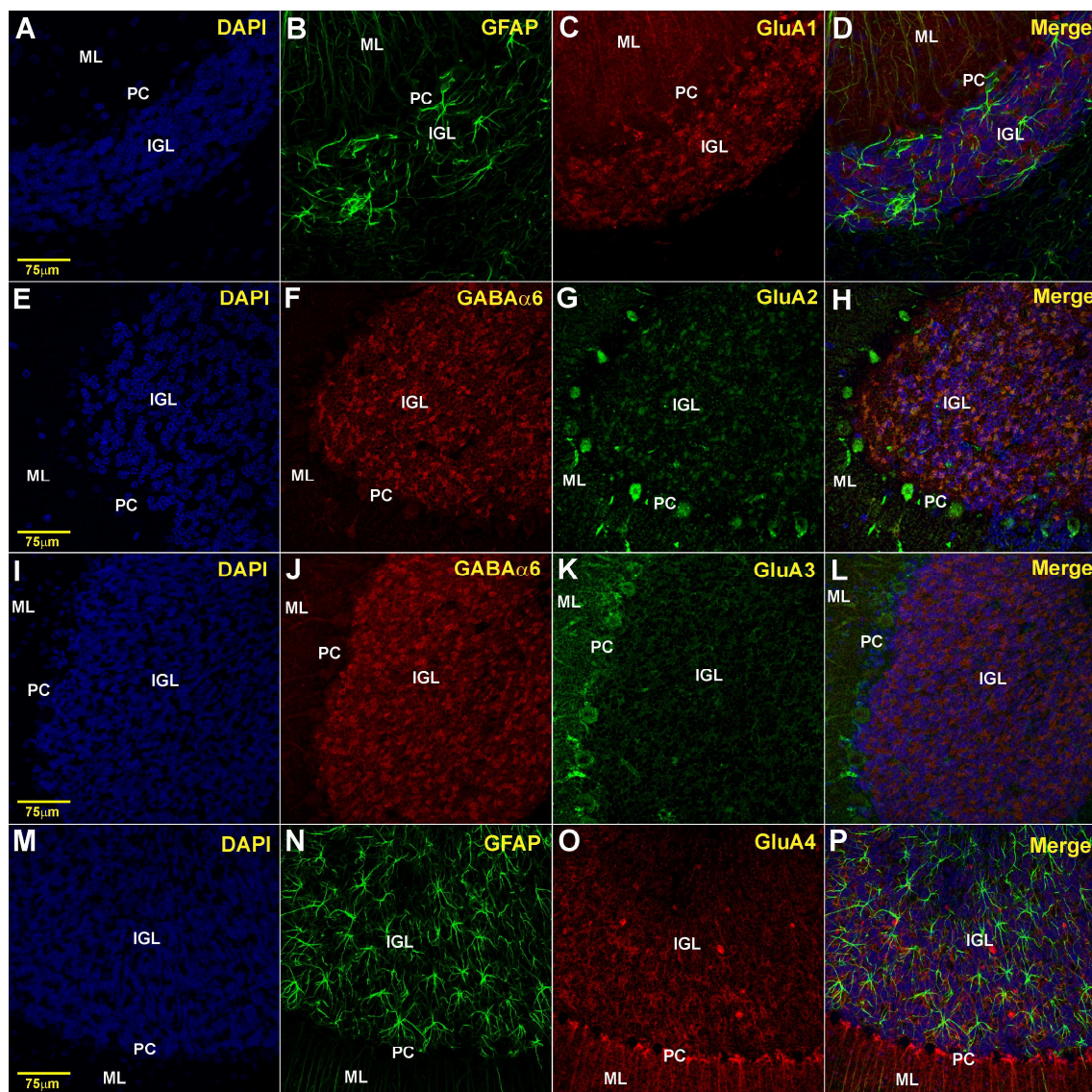


Figura 6. Micrografías de inmunohistoquímica confocal de las subunidades AMPA expresadas en cerebelo de ratas adultas. (A-E-I-M) Imágenes de los núcleos marcados con DAPI. (F-J) Imágenes de las células marcadas con anti- GABA α 6. (B-N) Imágenes de la glía marcada con anti-GFAP. (C-G-K-O) Imágenes de varias capas inmunomarcadas con anti-GluA1 (C), anti-GluA2 (G), anti-GluA3 (K), anti-GluA4 (O). (D-H-L-P) Imágenes combinadas. Escala: 75 μ m.

1.3 Variación en la expresión de las subunidades de los receptores AMPA en función del nivel de despolarización de la membrana plasmática

El nivel de despolarización de la membrana plasmática, regula la expresión de distintos genes en las neuronas granulares de cerebelo y es necesario mantener las células en altas concentraciones de potasio (25mM) para la supervivencia del cultivo y el correcto desarrollo de las células *in vitro* (Gallo y cols. 1987). La despolarización de la membrana permite la entrada de calcio a través de los canales de calcio dependientes de voltaje y la liberación de glutamato por las propias células activará los receptores NMDA y AMPA, que contribuirán a la entrada de calcio. El calcio activará diferentes cascadas de señalización necesarias para el desarrollo de las células.

En general, los canales de calcio dependientes de voltaje (en inglés voltage gated calcium channels- VGCC), están formados por una subunidad principal (α) y tres subunidades accesorias (β , γ y $\alpha_2\delta$). La subunidad α es transmembranal y constituye el canal iónico (Tanabe y cols. 1987). La subunidad α es el núcleo funcional del canal de calcio ya que forma el poro y permite la entrada de calcio, contiene el sensor de voltaje y los sitios de unión de los bloqueantes (Catterall 2000). En los mamíferos superiores, existen 10 genes que codifican 10 subunidades α diferentes; la homología entre las distintas subunidades α se ha usado como criterio para definir tres familias distintas de canales de calcio dependientes de voltaje (Ca_v1 , Ca_v2 y Ca_v3) (Snutch y cols. 2005).

Los canales de la familia Ca_v1 son los **canales de tipo L**, caracterizados por un alto umbral de activación, una alta conductancia y una cinética de inactivación lenta (Tsien y cols. 1988; Bean y cols. 1989). La entrada de calcio a través de los canales de tipo L está relacionada con la regulación de la expresión génica (Deisseroth y cols. 1998; Chen y cols. 2003), genes que, en algunos casos, están relacionados con la plasticidad homeostática. La entrada de Ca^{2+} a través de los canales tipo L inhibe tónicamente la expresión de nuevas subunidades

GluA1 (Goold y cols. 2011). El bloqueo de estos canales por nifedipino provoca el incremento en los niveles de expresión de GluA1 en neuronas de hipocampo (Thiagarajan y cols. 2005).

Por otro lado, la familia Ca_v2 los **canales de tipo N** presentan una cinética de inactivación más lenta así como umbrales de activación e inactivación más negativos que los canales de calcio de la familia Ca_v1 . Una de las herramientas farmacológicas más empleadas para el estudio de estos canales es la toxina peptídica procedente de los caracoles del género *Conus*, ω -conotoxina GVIA, que bloquea el canal de manera irreversible (Olivera y cols. 1985; Tsien y cols. 1988). Posteriormente, mediante el empleo de otras toxinas peptídicas como la ω -agatoxina IVA, procedente del veneno de la araña *Agenoleptis aperta*, se definieron otros dos tipos de corrientes de calcio y se llegó a la distinción de otros dos tipos de canales: las corrientes de tipo P, registradas por primera vez en células de Purkinje (Llinás y cols 1989) y las corrientes de tipo Q, que se registraron en las neuronas granulares de cerebelo (Randall y Tsien 1995). Por último, se definieron los **canales de tipo R**, los que resisten a las toxinas descritas anteriormente, pero que se bloquean por SNX- 482 procedente del veneno de la tarántula africana *Hysterocrates gigas* (Newcomb y cols. 1998; Bourinet y cols. 2001).

En primer lugar, dada la importancia del grado de despolarización de la membrana y la entrada de calcio, a través de los diferentes canales de calcio, en el control de la expresión génica, estudiamos las variaciones de los ARNm, mediante PCR cuantitativa, de las cuatro subunidades de los receptores AMPA en función de las concentraciones de KCl del medio extracelular. Las células se cultivaron en condiciones estándar (25mM KCl) durante 6 días, en ese momento se les cambió el medio por otro igual (control) o con concentraciones decrecientes de KCl y se mantuvieron en ese medio de cultivo durante 24 horas más. Cuando se disminuyó la concentración de KCl extracelular se observó un incremento de la expresión de los ARNm de las cuatro subunidades de tres a diez veces (**Fig. 7 A**). En todos los casos, excepto para la subunidad GluA1, se observó una correlación inversa de la abundancia del ARNm con la

concentración extracelular de KCl. En el caso de GluA1 alcanzó su máxima expresión a 15 mM KCl pero decreció a 10 o 5 mM KCl. Sin embargo, en todos los casos la cantidad de ARNm fue más elevada que en las condiciones control. La especificidad del efecto se verificó analizando la expresión de la subunidad α_2 de la GCs, que no mostró ninguna variación en las diferentes condiciones experimentales.

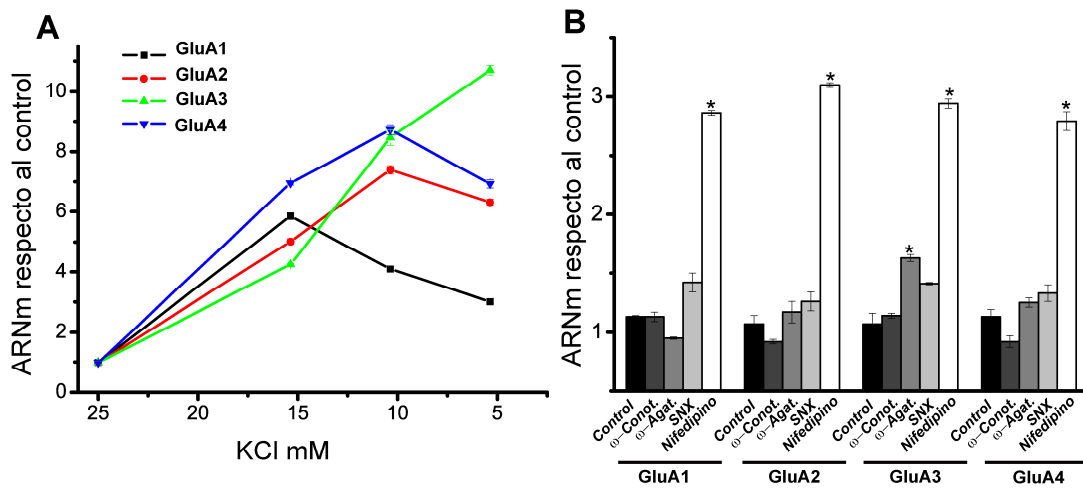


Figura 7. Variación de la expresión de los ARNm de las cuatro subunidades de los receptores AMPA en diferentes condiciones de cultivo. (A) Efecto de la concentración extracelular de KCl en la expresión de los ARNm que codifican para las cuatro subunidades de los AMPARs.. (B) Efecto sobre la expresión de ARNm de la incubación durante 24 horas con diferentes bloqueantes de canales de calcio dependientes de voltaje en células de 7 días. Los valores están expresados como las veces que se incrementa la cantidad de cada ARNm respecto a su nivel en el control (25 mM KCl), expresados como la media $\pm$ error estándar de doce determinaciones individuales realizadas con cuatro cultivos celulares diferentes. (n=12, *p<0,01 significación estadística calculada comparando las diferentes condiciones con el control mediante el test de la t de student).

La viabilidad de los cultivos se analizó midiendo los niveles de LDH en el medio extracelular en las diferentes condiciones experimentales. La actividad LDH (expresada como % del total) fue similar en todas las condiciones (control: 7,97 $\pm$ 1,72%; 15 mM K⁺: 7,15 $\pm$ 1,18%; 10 mM K⁺: 9,80 $\pm$ 1,37%; 5 mM K⁺:

9,82±1,30%). La presencia de una concentración 25 mM de KCl en el medio de cultivo produce una despolarización tónica que tiene como consecuencia una entrada de Ca²⁺, vía canales de calcio dependientes de voltaje, que activan distintas cascadas de señalización. Para determinar si la reducción de la entrada de calcio en las células expuestas a bajas concentraciones de KCl induce la regulación de la expresión de los ARNm, o si la vía de entrada a través de algún tipo de canal es relevante para este mecanismo, se utilizaron bloqueantes específicos para los diferentes tipos de canales. No se observó ninguna diferencia en la expresión de los ARNm de las cuatro subunidades en presencia de la ω -conotoxina GVIA (2 μ M) que bloquea los canales de tipo N y de SNX (400 nM) que bloquea los canales R (**Fig. 7 B**). Sin embargo, en presencia de nifedipino (5 μ M), bloqueante específico de los canales de calcio de tipo L, la abundancia de cada una de las cuatro subunidades incrementó significativamente de forma similar (GluA1: 2,53±0,09 veces respecto al control; GluA2: 2,90±0,11; GluA3: 2,75±0,28 y GluA4: 2,74±0,08).

Este resultado está de acuerdo con los resultados publicados en trabajos recientes sobre el papel de los canales de calcio de tipo L en plasticidad homeostática (Goold y cols. 2011; Lindskog y cols. 2010). Nuestros resultados ponen de manifiesto que la entrada de calcio por el canal de tipo L es necesaria para reprimir la expresión de las cuatro subunidades de los receptores AMPA y que, al menos en parte, el incremento de la concentración de los mensajeros que codifican para estas proteínas observado cuando se disminuye la concentración de KCl se debe a la reducción de la entrada de calcio.

1.4 El incremento en la expresión de los ARNm se refleja en la cantidad de proteínas de GluA1 y GluA4

El incremento en los niveles de ARNm observados cuando se redujo la concentración extracelular de KCl se reflejó en un aumento de las proteínas correspondientes, determinadas mediante inmunocitoquímica. Para evaluar la inmunoreactividad de estas proteínas, se efectuó un doble marcaje con el

anticuerpo que reconoce cada una de las subunidades y un anticuerpo frente a la proteína MAP2. El aumento de los ARN mensajeros, se correlacionó con un incremento en la inmunoreactividad de las cuatro subunidades en los somas de las neuronas analizadas (Fig. 8).

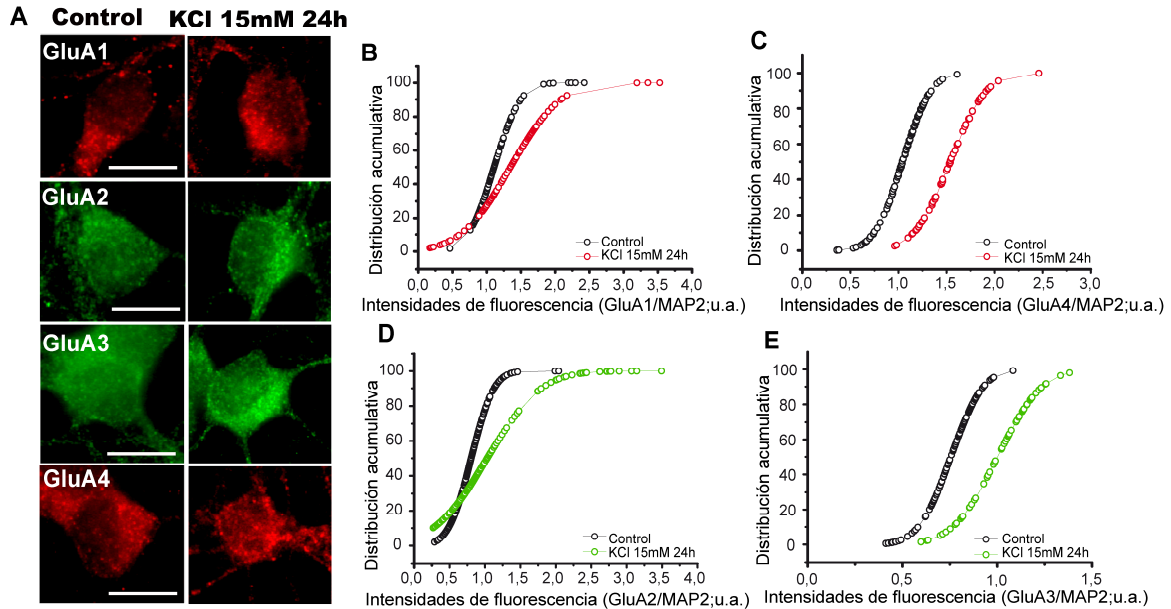


Figura 8. Efecto del grado de despolarización de la membrana en la expresión de las cuatro subunidades de los receptores AMPA en los somas de neuronas granulares de 7 DIV. Los gráficos (B, C, D y F) representan las distribuciones acumulativas de los valores de intensidad integrada de GluAn normalizados a los valores de densidad integrada de MAP2 para cada una de las subunidades.

Una vez sintetizadas, las subunidades se transportan a lo largo de las fibras, hasta llegar a los sitios sinápticos. Por ello, el siguiente paso fue el análisis de la inmunoreactividad de las cuatro subunidades en las fibras de las neuronas granulares de 7 DIV. Cuando se analizaron las dendritas, mientras que la intensidad de fluorescencia de MAP2 (Fig. 9 A, B, C) fue igual en las dos condiciones experimentales (control y bajo KCl), la fluorescencia media de las dendritas inmunomarcadas con el anticuerpo anti-GluA1 se incrementó un 37% en células incubadas con KCl 15 mM durante 24 horas. (Fig. 9 A, B y D): la intensidad media de fluorescencia de GluA1 dividida por la intensidad media

de fluorescencia de MAP2 fue $1,01 \pm 0,01$ para los controles y $1,39 \pm 0,01$ para la condición de baja concentración de KCl ($p < 0,001$; Mann-Whitney test y Komolgorov-Smirnov test). Para este estudio se utilizó un anticuerpo que reconoce el dominio carboxi terminal de la subunidad GluA1, por lo que la determinación se realizó en células permeabilizadas y lo que se cuantifica es la variación de la cantidad total de la GluA1 en las dendritas.

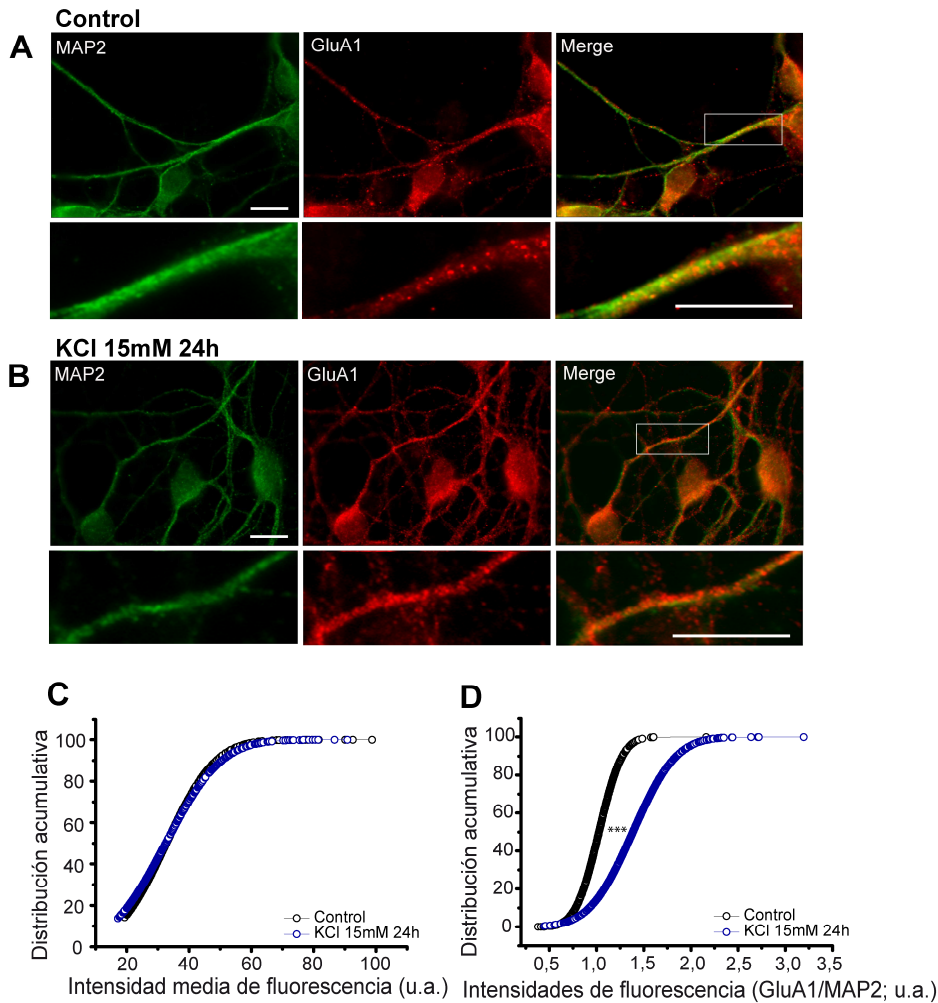


Figura 9. Inmunomarcaje de GluA1 y MAP2 en células de 7 DIV mantenidas en condiciones control (25 mM K⁺) o 24 horas antes de la determinación en un medio con baja concentración de KCl (15 mM) (A y B). (C) Distribución acumulativa de las intensidades medias de fluorescencia de MAP2: $30,76 \pm 0,27$ y $32,2 \pm 1,75$ unidades arbitrarias para el control (770 regiones de interés) y KCl 15 mM (623 regiones de interés). (D) Gráfico de la distribución acumulativa para GluA1. Los datos se representaron como cociente entre GluA1 y MAP2. La intensidad media de GluA1 resultó más alta en la condición de bajo KCl (control: $30,92 \pm 0,27$ y KCl 15 mM $39,53 \pm 0,49$). La significación estadística se hizo comparando las dos condiciones mediante el test de Mann-Whitney y Komolgorov-Smirnov. (*) $p < 0,001$).**

Resultados similares se observaron cuando se analizaron los valores de fluorescencia de la otra subunidad con alto grado de expresión en este estadio de desarrollo, GluA4. Las intensidades integradas de fluorescencia de GluA4 se incrementaron en un 43% en la condición de baja concentración de KCl durante 24 horas (**Fig. 10 A-D**) con respecto a la condición control, siendo el cociente GluA4/MAP2 $1,05 \pm 0,01$ en el control y $1,49 \pm 0,02$ en bajo KCl ($p < 0,001$ test de Mann-Whitney y Komolgorov-Smirnov). Estas variaciones representan cambios en el contenido total de estas proteínas, ya que la inmunodetección se realizó en células permeabilizadas.

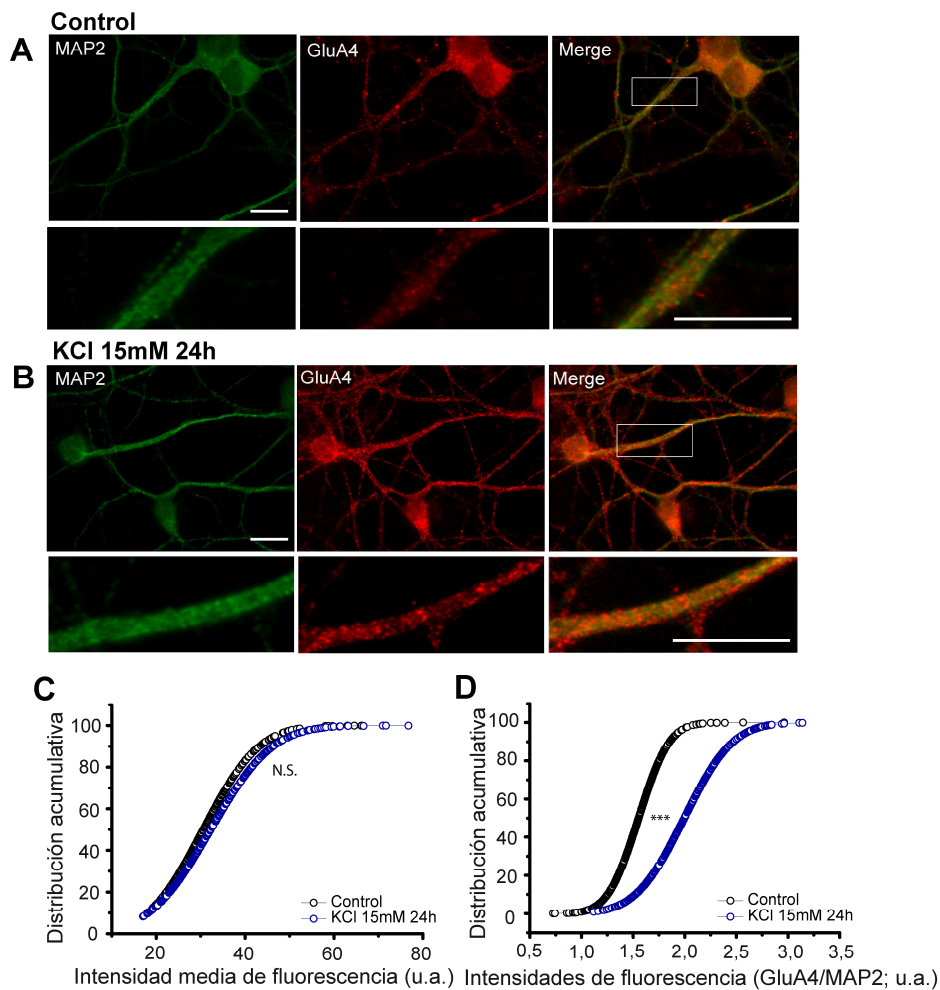


Figura 10. Inmunodetección de GluA4 y MAP2 en células de 7 DIV mantenidas en condiciones de control (25 mM KCl) o cambiadas a un medio con baja concentración de KCl (15 mM) 24 horas antes (A y B). (C) Distribución acumulativa de las intensidades medias de fluorescencia de MAP2 (intensidad media: $29,32 \pm 1,44$ para el control y $31,72 \pm 0,71$ para KCl 15 mM 24 h en u.a.; control 1.228 regiones de interés, KCl 15 mM 532 regiones de interés

analizadas) (D) Distribución acumulativa para el cociente GluA4/MAP2. Los datos se representaron como cociente entre GluA1 y MAP2. La intensidad media fue de $29,68 \pm 2,07$ u.a y $45,21 \pm 2,05$ u.a para el control y bajo KCl, respectivamente. La significación estadística se hizo comparando las dos condiciones mediante el test de Mann-Whitney y Komolgorov-Smirnoff. (N.S. $p > 0,05$; *** $p < 0,001$). Escala $10\mu\text{m}$, ampliada 3x.

Estos resultados, ponen de manifiesto un importante incremento de la presencia de las subunidades GluA1 y GluA4 en las dendritas de las neuronas granulares.

1.5 La expresión total en dendritas de las subunidades GluA2 y GluA3 no varía

A diferencia de lo observado para las subunidades GluA1 y GluA4, la inmunoreactividad de GluA2 en células permeabilizadas e incubadas con los anticuerpos específicos contra GluA2 y MAP2, no varió significativamente (**Fig. 11 A, B y D**). El cociente de las intensidades integradas de GluA2 y MAP2 fue de $0,60 \pm 0,01$ ($n=595$) en el control y $0,62 \pm 0,01$ ($n=490$) en la condición de bajo potasio ($p > 0,05$, test de Mann-Whitney y Komolgorov-Smirnof).

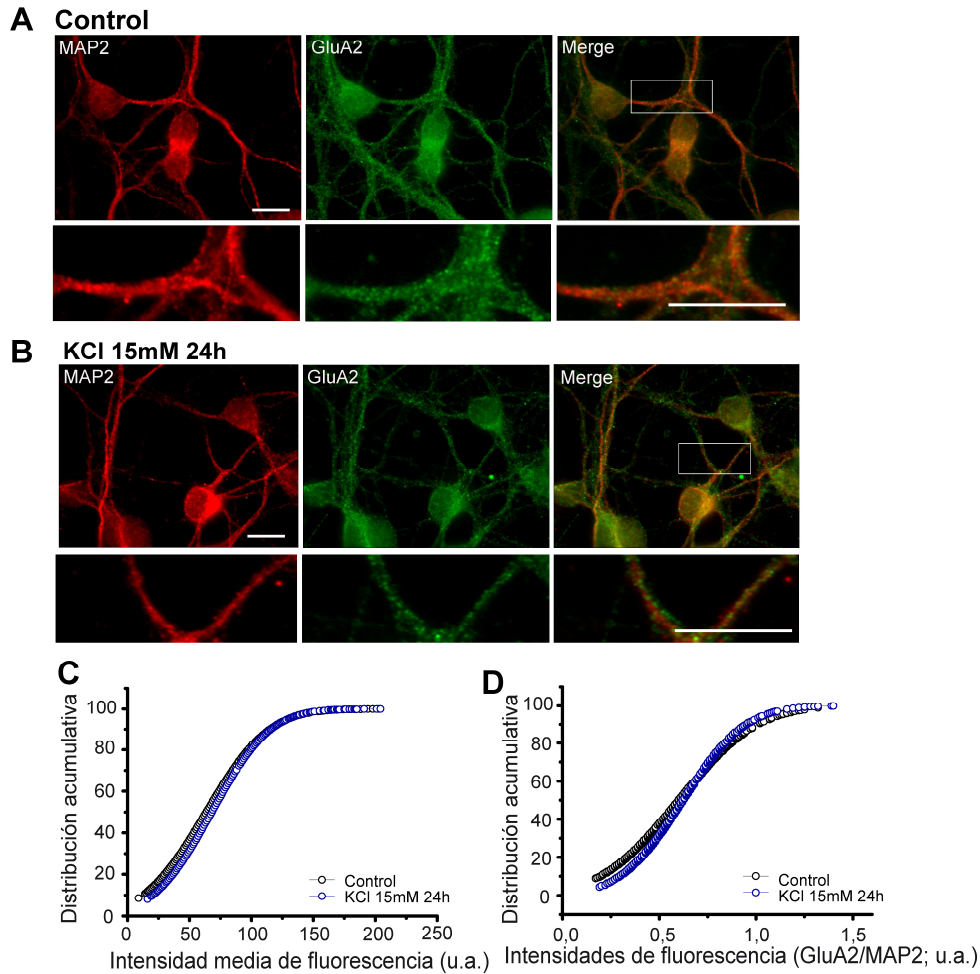


Figura 11. Inmunocitoquímica de GluA2 y MAP-2 en células de 7 DIV mantenidas en condiciones control (25 mM KCl) o 24 horas en medio con baja concentración de KCl (15 mM) (A y B). (C) Distribución acumulativa de MAP2 demuestra que la fluorescencia no cambió significativamente siendo $66,8 \pm 3,8$ y $66,9 \pm 6,1$ u.a. para control (924 regiones de interés) y KCl 15 mM (897 regiones de interés), respectivamente. ($p > 0,05$, Mann-Whitney y Kolmogorov-Smirnov test). (D) Distribución acumulativa del cociente GluA2/MAP2. La intensidad media de GluA2 fue de $32,1 \pm 1,4$ y $33,6 \pm 1,84$ u.a. para control y KCl 15 mM, respectivamente. Los resultados representan valores de fluorescencia en unidades arbitrarias. La significación estadística se calculó comparando la condición de baja actividad con el control mediante el test de Mann-Whitney y de Komolgorov-Smirnov. ($N.S. p > 0,05$; $***p < 0,001$). Escala 10 μ m, ampliada 3x.

Se obtuvieron resultados parecidos para la subunidad GluA3, que es la menos expresada en este estadio de desarrollo. Los valores absolutos de fluorescencia y el cociente entre los valores para GluA3 y MAP2 (**Fig. 12**), no varían entre las condiciones control y las de baja concentración de KCl

(intensidad de fluorescencia media $18,60 \pm 1,98$ y $18,47 \pm 1,06$ para control y bajo KCl, respectivamente).

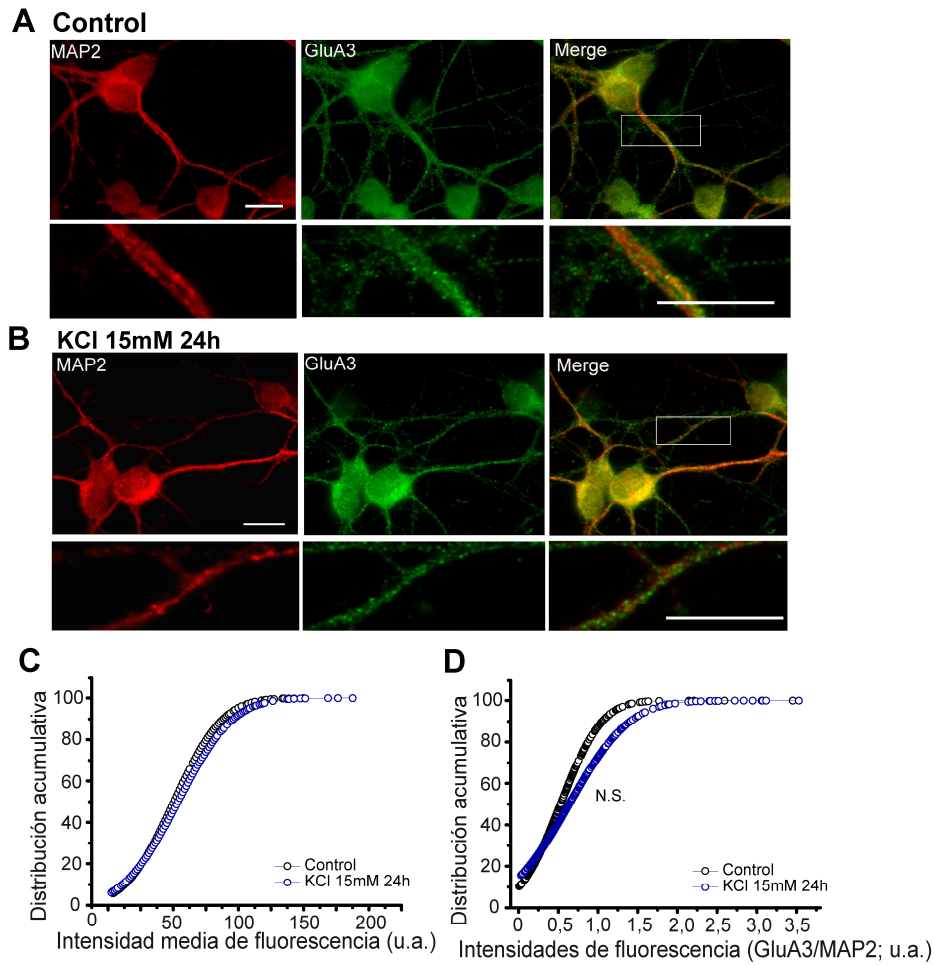


Figura 12. Inmunocitoquímica de GluA3 y MAP2 en células de 7 DIV mantenidas en condiciones control (25 mM KCl) o 24 horas en medio con baja concentración de KCl (15 mM) (A y B). (C) Distribución acumulativa para la intensidad media de fluorescencia de MAP2. La intensidad de fluorescencia media de MAP2 es $40,25 \pm 0,81$ y $41,69 \pm 1,14$ u.a. para control (374 regiones de interés) y KCl 15 mM (regiones de interés), respectivamente. (D) Distribución acumulativa del cociente GluA3/MAP2. La intensidad media de GluA3 fue de $18,60 \pm 1,98$ y $18,47 \pm 1,0$ u.a. para control y bajo KCl, respectivamente. La significación estadística se calculó comparando las dos condiciones mediante el test de Mann-Whitney y de Komolgorov-Smirnoff. $N.S. p > 0,05$; Escala 10 μ m, ampliada 3x.

Estos resultados ponen de manifiesto que aunque la cantidad de los mensajeros que codifican para las subunidades GluA2 y GluA3 aumenta

significativamente al reducir la concentración de KCl extracelular, y se observa un incremento de estas proteínas en los somas, no ocurre lo mismo en las fibras.

1.6 La localización nuclear de p-CaMKIV en células desarrolladas en un medio con alto potasio contribuye a la inhibición de la expresión de las subunidades de AMPA

Nuestros resultados pusieron de manifiesto que la entrada de calcio regula la expresión de las cuatros subunidades de los receptores AMPA. Nos propusimos conocer algo más del mecanismo molecular que subyace a esta regulación. Tal y como se ha descrito, los sensores celulares de calcio son importantes componentes de los sistemas homeostáticos de plasticidad (Frank y cols. 2006). Entre ellos, las proteínas quinasas calcio/calmodulina dependientes (CaMKs) son mediadores de muchas formas de plasticidad dependientes de calcio (Lisman y cols. 2002; Soderling 1999). A diferencia de las otras CaMKs, la CaMKIV tiene una localización principalmente somática/nuclear (Nakamura y cols. 1995; Soderling 1999), con la posibilidad de que un cambio en la entrada somática de calcio pueda inducir un cambio homeostático rápido modificando la actividad de la CaMKIV (Bito y cols. 1996). Estudios anteriores, han demostrado que el bloqueo de la actividad basal en cultivo de neuronas hipocampales mediante incubación con TTX redujo la activación de la CaMKIV de forma persistente y ésta se mantuvo hasta 4 horas después del tratamiento (Ibata y cols. 2008).

De forma similar, en nuestro modelo la reducción crónica de la actividad (KCl 15 mM, 24h) así como el bloqueo de los canales de calcio de tipo L con nifedipino 5 μ M, afectaron a la activación de la CaMKIV. De hecho, la inmunofluorescencia normalizada como cociente núcleo/citosol, obtenida tras la incubación con el anticuerpo contra la forma activa fosforilada de la CaMKIV (pCaMKIV) se vió reducida de forma significativa en las células tratadas 24 horas con nifedipino ($1,04 \pm 0,01$) (**Fig. 13 A y B**) con respecto al control ($1,31 \pm 0,01$). De forma similar, la sustitución del medio normal por otro con baja

concentración de potasio redujo la activación de CaMKIV ($1,14 \pm 0,01$) de forma significativa ($p < 0,001$). Estos resultados indicaban que la reducción de la concentración extracelular de KCl, así como el bloqueo de la entrada de calcio a través de los canales tipo L se traducían en una reducción de la activación de la CaMKIV, y que, al igual que ocurre en otras neuronas, podría formar parte del mecanismo molecular responsable de la regulación de la expresión de las diferentes subunidades de los receptores AMPA.

Para analizar si la disminución de la CaMKIV modificaba la expresión de los mensajeros que codifican para las subunidades de los receptores AMPA, dado que no hay ningún inhibidor selectivo para esta enzima, se silenció la expresión de CaMKIV con ARN de interferencia (siRNA) específicos. 48 horas después de la transfección verificamos, mediante inmunocitoquímica, que en un 65% de las células se había producido el silenciamiento de la CaMKIV. En las células transfectadas con el siRNA específico para CaMKIV observamos un incremento significativo de la expresión de los ARNm de las cuatro subunidades de AMPA con respecto al control (GluA1: $1,315 \pm 0,035$; GluA2: $1,266 \pm 0,005$; GluA3: $1,23 \pm 0,08$; GluA4: $1,61 \pm 0,13$) mientras que en las células transfectadas con un siRNA que no produce silenciamiento no se observó ninguna modificación (**Fig. 13 C**).

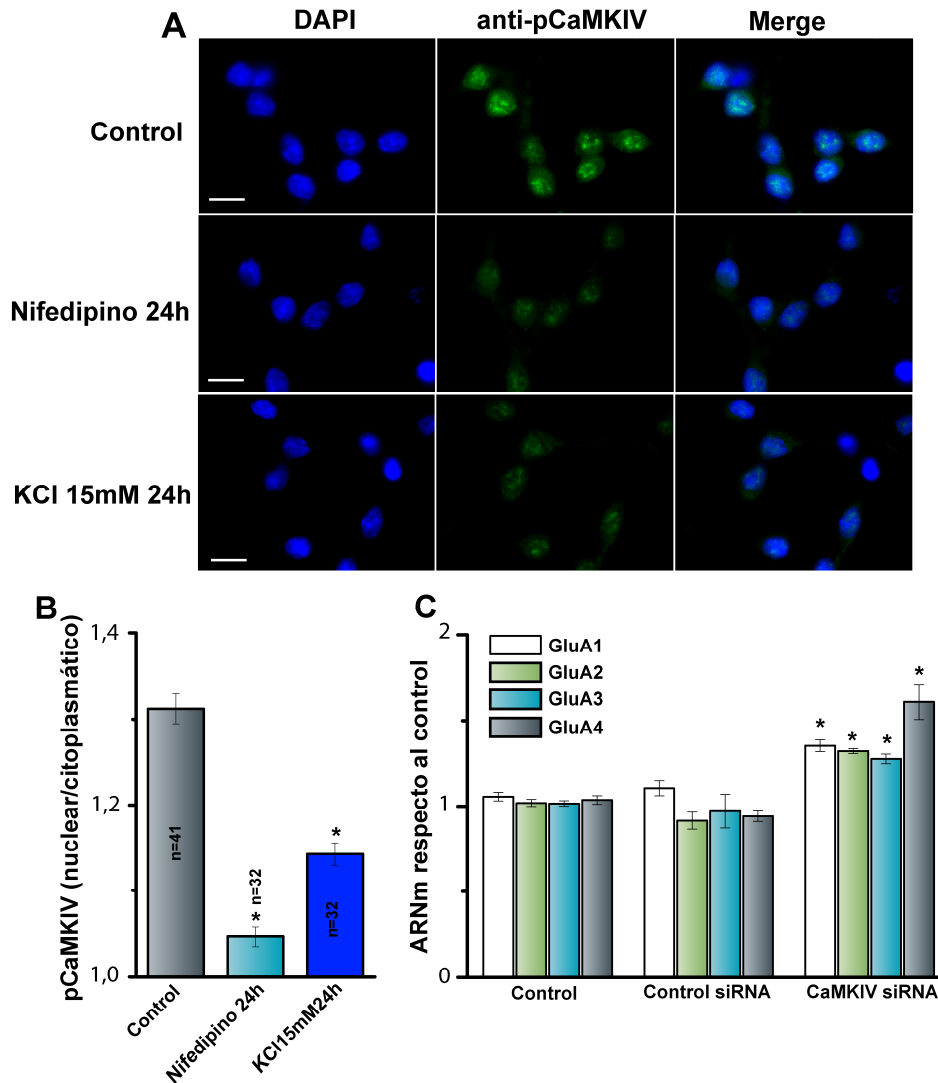


Figura 13. Papel de la CaMKIV en el control de la expresión de las subunidades de los receptores AMPA en las condiciones de inhibición de la despolarización. (A) El inmunomarcaje con un anticuerpo específico contra la forma activa (fosforilada) de la CaMKIV disminuye después de 24 horas de incubación con nifedipino o en un medio de baja concentración de KCl. El marcaje con DAPI se utilizó como marcador de los núcleos (en azul). (B) Cociente entre los valores de fluorescencia del núcleo y del citoplasma. (C) Nivel de expresión de los ARNm de las cuatro subunidades AMPA en células control, transfectadas con un siRNA que no produce silenciamiento y en células transfectadas con siRNA específico de CaMKIV. La significación estadística se calculó comparando la condición control con las otras dos mediante el test de la t de student (* $p < 0,001$). Escala de las imágenes 10 μ M, objetivo 100x.

Estos resultados ponen de manifiesto que la activación de la CaMKIV se traduce en una disminución de la expresión de las cuatro subunidades de los receptores AMPA. Otros autores también han demostrado que esta proteína

está implicada en la regulación del tráfico intracelular de estos receptores. Es probable que CaMKIV regule la expresión de factores de transcripción implicados en la regulación de la expresión de las subunidades de AMPA y en su tráfico a membrana (Ibata y cols. 2008; Wang y cols. 2012).

1.7 La reducción crónica de la actividad neuronal favorece la inserción en la membrana plasmática de receptores AMPA

La manipulación de la actividad neuronal en circuitos neuronales o cultivos de neuronas para estudiar procesos de plasticidad homeostática ha puesto de manifiesto que existen mecanismos tanto presinápticos como postsinápticos que son responsables de los procesos adaptativos a la nueva situación de actividad. En la unión neuro-muscular (NMJ), por ejemplo, la hiperpolarización mediante la inserción de canales de potasio indujo una forma presináptica de adaptación homeostática que se manifestó en un incremento de la probabilidad de liberación (Murthy y cols. 2001; Paradis y cols. 2001). En neuronas de hipocampo el bloqueo de la actividad sináptica con TTX durante 24 horas incrementa la inserción de receptores AMPA en la membrana a nivel postsináptico (Ibata y cols. 2008). En nuestro modelo de estudio, las neuronas granulares, hemos observado un aumento en la expresión de las cuatro subunidades tanto en los ARNm como de las proteínas en condiciones de reducción crónica de la actividad.

Para analizar si el aumento en la expresión, se correlacionaba con la inserción de más receptores AMPA en la membrana, utilizamos extractos de células granulares de cerebelo de 7 DIV, adaptando un protocolo que nos permitió separar la fracción enriquecida en membrana plasmática del resto de constituyentes celulares. La separación de proteínas mediante electroforesis, transferencia a membrana y revelado con anticuerpos específicos contra GluA1 y GluA4, indicaron que el cambio de medio (KCl 15 mM) durante 24 horas se traducía en un incremento de GluA1 y GluA4 ($2,33 \pm 0,12$ y $2,27 \pm 0,02$ veces respecto al control) en la membrana plasmática (**Fig. 14**). De la misma forma, el

bloqueo durante 24 horas de los canales de calcio de tipo L con nifedipino también produjo un incremento de las dos subunidades (GluA1: $2,90 \pm 0,31$; GluA4: $2,76 \pm 0,24$ veces respecto al control). La bomba Na^+/K^+ ATPasa sirvió como control de carga cuando se utilizaron fracciones enriquecidas en membranas plasmáticas.

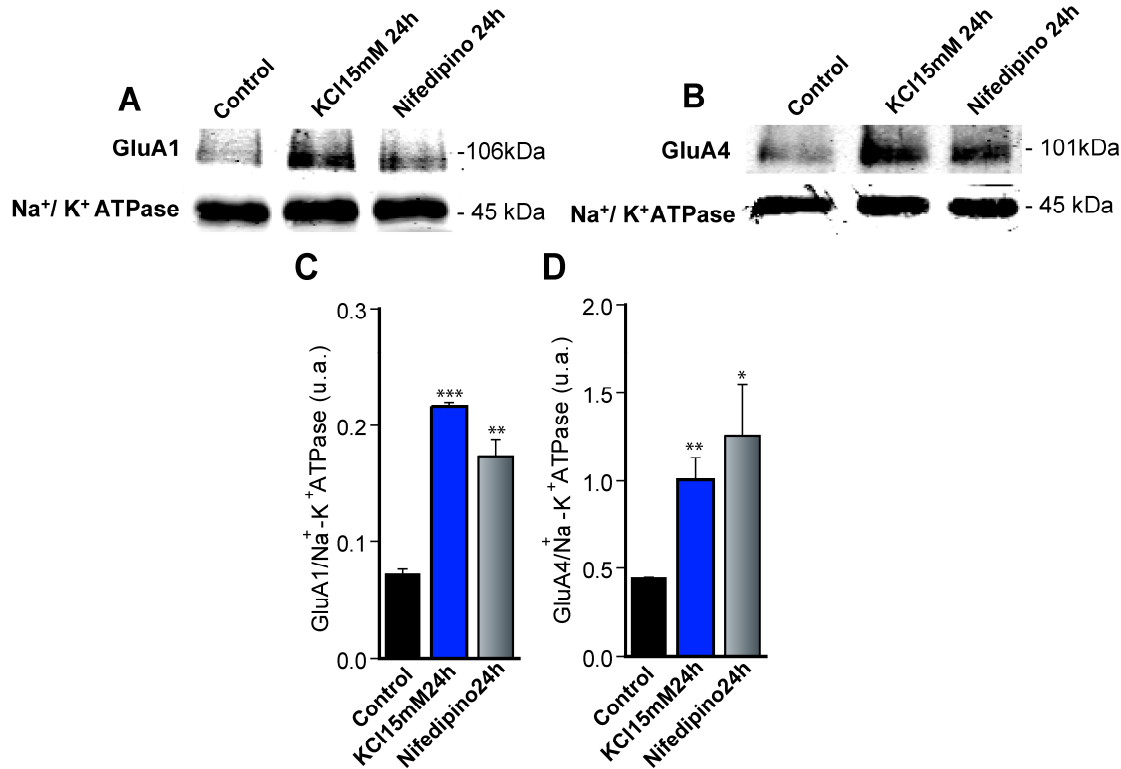


Figura 14. Inmunodetección de los extractos de membrana de células granulares de cerebelo a 7 DIV. (A) Inmunodetección de GluA1 en extractos de proteínas de membrana obtenidos a partir de células en condiciones control, o mantenidas 24 horas en medio con KCl 15 mM o con 5 μM Nifedipino. La detección de la subunidad β de la bomba Na^+/K^+ ATPasa se utilizó como control de carga. (B) Cuantificación de GluA1, los valores se normalizaron a los valores para la Na^+/K^+ ATPasa. Los datos representan la media $\pm$ error estándar de $n=5$ experimentos realizados con distintos cultivos. (C) Inmunodetección de la subunidad GluA4 en preparaciones enriquecidas de membrana obtenidas a partir de células en condiciones control, o mantenidas 24 horas en medio con KCl 15 mM o con 5 μM Nifedipino. (D) Cuantificación de la proteína GluA4 normalizada al contenido de Na^+/K^+ ATPasa. Los datos representan la media $\pm$ error estándar de $n=4$ experimentos realizados con distintos cultivos. La significación estadística se comprobó mediante el test de la t de student. (** $p<0,01$; *** $p<0,001$).

El análisis del nivel de expresión de GluA2 y GluA3 en membrana se realizó mediante inmunocitoquímica utilizando anticuerpos contra el dominio extracelular N-terminal de estas proteínas, y en condiciones de no-permeabilización. Los valores de intensidad de fluorescencia se normalizaron con los valores de fluorescencia medidos cuando se inmunodetectó la proteína MAP2. La fluorescencia de GluA2 aumentó en las células mantenidas 24 horas en bajo potasio o con nifedipino 5 μ M (los valores para el cociente de las intensidades medias de fluorescencia GluA2/MAP2 fueron: $0,75 \pm 0,01$ (n=1.099) para el control; $0,95 \pm 0,01$ (n=1.052) en bajo potasio y $0,89 \pm 0,02$ en presencia de nifedipino; **Fig. 15**).

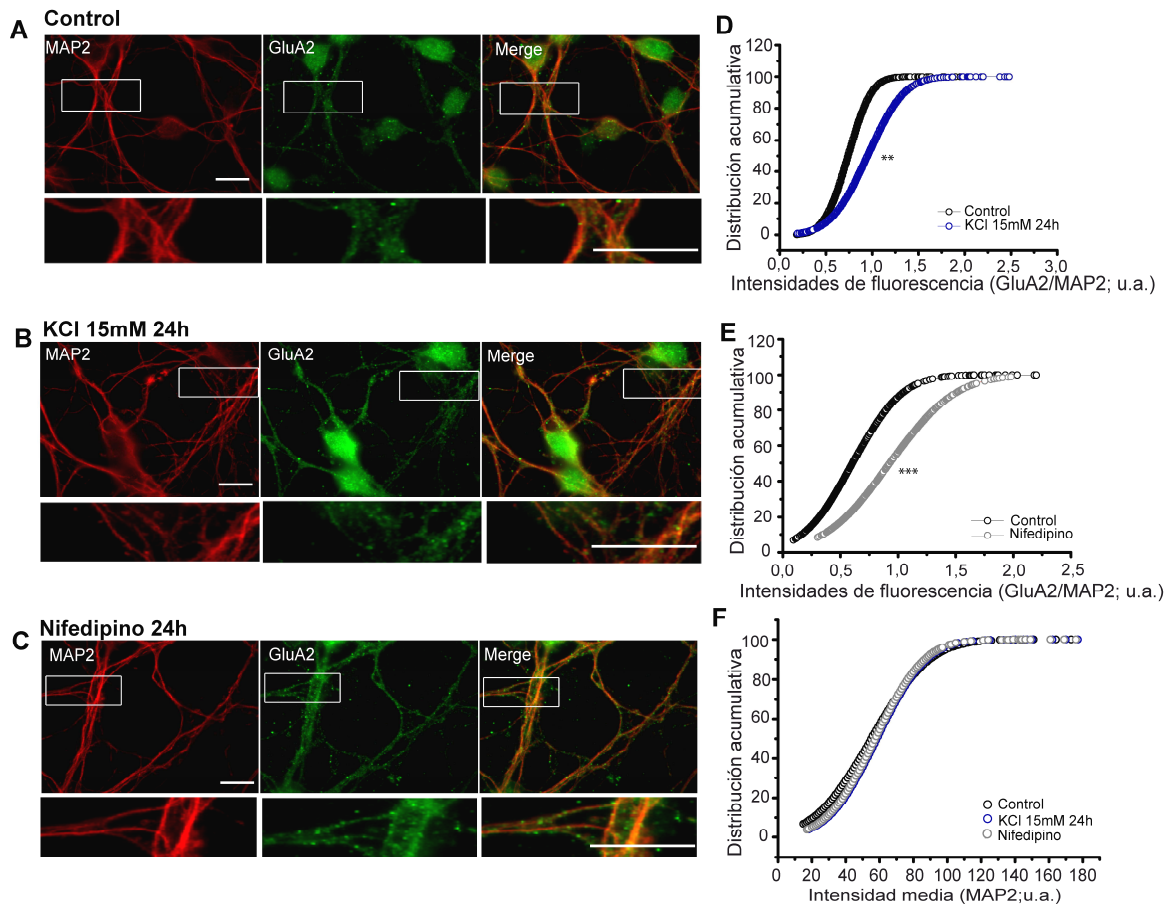


Figura 15. Inmunocitoquímica de las células granulares en cultivo de 7DIV con el anticuerpo que detecta el dominio extracelular de GluA2. (A, B y C) Imágenes representativas de las células inmunomarcadas con anti-GluA2, MAP2 y sobrepuestas, en cada una de las condiciones analizadas. (D y E) Distribuciones acumulativas de GluA2 en el control, KCl 15 mM y nifedipino. Los datos representan el cociente entre los valores de intensidad integrada de GluA2 y MAP2. (**p<0,01; ***p<0,001, test de Mann-Whitney y Komolgorov-Smirnov). (F)

Gráfico de las distribuciones acumulativas de la intensidad media de fluorescencia para MAP2. Intensidades medias de fluorescencia para GluA2: $10,03 \pm 0,53$; $19,56 \pm 2,91$; $20,28 \pm 3,21$, para control (970 ROIs), bajo KCl (931 regiones de interés) y 5 μ M nifedipino (753 regiones de interés).

Cuando se analizó la expresión de GluA3, se obtuvieron resultados similares a los observados para GluA2, un incremento de esta proteína en células incubadas durante 24 horas en bajo KCl o 5 μ M nifedipino (**Fig. 16**). El cociente de las intensidades medias de fluorescencia GluA3/MAP2 fue $0,52 \pm 0,01$ en las condiciones control, $0,97 \pm 0,02$ en condiciones de bajo potasio y $0,93 \pm 0,03$ en células incubadas con nifedipino.

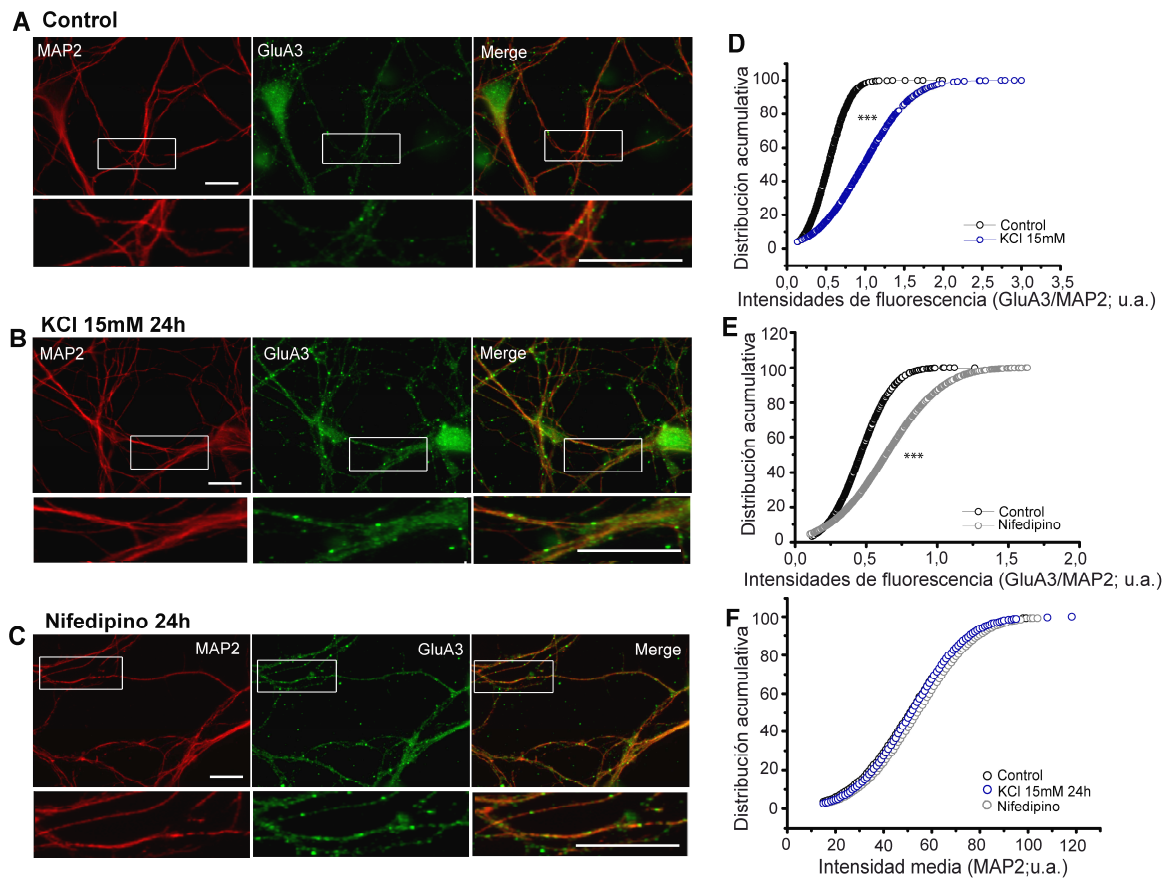


Figura 16. Inmunocitoquímica de las células granulares en cultivo de 7DIV con el anticuerpo que detecta el dominio extracelular de GluA3. (A, B y C) Imágenes representativas de las células inmunomarcadas con anti-GluA3, MAP2 y sobrepuestas, en cada una de las condiciones analizadas. (D y E) Distribuciones acumulativas de GluA3 en el control, en KCl 15 mM y en presencia de nifedipino. Los datos representan el cociente entre los valores de intensidad media

de GluA3 y MAP2. (** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$, test de Mann-Whitney y Komolgorov-Smirnov). (F) Distribuciones acumulativas de la intensidad media de fluorescencia para MAP2. Intensidades medias para GluA3: $20,32 \pm 1,75$, $36,86 \pm 1,8$ y $35,76 \pm 2,23$ u.a. para control (563 regiones de interés), bajo K^+ (650 regiones de interés), y 5 μM nifedipino (732 regiones de interés), respectivamente.

1.8 La persistente inhibición de actividad neuronal favorece la inserción de receptores AMPA permeables a calcio

En neuronas granulares de cerebelo hemos observado que, en los estadios de desarrollo estudiados, se expresan las cuatro subunidades de los receptores AMPA, que las subunidades más abundantes son GluA1 y GluA4 y que la disminución de la despolarización de la membrana plasmática o de la entrada de calcio se traduce en un incremento de la expresión de estas proteínas en la membrana. El hecho de que las subunidades GluA1 y GluA4 sean las más abundantes puede favorecer la formación de receptores AMPA permeables a calcio, constituidos por monómeros de GluA1 o GluA4, o heterómeros GluA1/GluA4.

Medimos el incremento del calcio intracelular en respuesta al agonista específico (S)-AMPA como prueba funcional de la activación de los receptores AMPA para analizar si la respuesta a dicho agonista es diferente en las células mantenidas 24 horas en condiciones de bajas concentraciones de KCl. En primer lugar se analizó la respuesta al agonista de los receptores AMPA 50 μM , en combinación con la ciclotiazida 10 μM (para prevenir la rápida desensibilización de los receptores) en poblaciones de neuronas granulares, mediante la sonda fluorescente de calcio Fluo-4 AM. Las células se estimularon con el agonista de AMPA 50 μM (más la ciclotiazida) y posteriormente con KCl 50 mM como control funcional de las células y para normalizar la posible variabilidad en la densidad celular (**Fig. 17**). Las respuestas se normalizaron a la fluorescencia inicial y posteriormente se efectuó el cociente entre los valores de incremento máximo producido por cada una de las dos estimulaciones. En células mantenidas en KCl 15 mM durante 24 horas, la respuesta a AMPA se

incremento en un 50%: el cociente entre la respuesta a AMPA y KCl fue de $0,79 \pm 0,05$ ($n=8$) para la condición control y $1,03 \pm 0,05$ ($n=7$) para la condición de KCl 15 mM durante 24h ($p<0,05$, comparación estadística obtenida mediante el test de la t de student) (**Fig. 17 A**). La especificidad de la respuesta a AMPA se confirmó por la completa abolición del incremento de calcio en presencia del antagonista específico de los receptores AMPA, NBQX 10 μ M (**Fig. 17 B**).

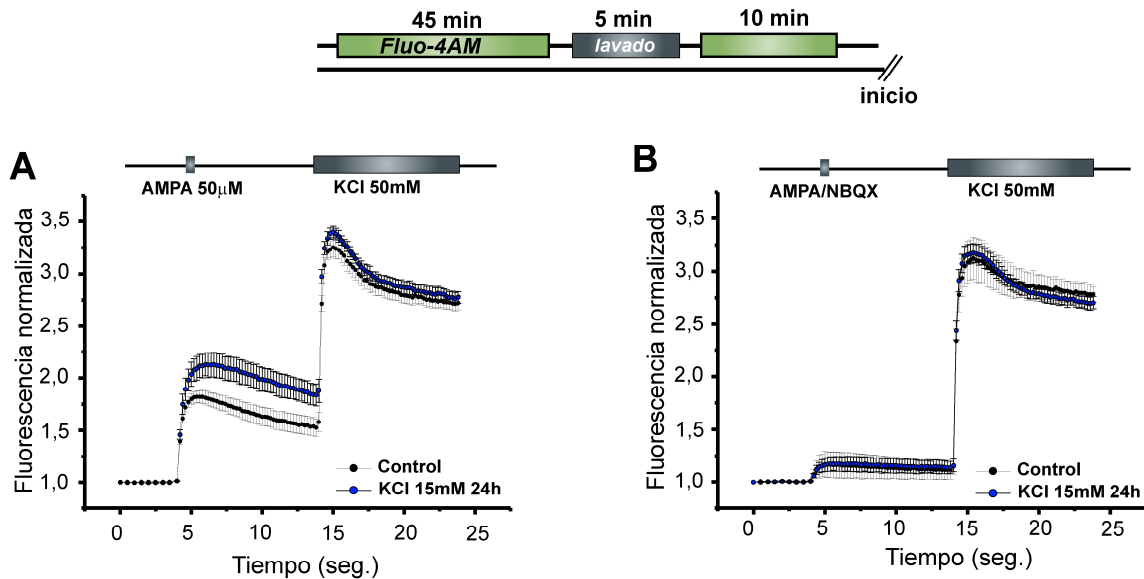


Figura 17. Incrementos de calcio en poblaciones de células a 7DIV. La estimulación con un agonista específico de los receptores AMPA provoca un incremento en la entrada de calcio en células mantenida en KCl 15 mM 24h. (A) Respuestas de células de 7 DIV en condiciones control (en negro, $n=8$) y en bajo KCl (en azul, $n=7$), estimuladas con AMPA 50 μ M + ciclotiazida 10 μ M. (B) Respuestas de células de 7 DIV en condiciones control (en negro, $n=6$) y en bajo KCl (en azul, $n=5$) preincubadas con el antagonista específico de los receptores AMPA, NBQX 10 μ M y posteriormente estimuladas con AMPA 50 μ M y ciclotiazida 10 μ M. La significación estadística se calculó comparando la condición control con las otras dos mediante el test de la t de student (* $p<0,05$).

De forma similar, cuando se analizó la entrada de calcio a través de los receptores AMPA, en células individuales mediante la sonda Fura-2 AM, se confirmó el resultado observado en poblaciones. Las células se perfundieron con medio tamponado con TES, y se estimularon durante 10 segundos con el respectivo agonista. Se analizaron las repuestas de calcio en somas individuales, normalizando la fluorescencia (350/380 nm) en cada tiempo a la fluorescencia

inicial (F0) y posteriormente calculando los incrementos de la respuesta máxima. El incremento observado pasó de $0,66 \pm 0,05$ en células mantenidas en condición control (n=35 células) a $1,17 \pm 0,02$ (n=37 células) en células mantenidas 24 horas en bajo KCl (p<0,001, test de la t de student) (Fig. 18 A y B). Cuando la estimulación se realizó en presencia del antagonista de los receptores AMPA, NBQX, no se observó ningún incremento de calcio, pero la respuesta se recuperó después de 2 min de lavado (Fig. 18 A y B).

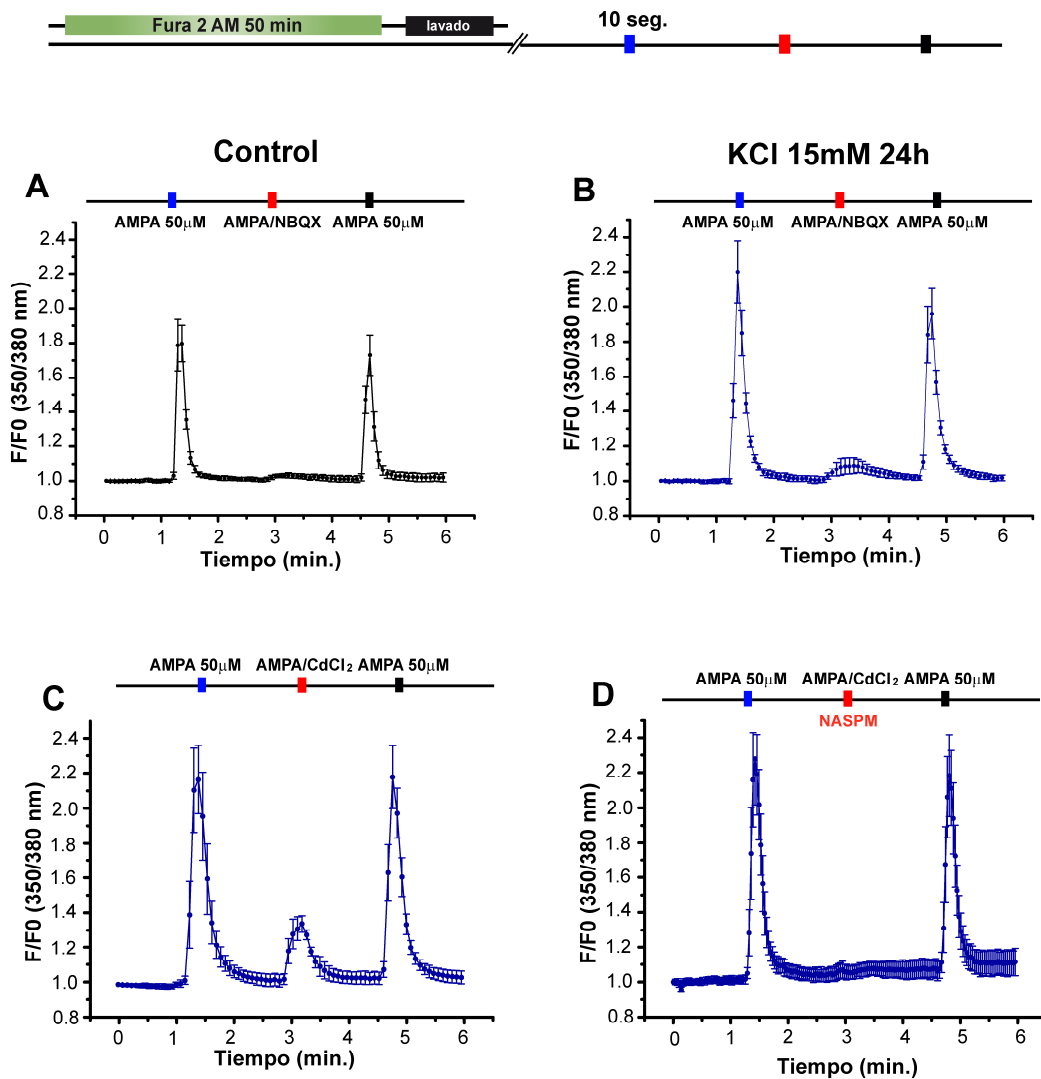


Figura 18. Incrementos de calcio en células individuales de 7 DIV mantenidas en condiciones control (A) y en un medio con bajo KCl (B). Las células se estimularon con (S)-AMPA 50 μ M (primer estímulo 10 segundos), (S)-AMPA más el antagonista NBQX 10 μ M (segundo estímulo 10 segundos) y (S)-AMPA (tercer estímulo 10 segundos). La fluorescencia a cada tiempo está

normalizada con la fluorescencia inicial. Los resultados representan la media $\pm$ error estándar de 35 células en el control y de 37 células en bajo KCl ($p < 0,001$, t-test). Incrementos de calcio en células individuales de 7 DIV mantenidas en un medio con bajo KCl estimuladas con (S)-AMPA en presencia de CdCl_2 25 μM (C) o CdCl_2 +NASPM 10 μM (D). La completa abolición de respuesta en (D) confirma la presencia de receptores AMPA permeables a calcio.

Para determinar la contribución de la entrada de Ca^{2+} a través de los canales de calcio dependientes de voltaje (VSCCs), las respuestas al agonista específico de los receptores AMPA se estudió en presencia del bloqueante inespecífico de los canales, CdCl_2 (**Fig. 18 C**). La presencia de CdCl_2 eliminó totalmente la respuesta a KCl 50 mM (**Fig. 19**) pero no la respuesta a (S)-AMPA (**Fig. 18 C**).

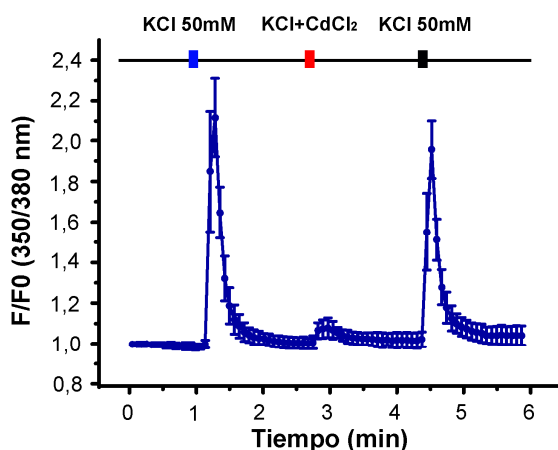


Figura 19. Respuestas de células individuales a la estimulación con KCl 50mM (primer y tercer estímulo) o en presencia de CdCl_2 25 μM (segundo estímulo). El resultado representa la respuesta media de 68 células cultivadas en medio 15 mM KCl durante las últimas 24 horas.

Para evitar la posible entrada de calcio a través de los receptores NMDA, se hicieron experimentos en presencia del antagonista MK-801. Las respuestas a AMPA se inhibieron parcialmente, por CdCl_2 y MK-801 (**Tabla. 1**), siendo la inhibición producida por MK-801 de menor magnitud. Cuando se combinaron CdCl_2 y MK-801 la inhibición observada fue similar a la producida por el CdCl_2 solo. En ningún caso se inhibió totalmente la respuesta al agonista AMPA,

sugiriendo la entrada de calcio a través de los receptores AMPA permeables a calcio.

Este hecho se confirmó mediante el empleo del análogo sintético de la toxina de *Joro spider* (JSTX) el 1-naftil acetil espermina (NASPM), que bloquea específicamente los receptores AMPA permeables a Ca^{2+} , porque suprimió la respuesta a AMPA resistente a CdCl_2 (Fig. 18 D).

Control (KCl 25 mM).			KCl 15 mM 24 horas.	
Compuestos utilizados	Medida en población	Células individuales	Medida en población	Células individuales
NBQX (10 μM)	100% (n=6)	94,9 $\pm$ 2,2% (n=4)	100% (n=5)	97,0 $\pm$ 2,1% (n=4)
CdCl_2 (25 μM)	57,9 $\pm$ 3,0% (n=7)	68,2 $\pm$ 2,6% (n=3)	58,3 $\pm$ 2,9% (n=7)	72,7 $\pm$ 1,5% (n=6)
MK-801 (20 μM)	26,9 $\pm$ 0,9% (n=5)	24,5 $\pm$ 1,2% (n=4)	21,9 $\pm$ 3,0% (n=5)	26,0 $\pm$ 1,0% (n=4)
MK-801+CdCl_2	63,5 $\pm$ 3,0% (n=6)	77,0 $\pm$ 2,3% (n=4)	58,9 $\pm$ 4,5% (n=5)	80,5 $\pm$ 1,2 (n=4)

Tabla. 1: Porcentajes de inhibición de la entrada de calcio en respuesta al agonista (S)-AMPA medidas en poblaciones o células individuales. Los datos de células individuales representan la media $\pm$ el error estándar de un mínimo de 8-10 células (por experimento) de 4 experimentos realizados en cultivos diferentes.

1.9 La reducción crónica de la actividad neuronal no afecta al grado de edición del ARNm de la subunidad GluA2

La subunidad GluA2 está regulada por una edición del ARNm que la codifica, un proceso que consiste en la desaminación enzimática de los ribonucleótidos en ARNm previamente procesados (Bass 2002). La edición del mensajero que codifica para la subunidad GluA2 consiste en la conversión de un codón que codifica para glutamina en un codón para arginina (*edición Q/R*) en la región que forma el poro del canal. Este cambio de un aminoácido neutro por otro cargado positivamente confiere impermeabilidad al calcio a los receptores formados por heterómeros que contengan al menos una subunidad GluA2 editada u homómeros de GluA2 (Greger y cols. 2002; Malinow y Malenka 2002). En nuestro estudio hemos puesto de manifiesto una mayor

expresión de las subunidades GluA1 y GluA4. Sin embargo, la presencia de GluA2 no editada podría afectar, en parte, a la permeabilidad a calcio y contribuir de forma significativa a la entrada de calcio observada en los experimentos funcionales. Por otra parte la edición de ARNm es un mecanismo que podría estar regulado por las condiciones de cultivo.

Analizamos el grado de edición del ARNm que codifica para GluA2 en nuestro modelo experimental y si se afectaba por la disminución de la concentración de KCl en el medio extracelular. Para ello se utilizaron extractos de ARNm de células de 7 DIV, mantenidas en condiciones control o incubadas en un medio con KCl 15 mM las últimas 24 horas. Se amplificó un fragmento de cDNA de 350 pb que contenía el sitio de edición. La edición (Q/R) del RNAm que codifica para GluA2 consiste en la desaminación de una A que se transforma en una G. Este cambio de base introduce un sitio de restricción para la enzima Acil y elimina un sitio de restricción para la enzima BBvI. Tanto en las células mantenidas en las condiciones control como en las incubadas durante 24 horas con 15 mM KCl. El ARNm que codifica para la GluA2 está totalmente editado, tal y como se muestra en la **Figura 20**. Por una parte, Acil digirió todo el producto de PCR (**Fig. 20 A**), mientras que la enzima BBvI, no fue capaz de digerir los productos de PCR procedentes de las dos condiciones experimentales (**Fig. 20 B**). Para confirmar la actividad de la enzima BBvI se utilizó, como control positivo, el plásmido pBR322 que contiene varias secuencias de restricción para BBvI. La **Figura 20 C** muestra que BBvI digirió totalmente el plásmido pBR322.

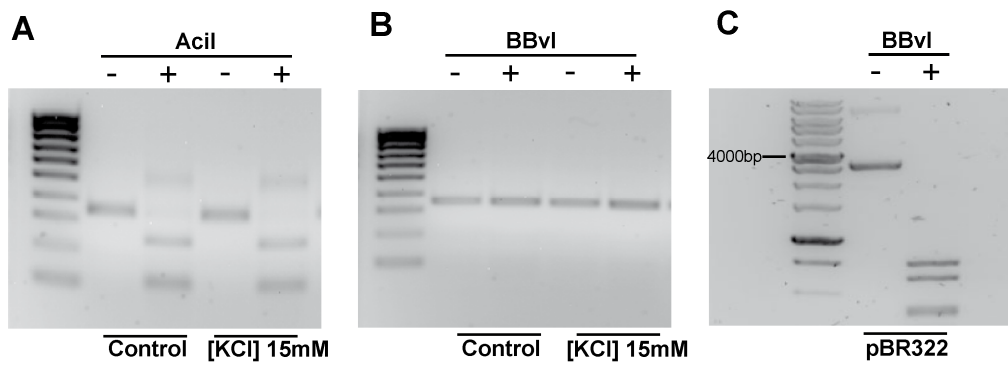


Figura 20. Ensayo de edición del ARNm que codifica para la subunidad GluA2. El + o - indican la presencia o no de la enzima de restricción (Acil que digiere el fragmento editado, BBvI digiere el fragmento no editado). (A) La digestión enzimática de Acil demuestra la completa edición de los ARNm de GluA2 presentes en nuestras condiciones de cultivo. (B) La completa ausencia de digestión de BBvI confirma la ausencia de GluA2 no editado. (C) Control positivo que demuestra el correcto funcionamiento de BBvI utilizando el plásmido pBR322 como sustrato.

2. Regulación del tráfico de la subunidad GluA1 por la cascada de señalización del NO

En trabajos previos de nuestro grupo de investigación se llevó a cabo la caracterización molecular de la vía de señalización del NO/GMPc en neuronas granulares en cultivo, así como en el cerebelo *in vivo* (Jurado y cols. 2003, 2005). En estos trabajos se demostró la presencia de NOS I, GCs, cGKI y cGKII en neuronas granulares de diferentes estadios de diferenciación y su activación como consecuencia de la estimulación de los receptores NMDA (Jurado y cols. 2004, 2006). Por otra parte, la activación de esta vía de señalización es necesaria para el desarrollo de estas neuronas, al menos *in vitro*, ya que está implicada en la emisión de neuritas, en la formación de botones sinápticos y en su maduración funcional (López-Jiménez y cols. 2009, 2012).

En neuronas de hipocampo y corteza, la activación de la vía de señalización NO-GMPc-cGKII, como consecuencia de la estimulación de receptores NMDA, se traduce en un incremento de receptores AMPA en la membrana (Serulle y cols. 2007). Este incremento se debe a la presencia de la subunidad GluA1, que resulta fosforilada en la Ser845 por la cGKII, mecanismo relacionado con un incremento del tráfico hacia la membrana de esta proteína (Esteban y cols. 2003; Man y cols. 2007).

En cerebelo se conoce desde hace tiempo la necesidad de la estimulación de los receptores NMDA para el correcto desarrollo de las neuronas granulares (Jurado y cols. 2006; Contestabile y cols. 2012). Nosotros hemos demostrado la expresión de las cuatro subunidades de los receptores AMPA y que la subunidad GluA1 es una de las más abundantes en las neuronas granulares en los estadios de desarrollo estudiados. Por tanto, el siguiente objetivo fue analizar si en neuronas granulares la activación de la vía de señalización NO-GMPc-cGKII también regula el tráfico de esta proteína.

2.1 La proteína quinasa dependiente de GMPc de tipo II fosforila la subunidad GluA1 en la Ser845

En nuestro modelo, debido a la presencia de una alta concentración de potasio en el medio extracelular, que produce una despolarización de la membrana plasmática y permite la entrada de calcio, la ruta NO-cGMP-cGKII está activada tónicamente. Por esto antes de cada experimento se mantuvieron las células una hora en un medio con baja concentración de potasio (5 mM), para disminuir la actividad de esta vía en condiciones control y así, poder analizar el efecto de su activación.

En primer lugar analizamos el grado de fosforilación de Ser845 de GluA1 cuando se manipula farmacológicamente la actividad de la vía NO-GMPc-cGKII. Cuando las células granulares de 8 días *in vitro* se incubaron con un análogo permeable de GMPc más resistente a la hidrólisis por la PDEs que el GMPc, 8Br-cGMP durante 20 minutos, se observó un incremento del 30% ($1,30 \pm 0,03$) en el grado de fosforilación de la Ser845 de la subunidad GluA1 inmunodetectada mediante un anticuerpo específico para la Ser845-PO (**Fig. 21 A y B**). Sin embargo, la incubación previa con el inhibidor de las proteínas quinasas dependientes de GMPc, KT5823 2 μ M, redujo de forma evidente el grado de fosforilación de GluA1, y abolió el incremento producido por el 8Br-cGMP ($0,62 \pm 0,04$). Ningún tratamiento modificó la cantidad total de GluA1.

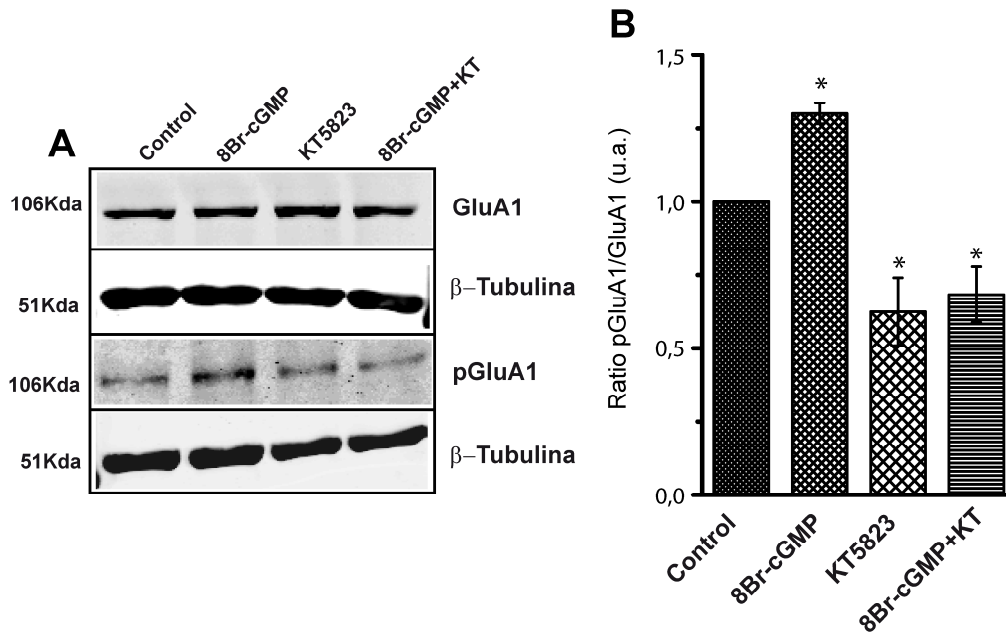


Figura 21. Efecto de la manipulación farmacológica de la actividad quinasa dependiente de GMPc en el grado de fosforilación de GluA1. (A) Inmunodetecciones representativas realizadas con extractos de proteínas obtenidos de células control, células incubadas con 8Br-GMPc (500 μ M; 20 min); con KT5823 (2 μ M; 30 min); o con ambos (8Br-GMPc+KT), revelados con anticuerpos frente a GluA1, GluA1 PO-Ser845 y β -tubulina, utilizada como control de carga. (B) Promedio del cociente de las densidades ópticas P-GluA1/GluA1. Los valores de las densidades ópticas se normalizaron con el control de carga de cada experimento y posteriormente con la condición de control. (Control: 1; 8Br-cGMP: 1,30 $\pm$ 0,03; KT5823: 0,79 $\pm$ 0,04; 8Br-cGMP+KT: 0,75 $\pm$ 0,08). Los datos representan los valores de las medias $\pm$ error estándar. La significación estadística se calculó mediante el test de la t de student. (*p<0,05; n=7).

Por otro lado, cuando se estimuló la vía endógena mediante el agonista específico NMDA 50 μ M más el co-agonista glicina (10 μ M) durante 10 minutos en medio sin Mg^{2+} , también se observó un incremento (20%) en la fosforilación de GluA1 en la Ser845 (**Fig. 22 A y B**). El pre-tratamiento con el inhibidor de las cGKs, KT5823 2 μ M, confirmó que el receptor NMDA induce la fosforilación de la subunidad GluA1 a través de la activación de la cGK.

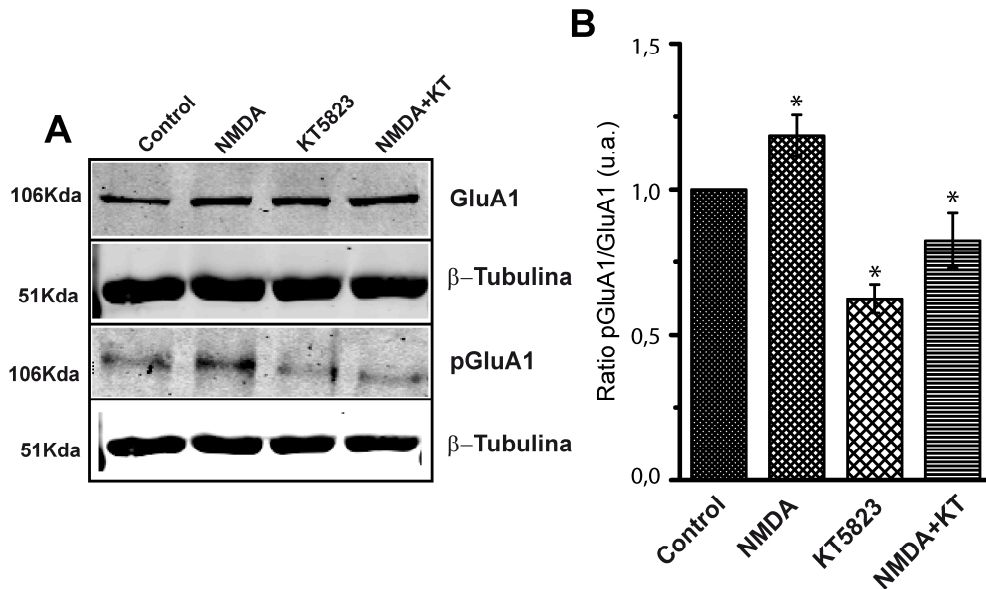


Figura 22. Efecto de la estimulación de los receptores NMDA en el grado de fosforilación de GluA1. (A) Inmunodetecciones representativas realizadas con extractos de proteínas obtenidos de células control, células incubadas con NMDA (50 μ M) + Glycine (10 μ M; 10 min); con KT5823 (2 μ M; 30 min); o con ambos (NMDA+KT), revelados con anticuerpos frente a GluA1, GluA1 PO-Ser845 y β -tubulina, utilizada como control de carga (B) Promedio del cociente de las densidades ópticas P-GluA1/GluA1. Los valores de las densidades ópticas se normalizaron con el control de carga de cada experimento y posteriormente con la condición de control. (Control: 1; NMDA: $1,24 \pm 0,02$; KT5823: $0,63 \pm 0,05$; NMDA+KT: $0,82 \pm 0,09$). Los datos representan los valores de las medias $\pm$ error estándar. (* $p < 0,05$; $n = 7$ test de la t de student).

Estos resultados demuestran que, en neuronas granulares de cerebelo, la cascada de señalización iniciada por la síntesis de NO, tras la estimulación de los receptores NMDA, se traduce en la fosforilación de GluA1 en la Ser845, mecanismo que podría estar relacionado con la regulación del tráfico de esta proteína hacia la membrana (He y cols. 2009; Makino y cols. 2011). El protocolo utilizado en este estudio para la activación de los receptores NMDA (NMDA+glicina durante 10 minutos), es similar al utilizado en un trabajo reciente, que demuestra el aumento de la subunidad GluA1 en la sinapsis por activación de los receptores NMDA (Jaafari y cols. 2012).

2.2 Los niveles de GluA1 y pGluA1 están disminuidos en las fracciones sinápticas de cerebelo obtenidas a partir de un ratón de 14 días que no expresa cGKII

Tal como se demuestra en el apartado anterior, GluA1 es sustrato de una quinasa activada por GMPc. En un estudio anterior al nuestro, se había demostrado la fosforilación de GluA1 por cGKII en neuronas piramidales de hipocampo (Serulle y cols. 2007). Nos preguntamos si *in vivo*, la supresión de la expresión de cGKII afectaba a la expresión, localización y/o grado de fosforilación de GluA1 en cerebelo. Para responder a esta pregunta, analizamos el nivel de GluA1 en extractos de proteínas preparados a partir de cerebelos de ratones de 14 días de la cepa salvaje (WT) y cGKII^{-/-} (Pfeifer y cols. 1996).

En homogenados totales de cerebelo de ratones de 14 días no se observaron diferencias del contenido de GluA1, cuando se compararon los resultados de WT y cGKII^{-/-}, sugiriendo que la expresión de esta proteína no se modifica por la ausencia de cGKII (**Fig. 23 A**). Cuando se realizó un fraccionamiento subcelular se observaron diferencias significativas en la fracción P2, la fracción enriquecida en sinaptoneurosomas y la fracción enriquecida en la densidad postsináptica (P2 WT: 1; P2 KO: 0,55±0,18; Syn WT: 1; Syn KO: 0,71±0,02; cPSD WT: 1; cPSD KO: 0,58±0,11). Las **figuras 23 A y B** muestran una clara disminución de la subunidad GluA1 en las fracciones obtenidas de cerebelos cGKII^{-/-} respecto al WT. Cuando se analizó el nivel de GluA1 fosforilado en Ser845 también se observó una disminución en la fracción de sinaptoneurosomas y la fracción de densidad postsináptica (Syn WT: 1; Syn KO: 0,76±0,02; cPSD WT: 1; cPSD KO: 0,68±0,01) (**Fig. 23 C y D**). Cuando calculamos el cociente entre pGluA1 y GluA1 total (**Fig. 23 E**) no se observaron diferencias entre las fracciones obtenidas de WT y de cGKII^{-/-}, sugiriendo que la disminución de la subunidad GluA1 total es paralela a la disminución de la fosforilación de dicha subunidad como consecuencia de la ausencia de cGKII.

Puesto que las variaciones se observan en fracciones de membrana, estos resultados, demuestran que la cGKII regula en el tráfico a membrana de la subunidad GluA1 *in vivo*.

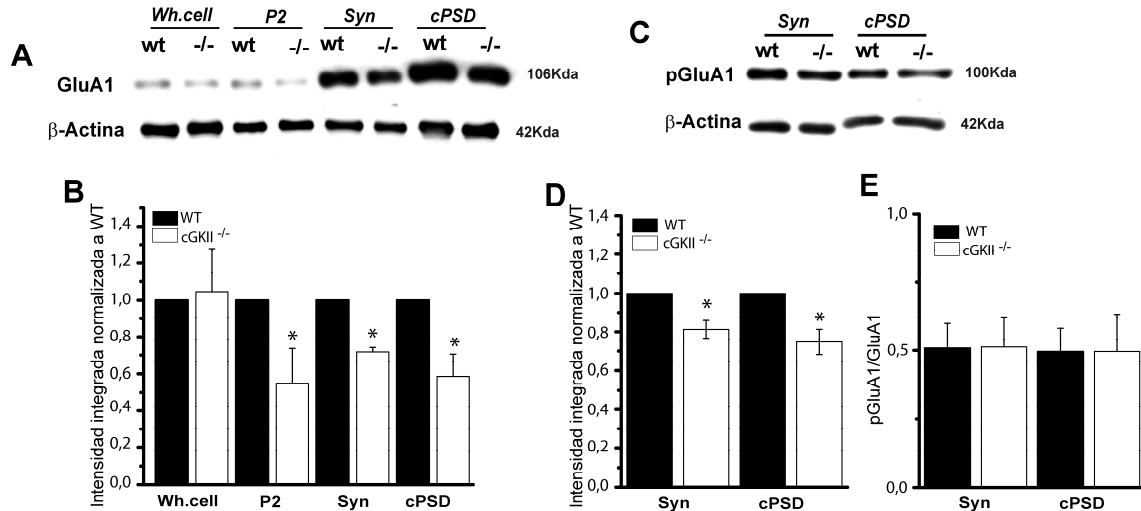


Figura 23. La ausencia de cGKII se traduce en una disminución de GluA1 en fracciones de membrana obtenidas de cerebelos de ratones de 14 días. (A) Resultados de inmunotransferencia obtenidos con diferentes fracciones del cerebelo de ratones de una cepa salvaje (WT) y ratones carentes de cGKII (cGKII^{-/-}), revelado con anticuerpos frente a GluA1 y β -actina, utilizado como control de carga. (B) Cuantificación de los valores de densidad óptica normalizados con los de β -actina y con los valores del WT. (C) Inmunotransferencia representativa de las fracciones de membrana revelada con el anticuerpo que reconoce la Ser845 fosforilada de GluA1. (D) Cuantificación de las densidades ópticas normalizadas a los valores de β -actina y con los valores del WT. (E) Cociente de las densidades ópticas pGluA1/GluA1 para las diferentes fracciones (Wh. Cell: homogenado total de cerebelo; P2: fracción particulada; Syn: fracción sinaptoneurosomal; cPSD: fracción de la densidad post-sináptica). (*p<0,05; n=3. Los datos representan los valores de las medias $\pm$ el error estándar. La significación estadística se calculó mediante el test de la t de student).

2.3 Co-inmunoprecipitación de las proteínas cGKII y GluA1 en extractos de cerebelo de ratas de 14 días

En un estudio anterior al nuestro, se había demostrado la interacción entre GluA1 y cGKII en neuronas piramidales de hipocampo (Serulle y cols. 2007). En este estudio se puso de manifiesto que la secuencia de aminoácidos

839-841 del dominio C-terminal del GluA1, una región que hasta ahora no se había relacionado con otras proteínas, es importante para la interacción con cGKII. Además se demostró que la región correspondiente a los últimos 173 aminoácidos del dominio catalítico de la cGKII es necesaria para que se produzca esta interacción.

Una vez comprobado que, en el cerebelo *in vivo*, la cGKII también es importante para la expresión en membrana de la subunidad GluA1, quisimos analizar si en nuestro modelo también existe una interacción entre estas dos proteínas. Para alcanzar el objetivo, se hicieron experimentos de co-inmunoprecipitación en extractos de cerebelos de ratas de 14 días utilizando anticuerpos específicos para estas proteínas. El anticuerpo anti-cGKII co-inmunoprecipitó GluA1 (**Fig. 24**; calle 2 IB: anti-GluA1). Del mismo modo, el anticuerpo anti-GluA1 también co-inmunoprecipitó cGKII (**Fig. 24**; calle 2 IB: anti-cGKII). Las bandas no fueron evidentes cuando, para la inmunoprecipitación, se utilizaron anticuerpos IgG de ratón o conejo (**Fig. 24**; calle 1 y 3) confirmando, así, la especificidad de la reacción.

Estos resultados demuestran que GluA1 y cGKII pueden formar complejos estables proteína-proteína en cerebelos de rata que resisten a las condiciones requeridas para la solubilización y la co-inmunoprecipitación, sugiriendo que estos complejos oligoméricos pueden ser relevantes *in vivo*.

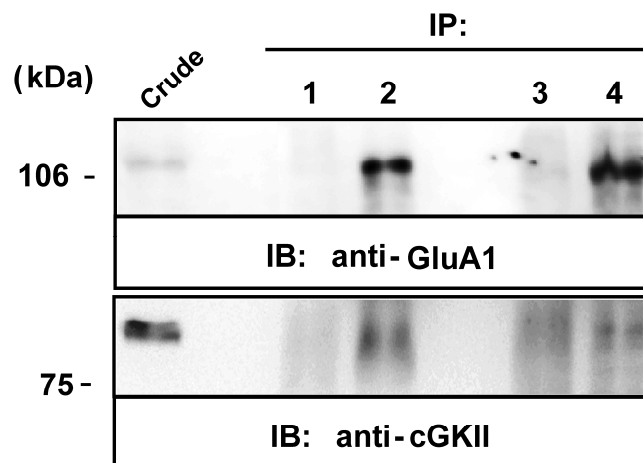


Figura 24. Co-inmunoprecipitación de GluA1 y cGKII en cerebelo de rata de 14 días. Los extractos de ratas de 14 días, se homogenizaron y co-inmunoprecipitaron utilizando un

anticuerpo de ratón anti-Flag (2µg, calle 1), un anticuerpo de conejo anti-cGKII policlonal (2µg, calle 2), un anticuerpo de conejo anti-HA (2µg, calle 3), un anticuerpo de conejo anti-GluA1 policlonal (2µg, calle 4) o un anticuerpo de ratón anti-GluA1 monoclonal (2mg, calle 4 de cGKII IB). Los extractos (crudos) y los inmunoprecipitados (IP) se analizaron mediante inmunotransferencia utilizando un anticuerpo de conejo anti-GluA1 policlonal (1µg/ml) y un anticuerpo de conejo anti-cGKII (1µg/ml). Para evitar una reactividad cruzada de inmunoglobulinas (IgG) se utilizaron anticuerpos secundarios conjugados a HRP anti-conejo IgG y anti-ratón True-Blot™ (1:1000). La inmunoreactividad de las bandas se visualizó mediante quimioluminiscencia.

2.4 El silenciamiento de la cGKII provoca la disminución de la expresión de GluA1 en la membrana plasmática

A la luz de los resultados obtenidos, parecía evidente que la cGKII era importante para la regulación de la expresión de GluA1 en la membrana plasmática. Para verificar estos resultados en células granulares en cultivo, se silenció la expresión de cGKII en estas células y se analizó la expresión de GluA1 en membrana. Para ello las células se transfectaron con un siRNA específico para inducir la degradación del ARNm que codifica para la cGKII o con un siRNA de secuencia aleatoria que no induce el silenciamiento de ningún producto génico (control negativo). La reducción de la concentración del ARNm que codifica para la cGKII se analizó a las 48 horas después de la transfección mediante RT-PCR cuantitativa, observándose una reducción clara (>80%) con respecto a las células control.

Con objeto de cuantificar el nivel de expresión de GluA1 en la membrana plasmática, a las 72 horas después de la transfección, las células se fijaron y se incubaron con un anticuerpo que reconoce el dominio N-terminal, extracelular, de GluA1. Posteriormente, se permeabilizaron y se incubaron con un anticuerpo frente a la proteína MAP2. Se observó que la intensidad del marcaje de GluA1 disminuyó de forma muy significativa en las células en las que se había silenciado la expresión de cGKII (**Fig. 25 A y B**) mientras que el inmunomarcaje de MAP2 fue similar en células control, en células transfectadas con un siRNA de secuencia aleatoria así como en las células en las que se había

silenciado la cGKII (**Fig. 25 A y C**). La intensidad de fluorescencia de MAP2 sirvió para normalizar la fluorescencia de GluA1. En la **Figura 25 D** se muestran los valores medios de los cocientes entre la intensidad de fluorescencia de GluA1 y la de MAP2, evidenciando la disminución significativa de fluorescencia en las células donde se había silenciado cGKII (Control: $0,27 \pm 0,005$ $n=2284$ regiones de interés; siRNA control: $0,26 \pm 0,001$ $n=3365$ regiones de interés; siRNA: $0,06 \pm 0,003$ $n=2716$ regiones de interés).

Estos resultados, confirman que la cGKII participa en el mecanismo molecular que regula la expresión de la subunidad GluA1 en la membrana de las neuronas granulares.

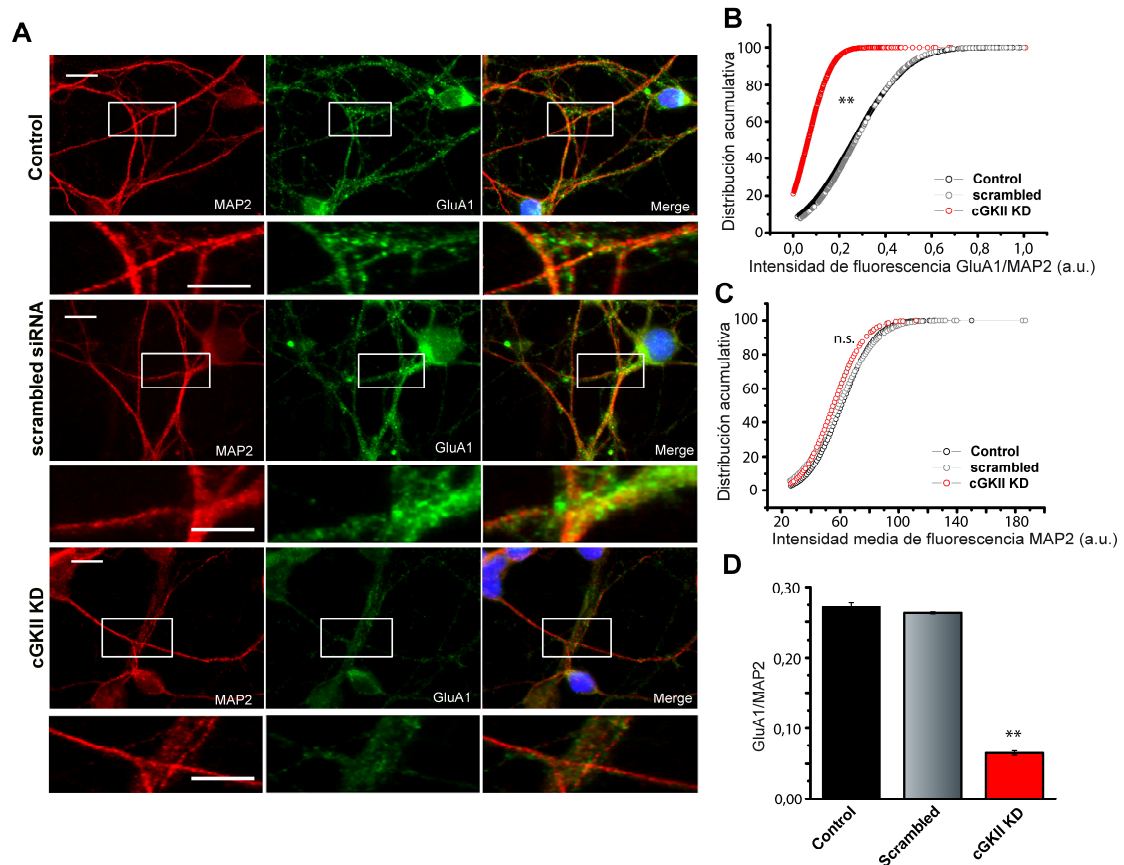


Figura 25. Inmunocitoquímica de células de 8 días *in vitro*, transfectadas durante 72 horas con ARN de interferencia para silenciar la expresión de cGKII. (A). Imágenes representativas, de las condiciones analizadas: control, control negativo siARN (scrambled siRNA) y siARN de cGKII (cGKII KD). El marcaje en azul con DAPI se utilizó para marcar los núcleos. (B y D). Las intensidades de fluorescencia de GluA1 se normalizaron con las intensidades de MAP2 y posteriormente se realizó la distribución acumulativa. (D) representa el valor promedio de los cocientes intensidad de fluorescencia de GluA1/intensidad de fluorescencia de MAP2. (Control: $0,27 \pm 0,005$ $n=2.284$; siRNA control negativo: $0,26 \pm 0,001$ $n=3.365$; siRNA: $0,06 \pm 0,003$ $n=2.716$) (C)

Las intensidades de fluorescencia de MAP2 no variaron en las tres condiciones analizadas ($60,7 \pm 0,54$, $58,7 \pm 1$, $59,2 \pm 1,5$ para control, siRNA control negativo y siRNA de cGKII). (** $p < 0,001$, test de Mann-Whitney y test de Kolmogorov-Smirnov).

2.5 La activación de la cGKII incrementa los niveles de GluA1 en la membrana en sitios extra-sinápticos

La fosforilación de diferentes residuos aminoacídicos del dominio C-terminal (concretamente tres residuos de serina) de la subunidad GluA1 es fundamental para la incorporación de esta subunidad a la membrana plasmática (Raymond y cols. 1993; Swope y cols. 1999). Diferentes proteínas quinasas fosforilan estos residuos, la proteína quinasa A fosforila la Ser845, la calmodulina quinasa II la Ser831 y la PKC Ser818. La fosforilación de la Ser845 es necesaria para la inserción de GluA1 en la membrana, pero esta inserción se produce en sitios extra-sinápticos (Man y cols. 2007; Serulle y cols. 2007; Oh y cols. 2006; Sun y cols. 2005), mientras que la fosforilación por PKC y CaMKII de la Ser818 favorece la inserción en sitios sinápticos (Boehm y cols. 2006; Lisman y cols. 2012). De hecho, serían necesarias las dos fosforilaciones de manera secuencial para la inserción de GluA1 en la membrana sináptica.

La cGKII también fosforila la Ser845 de GluA1, como ya hemos demostrado en los resultados anteriores. Para analizar si las diferentes condiciones experimentales que se traducen en un incremento de la fosforilación de GluA1 en la Ser845 afectaban, por un lado, a su nivel de expresión en membrana, y por otro, a su localización, se realizaron experimentos de inmunocitoquímica de doble marcaje con un anticuerpo que reconoce el dominio N-terminal de la subunidad GluA1 (en células vivas, previa a la fijación y a la permeabilización), y otro contra sinapsina para marcar los sitios sinápticos. Como se observa en la **Figura 26**, tanto el marcaje de GluA1 como el de sinapsina mostró un patrón punteado (áreas marcadas) a lo largo de las fibras. Se analizó: a) la densidad de las áreas marcadas, midiendo su número y dividiéndolo por la longitud de las dendritas, b) la intensidad de marcaje y c)

el grado de yuxtaposición de GluA1 y sinapsina. En primer lugar se analizó si la incubación con el análogo permeable de GMPc, (8Br-GMPc, 500 μ M) durante 20 minutos, previos a la incubación con el anticuerpo, afectaba a estos parámetros. La densidad de áreas marcadas (**Fig. 26 A y B**) se incrementó en un 33% en las células incubadas con 8Br-GMPc ($0,36 \pm 0,016$ áreas/ μ m) con respecto al control ($0,27 \pm 0,012$ áreas/ μ m). Del mismo modo, también se observó un incremento importante en la intensidad de marcaje de estas áreas (**Fig. 26 A y C**; control: $22,5 \pm 0,55$ u. a; 8Br-GMPc: $29,7 \pm 0,7$ u. a). Estos resultados demuestran que el tratamiento con 8Br-GMPc se traduce en un incremento de GluA1 en la superficie. Sin embargo, el porcentaje de yuxtaposición de GluA1 y sinapsina no se modificó ($22 \pm 0,74\%$ $p > 0,05$) respecto a la condición control ($22 \pm 0,74\%$), indicando que el incremento de marcaje observado se debe a un incremento de GluA1 en la membrana en sitios extra sinápticos (**Fig. 26 A y D**). Cuando se realizó una incubación previa con el inhibidor de cGKII, KT5823, se abolió el efecto del 8Br-GMPc y se observó una disminución de la densidad de áreas marcadas (KT5823: $0,18 \pm 0,01$ áreas/ μ m; 8Br+KT: $0,19 \pm 0,02$ áreas/ μ m), de la intensidad de marcaje (KT5823: $15 \pm 0,32$ u.a; 8Br+KT: $16,7 \pm 0,06$ u.a.), y del porcentaje de yuxtaposición (KT5823: $15,6 \pm 0,49\%$; 8Br+KT: $16,2 \pm 0,88\%$). Estos resultados, por una parte, confirman que la activación de cGKII se traduce en un aumento de GluA1 en la superficie y sugieren que la defosforilación de Ser845 facilita la endocitosis de GluA1 sináptico. Además, se confirma la activación tónica de cGKII.

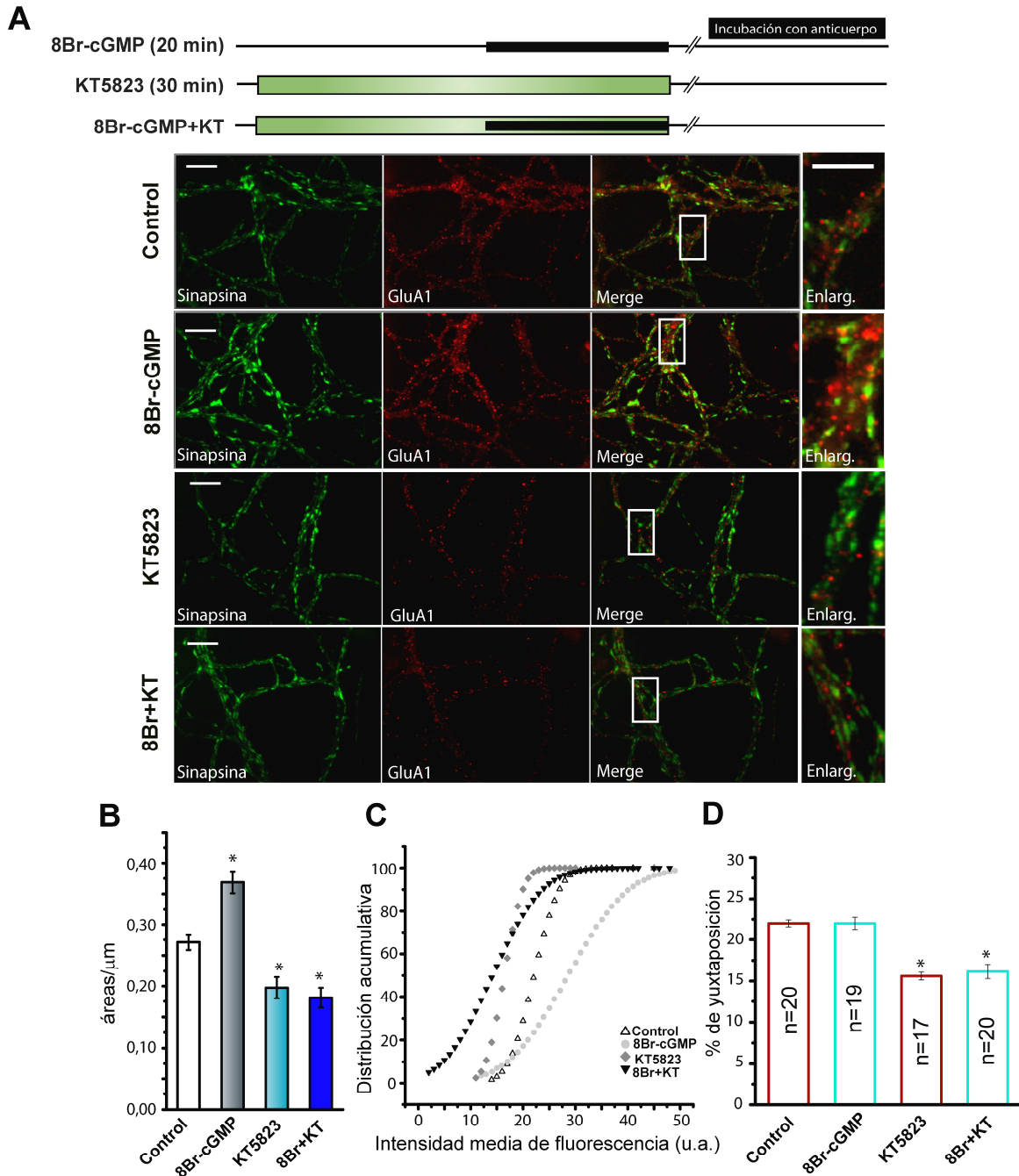


Figura 26. Inmunocitoquímica de GluA1 y Sinapsina en células de 7 DIV. (A) Diseño experimental e imágenes representativas del inmunomarcaje con los anticuerpos específicos para GluA1 (N-terminal) y Sinapsina, y la superposición de ambos marcajes, mostrando una región de la imagen ampliada. (B) Densidad de áreas marcadas con anti-GluA1 para las diferentes condiciones experimentales, expresada como área/μm (control: 0,27±0,012; 8Br-cGMP: 0,36±0,016; KT5823: 0,18±0,01; 8Br+KT: 0,19±0,02). (C) Distribución acumulativa de los valores de intensidad de fluorescencia obtenidos para el marcaje de GluA1 en las diferentes condiciones experimentales (control: 22,5±0,55 u.a.; 8Br-cGMP: 29,7±0,7 u.a.; KT5823: 15±0,32 u.a.; 8Br+KT: 16,7±0,06 u.a.). (D) Porcentaje de yuxtaposición de las regiones marcadas con anti-GluA1 y anti-Sinapsina (control: 22±0,43%; 8Br-cGMP: 22±0,74%; KT5823: 15,6±0,49%; 8Br+KT:

16,2±0,88%). Los datos de B y D representan las media ± el error estándar de n=20 campos de 2 experimentos diferentes (*p<0,001, t de student; se utilizo el test de Komolgorov-Smirnov para confirmar las diferencias estadísticas en las distribuciones acumulativas).

Por otra parte, la estimulación de la vía endógena del oxido nítrico mediante el agonista de los receptores NMDA, produjo resultados parecidos (**Fig. 27**). Las células se incubaron durante 10 minutos con NMDA 50 µM y el co-agonista glicina 10 µM en medio sin MgCl₂, seguido de una incubación de 20 minutos con el anticuerpo primario anti-GluA1 (20µg/ml). De la misma forma que en el experimento anterior, se analizó la densidad de las regiones marcadas, las intensidades de fluorescencia y el grado de yuxtaposición del marcaje para GluA1 y sinapsina. Como se puede ver en la **Figura 27**, se obtuvieron resultados similares al experimento anterior, con el análogo de GMPc. La densidad de GluA1 en las dendritas aumentó, pasando de 0,28±0,023 áreas/µm a 0,34±0,014 áreas/µm (**Fig. 27 C**). El grado de yuxtaposición no vario significativamente (**Fig. 27 D**) siendo el valor del control 23,6±0,5% y el de las células tratadas con NMDA/glicina 23,2±0,71%. Con la incubación previa con el inhibidor de cGKII, KT5823, se abolió el efecto del NMDA/glicina y se observó una disminución de la densidad de áreas marcadas (KT5823: 0,17±0,02µm; NMDA+KT: 0,18±0,02µm), de la intensidad de marcaje (KT5823: 16,2±0,06 u.a.; NMDA+KT: 16,9±0,07 u.a.) y del porcentaje de yuxtaposición (KT5823: 15,6±0,49%; NMDA+KT: 17,6±0,5%).

Como conclusión, en esta parte de trabajo se confirma la importancia de la activación de la proteína quinasa dependiente de GMPc, en la regulación del tráfico de la subunidad GluA1. De acuerdo con estudios previamente publicados, la fosforilación de la Ser845, conduce a un incremento de GluA1 en sitios extra-sinápticos como lo demuestra nuestro análisis del nivel de yuxtaposición entre las regiones marcadas con anti-GluA1 y los botones sinápticos inmunomarcados con el anticuerpo contra la sinapsina. Varios estudios han demostrado la importancia de esta fosforilación como mecanismo de incorporación de subunidades GluA1 a la membrana, preparándolas para su incorporación posterior a la sinapsis cuando sean

fosforiladas por PKC o CaMKII como consecuencia de las fluctuaciones en la entrada de calcio, típica del desarrollo o de la plasticidad sináptica (Boehm y cols. 2006; Opazo y cols.2010; Lisman y cols. 2012).

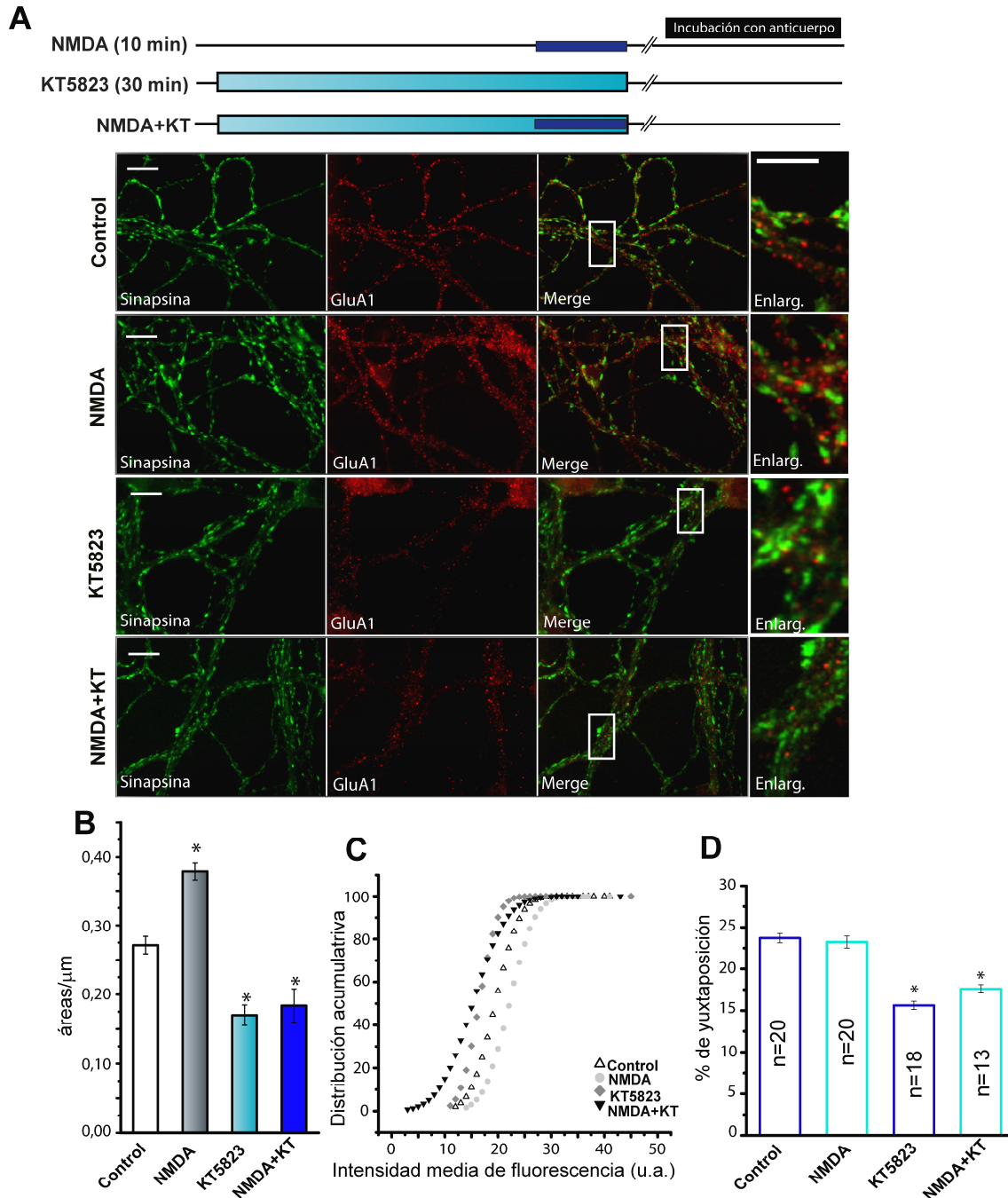


Figura 27. Inmunocitoquímica en células vivas para GluA1/Sinapsina. (A) Diseño experimental e imágenes representativas del inmunomarcaje con los anticuerpos específicos para GluA1 (N-terminal) y Sinapsina, y la superposición de ambos marcajes, mostrando una región de la imagen ampliada. (B) Densidad de áreas marcadas con anti-GluA1 para las diferentes condiciones experimentales, expresada como área/μm (control: 0,28±0,023;

NMDA/gli: $0,34 \pm 0,014$; KT5823: $0,17 \pm 0,02$; NMDA+KT: $0,18 \pm 0,02$). (C) Distribución acumulativa de los valores de intensidad de fluorescencia obtenidos para el marcaje de GluA1 en las diferentes condiciones experimentales (u.a. Control: $19,7 \pm 0,04$; NMDA: $23,4 \pm 0,08$; KT5823: $16,2 \pm 0,06$; NMDA+KT: $16,9 \pm 0,07$). (D) Porcentaje de yuxtaposición de las regiones marcadas con anti-GluA1 y anti-Sinapsina (control: $23,6 \pm 0,5$; NMDA: $23,2 \pm 0,71$; KT5823: $15,6 \pm 0,49$; NMDA+KT: $17,6 \pm 0,5$). Los datos de B y D representan las media $\pm$ el error estándar de $n=20$ campos de 2 experimentos diferentes (* $p < 0,001$, t de student; se utilizo el test de Komolgorov-Smirnov para confirmar las diferencias estadísticas en las distribuciones acumulativas).

2.6 El análisis de la respuesta de Ca^{2+} inducida por AMPA, evidencia la formación de receptores AMPA permeables a calcio

La regulación de los receptores AMPA permeables a calcio, su expresión, su biogénesis, tráfico y recambio, es crucial en plasticidad sináptica, desarrollo neuronal y enfermedades neurológicas (Cull-Candy y cols. 2006). En cerebelo se ha demostrado la presencia de este tipo de receptores AMPA en los primeros estadios del desarrollo, en células estrelladas, pero no se había estudiado hasta ahora en células granulares. Además se desconocen los mecanismos moleculares que regulan el tráfico y la expresión en membrana de estos receptores.

Por esta razón y porque nuestros resultados mostraban un incremento de la subunidad GluA1 en la membrana decidimos estudiar la respuesta a la estimulación con AMPA mediante imagen de calcio utilizando la sonda Fura-2AM. Para ello, las células se estimularon con el agonista AMPA ($50 \mu\text{M}$) en presencia de ciclotiazida ($10 \mu\text{M}$) para evitar la rápida inactivación de estos receptores, y se analizó la contribución de los CP-AMPA al incremento intracelular de calcio utilizando su bloqueante específico, la 1-naftil acetil espermina (NASPM), derivado sintético de la toxina procedente de *Joro spider*. Primero se estimularon las células con KCl 50 mM durante 2 minutos en presencia de la sonda FM1-43, que se incorpora en las vesículas sinápticas en condiciones de estimulación, y que puede considerarse como un marcador presináptico. Esta sonda marca regiones discretas que se corresponden con los sitios sinápticos (Fig. 28 A). Las regiones que están sobre las fibras son las que

se utilizaron para analizar las respuestas de Ca^{2+} . Las células recibieron tres estímulos (AMPA/ciclotiazida, AMPA/ciclotiazida + NASPM y KCl 50 mM) de 10 segundos cada 180 segundos según se muestra en el esquema del experimento (Fig. 28 A).

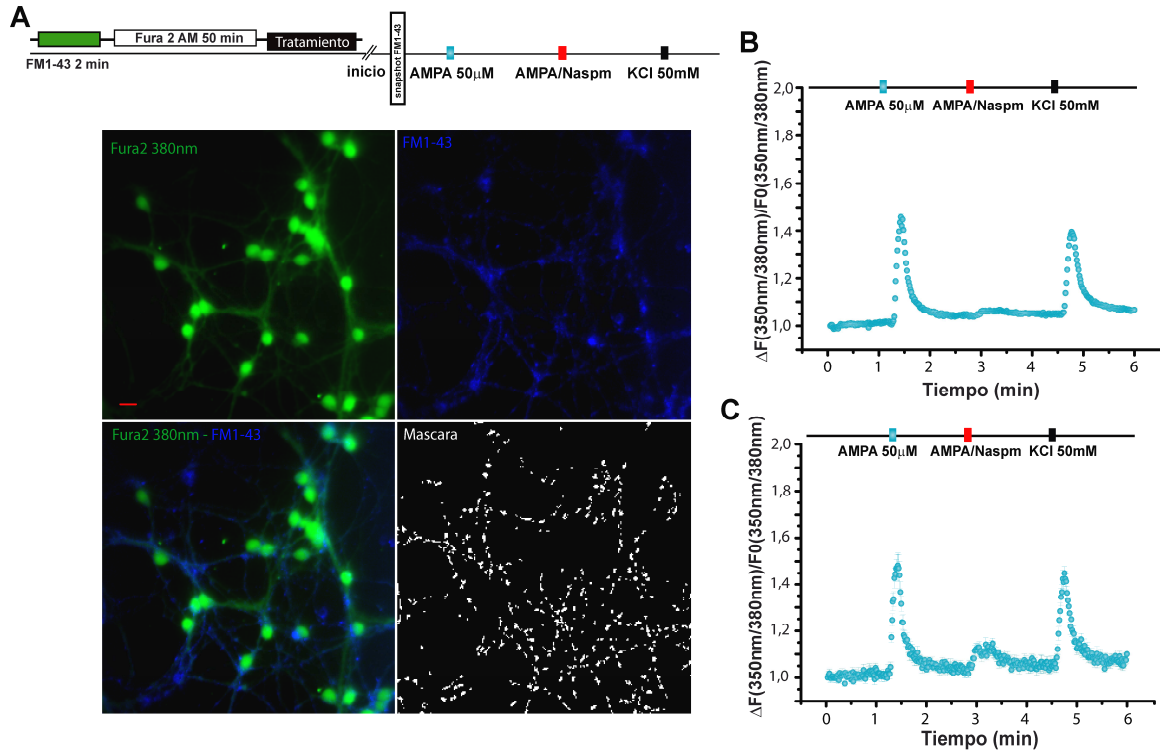


Figura 28. Imagen de calcio con Fura-2AM en células individuales. (A). Esquema del experimento y figuras representativas de neuronas marcadas con Fura 2-AM (verde), FM1-43 (azul) y la imagen binaria (máscara) obtenida con la imagen de FM1-43 (escala 10 μm). (B) Respuesta representativa del incremento de calcio inducido por AMPA y su completa inhibición por NASPM. (C) Respuesta representativa del incremento de calcio inducido por AMPA resistente a la inhibición por NASPM.

Cuando se analizaron las respuestas individuales de cada una de las regiones de interés observamos que esas respuestas se podían distribuir en dos grupos: un grupo (el mayoritario, $86,2 \pm 2\%$) en el que la respuesta a AMPA se inhibía completamente en presencia de NASPM y el segundo grupo ($13,8 \pm 3\%$) en el que la respuesta a AMPA sólo se inhibía parcialmente (Fig. 27 B y C). La diferente sensibilidad a la inhibición por NASPM sugiere que hay regiones donde coexisten CP-AMPA y AMPA no permeables a calcio. Sin embargo predominan las regiones donde toda la respuesta de AMPA está mediada por

CP-AMPA. La magnitud del incremento de Ca^{2+} inducido por AMPA en ambos grupos fue similar.

El análisis de la respuesta a calcio en células sometidas a los tratamientos que incrementaban la fosforilación en la Ser845 de GluA1 y su presencia en la membrana plasmática (**Fig. 29 A**) reveló un incremento de dicha respuesta en las células preincubadas con 8Br-cGMP o con NMDA (control: 1.363 ROIs $0,36 \pm 0,01$ n=9; 8Br-cGMP 823 ROIs: $0,62 \pm 0,05$ n=6; NMDA 341 ROIs: $0,56 \pm 0,03$ n=5). Por otra parte, tanto la inhibición de cGKII con KT5823 como su silenciamiento, se tradujeron en una disminución clara del incremento de calcio inducido por AMPA (KT5823 817 ROIs: $0,17 \pm 0,007$ n=9; 8Br+KT 315 ROIs: $0,23 \pm 0,01$ n=6; NMDA+KT 454 ROIs: $0,21 \pm 0,01$ n=5; cGKII KD 1138 ROIs: $0,18 \pm 0,01$ n=4; cGKII KD+KT 882 ROIs: $0,12 \pm 0,03$ n=4). En cuanto a la distribución de las respuestas según su inhibición por NASPM, el porcentaje de respuestas inhibidas completamente por NASPM se incrementó con respecto al control tanto en células preincubadas con 8Br-cGMP (92,7%) como con NMDA + glicina (93,6%). Estos incrementos no se observaron cuando se inhibió la cGKII con KT5823 (**Fig. 29 B**). Cuando, en aquellas regiones donde NASPM no abolió la respuesta de AMPA, se analizó el porcentaje de inhibición (**Fig. 29 C**) se observó que era claramente mayor en las células pretratadas con 8Br-cGMP y NMDA (control: $44,2 \pm 2,57$; 8Br-cGMP: $69,7 \pm 2,8$; NMDA: $65,7 \pm 1,76$), y menor cuando la cGKII se inhibió o se silenció su expresión (KT5823: $23 \pm 1,72$; 8Br+KT: $26 \pm 4,58$; NMDA+KT: $26,5 \pm 2,5$; cGKII KD: $16,1 \pm 1,24$; cGKII KD+KT: $19,8 \pm 1,8$).

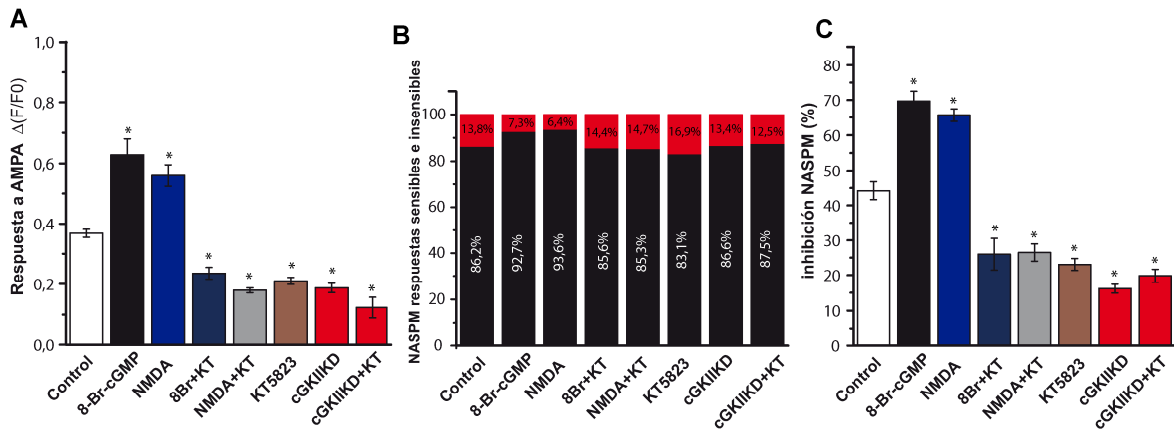


Figura 29. Análisis de los experimentos de imagen de calcio. (A) $\Delta(F/F_0)$ de la respuesta a AMPA para cada condición (control: 1.363 ROIs, $0,36 \pm 0,01$ n=9; 8Br-cGMP, 823 ROIs: $0,62 \pm 0,05$ n=6; NMDA, 341 ROIs: $0,56 \pm 0,03$ n=5; KT5823, 817 ROIs: $0,17 \pm 0,007$ n=9; 8Br+KT, 315 ROIs: $0,23 \pm 0,01$ n=6; NMDA+KT, 454 ROIs: $0,21 \pm 0,01$ n=5; cGKI/KD, 1138 ROIs: $0,18 \pm 0,01$ n=4; cGKI/KD+KT, 882 ROIs: $0,12 \pm 0,03$ n=4). (B) Distribución de los porcentajes de las respuestas de calcio inducidas por AMPA sensibles a NASPM y resistentes a NASPM. (C) Porcentajes de inhibición de NASPM en aquellas regiones donde NASPM no abole la respuesta de AMPA (control: $44,2 \pm 2,57\%$; 8Br-cGMP: $69,7 \pm 2,8\%$; NMDA: $65,7 \pm 1,76\%$; KT5823: $23 \pm 1,72\%$; 8Br+KT: $26 \pm 4,58\%$; NMDA+KT: $26,5 \pm 2,5\%$; cGKI/KD: $16,1 \pm 1,24\%$; cGKI/KD+KT: $19,8 \pm 1,8\%$). Los datos son representados como medias $\pm$ error estándar y la significación estadística se analizó utilizando el test de la t de student y el ANOVA seguido del test de Bonferroni (* $p < 0,05$).

Estos resultados demuestran claramente que el incremento de la subunidad GluA1 en la membrana se traduce en un aumento de los CP-AMPA. Estos receptores podrían contribuir de forma importante a la regulación de mecanismos de plasticidad sináptica, proporcionando una vía de entrada de Ca^{2+} de forma independiente de los receptores NMDA y de los canales de calcio voltaje dependiente durante el desarrollo (Shepherd y cols. 2012). Esta entrada de calcio podría, a su vez, activar la vía del NO, y contribuir a un mayor incremento de los CP-AMPA hasta que se active un mecanismo que restablezca la situación basal aumentando la subunidad GluA2 (Jaafari y cols. 2012). Este mecanismo permitiría una regulación de la actividad sináptica rápida, importante en el desarrollo cuando las fluctuaciones en la entrada de calcio controlan los procesos migratorios o en la fase temprana del aprendizaje.

V. DISCUSIÓN

1. Regulación de la expresión de los receptores AMPA dependiente de la despolarización de la membrana

1.1 Expresión de las cuatro subunidades en neuronas granulares de cerebelo en cultivo

Para la realización de este trabajo experimental se han utilizado, fundamentalmente, neuronas granulares de cerebelo de rata en cultivo. Hemos encontrado que estas células expresan los ARNm que codifican para las cuatro subunidades de los AMPARs (GluA1-GluA4) confirmando, así, resultados anteriores de otros grupos (Hack y cols. 1995; Mogensen y Jorgensen 2000). Cuando analizamos la expresión de estos mensajeros en tres estadios de desarrollo distintos (FIC, 7 DIV y 14 DIV) observamos una disminución de todos ellos en las células de 7 DIV, con respecto a las FIC y una ligera recuperación a los 14 DIV. Estos resultados contrastan claramente con lo descrito por otros autores respecto al perfil de expresión de las proteínas. Estos autores observaban un incremento de GluA1, GluA2/3 paralelo a los días en cultivo y un nivel de expresión estable para GluA4 (Hack y cols. 1995). Discrepancia que podría explicarse por las diferentes condiciones de cultivo utilizadas en ambos estudios, ya que en un trabajo anterior de nuestro grupo se demostró que las condiciones de cultivo afectan a la expresión génica y determinan la respuesta de estas células (Jurado y cols. 2003). Nuestros resultados también pusieron de manifiesto que, en los tres estadios de desarrollo estudiados, los mensajeros más abundantes eran los que codificaban para GluA1 y GluA4 y el menos abundante el que codificaba para GluA3. Esta comparación fue posible porque la cuantificación se realizó mediante la técnica de PCR cuantitativa y la eficiencia de las cuatro reacciones era similar.

Mediante técnicas de inmunocitoquímica e inmunohistoquímica fue posible detectar las cuatro subunidades tanto en neuronas granulares en cultivo (7 DIV) como en rodajas de cerebelos de ratas de 14 días. En las rodajas de cerebelo se observó un marcaje más intenso de las neuronas granulares para las subunidades GluA1 y GluA4, indicando que en este estadio del desarrollo se

confirma una mayor expresión de estas subunidades, que coincide con la mayor concentración de los mensajeros que las codifican. También coinciden, en parte, con los resultados que muestran un incremento del mensajero que codifica para GluA1 durante los primeros estadios de desarrollo de las neuronas granulares (Longone y cols. 1998). En ese estudio, además, se puso de manifiesto que la maduración de las neuronas granulares *in vitro* se acompaña de un incremento en las isoformas *flop* de las diferentes subunidades, en concordancia con otro que demostró una mayor desensibilización de los AMPARs en células granulares maduras con respecto a las recién aisladas (Longone y cols. 1998; Mogensen y Jorgensen 2000).

Estos resultados demuestran que en los primeros estadios de desarrollo las subunidades que se expresan mayoritariamente son GluA1 y GluA4, sugiriendo la formación de CP-AMPArs que se desensibilizan más lentamente y que proporcionan una vía de entrada de Ca^{2+} a la célula, igual que sucede en otras neuronas. En las células estrelladas del cerebelo, se ha demostrado la expresión de la subunidad GluA1 en células inmaduras y su rápida sustitución en neuronas adultas o bajo fuertes corrientes de despolarización donde predominan los receptores formados por las subunidades GluA2 y GluA4 (Cull-Candy y cols. 2006). Estos resultados contrastan con lo que se ha descrito en otras regiones del cerebro más estudiadas, como el hipocampo, donde se ha demostrado el predominio de heterotetrámeros constituidos por la subunidad GluA2 y otra subunidad (GluA3 ó GluA1), mientras que la subunidad GluA4 sólo está presente en las fases tempranas del desarrollo formando receptores funcionales junto con la subunidad GluA3 (Wang y cols. 2011). Aunque no se conoce con exactitud el papel de la subunidad GluA1 en las fases tempranas del desarrollo de neuronas de hipocampo, se ha relacionado con la plasticidad sináptica de células inmaduras, con la formación de CP-AMPArs y la posible implicación de los mismos en los procesos de plasticidad asociados al desarrollo (Fortin y cols. 2012).

Nuestros resultados de análisis de restricción con un fragmento de cDNA de GluA2, que contiene el sitio de edición Q/R (Peng y cols. 2006),

demuestran que todo el ARNm que codifica para esta subunidad se encuentra editado en células de 7 DIV, indicando que cuando GluA2 esté formando parte de los receptores, éstos serán impermeables a calcio.

1.2 Variaciones en la expresión de las cuatro subunidades como respuesta homeostática a cambios de la actividad neuronal. Aumento de AMPARs en la membrana

Para cultivar estas células el medio de cultivo se suplementa con KCl hasta que la concentración final sea de 25 mM. Esta elevada concentración de KCl produce un estado de despolarización crónica, que podría mimetizar los estímulos que reciben estas neuronas *in vivo* (Marchetti y cols. 1995; Borodinsky y Fizman 1998). La despolarización de la membrana plasmática y la consecuente entrada de Ca^{2+} a través de los canales de calcio dependientes de voltaje, de los NMDARs y de los CP-AMPARs es esencial para la supervivencia y la diferenciación de las células granulares de cerebelo en cultivo (Ha y cols. 2002; Lauritzen y cols. 2002). Sin embargo, se ha descrito que en estas condiciones de cultivo no establecen contactos sinápticos funcionales (Mellor y cols. 1998) y que presentan respuestas y patrones de expresión génica diferentes de los encontrados en el cerebelo *in vivo* (Condorelli y cols. 1993; Vallano y cols. 1996; Mogensen y Jorgensen 2000). El hecho de que, en nuestras condiciones de cultivo, se observe co-localización de las diferentes subunidades de los AMPARs con diferentes proteínas presinápticas, como Bassoon ó sinapsina, sugieren la formación de sinapsis. Además, otros estudios realizados en nuestro grupo sugieren que estas sinapsis son funcionales, y que, en su mayoría, se establecen entre las propias neuronas granulares, puesto que el cultivo está enriquecido en este tipo celular y se observan muy pocas células, que por su morfología, indiquen que se trata de otros tipos celulares diferentes.

Respecto al efecto, que sobre la expresión génica, pueda tener la composición del medio de cultivo, varios estudios habían demostrado que la expresión de las cuatro subunidades de los AMPARs dependía de la concentración de KCl con la que se suplementaba el medio de cultivo

(Conadorelli y cols. 1993; Mogensen y Jorgensen 2000). Este hecho podría explicar la disminución del contenido de los ARNm que codifican para las subunidades de los AMPARs observado a los 7 DIV con respecto al de las células recientemente aisladas. Dato que se confirmó cuando al disminuir la concentración extracelular de KCl en el medio de cultivo aumentó, de forma muy significativa, la concentración de los cuatro ARNm. En los cuatro casos cuando la concentración de KCl se redujo a 15 mM se observaron fuertes incrementos, que siguieron aumentando en el caso de GluA2, GluA3 y GluA4 cuando la concentración se redujo todavía más hasta 10 mM. En el caso de GluA1, sin embargo, el incremento observado a 10 mM KCl fue menor que el observado a 15 mM, indicando que, aunque la expresión de todas las subunidades está regulada por el grado de despolarización de la membrana, existen diferencias en cuanto a la magnitud de la regulación. Aunque no existen estudios similares en la bibliografía, si que se ha estudiado previamente la expresión de las subunidades de los AMPARs en estas células cultivadas con una concentración fisiológica de KCl (5 mM) y en todos los casos, con la excepción del ARNm que codifica para GluA1, se observó un incremento (Mongensen y Jorgensen 2000). En los resultados mostrados en esta tesis, el ARNm que codifica para GluA1, aunque disminuyó con relación al detectado en células cultivadas durante 24 horas con un medio que contenía 15 mM KCl, todavía se observó una concentración mayor que la encontrada en las células cultivadas en condiciones control (25 mM KCl). Las diferencias en las condiciones experimentales, tiempo y medio de cultivo utilizados así como el tiempo de exposición a una concentración de KCl baja, pueden explicar porqué estos autores observan una disminución del ARNm, mientras que nosotros todavía observamos un incremento.

Es un hecho aceptado que la reducción de la concentración de KCl a valores fisiológicos a un cultivo de neuronas granulares mantenidas durante 6-8 días en DMEM suplementado con suero y alta concentración de KCl induce apoptosis a las pocas horas (Gleichmann y cols. 1998). Sin embargo, en un medio de cultivo suplementado con B-27, la presencia de factores tróficos puede

contrarrestar el efecto de la disminución de KCl en la supervivencia celular (El Idrissi y Trenkner 1999). La presencia de dichos factores tróficos también podrían estar afectando a la expresión de estas proteínas y, por tanto, los resultados obtenidos en diferentes condiciones experimentales no son del todo comparables.

Una de las primeras consecuencias de la reducción de la concentración extracelular de KCl es la disminución de la activación de los canales de calcio dependientes de voltaje. Se analizó, también, si el bloqueo de los diferentes tipos de canales de calcio dependientes de voltaje afectaba a la expresión de los ARNm que codifican para las cuatro subunidades de los AMPARs. Observamos un incremento muy significativo en la expresión de las cuatro subunidades sólo cuando se bloquearon los canales de calcio de tipo L. Resultados similares se han observado en neuronas de corteza, donde el bloqueo de canales L induce un incremento tanto en la expresión de GluA1 como en su inserción en la membrana (Gong y cols. 2007). En hipocampo se había descrito que los incrementos intracelulares de calcio provocan la disminución de la expresión de los ARNm que codifican para las diferentes subunidades de los AMPARs (Grooms y cols. 2006), y en un estudio reciente, en células piramidales de hipocampo, se ha demostrado la importancia de los canales de calcio de tipo L en la regulación homeostática de la expresión de las subunidades de los AMPAR (Goold y Nicoll 2011).

Varios estudios han demostrado que cambios de actividad en redes neuronales pueden causar plasticidad homeostática (O'Brien y cols. 1998; Turrigiano y cols. 1998; Thiagarajan y cols. 2005) y que además este fenómeno puede manifestarse también en neuronas individuales de forma independiente (Goold y Nicoll 2011). Sin embargo, todavía se desconocen los mecanismos moleculares que regulan los cambios postsinápticos debidos a la adaptación a los cambios en el nivel de actividad.

Nuestro estudio, en sincronía con resultados de otros grupos, ha demostrado el incremento de la expresión de las cuatro subunidades de los AMPARs en respuesta a una disminución crónica de la actividad

(disminuyendo la concentración de KCl en el medio de cultivo durante 24 horas) y ha desvelado la importancia de la entrada de calcio, a través de los canales de tipo L, en este proceso.

Durante la actividad neuronal el calcio, que entra, se une a la calmodulina que activa, entre otras, a las CaM quinasas (CaMK) (Wayman y cols. 2008). Durante la plasticidad sináptica, la entrada de calcio activa la CaMKII, cuya activación parece ser esencial en fenómenos de potenciación sináptica (Thiagarajan y cols. 2005; Sanhueza y cols. 2007; Lemieux y cols. 2012). La plasticidad homeostática, no obstante, es un proceso diferente a otras formas de plasticidad como la potenciación a largo plazo (LTP), y se caracteriza porque se alcanzan unas concentraciones de calcio muchos menores y porque participan proteínas que requieren una menor concentración de calcio para activarse. En este sentido, la activación de la CaMKIV se postuló como posible mecanismo para la regulación de la plasticidad homeostática en varios modelos (Ibata y cols. 2008; Goold y Nicoll 2011). En neuronas granulares de cerebelo hemos demostrado la participación de esta proteína en la regulación de la expresión de las cuatro subunidades de los AMPARs en las condiciones en las que observamos los cambios homeostáticos de estas proteínas. Así, en las condiciones de bajo KCl y bloqueo de los canales de tipo L con nifedipino durante 24 horas, observamos una disminución significativa de la fosforilación/activación de la CaMKIV (pCaMKIV) y de su concentración en el núcleo. Al mismo tiempo, el silenciamiento de la CaMKIV, con un siRNA específico, se tradujo en un aumento en la concentración de los ARNm que codifican para la subunidades de los AMPARs. Estos resultados confirman lo observado por otros grupos, respecto a que la CaMKIV regula negativamente la expresión de los AMPARs y su tráfico a la membrana, probablemente debido a una disminución del recambio de estos receptores durante el periodo de inhibición de la actividad (Marie y cols. 2005; Turrigiano y cols. 2007; Ibata y cols. 2008).

El incremento observado en la concentración de los ARNm que codifican para las diferentes subunidades de los AMPARs se tradujo, en todos los casos,

en un incremento en la cantidad de las proteínas y en un incremento en su inserción en la membrana, confirmando los resultados de otros grupos en modelos celulares diferentes al utilizado en este trabajo (Turrigiano y cols. 2007).

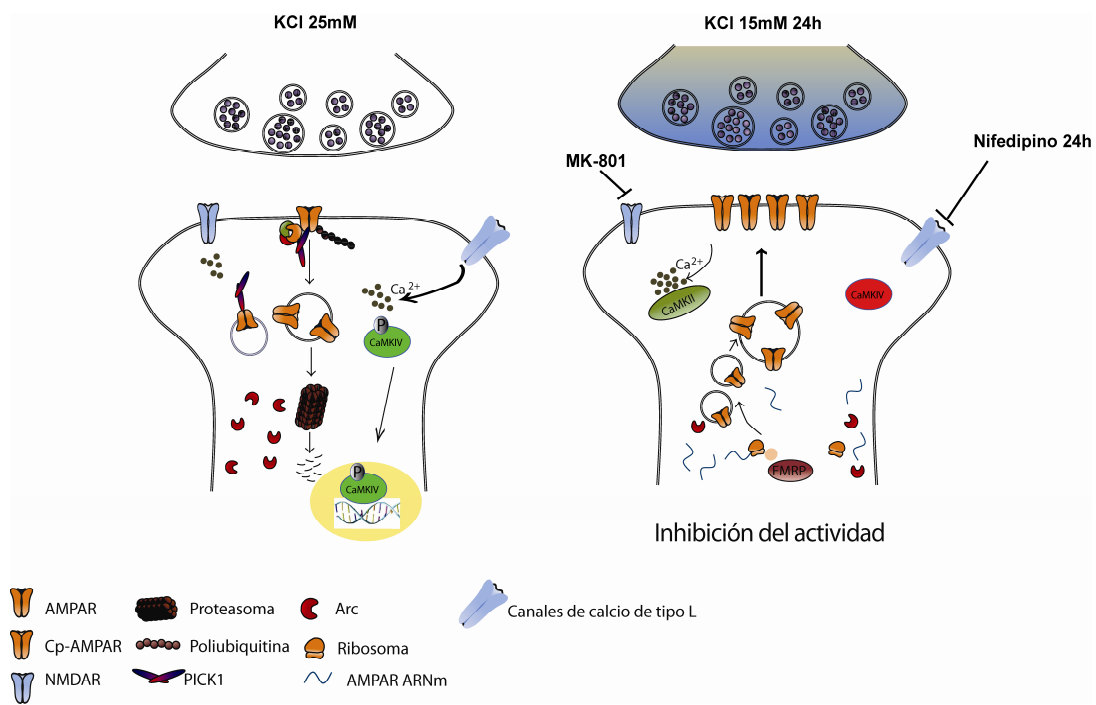


Figura 1. Esquema del mecanismo de activación de la CaMKIV. La entrada de calcio a través de los canales de calcio dependientes de voltaje de tipo L se traduce en una activación de la CaMKIV (unión del complejo Ca^{2+} /calmodulina y fosforilación por la CaMKK). La pCaMKIV citoplasmática se transloca al núcleo donde activa la expresión de factores implicados en la endocitosis de los receptores AMPA. En las condiciones experimentales de baja actividad, la CaMKIV inactiva hace que se produzca un aumento de la expresión de los receptores AMPA en la membrana, y la formación de receptores AMPA permeables a calcio.

Sin embargo, los resultados no fueron iguales para las cuatro subunidades. En el caso de la subunidades GluA1 y GluA4 se observaron incrementos muy significativos de los contenidos totales de las proteínas, tanto en el soma como en las dendritas, que estaban acompañados por un incremento de estas proteínas en la fracción enriquecida en membranas plasmáticas. En el caso de GluA2 y GluA3, se observó un incremento de la cantidad total de estas

proteínas en los somas de las células, pero no en las dendritas, donde el nivel total fue similar al encontrado en las células mantenidas en condiciones control. Sin embargo, sí se observó un incremento de su inserción en la membrana. Algunos estudios han demostrado la presencia de los ARNm que codifican para los AMPAR en las dendritas y su aumento en condiciones de un bloqueo crónico de la actividad (Ju y cols. 2004). Presumiblemente el incremento en los ARNm dé lugar a un incremento en la síntesis de proteínas, que explicaría el incremento de GluA1 y GluA4. El hecho de que no se observe un incremento del contenido total de GluA2 y GluA3 en las dendritas podría explicarse por una mayor velocidad de reciclamiento de estas proteínas, aunque tampoco tenemos evidencia de que en estas células se estén sintetizando estas proteínas en las dendritas. El incremento de la cantidad total de estas proteínas observado en los somas podría indicar que es ahí donde se sintetizan fundamentalmente y que, posteriormente, son transportadas a las dendritas (Yang y cols. 2008).

1.3 El aumento de las subunidades de los AMPARs en la membrana se traduce en una mayor entrada de calcio debido a la formación de receptores permeables a calcio

El incremento observado de las cuatro subunidades de los AMPAR en la membrana plasmática, estaría indicando que la adaptación a las nuevas condiciones de cultivo (disminución de la actividad), favorece el tráfico de dichas proteínas hacia la membrana. Dichas proteínas forman receptores funcionales, ya que la estimulación con AMPA, en presencia de ciclotiazida, para evitar la rápida desensibilización de los AMPAR (Buldakova y cols. 2000; Longone y cols. 1998), se tradujo en una mayor respuesta de calcio en las células incubadas en medio con bajas concentraciones de KCl o con nifedipino.

Es difícil conocer la composición, en cuanto a subunidades, y la estequiometría real de los AMPARs, tanto en las condiciones control, como en aquellas en las que la reducción de la actividad se traduce en un incremento de estos AMPARs en la membrana, pero nuestros resultados son compatibles con la existencia de receptores permeables e impermeables a calcio. La existencia de

receptores permeables a calcio se sustenta por el hecho de que hay una componente de la entrada de calcio que es resistente al bloqueo por Cd^{2+} (bloqueante no selectivo de los VDCCs; Usai y cols. 1998) y MK-801 (antagonista de los NMDAR; Zajackowski y cols. 1997) y es sensible a NASPM, análogo sintético de la toxina de *Joro spider* y que bloquea de forma selectiva los CP-AMPArs (Noh y cols. 2005).

La presencia de receptores impermeables a calcio se fundamenta en dos evidencias experimentales: a) la detección de GluA2 en la membrana y b) la evidencia de que el ARNm que codifica para esta proteína está totalmente editado en el sitio Q/R (Seeburg 1996). Cuando de forma crónica se disminuyó la actividad o se bloquearon los canales de calcio tipo L no se afectó al grado de edición del ARNm. Esta verificación se realizó porque en determinadas situaciones este mensajero deja de editarse, y como consecuencia todos los AMPARs son permeables a Ca^{2+} , aunque en la mayoría de los casos descritos, la no edición está relacionada con estados patológicos como la isquemia (Pellegrini- Giampietro y cols. 1992; Pollard y cols 1993; Dias y cols. 2012) o la esclerosis lateral amiotrófica (Weiss 2011).

La disminución de la concentración extracelular de potasio no pareció afectar a la relación GluA1/GluA4 ya que tanto su concentración total como su nivel de expresión en la membrana se incrementaron en la misma proporción. Sin embargo, se incrementó la relación GluA3/GluA2 en la membrana, apoyando la observación de que la disminución de KCl produce un incremento de los CP-AMPArs. Estos receptores podrían estar formados por subunidades GluA1, GluA3 y GluA4, que se combinarían de forma homomérica o heteromérica. Aunque las aproximaciones experimentales utilizadas en este estudio no permiten conocer la composición exacta de los receptores, el hecho de que las subunidades GluA1 y GluA4 sean las más abundantes hace pensar que pueda haber una mayoría de receptores homotetraméricos formados por GluA1 o GluA4 o constituidos por dímeros de GluA1 y GluA4.

Nuestros resultados demuestran que la fuerte despolarización inducida por la elevada concentración de KCl en el medio extracelular, regula la

abundancia y la composición de los AMPARs en la membrana plasmática de las neuronas granulares de cerebelo en cultivo. Este mecanismo puede considerarse como una forma de plasticidad homeostática, ya que la disminución de la actividad se traduce en un incremento de AMPARs en la membrana como sucede en otros modelos (O'Brien y cols. 1998; Ju y cols. 2004; Goel y cols. 2006 y 2011). Muchos de estos estudios coinciden, al igual que el nuestro, en que la subunidad GluA1 se acumula de forma significativa en la membrana de neuronas sometidas a un bloqueo de la actividad durante horas o días (Ju y cols. 2004; Thiagarajan y cols. 2005; Aoto y cols. 2008). Respecto a GluA2 existe alguna discrepancia, mientras que en muchos estudios de plasticidad homeostática no se encuentran diferencias en el nivel de GluA2 en la membrana (Ju y cols. 2004; Thiagarajan y cols. 2005; Aoto y cols. 2008), en otros se observan incrementos tanto de GluA1 como de GluA2 y estos son dependientes de los mecanismos que regulan el tráfico de GluA2 a la membrana (O'Brien y cols. 1998; Wierenga y cols. 2005; Anggono y cols. 2011).

Aunque la mayoría de los AMPARs en el sistema nervioso central contienen la subunidad GluA2 y, por tanto son impermeables a Ca^{2+} , la expresión de CP-AMPARs se ha observado tanto en neuronas como células gliales en varias regiones del SNC (Cull-Candy y cols. 2006) y, en los últimos años, se ha puesto de manifiesto que la regulación de los CP-AMPARs es crucial para la plasticidad sináptica, desarrollo neuronal e, incluso, desórdenes neurológicos. Los CP-AMPARs están estrechamente controlados y su expresión muy regulada, quizá porque el exceso de Ca^{2+} que entra a través de estos receptores puede ser neurotóxico (Tanaka y cols. 2000; Liu y Zukin 2007). Sin embargo, a pesar del potencial impacto negativo que estos receptores puedan tener sobre la actividad neuronal poseen propiedades únicas que pueden ser beneficiosas para la función sináptica, especialmente en las condiciones que conducen a la adaptación homeostática a la inactividad. La regulación de los CP-AMPARs durante la plasticidad homeostática no es una observación aislada *in vitro*, también se ha observado *in vivo* después de ciertos paradigmas de privación sensorial (Goel y cols. 2006, 2011). Aunque se pueden predecir

algunas de las consecuencias funcionales de la presencia de CP-AMPA en las sinapsis, su contribución real a la adaptación del cerebro a la inactividad requiere un estudio mucho más profundo.

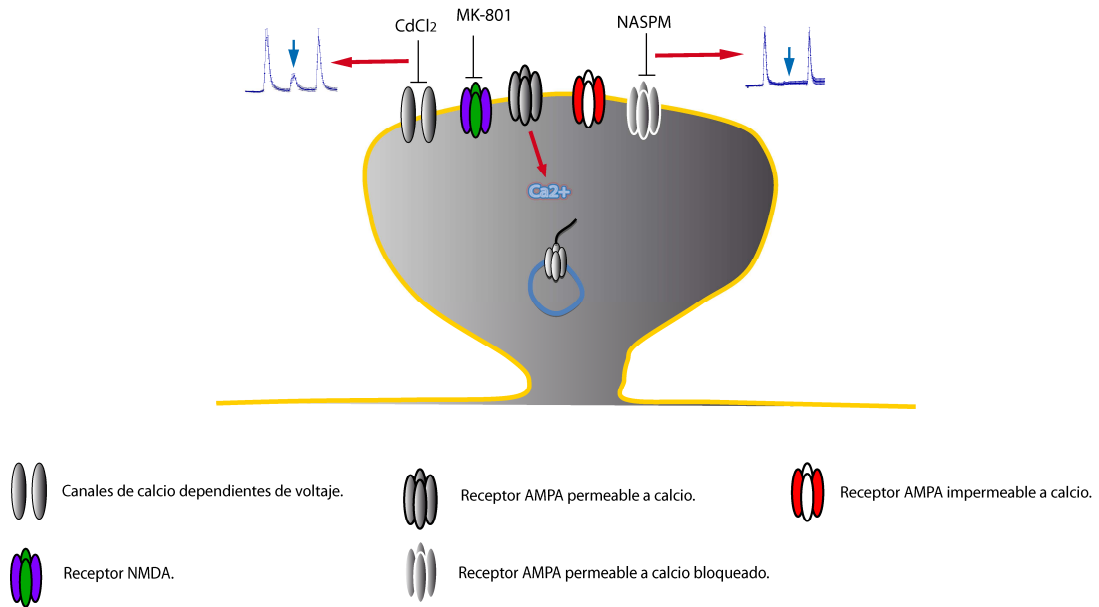


Figura 2. Esquema de los diferentes tratamientos farmacológicos para detectar la presencia de CP-AMPA en la membrana. El bloqueo parcial de la entrada de calcio tras el tratamiento con antagonista del receptor NMDA o mediante la perfusión con CdCl_2 evidencia la presencia de la posible inserción de receptores AMPA permeables a calcio. Esta hipótesis fue confirmada por el bloqueo de la respuesta residual al agonista AMPA con la toxina específica NASPM.

2. La proteína quinasa dependiente de GMPc de tipo II (cGKII) regula los niveles de la subunidad GluA1 en la membrana plasmática de células granulares de cerebelo

2.1 La cGKII fosforila la subunidad GluA1 en la Ser845 y aumenta su expresión en membrana

La fosforilación es el principal mecanismo de regulación del tráfico de los AMPARs hacia y desde la membrana plasmática y desde sitios extra-sinápticos a sitios sinápticos (Malinow y Malenka 2002; Esteban 2003; Opazo y cols. 2010). La fosforilación puede ser directa, de residuos específicos de las distintas subunidades, o indirecta, de proteínas reguladoras que interaccionan con los AMPARs o proteínas transmembrana asociadas a los AMPARs (TARPs; Tomita y cols. 2005), que modulan tanto el tráfico como las propiedades de estos receptores (Jackson y cols. 2011).

Varias de las proteínas quinasas que regulan el tráfico de los AMPARs, están reguladas por la concentración intracelular de calcio (Shepherd y Huganir 2007), como por ejemplo la CaMKII, que es fundamental para el tráfico de la subunidad GluA1 en procesos de potenciación sináptica (Appleby y cols. 2011). La subunidad GluA1 contiene diferentes residuos de serina que son sustratos de diferentes quinasas y cuya fosforilación regula tanto el tráfico de esta proteína, como las propiedades de los AMPARs constituidos por homotetrámeros de GluA1 (Esteban y cols. 2003; Man y cols. 2007; Lu y cols. 2009; Kristensen y cols. 2011). Es importante el residuo de serina fosforilado, porque de ello depende que la localización de la subunidad GluA1 sea en sitios extrasinápticos o sinápticos. Hasta ahora se había demostrado que un incremento de AMPc, durante procesos de LTP en hipocampo y corteza, provocaba la activación de PKA y la fosforilación de GluA1 en la Ser845, incrementando su tráfico a la membrana (Esteban y cols. 2003; Man y cols. 2007). También se había demostrado, en neuronas de hipocampo y corteza, que la Ser845 podía ser sustrato de la cGKII (Serulle y cols. 2007). El incremento del

GMPc producido como consecuencia de la entrada de calcio por los NMDARs y la producción de NO, conducía a la activación de la cGKII y a su interacción con la subunidad GluA1, facilitando así su fosforilación y su incorporación a la membrana plasmática como mecanismo de la LTP (Serulle y cols. 2007).

Tanto los NMDARs como el NO desempeñan funciones fundamentales en el desarrollo y en la plasticidad de las células granulares del cerebelo (Li y cols. 2010; Contestabile 2012). Diferentes trabajos anteriores del grupo habían demostrado la expresión de NOS I, GCs, cGKI y cGKII en neuronas granulares y su activación tras la estimulación con NMDA (Jurado y cols. 2004; Jurado y cols. 2006). Así mismo, se ha demostrado la importancia de esta vía de señalización en el desarrollo de estas células y en la maduración sináptica (López-Jiménez y cols. 2009, 2012). Por otra parte, diferentes evidencias experimentales sugieren que el NO es necesario para la inducción de la LTP en la sinapsis entre las fibras musgosas y las células granulares (D'Angelo y cols. 1999; Armano y cols. 2000). Dichas evidencias son: que durante estimulaciones de alta frecuencia el NO alcanza concentraciones capaces de activar la GCs; la LTP se bloquea por la inhibición de la GCs o de NOS I; los donadores de NO son capaces de inducir LTP y mantenerla, también en ausencia de la estimulación de las fibras musgosas en condiciones de bloqueo de los NMDAR (Maffei y cols. 2003). Todos estos resultados previos demostraban la importancia de la vía de señalización del NO/GMPc en la regulación de diferentes procesos fisiológicos en neuronas granulares. Por otra parte, la subunidad GluA1 es muy abundante en estas células y los mecanismos que regulan su tráfico intracelular están relacionados con diferentes modos de plasticidad. Por tanto, nuestro interés se centró en analizar si cGKII fosforilaba a GluA1 y si este mecanismo regulaba su tráfico a la membrana.

Los resultados presentados en este trabajo demuestran que, en las neuronas granulares de cerebelo, la cGKII fosforila a la subunidad GluA1 de los AMPARs en la Ser845. Para estimular a la cGKII se utilizaron dos protocolos diferentes que, en otros trabajos del grupo, se había observado que producían el máximo de fosforilación de dos sustratos de esta enzima (Jurado y cols. 2004).

En primer lugar se activó directamente la enzima mediante un análogo permeable de GMPc, y en segundo lugar se estimuló toda la vía de señalización NO/GMPc mediante la estimulación de los NMDARs. En ambos casos, se observó un incremento en el grado de fosforilación de la Ser845, que se abolió en presencia de KT5823, un inhibidor no competitivo de las quinasas dependientes de GMPc (Burkhardt y cols. 2000). La incubación con este inhibidor, no sólo evitó el incremento en la fosforilación producido por los diferentes tratamientos, sino que redujo de forma muy significativa el grado de fosforilación encontrado en las condiciones control. Estos resultados confirman lo que ya se había observado en otros trabajos anteriores, y es que la vía de señalización del NO/GMPc está tónicamente activa en neuronas granulares en nuestras condiciones de cultivo (Jurado y cols. 2006; López-Jiménez y cols. 2009, 2012).

En hipocampo y corteza la cGKII activada interacciona con GluA1, formando un complejo estable (Serulle y cols. 2007). Utilizando extractos de cerebelos de ratas de 14 días para experimentos de co-inmunoprecipitación con anticuerpos específicos para GluA1 y cGKII observamos que *in vivo* las dos proteínas podrían estar formando parte del mismo complejo proteico, que resiste a las condiciones de solubilización y co-inmunoprecipitación. Puesto que en este trabajo no se estimuló la producción de GMPc, nuestros resultados son compatibles con la existencia constitutiva de dicho complejo y con que la activación de cGKII conduciría a la fosforilación de GluA1 y su incorporación a la membrana a diferencia de lo que sucede en hipocampo, donde parece ser necesaria la activación de cGKII para la interacción con GluA1 (Serulle y cols. 2007).

El incremento en la fosforilación de Ser845 de GluA1, también en nuestro modelo, se tradujo en una mayor expresión de esta proteína en la membrana, tal como se ha demostrado en otros modelos (Esteban y cols. 2003; Serulle y cols. 2007). Nos preguntamos si las nuevas subunidades se insertaban en sitios sinápticos ó extrasinápticos.

2.2 El aumento de la fosforilación se refleja en un aumento de la subunidad GluA1 en sitios extra-sinápticos

Los resultados de este trabajo demuestran que la fosforilación de la Ser845 por cGKII, al igual que sucede con la fosforilación por PKA, parece ser necesaria pero no suficiente para la inserción de la subunidad GluA1 en sitios sinápticos (Esteban y cols. 2003; Serulle y cols. 2007, 2008). En nuestro modelo la co-localización de GluA1 con el marcador presináptico sinapsina no se modifica en aquellas condiciones experimentales en las que se observa un incremento en la fosforilación de GluA1 y en su inserción en la membrana plasmática, sugiriendo que, tal como han demostrado otros grupos, la fosforilación de Ser845 favorece la inserción de GluA1 en sitios extrasinápticos, preparando al sistema para su posterior localización en la sinapsis (Sun y cols. 2005; Oh y cols. 2006). El movimiento lateral de los receptores desde los sitios extrasinápticos a los sitios sinápticos está favorecido por la activación de la PKC, que fosforila la Ser818 de GluA1 y favorece su inserción en los sitios sinápticos (Boehm y cols. 2006). Además, la activación de PKC favorece la estabilización de estos receptores en la membrana sináptica potenciando interacciones entre las proteínas TARPs y las proteínas "organizadoras" de la densidad postsináptica, como PSD95, mecanismo necesario para el desarrollo de LTP (Opazo y cols. 2010; Mondin y cols. 2011). El hecho de que no observemos incremento en la co-localización con sinapsina a pesar de observar un incremento de GluA1 en la superficie sugiere que, en nuestras condiciones experimentales, esta segunda etapa no se está activando.

Sin embargo, la inhibición de cGKII se traduce en una disminución significativa de dicha co-localización, sugiriendo que la defosforilación de Ser845 favorece la endocitosis de GluA1 y su disminución en la membrana sináptica. Coincidiendo con esta observación, otros grupos han demostrado que la defosforilación de Ser845 se traduce en el desarrollo de LTD (Kameyama y cols. 1998; Lee 2012). Este mecanismo explicaría el porqué cuando se analizó el contenido de GluA1 y GluA1 fosforilado en Ser845 en la fracción de

sinaptoneurosomas y de densidad postsináptica, obtenidas de cerebelos de ratones de 14 días carentes de la proteína cGKII (cGKII^{-/-}; Pfeiffer y cols. 1996), se observó una disminución en comparación a los niveles encontrados en las mismas fracciones obtenidas de ratones de la cepa salvaje. Estos resultados, además, demuestran que aunque la Ser845 también es sustrato de PKA (Roche y cols. 1996), la supresión de la cGKII se traduce en una menor expresión de GluA1 en la densidad postsináptica de cerebelo *in vivo*, poniendo de manifiesto, una vez más, la importancia de la señalización mediada por NO/GMPc en la regulación de diferentes procesos y funciones del cerebelo (Maffei y cols. 2003; Contestabile 2012).

El hecho de que la síntesis del NO se produzca en la postsinapsis y que, desde su descubrimiento, se le propusiera como mensajero retrógrado en diferentes mecanismos de plasticidad sináptica (Garthwaite y Boulton 1995), ha influido en que el estudio de la participación del NO en dichos mecanismos se haya realizado, fundamentalmente, a nivel de fenómenos presinápticos (Arancio y cols. 1996; Micheva y cols. 2003). Sin embargo, también se han encontrado diferentes efectos del NO a nivel postsináptico (Ko y Kelly 1999; Lu y cols. 1999; Taqatqeh y cols. 2009). Nuestros resultados confirman, al igual que los descritos en neuronas de hipocampo y corteza (Serulle y cols. 2007 y 2008), que la señalización NO-GMPc-cGKII participa en mecanismos de plasticidad postsináptica, regulando el tráfico de la subunidad GluA1 de los AMPARs a la membrana. La activación de esta vía de señalización se traduce en un incremento de la subunidad GluA1 en la membrana plasmática de las neuronas granulares.

2.3 La activación de cGKII se traduce en la formación de receptores permeables a calcio (CP-AMPArs)

A la vista de estos resultados nos preguntamos si este incremento en subunidades GluA1 en la membrana se traducía, como era previsible, en una mayor densidad de receptores en la superficie y si dichos receptores eran permeables o impermeables a calcio. Para contestar a estas preguntas,

analizamos la respuesta de calcio producida por la estimulación con AMPA en presencia de ciclizida y su sensibilidad a la inhibición por NASPM. La respuesta de calcio se analizó en múltiples regiones individuales de las fibras del cultivo. Dichas regiones se seleccionaron marcando los botones sinápticos con la sonda fluorescente FM1-43 y comprobando que estaban sobre las fibras.

En un elevado porcentaje de estas regiones la respuesta a la estimulación con AMPA se inhibió casi totalmente (>90% de la respuesta) por NASPM, indicando que dicha respuesta está mediada principalmente por CP-AMPA. Resultado que no sorprende si se tiene presente, tal y como se ha discutido anteriormente, que en este estadio de desarrollo las subunidades más abundantes son GluA1 y GluA4. Así que, previsiblemente, la mayoría de los AMPARs estará constituida por estas subunidades, combinándose de forma homomérica o heteromérica. En otras regiones, aunque NASPM siguió inhibiendo la respuesta de Ca^{2+} inducida por AMPA, esa inhibición fue menor, sugiriendo la mayor presencia de AMPARs impermeables a Ca^{2+} en esas regiones y su mayor contribución a la respuesta.

Estos resultados indican que la mayoría de los AMPARs presentes en las dendritas de las neuronas granulares son permeables a calcio. En los últimos años se han ido mostrando numerosas evidencias de que la regulación, tanto de la expresión como del ensamblaje, el tráfico y el reciclamiento, de los CP-AMPA es crucial para la plasticidad sináptica y para el desarrollo neuronal (Kumar y cols. 2002; Cull-Candy y cols. 2006; Whitney y cols. 2008). Es importante señalar que en la realización de este estudio se han utilizado células procedentes de cerebelos de ratas de 7 días y mantenidas en cultivo de 7-9 días. Por tanto, teniendo en cuenta que se habla de madurez del cerebelo a partir de los 21 días postnatales, las células todavía son inmaduras. La presencia de CP-AMPA en estas neuronas podría ofrecer una vía de entrada de Ca^{2+} alternativa altamente regulada, necesaria para el correcto desarrollo de las mismas (Plant y cols. 2008).

El incremento de GMPc se tradujo en un aumento de la respuesta de calcio a una estimulación con AMPA. Esa mayor respuesta estaba acompañada

por un aumento en el porcentaje de regiones sensibles a la inhibición por NASPM (inhibición casi total) y por una mayor inhibición en aquellas regiones donde la señal de calcio no se suprimía totalmente por este compuesto. Estos resultados sugieren que, tanto la estimulación de los NMDARs como la incubación con 8-Br-cGMPc, se traduce en un incremento de CP-AMPARs en la superficie. El silenciamiento de cGKII o su inhibición redujo tanto la respuesta de calcio inducida por AMPA, como el porcentaje de inhibición producido por NASPM en las regiones donde la respuesta a AMPA no se inhibe totalmente por NASPM. En ambos casos la magnitud del efecto fue similar, al igual que cuando se analizó la respuesta en células que no expresan cGKII y que se incubaron con KT5823, verificando que cGKII era la diana farmacológica de KT5823 para el efecto observado.

Todos estos resultados demuestran la existencia de un mecanismo de regulación del tráfico de GluA1 a la membrana de neuronas granulares por la vía de señalización NO/GMPc/cGKII, su activación como consecuencia de la estimulación de los NMDARs, conduce a la formación de CP-AMPARs en la membrana plasmática y, en consecuencia, a un aumento de la entrada de calcio en respuesta a la estimulación de dichos receptores. En general, el aumento de CP-AMPARs en membrana se ha relacionado con diferentes formas de plasticidad (Cull-Candy y cols. 2006; Lee 2012), las cuales, se piensa que, son las bases celulares para la formación de la memoria y para el establecimiento de los circuitos neuronales durante el desarrollo. Este mecanismo contribuye al establecimiento de LTP en hipocampo (Serulle y cols. 2007). En nuestro modelo, el hecho de que se trate de neuronas inmaduras y de que el nivel de expresión de GluA1 en neuronas maduras es prácticamente indetectable, nos hace pensar que se trata de un mecanismo de plasticidad relacionado con el desarrollo de estas células.

Varios laboratorios han puesto de manifiesto que la cascada de señalización NO/GMPc es importante en el desarrollo y la regulación de la función del cerebelo tanto *in vitro* como *in vivo* (Virgili y cols. 1998; Ciani y cols. 2002). La maduración de las células granulares *in vivo* está dirigida por los

estímulos excitatorios procedentes de las fibras musgosas (Hámori y cols. 1983) y la estimulación de las fibras musgosas produce una importante liberación de NO como consecuencia de la activación del receptor NMDA, tal y como se ha demostrado en rodajas de cerebelo de rata (Maffei y cols. 2003). El NO puede afectar a diferentes procesos importantes para la función neuronal, tales como la liberación de neurotransmisores, la supervivencia dependiente de actividad, y la LTP (Bredt y cols. 2003; Contestabile 2000; Holscher 1997). Además, puesto que el NO es una señal difusible puede afectar no sólo las sinapsis donde se produce si no también a las sinapsis cercanas (Wood y cols. 1994). En cultivo, las neuronas granulares de cerebelo establecen sinapsis consigo mismas y su desarrollo está regulado por las cascadas de señalización activadas por NO y GMPc. Mientras que el NO es un regulador negativo de la proliferación de forma GMPc independiente (Ciani y cols. 2006), favorece la diferenciación y maduración sináptica de forma GMPc dependiente (Ciani y cols. 2002; López-Jiménez y cols. 2009; López-Jiménez y cols. 2012).

La presencia de los CP-AMPArs en neuronas granulares de cerebelo inmaduras y su regulación por la vía de señalización NO/GMPc podría formar parte del mecanismo de diferenciación mediado por NO (López-Jiménez y cols. 2009; Contestabile y cols. 2012).

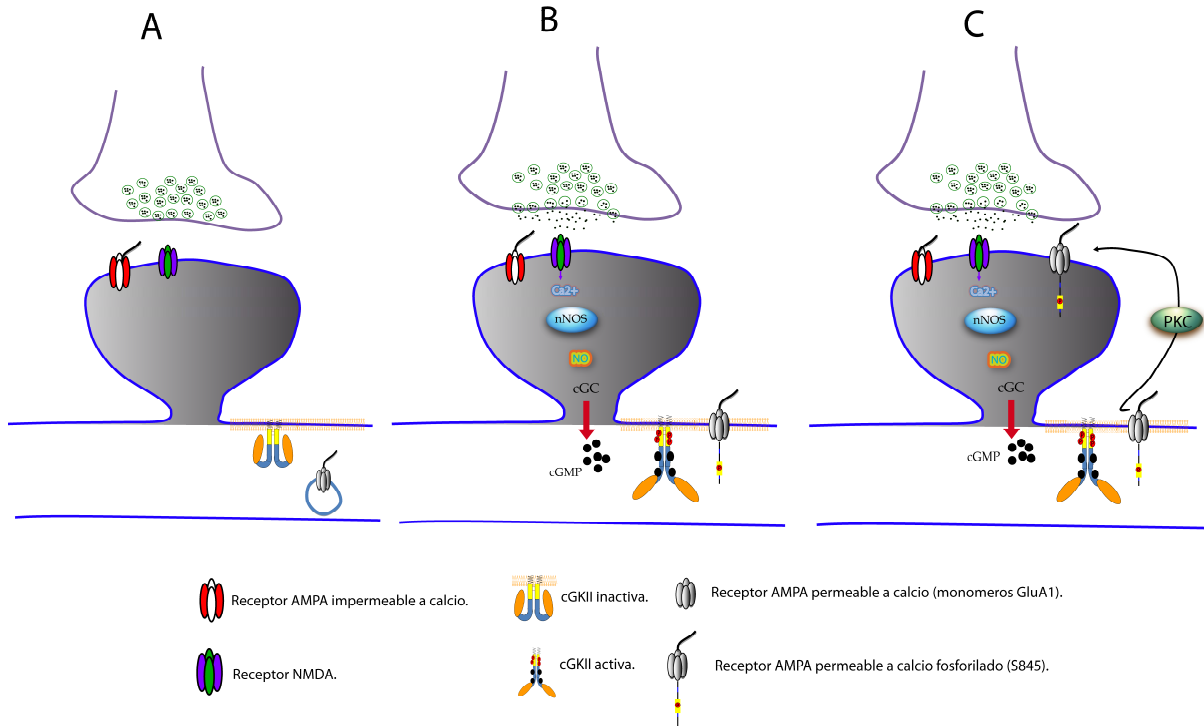


Figura 3. Esquema del modelo de activación de la cGKII a través de la activación de la ruta NMDA-NO-cGMP. A) Sinapsis en reposo: la presencia en la membrana de los AMPARs está constitutivamente controlada por su reciclaje independiente de actividad. B) La entrada de calcio a través de los NMDARs favorece la síntesis de NO que a su vez incrementa la síntesis de cGMP en la postsinapsis que activa la cGKII provocando la autofosforilación de la misma. C) La cGKII activa fosforila el dominio C-terminal de la subunidad GluA1 en la Ser845 de los AMPARs provocando la inserción en sitios extrasinápticos, y como consecuencia de CP-AMPA. Otras proteínas quinasas como la PKC, promoverán la inserción de los AMPARs que contienen la subunidad GluA1 en los sitios sinápticos mediante la fosforilación de otro residuo de Ser.

VI.CONCLUSIONES

Las principales conclusiones de este trabajo de investigación son:

- 1) Las neuronas granulares de cerebelo en cultivo a los 7 días *in vitro* expresan las cuatro subunidades de AMPARs, tanto los ARNm como las proteínas, siendo GluA1 y GluA4 las más abundantes. La expresión de las cuatro subunidades en neuronas granulares también se observa *in vivo* en cerebelo de ratas de 14 días.
- 2) La expresión de las cuatro subunidades varía a lo largo del desarrollo y con el grado de despolarización de la membrana plasmática. La disminución de la concentración de KCl en el medio de cultivo se traduce en una menor entrada de calcio y en un incremento de la expresión de las cuatro subunidades. El aumento de la expresión se acompaña de una mayor inserción de estas proteínas en la membrana y de la formación de CP-AMPARs.
- 3) Tanto la entrada de calcio por los canales de calcio de tipo L como la CaMKIV participan en este mecanismo de regulación homeostática, ya que las condiciones que conducen a una menor entrada de calcio inducen una mayor expresión en superficie de CP-AMPARs, proporcionando una vía alternativa de entrada de calcio.
- 4) La activación de los receptores NMDA con la consecuente síntesis de NO y activación de la cGKII, favorece la fosforilación del dominio C-terminal de la subunidad GluA1 en la Ser845. La actividad de cGKII *in vivo* determina el nivel de expresión de GluA1 en la densidad postsináptica.
- 5) La fosforilación en el residuo Ser845 de la subunidad GluA1 favorece la inserción de nuevos AMPARs en sitios extra-sinápticos. El enriquecimiento en la subunidad GluA1 en la membrana, tiene como consecuencia la formación de CP-AMPARs. El incremento de estos

receptores CP-AMPARs podría formar parte del mecanismo de plasticidad neuronal asociado al desarrollo de las neuronas granulares de cerebelo inducido por NO.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. (2001). Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem. J.* **357**: 593-615.
- Alkon DL, Nelson TJ. (1990). Specificity of molecular changes in neurons involved in memory storage. *FASEB J.* **4**: 1567-1576.
- Allison DW, Gelfand VI, Spector I, and Craig AM. (1998). Role of actin in anchoring postsynaptic receptors in cultured hippocampal neurons: Differential attachment of NMDA versus AMPA receptors. *J. Neurosci.* **18**: 2423-2436.
- Altman J, Bayer SA. (1997). Development of the Cerebellar System in Relation to its Evolution, Structure and Functions. *New York: CRC Press.* 783 pp.
- Andreeva SG, Dikkes P, Epstein PM, Rosenberg PA. (2001). Expression of cGMP-specific phosphodiesterase 9A mRNA in the rat brain. *J. Neurosci.* **21**: 9068-9076.
- Anwyl R. (1995). Synaptic plasticity. A molecular switch for memory. *Curr. Biol.* **4**: 854-856.
- Anggono V, Clem RL, Huganir RL. (2011). PICK1 loss of function occludes homeostatic synaptic scaling. *J. Neurosci.* **31**: 2188-2196.
- Aoto J, Nam CI, Poon MM, Ting P, Chen L. (2008). Synaptic signaling by all-trans retinoic acid in homeostatic synaptic plasticity. *Neuron.* **60**: 308-320.
- Appleby VJ, Corrêa SA, Duckworth JK, Nash JE, Noël J, Fitzjohn SM, Collingridge GL, Molnár E. (2011). LTP in hippocampal neurons is associated with a CaMKII-mediated increase in GluA1 surface expression. *J Neurochem.* **116**: 530-543.
- Arancio O, Kandel ER, Hawkins RD. (1995). Activity-dependent long-term enhancement of transmitter release by presynaptic 3',5'-cyclic GMP in cultured hippocampal neurons. *Nature.* **376**: 74-80.
- Armano S, Rossi P, Taglietti V, D'Angelo E. (2000). Long-term potentiation of intrinsic excitability at the mossy fiber-granule cell synapse of rat cerebellum. *J. Neurosci.* **20**: 5208-5216.
- Baader SL, Schilling K. (1996). Glutamate receptors mediate dynamic regulation of nitric oxide synthase expression in cerebellar granule cells. *J. Neurosci.* **16**: 1440-1449.

- Bagal AA, Kao JP, Tang CM, Thompson SM. (2005). Long-term potentiation of exogenous glutamate responses at single dendritic spines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**: 14434-14439.
- Bai X, Wong-Riley MT. (2003). Neuronal activity regulates protein and gene expressions of GluR2 in postnatal rat visual cortical neurons in culture. *J. Neurocytol.* **32**: 71-78.
- Balazs R, Gallo V, Kingsbury A. (1988). Effect of depolarization on the maturation of cerebellar granule cells in culture. *Devel. Brain. Res.* **40**: 269-276.
- Baptiste DC, Hartwick AT, Jollimore CA, Baldrige WH, Chauhan BC, Tremblay F, Kelly ME. (2002). Comparison of the neuroprotective effects of adrenoceptor drugs in retinal cell culture and intact retina. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **8**: 2666-2676.
- Bard L, Sainlos M, Bouchet D, Cousins S, Mikasova L, Breillat C, Stephenson FA, Imperiali B, Choquet D, Groc L. (2010). Dynamic and specific interaction between synaptic NR2-NMDA receptor and PDZ proteins. *Proc. Natl Acad. Sci. U. S. A.* **107**: 19561-19566.
- Barria A, Muller D, Derkach V, Griffith LC, Soderling TR. (1997). Regulatory phosphorylation of AMPA-type glutamate receptors by CaM-KII during long-term potentiation. *Science.* **276**: 2042-2045.
- Bass BL. (2002). RNA editing by adenosine deaminases that act on RNA. *Annu. Rev. Biochem.* **71**: 817-846.
- Bassani S, Cingolani LA, Valnegri P, Folci A, Zapata J, Gianfelice A, Sala C, Goda Y, Passafaro M. (2012). The X-linked intellectual disability protein TSPAN7 regulates excitatory synapse development and AMPAR trafficking. *Neuron.* **73**: 1143-1158.
- Bean B. (1989). More than a Ca²⁺ channel? *Trends in neurosciences.* **12**: 128-130.
- Bear MF, Abraham WC. (1997). Long-term depression in hippocampus. *Annu. Rev. Neurosci.* **19**: 437-462.
- Behar TN, Li YX, Tran HT, Ma W, Dunlap V, Scott C, Baker JL. (1996) GABA stimulates chemotaxis and chemokinesis of embryonic cortical neurons via calcium-dependent mechanism. *J. Neurosci.* **16**: 1808-1818.

- Bellone C, Lüscher C. (2006). Cocaine triggered AMPA receptor redistribution is reversed in vivo by mGluR-dependent long-term depression. *Nat. Neurosci.* **9**: 636-641.
- Benke TA, Luthi A, Isaac JT, Collingridge GL. (1998). Modulation of AMPA receptor unitary conductance by synaptic activity. *Nature.* **393**: 793-97.
- Beretta F, Sala C, Saglietti L, Sheng M, Passafaro M. (2005). NSF interaction is important for direct insertion of GluR2 at synaptic sites. *Mol. And Cell. Neurosci.* **28**: 650-660.
- Bito H, Deisseroth K, Tsien RW. (1996). CREB phosphorylation and dephosphorylation: a Ca^{2+} and stimulus duration-dependent switch for hippocampal gene expression. *Cell.* **87**: 1203-1214.
- Blokland A, Schreiber R, Prickaerts J. (2006). Improving memory: a role for phosphodiesterases. *Curr. Pharm. Des.* **12**: 2511-2523.
- Blokland A, Menniti FS, Prickaerts J. (2012). PDE inhibition and cognition enhancement. *Expert Opin. Ther. Pat.* **4**: 349-354.
- Boehm J, Kang MG, Johnson RC, Esteban J, Huganir RL, Malinow R. (2006). Synaptic incorporation of AMPA receptors during LTP is controlled by a PKC phosphorylation site on GluR1. *Neuron.* **51**: 213-225.
- Borgdoff AJ, Choquet D. (2002). Regulation of AMPA receptor lateral movements. *Nature* **417**: 649-653.
- Borghesiani PR, Peyrin JM, Klein R, Rubin J, Carter AR, Schwartz PM, Luster A, Corfas G, Segal RA. . (2002). BDNF stimulates migration of cerebellar granule cells. *Analysis.* **87**: 1435-1442.
- Borodinsky LN, Fiszman ML. (1998). Extracellular potassium concentration regulates proliferation of immature cerebellar granulecells. *Brain. Res. Dev. Brain. Res.* **107**: 43-48.
- Bourinet E, Stotz SC, Spaetgens RL, Dayanithi G, Lemos J, Nargeot J, Zamponi GW (2001). Interaction of SNX482 with domains III and IV inhibits activation gating of α_1E (Cav2.3) calcium channels. *Biophys. J.* **81**: 79-88.

- Brackmann M, Schuchmann S, Anand R, Braunewell KH. (2005). Neuronal Ca²⁺ sensor protein VILIP-1 affects cGMP signalling of guanylyl cyclase B by regulating clathrin-dependent receptor recycling in hippocampal neurons. *J. Cell. Sci.* **118**: 2495-2505.
- Bredt DS. (2003). Nitric oxide signaling specificity: the heart of the problem. *J. Cell. Sci.* **116**: 9-15.
- Bredt DS, Ferris CD, Snyder SH. (1992). Nitric oxide synthase regulatory sites. Phosphorylation by cyclic AMP-dependent protein kinase, protein kinase C, and calcium/calmodulin protein kinase, identification of flavin and calmodulin binding sites. *J. Biol.Chem.* **267**: 10976-10981.
- Bredt DS, Hwang PM, Fotuhi M, Dawson TM, Snyder SH. (1991). Nitric oxide synthase protein and mRNA are discretely localized in neuronal populations of the mammalian CNS together with NADPH diaphorase. *Neuron.* **7**: 615-624.
- Bredt DS, Snyder SH. (1990). Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin requiring enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **87**: 682-685.
- Brenman JE, Christopherson KS, Craven SE, McGee AW, Bredt DS. (1996). Cloning and characterization of postsynaptic density 93, a nitric oxide synthase interacting protein. *J. Neurosci.* **16**: 7407-7415.
- Bruhwyler J, Chleide E, Liegeois JF, Career F. (1993). Nitric oxide: a new messenger in the brain. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **17**: 373-378.
- Brune B, Dimmeler S, Molina-y-Vedia L, Lapetina EG. (1994). Apoptotic cell death and nitric oxide: activating and antagonistic transducing pathways. *Biochemistry.* **63**: 817-825.
- Buechler WA, Nakane S, Charles I, Powell K. (1999). Tissue distribution of the human soluble guanylate cyclases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **263**: 696-701.
- Buldakova SL, Bolshakov KV, Tikhonov DB, Magazanik LG. (2000). Ca²⁺-dependent desensitization of AMPA receptors. *Neuroreport.* **11**: 2937-2941.
- Burette A, Zabel U, Weinberg RJ, Schmidt HH, Valtschanoff JG. (2002). Synaptic localization of nitric oxide synthase and soluble guanylyl cyclase in the hippocampus. *J. Neurosci.* **22**: 8961-8970.

- Burgin AB, Magnusson OT, Singh J, Witte P, Staker BL, Bjornsson JM, Thorsteinsdottir M, Hrafnisdottir S, Hagen T, Kiselyov AS, Stewart LJ, Gurney ME. (2010). Design of phosphodiesterase 4D (PDE4D) allosteric modulators for enhancing cognition with improved safety. *Nat. Biotechnol.* **28**: 63-70.
- Burkhardt M, Glazova M, Gambaryan S, Vollkommer T, Butt E, Bader B, Heermeier K, Lincoln TM, Walter U, Palmetshofer A. (2000). KT5823 inhibits cGMP-dependent protein kinase activity in vitro but not in intact human platelets and rat mesangial cells. *J. Biol. Chem.* **275**: 33536-33541.
- Burlet S, Leger L, Cespuglio R. (1999). Nitric oxide and sleep in the rat: a puzzling relationship. *Neuroscience.* **92**: 627-639.
- Burrone J, Murthy VN. (2003). Synaptic gain control and homeostasis. *Curr. Opin. Neurobiol.* **13**: 560-567.
- Burrone J, O'Byrne M, Murthy VN. (2002). Multiple forms of synaptic plasticity triggered by selective suppression of activity in individual neurons. *Nature.* **420**: 414-418.
- Butt E, Abel K, Krieger M, Palm D, Hoppe V, Hoppe J, Walter U. (1994). cAMP- and cGMP-dependent protein kinase phosphorylation sites of the focal adhesion vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) in vitro and in intact human platelets. *J. Biol. Chem.* **269**: 14509-14517.
- Campese VM, Sindhu RK, Ye S, Bay Y, Vaziri ND, Jabbari B. (2007). Regional expression of NO synthase, NADPH oxidase and superoxide dismutase in the rat brain. *Brain Res.* **1134**: 27-32.
- Canosa M, Giordano E, Capello S, Guarnieri C, Ferri S. (2001). Nitric oxide down-regulates brain derived neurotrophic factor secretion in cultured hippocampal neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**: 3282-3287.
- Catterall WA. (2000). Structure and regulation of voltage-gated Ca²⁺ channels. *Annual review of cell and developmental biology.* **16**: 521-555.
- Chadderton P, Margrie TW, Häusser M. (2004). Integration of quanta in cerebellar granule cells during sensory processing. *Nature.* **428**: 856-860.

- Chan S, Yan C. (2011). PDE1 isozymes, key regulators of pathological vascular remodeling. *Curr. Opin. Pharmacol.* **11**: 720-724.
- Chedotal A. (2010). Should I stay or should I go? Becoming a granule cell. *Trends in Neurosciences.* **33**: 163-172.
- Chen WG, West AE, Tao X, Corfas G, Szentirmay MN, Sawadogo M, Vinson C, Greenberg ME. (2003). Upstream stimulatory factors are mediators of Ca²⁺-responsive transcription in neurons. *J. Neurosci.* **23**: 2572-2581.
- Chen BS, Braud S, Badger II JD, Isaac JT, Roche KW. (2006). Regulation of NR1/NR2C N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors by phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **281**: 16583–16590.
- Chen BS, Roche KW. (2009). Growth factor-dependent trafficking of cerebellar NMDA receptors via protein kinase B/Akt phosphorylation of NR2C. *Neuron.* **62**: 471-478.
- Chung HJ, Xia J, Scannevin RH, Zhang X, Huganir RL. (2000). Phosphorylation of the AMPA receptor subunit GluR2 differentially regulates its interaction with PDZ domain-containing proteins. *J. Neurosci.* **20**: 7258–7267.
- Ciani E, Calvanese V, Crochemore C, Bartesaghi R, Contestabile A. (2006). Proliferation of cerebellar precursor cells is negatively regulated by nitric oxide in the newborn rat. *J. Cell Sci.* **119**: 3161–3170.
- Ciani E, Severi S, Contestabile A, Bartesaghi R, Contestabile A. (2004). Nitric oxide negatively regulates proliferation and promotes neuronal differentiation through N-Myc downregulation. *J. Cell Sci.* **17**: 4727–37.
- Ciani, E., Guidi, S., Bartesaghi, R., and Contestabile, A. (2002) Nitric oxide regulates cGMP-dependent cAMP-responsive element binding protein phosphorylation and Bcl-2 expression in cerebellar neurons: implication for a survival role of nitric oxide. *J. Neurochem.* **82**: 1282-1289.
- Coleman SK, Cai C, Mottershead DG, Haapalahti JP, Keinanen K. (2003). Surface expression of GluR AMPA receptor is dependent on an interaction between its C-terminal domain and a 4.1 protein. *J. Neurosci.* **23**: 798–806.

- Collingridge GL, Isaac JT, Wang YT. (2005). Receptor trafficking and synaptic plasticity. *Nature Rev. Neurosci.* **5**: 952–962.
- Condoirelli DF, Dell’Albani P, Aronica E, Genazzani AA, Casabona G, Corsaro M, Balázs R, Nicoletti F. (1993). Growth conditions differentially regulate the expression of alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionate (AMPA) receptor subunits in cultured neurons. *J. Neurochem.* **61**: 2133–2139.
- Contestabile A. (2000). Roles of NMDA receptor activity and nitric oxide production in brain development. *Brain Res. Rev.* **32**: 476–509.
- Contestabile A. (2002) Cerebellar granule cells as a model to study mechanisms of neuronal apoptosis or survival in vivo and in vitro. *Cerebellum*. **1**: 41–55.
- Contestabile A. (2012). Role of nitric oxide in cerebellar development and function: focus on granule neurons. *Cerebellum*. **11**: 50–61.
- Coombs ID, Cull-Candy SG. (2009). Transmembrane AMPA receptor regulatory proteins and AMPA receptor function in the cerebellum. *Neuroscience*. **162**: 656–664.
- Craven SE, Brecht DS. (1998). PDZ proteins organize synaptic signalling pathways. *Cell*. **93**: 495–498.
- Cserép C, Szonyi A, Veres JM, Németh B, Szabadits E, de Vente J, Hájos N, Freund TF, Nyiri G. (2011). Nitric oxide signaling modulates synaptic transmission during early postnatal development. *Cereb. Cortex*. **9**: 2065–2074.
- Cudeiro J, Rivadulla C, Grieve KL. (2000). A possible role for nitric oxide at the sleep/wake interface. *Sleep*. **23**: 829–835.
- Cull-Candy SG, Leszkiewicz DN. (2004). Role of distinct NMDA receptor subtypes at central synapses. *Sci. STKE*. **255**: re16.
- Cull-Candy S, Kelly L, Farrant M. (2006). Regulation of Ca²⁺-permeable AMPA receptors: synaptic plasticity and beyond. *Curr. Opin. Neurobiol.* **16**: 288–297.
- Czöndör K, Mondin M, Garcia M, Heine M, Frischknecht R, Choquet D, Sibarita JB, Thoumine OR. (2012). Unified quantitative model of AMPA receptor trafficking at synapses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**: 3522–3527.

- D'Angelo E, De Zeeuw CI. (2009). Timing and plasticity in the cerebellum: focus on the granular layer. *Trends in Neuroscience*. **32**: 30-40.
- D'Angelo E, Rossi P, Armano S, Taglietti V. (1999). Evidence for NMDA and mGlu receptor-dependent long-term potentiation of mossy fiber-granule cell transmission in rat cerebellum. *J. Neurophysiol.* **81**: 277-287.
- Dachtler J, Hardingham NR, Glazewski S, Wright NF, Blain EJ, Fox K. (2011). Experience-dependent plasticity acts via GluR1 and a novel neuronal nitric oxide synthase-dependent synaptic mechanism in adult cortex. *J. Neurosci.* **31**: 11220-11230.
- Dahmane N, Ruiz-Altaba A. (1999). Sonic hedgehog regulates the growth and patterning of the cerebellum. *Development*. **126**: 3089-3100.
- Davis GW. (2006). Homeostatic control of neural activity: From phenomenology to molecular design. *Annu. Rev. Neurosci.* **29**: 307-323.
- Daw MI, Chittajallu R, Bortolotto ZA, Dev KK, Duprat F, Henley JM, Collingridge GL, Isaac JT. (2000). PDZ proteins interacting with C-terminal GluR2/3 are involved in a PKC-dependent regulation of AMPA receptors at hippocampal synapses. *Neuron*. **28**: 873-86.
- Dawson TM, Bredt DS, Fotuhi M, Hwang PM, Snyder SH. (1991). Nitric oxide synthase and neuronal NADPH diaphorase are identical in brain and peripheral tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **88**: 7797-7801.
- De Gois S, Schafer MK, Defamie N, Chen C, Ricci A, Weihe E, Varoqui H, Erickson JD. (2005). Homeostatic scaling of vesicular glutamate and GABA transporter expression in rat neocortical circuits. *J Neurosci.* **25**: 7121-7133.
- Deisseroth K, Heist EK, Tsien RW. (1998). Translocation of calmodulin to the nucleus supports CREB phosphorylation in hippocampal neurons. *Nature*. **392**: 198-202
- Derbyshire ER, Marletta MA. (2012). Structure and regulation of soluble guanylate cyclase. *Annu. Rev. Biochem.* **81**: 533-559.
- Derkach VA, Oh MC, Guire ES, Soderling TR. (2007). Regulatory mechanisms of AMPA receptors in synaptic plasticity. *Nature Rev. Neurosci.* **8**: 101-113.

- Dev KK, Nishimune A, Henley JM, Nakanishi S. (1999). The protein kinase C- binding protein PICK1 interacts with short but not long form alternative splice variants of AMPA receptor subunits. *Neuropharmacology*. **38**: 635–644.
- Dias RB, Rombo DM, Ribeiro JA, Sebastião AM. (2012). Ischemia-induced synaptic plasticity drives sustained expression of calcium-permeable AMPA receptors in the hippocampus. *Neuropharmacology*. **65**: 114-122.
- Dinerman JL, Steiner JP, Dawson TM, Dawson V, Snyder SH. (1994). Cyclic nucleotide dependent phosphorylation of neuronal nitric oxide synthase inhibits catalytic activity. *Neuropharmacology*. **33**: 1245-1251.
- Ding JD, Weinberg RJ. (2006). Localization of soluble guanylyl cyclase in the superficial dorsal horn. *J. Comp. Neurol.* **495**: 668-678.
- Eccles JC. (1964). The Physiology of Synapses. *New York: Academic Press*. **XI**: 316 pp.
- Ehlers MD, Heine M, Groc L, Lee MC, Choquet D. (2007). Diffusional trapping of GluR1 AMPA receptors by input-specific synaptic activity. *Neuron*. **54**: 447-460.
- Ehlers MD. (2000). Reinsertion or degradation of AMPA receptors determined by activity dependent endocytic sorting. *Neuron*. **28**: 511–525.
- El Husseini AE, Schnell E, Chetkovich DM, Nicoll RA, Brecht DS. (2000). PSD-95 involvement in maturation of excitatory synapses. *Science*. **290**: 1364–1368.
- El Idrissi A, Trenkner E. (1999). Growth factors and taurine protect against excitotoxicity by stabilizing calcium homeostasis and energy metabolism. *J. Neurosci.* **19**: 9459-9468.
- Erickson JD, De Gois S, Varoqui H, Schafer MK, Weihe E. (2006). Activity-dependent regulation of vesicular glutamate and GABA transporters: a means to scale quantal size. *Neurochem. Int.* **48**: 643-649.
- Esteban JA, Shi SH, Wilson C, Nuriya M, Huganir RL, Malinow R. (2003). PKA phosphorylation of AMPA receptor subunits controls synaptic trafficking underlying plasticity. *Nat. Neurosci.* **6**: 136-143.
- Feil R, Hofmann F, Kleppisch T. (2005). Function of cGMP-dependent protein kinases in the nervous system. *Rev. Neurosci.* **16**: 23–41.

- Feil R, Kleppisch T. (2008). NO/cGMP-dependent modulation of synaptic transmission. *Handb. Exp. Pharmacol.* **184**: 529–560.
- Fischer M, Kaech S, Knutti D, Matus A. (1998). Rapid actin-based plasticity in dendritic spines. *Neuron.* **20**: 847–854.
- Flint AC, Maisch US, Weishaupt JH, Kriegstein AR, Monyer H. (1997). NR2A subunit expression shortens NMDA receptor synaptic currents in developing neocortex. *J. Neurosci.* **17**: 2469–2476.
- Fortin DA, Srivastava T, Dwarakanath D, Pierre P, Nygaard S, Derkach VA, Soderling TR. (2012). Brain-derived neurotrophic factor activation of CaM-kinase kinase via transient receptor potential canonical channels induces the translation and synaptic incorporation of GluA1-containing calcium-permeable AMPA receptors. *J. Neurosci.* **32**: 8127–8137.
- Föstermann U, Pollock JS, Schmidt HHW, Heller M, Murad F. (1991). Calmodulin-dependent endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide synthase activity is present in the particulate and cytosolic fractions of bovine aortic endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **88**: 1178–1792.
- Francis SH, Corbin JD. (1999). Cyclic nucleotide-dependent protein kinases: intracellular receptors for cAMP and cGMP action. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* **36**: 275–328.
- Frank CA, Kennedy MJ, Goold CP, Marek KW, Davis GW. (2006). Mechanisms underlying the rapid induction and sustained expression of synaptic homeostasis. *Neuron.* **52**: 663–677.
- Frey U, Huang YY, Kandel ER. (1993). Effects of cAMP simulate a late stage of LTP in hippocampal CA1 neurons. *Science.* **260**: 1661–1664.
- Friedman HV, Bresler T, Garner CC, Ziv NE. (2000). Assembly of new individual excitatory synapses: time course and temporal order of synaptic molecule recruitment. *Neuron.* **27**: 57–69.
- Fujiwara M, Sengupta P, McIntire SL. (2002). Regulation of body size and behavioral state of *C. elegans* by sensory perception and the EGL-4 cGMP-dependent protein kinase. *Neuron.* **36**: 1091–1102.

- Gallo V, Kingsbury A, Balazs R, Jorgensen OS. (1987). The role of depolarization in the survival and differentiation of cerebellar granule cells in culture. *J. Neurosci.* **7**: 2203–2213.
- Gallo EF, Iadecola C. (2011). Neuronal nitric oxide contributes to neuroplasticity-associated protein expression through cGMP, protein kinase G, and extracellular signal-regulated kinase. *J. Neurosci.* **31**: 6947–6955.
- Gamm DM, Francis SH, Angelotti TP, Corbin JD, Uhler MD. (1995). The type II isoform of cGMP-dependent protein kinase is dimeric and possesses regulatory and catalytic properties distinct from the type I isoforms. *J. Biol. Chem.* **270**: 27380–27388.
- Garthwaite J. (2005) Dynamics of cellular NO-cGMP signaling. *Front Biosci.* **10**: 1868–1880.
- Garthwaite J, Boulton CL. (1995). Nitric oxide signaling in the central nervous system. *Annu. Rev. Physiol.* **57**: 683–706.
- Gilthorpe JD, Papantoniou EK, Chédotal A, Lumsden A, Wingate RJ. (2002). The migration of cerebellar rhombic lip derivatives. *Development.* **129**: 4719–4728.
- Gleichmann M, Beinroth S, Reed JC, Krajewski S, Schulz JB, Wüllner U, Klockgether T, Weller M. (1998). Potassium deprivation-induced apoptosis of cerebellar granule neurons: cytochrome c release in the absence of altered expression of Bcl-2 family proteins. *Cell. Physiol. Biochem.* **8**: 194–201.
- Goel A, Jiang B, Xu LW, Song L, Kirkwood A, Lee HK. (2006). Cross-modal regulation of synaptic AMPA receptors in primary sensory cortices by visual experience. *Nat. Neurosci.* **9**: 1001–1003.
- Goel A, Xu LW, Snyder KP, Song L, Goenaga-Vazquez Y, Megill A, Takamiya K, Huganir RL, Lee HK. (2011). Phosphorylation of AMPA receptors is required for sensory deprivation-induced homeostatic synaptic plasticity. *PLoS One.* **6**: e18264.
- Gong B, Wang H, Gu S, Heximer SP, Zhuo M. (2007). Genetic evidence for the requirement of adenylyl cyclase 1 in synaptic scaling of forebrain cortical neurons. *Eur. J. Neurosci.* **26**: 275–288.
- Goold CP, Nicoll RA. (2011). Single-cell optogenetic excitation drives homeostatic synaptic depression. *Neuron.* **68**: 512–528.

- Gragasin FS, Michelakis ED, Hogan A, Moudgil R, Hashimoto K, Wu X, Bonnet S, Haromy A, Archer SL. (2004). The neurovascular mechanism of clitoral erection: nitric oxide and cGMP-stimulated activation of BKCa channels. *FASEB J.* **18**: 1382-1391.
- Greengard P, Jen J, Nairn AC, Stevens CF. (1991). Enhancement of the glutamate response by cAMP dependent protein kinase in hippocampal neurons. *Science.* **253**: 1135-1138.
- Greger IH, Akamine P, Khatri L, Ziff EB. (2006). Developmentally regulated, combinatorial RNA processing modulates AMPA receptor biogenesis. *Neuron.* **51**: 85-97.
- Greger IH, Esteban JA. (2007). AMPA receptor biogenesis and trafficking. *Curr. Opin. Neurobiol.* **17**: 289-297.
- Greger IH, Khatri L, Ziff EB. (2002). RNA editing at arg607 controls AMPA receptor exit from the endoplasmic reticulum. *Neuron.* **34**: 759-772.
- Gregory KJ, Dong EN, Meiler J, Conn PJ. (2011). Allosteric modulation of metabotropic glutamate receptors: structural insights and therapeutic potential. *Neuropharmacology.* **60**: 66-81.
- Groc L, Heine M, Cognet L, Brickley K, Stephenson FA, Lounis B, Choquet D. (2004). Differential activity-dependent regulation of the lateral mobilities of AMPA and NMDA receptors. *Nat. Neurosci.* **7**: 695-696.
- Groc L, Heine M, Cousins SL, Stephenson FA, Lounis B, Cognet L, Choquet D. (2006). NMDA receptor surface mobility depends on NR2A-2B subunits. *Proc. Natl Acad. Sci. U. S. A.* **103**: 18769-18774.
- Grooms SY, Noh KM, Regis R, Bassell GJ, Bryan MK, Carroll RC, Zukin RS. (2006). Activity bidirectionally regulates AMPA receptor mRNA abundance in dendrites of hippocampal neurons. *J. Neurosci.* **26**: 8339-8351.
- Grosshans DR, Clayton DA, Coultrap SJ, Browning MD. (2002). LTP leads to rapid surface expression of NMDA but not AMPA receptors in adult rat CA1. *Nat. Neurosci.* **5**: 27-33.
- Groth RD, Lindskog M, Thiagarajan TC, Li L, Tsien RW. (2010). Beta Ca²⁺/CaM-dependent kinase type II triggers upregulation of GluA1 to coordinate adaptation to synaptic inactivity in hippocampal neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**: 828-833.

- Gudi T, Huvar I, Meinecke M, Lohmann SM, Boss GR, Pilz RB. (1996). Regulation of gene expression by cGMP-dependent protein kinase. Transactivation of the c-fos promoter. *J. Biol. Chem.* **271**: 4597-4600.
- Ha BK, Vicini S, Rogers RC, Bresnahan JC, Burry RW, Beattie MS. (2002). Kainate-induced excitotoxicity is dependent upon extracellular potassium concentrations that regulate the activity of AMPA/KA type glutamate receptors. *J. Neurochem.* **83**: 934-945.
- Haase A, Bicker G. (2003). Nitric oxide and cyclic nucleotides are regulators of neuronal migration in an insect embryo. *Development.* **130**: 3977-3987.
- Hack N, Balázs R. (1995). Properties of AMPA receptors expressed in rat cerebellar granule cell cultures: Ca²⁺ influx studies. *J. Neurochem.* **65**: 1077-1084.
- Hámori J, Somogyi J. (1983). Differentiation of cerebellar mossy fiber synapses in the rat: a quantitative electron microscope study. *J. Comp. Neurol.* **220**: 365-377.
- Hanley JG, Katri L, Hanson PI, Ziff. (2002). NSF ATPase and α/β SNAPs disassemble the AMPA receptor-PICK1 complex. *Neuron.* **34**: 53-67.
- Hardingham N, Fox K. (2006). The role of nitric oxide and GluR1 in presynaptic and postsynaptic components of neocortical potentiation. *J. Neurosci.* **26**: 7395-7404.
- Harteneck C, Wedel B, Koesling D, Malkewitz J, Schultz G, Böhme E. (1991). Molecular cloning and expression of a new alpha-subunit of soluble guanylyl cyclase. Interchangeability of the alpha-subunits of the enzyme. *FEBS Lett.* **292**: 217-222.
- Hayashi Y, Shi SH, Esteban JA, Piccini A, Poncer JC, Malinow R. (2000). Driving AMPA receptors into synapses by LTP and CaMKII: Requirement for GluR1 and PDZ domain interaction. *Science.* **287**: 2262-2267.
- Hatten ME. (1999). Central nervous system neuronal migration. *Annu. Rev. Neurosci.* **22**: 511-39.
- He K, Song L, Cummings LW, Goldman J, Huganir RL, Lee HK. (2009). Stabilization of Ca²⁺-permeable AMPA receptors at perisynaptic sites by GluR1-SER845 phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**: 20033-20038.

- Heine M, Groc L, Frischknecht R, Béïque JC, Lounis B, Rumbaugh G, Huganir RL, Cognet L, Choquet D. (2008). Surface mobility of postsynaptic AMPARs tunes synaptic transmission. *Science*. **320**: 201-205.
- Henley JM, Barker EA, Glebov OO. (2011). Routes, destinations and delays: recent advances in AMPA receptor trafficking. *Trends Neurosci*. **34**: 258-268.
- Hering H, Sheng M. (2002). Dendritic spines: Structure, dynamics and regulation. *Nat. Rev. Neurosci*. **2**: 880-888.
- Ho VM, Lee JA, Martin KC. (2011). The cell biology of synaptic plasticity. *Science*. **334**: 623-628.
- Hofmann F, Dostmann W, Keilbach A, Landgraf W, Ruth P. (1992). Structure and physiological role of cGMP-dependent protein kinase. *Biochim. Biophys. Acta*. **1135**: 51-60.
- Hollmann M, Heinemann S. (1994). Cloned glutamate receptors. *Annu. Rev. Neurosci*. **17**: 31-108.
- Holscher C. (1997). Nitric oxide, the enigmatic neuronal messenger: its role in synaptic plasticity. *Trends in Neurosci*. **20**: 298-303.
- Hulko M, Berndt F, Gruber M, Linder JU, Truffault V, Schultz A, Martin J, Schultz JE, Lupas AN, Coles M. (2006). The HAMP domain structure implies helix rotation in transmembrane signaling. *Cell*. **126**: 929-940.
- Ibata K, Sun Q, Turrigiano GG. (2008). Rapid synaptic scaling induced by changes in postsynaptic firing. *Neuron*. **57**: 819-826.
- Ignarro LJ, Gruetter CA. (1981). Requirement of thiols for activation of coronary arterial guanylate cyclase by glyceryl trinitrate and sodium nitrite: possible involvement of S-nitrosothiols. *Biochim. Biophys. Acta*. **631**: 221-231.
- Ihara H, Kuwamura M, Atsuta M, Nihonmatsu I, Okada T, Mukamoto M, Kozaki S. (2006). Expression of neuronal nitric oxide synthase variant, nNOS- μ , in rat brain. *Nitric Oxide*. **15**: 13-19.
- Inceoglu B, Wagner K, Schebb NH, Morisseau C, Jinks SL, Ulu A, Hegedus C, Rose T, Brosnan R, Hammock BD. (2011). Analgesia mediated by soluble epoxide hydrolase inhibitors is dependent on cAMP. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**: 5093-5107.

- Isaac JT, Ashby M, McBain CJ. (2007). The role of the GluR2 subunit in AMPA receptor function and synaptic plasticity. *Neuron*. **54**: 859–871.
- Ito M. (1984). *The Cerebellum and Neural Control*. New York: Raven. 580 pp.
- Ito M. (2001). Cerebellar long-term depression: characterization, signal transduction and functional roles. *Physiol. Rev.* **81**: 1143–1195.
- Jaafari N, Henley J, Hanley J. (2012). PICK1 mediates transient synaptic expression of GluA2-Lacking AMPA receptors during glycine-induced AMPA receptor trafficking. *J. Neurosci.* **32**: 11618–11630.
- Jackson AC, Milstein AD, Soto D, Farrant M, Cull-Candy SG, Nicoll RA. (2011). Probing TARP modulation of AMPA receptor conductance with polyamine toxins. *J. Neurosci.* **31**: 7511–7520.
- Jarnaess E, Tasken K. (2007). Spatiotemporal control of cAMP signalling processes by anchored signalling complexes. *Biochem. Soc. Trans.* **35**: 931–937.
- Johnson EC, Robinson PR, Lisman JE. (1986). Cyclic GMP is involved in the excitation of invertebrate photoreceptors. *Nature*. **324**: 468–470.
- Jones JD, Camey ST, Vrana KE, Norford DC, Howlett AC. (2008). Cannabinoid receptor-mediated translocation of NO-sensitive guanylyl cyclase and production of cyclic GMP in neuronal cells. *Neuropharmacology*. **54**: 23–30.
- Jordan BA, Fernholz BD, Boussac M, Xu C, Grigorean G, Ziff EB, Neubert TA. (2004). Identification and verification of novel rodent postsynaptic density proteins. *Mol. Cell. Proteomics*. **3**: 857–871.
- Joshi I, Wang LY. (2002). Developmental profiles of glutamate receptors and synaptic transmission at a single synapse in the mouse auditory brainstem. *J. Physiol.* **540**: 861–873.
- Ju W, Morishita W, Tsui J, Gaietta G, Deerinck TJ, Adams SR, Garner CC, Tsien RY, Ellisman MH, Malenka RC. (2004). Activity dependent regulation of dendritic synthesis and trafficking of AMPA receptors. *Nat. Neurosci.* **7**: 244–253.

- Jurado S, Sánchez-Prieto J, Torres M. (2003). Differential expression of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase subunits during the development of rat cerebellar granule cells: regulation via N-methyl-D-aspartate receptors. *J. Cell. Sci.* **116**: 3165-3175.
- Jurado S, Sánchez-prieto J, Torres M. (2004). Elements of the nitric oxide / cGMP pathway expressed in cerebellar granule cells: biochemical and functional characterisation. *Neurochem. Int.* **45**: 833-843.
- Jurado S, Sánchez-Prieto J, Torres M. (2005). Expression of cGMP-dependent protein kinases (I and II) and neuronal nitric oxide synthase in the developing rat cerebellum. *Brain Res. Bull.* **65**: 111-115.
- Jurado S, Rodríguez-Pascual F, Sánchez-Prieto J, Reimunde FM, Lamas S, Torres M. (2006). NMDA induces post-transcriptional regulation of alpha2-guanylyl-cyclase-subunit expression in cerebellar granule cells. *J. Cell. Sci.* **119**: 1622-1631.
- Kamboj SK, Swanson GT, Cull-Candy SG. (2000). Intracellular spermine confer rectification on rat calcium-permeable AMPA and kainate receptors. *J. Physiol.* **486**: 297-303.
- Kandel ER. (1997). Genes, synapses, and long term memory. *J. Cell. Physiol.* **173**: 124.
- Kaupp UB, Seifert R. (2002). Cyclic nucleotide-gated ion channels. *Physiol. Rev.* **82**: 769-824.
- Kenney AM, Rowitch DH. (2000). Sonic hedgehog promotes G(1) cyclin expression and sustained cell cycle progression in mammalian neuronal precursors. *Mol. Cell. Biol.* **20**: 9055-9067.
- Kim CH, Lisman JE. (2001). A labile component of AMPA receptormediated synaptic transmission is dependent on microtubule motors, actin, and N-ethylmaleimide-sensitive factor. *J. Neurosci.* **21**: 4188-4194.
- Kingston PA, Zufall F, Barnstable CJ. (1996). Rat hippocampal neurons express genes for both rod retinal and olfactory cyclic nucleotide-gated channels: novel targets for cAMP/cGMP function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**: 10440-10445.
- Kingston PA, Zufall F, Barnstable CJ. (1999). Widespread expression of olfactory cyclic nucleotide-gated channel genes in rat brain: implications for neuronal signalling. *Synapse.* **32**: 1-12.

- Kleppisch T, Feil R. (2009). cGMP signaling in the mammalian brain: role in synaptic plasticity and behaviour. *Handb. Exp. Pharmacol.* **191**: 549–579.
- Kleppisch T, Pfeifer A, Klatt P, Ruth P, Montkowski A, Fässler R, Hofmann F. (1999). Long-term potentiation in the hippocampal CA1 region of mice lacking cGMP-dependent kinases is normal and susceptible to inhibition of nitric oxide synthase. *J. Neurosci.* **19**: 48-55.
- Ko GY, Kelly PT. (1999). Nitric oxide acts as a postsynaptic signaling molecule in calcium/calmodulin-induced synaptic potentiation in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J. Neurosci.* **19**: 6784-6794.
- Koesling D, Russwurm M, Mergia E, Mullershausen F, Friebe A. (2004). Nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase: structure and regulation. *Neurochem. Int.* **45**: 813-819.
- Komuro H, Rakic P. (1992). Selective role of N-type calcium channels in neuronal migration. *Science.* **257**: 806-809.
- Komuro H, Rakic P. (1993). Modulation of neuronal migration by NMDA receptors. *Science.* **260**: 95-97.
- Komuro H, Rakic P. (1998a). Distinct modes of neuronal migration in different domains of developing cerebellar cortex. *J. Neurosci.* **18**: 1478-1490.
- Komuro H, Rakic P. (1998b). Orchestration of Neuronal Migration by Activity of Ion Channels, Neurotransmitter Receptors and Intracellular calcium Fluctuations. *J. Neurobiol.* **37**: 110-130.
- Komuro H, Yacubova E (2003). Recent advances in cerebellar granular cell migration. *Cell. Mol. Life. Sci.* **60**: 1084-1098.
- Kristensen AS, Jenkins MA, Banke TG, Schousboe A, Makino Y, Johnson RC, Huganir R, Traynelis SF. (2011). Mechanism of Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II regulation of AMPA receptor gating. *Nat Neurosci.* **14**: 727-735.
- Kuhar SG, Feng L, Vidan S, Ross M, Hatten ME, Heintz N (1993). Changing patterns of gene expression define four stages of cerebellar granule neuron differentiation. *Development.* **117**: 97-104.

- Kumar SS, Bacci A, Kharazia V, Huguenard JR. (2002). A developmental switch of AMPA receptor subunits in neocortical pyramidal neurons. *J Neurosci.* **22**: 3005-3015.
- Kwon NS, Stuhler DJ, Nathan CF. (1991). Inhibition of tumor cell ribonucleotide reductase by macrophage-derived nitric oxide. *J. Exp. Med.* **174**: 761-767.
- Laezza F, Doherty JJ, Dingledine R. (1999). Long-term depression in hippocampal interneurons: joint requirement for pre- and postsynaptic events. *Science.* **285**: 1411-1414.
- Lemieux M, Labrecque S, Tardif C, Labrie-Dion E, Lebel E, De Koninck P. (2012). Translocation of CaMKII to dendritic microtubules supports the plasticity of local synapses. *J. Cell Biol.* **198**: 1055-1073.
- Lan JY, Skeberdis VA, Jover T, Grooms SY, Lin Y, Araneda RC, Zheng X, Bennett MV, Zukin RS. (2001). Protein kinase C modulates NMDA receptor trafficking and gating. *Nat. Neurosci.* **4**: 382-390.
- Lau G, Zukin S. (2007). NMDA receptor trafficking in synaptic plasticity and neuropsychiatric disorders. *Nature Rev.* **4**: 414-426.
- Launey T, Endo S, Sakai R, Harano J, Ito M. (2004). Protein phosphatase 2A inhibition induces cerebellar long-term depression and declustering of synaptic AMPA receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**: 676-681.
- Lauritzen I, Zanzouri M, Honoré E, Duprat F, Ehrengruber MU, Lazdunski M, Patel AJ. (2002). K⁺-dependent cerebellar granule neuron apoptosis. Role of task leak K⁺ channels. *J. Biol. Chem.* **278**: 32068-32076.
- Lee HK. (2012). Ca²⁺-permeable AMPA receptors in homeostatic synaptic plasticity. *Front Mol Neurosci.* **5**: 17.
- Lei S, McBain CJ. (2002). Distinct NMDA receptors provide differential modes of transmission at mossy fiber-interneuron synapses. *Neuron.* **33**: 921-933.
- Leinders-Zufall T, Rand MN, Shepherd GM, Greer CA, Zufall F. (1997). Calcium entry through cyclic nucleotide-gated channels in individual cilia of olfactory receptor cells: spatiotemporal dynamics. *J Neurosci.* **17**: 4136-4148.

- Leipovre M, Fieschi F, Coves J, Thelander L, Fontecave M. (1991). Inactivation of ribonucleotide reductase by nitric oxide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **179**: 442-448.
- L'Etoile ND, Coburn CM, Eastham J, Kistler A, Gallegos G, Bargmann CI. (2002). The cyclic GMP-dependent protein kinase EGL-4 regulates olfactory adaptation in *C. elegans*. *Neuron*. **36**: 1079-1089.
- Lev-Ram V, Jiang T, Wood J, Lawrence DS, Tsien RY. (1995). Synergies and coincidence requirements between NO, cGMP and Ca²⁺ in the induction of cerebellar long term depression. *Neuron*. **18**: 1025-1038.
- Lev-Ram V, Metha SB, Kleinfeld D, Tsien RY. (2003). Reversing cerebellar long-term depression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**: 15989-15993.
- Li M, Wang L, Peng Y, Wang JC, Zhou LH. (2010). Knockdown of the neuronal nitric oxide synthase gene retard the development of the cerebellargranule neurons in vitro. *Dev. Dyn.* **239**: 474-481.
- Lin Y, Jover-Mengual T, Wong J, Bennett MVL, Zukin RS. (2006). PSD-95 and PKC converge in regulating NMDA receptor trafficking and gating. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. **103**: 19902-19907.
- Lindskog M, Li L, Groth RD, Poburko D, Thiagarajan TC, Han X, Tsien RW. (2010). Postsynaptic GluA1 enables acute retrograde enhancement of presynaptic function to coordinate adaptation to synaptic inactivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **07**: 21806-21811.
- Lisman J, Schulman H, and Cline H. (2002). The molecular bases of CaMKII function in synaptic and behavioural memory. *Nat. Rev. Neurosci.* **3**: 175-190.
- Lisman J, Yasuda R, Raghavachari S. (2012). Mechanisms of CaMKII action in long-term potentiation. *Nat. Rev. Neurosci.* **13**: 169-182.
- Lissin DV, Gomperts SN, Carroll RC, Christine CW, Kalman D, Kitamura M, Hardy S, Nicoll RA, Malenka RC, von Zastrow M. (1998). Activity differentially regulates the surface expression of synaptic AMPA and NMDA glutamate receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**: 7097-7102.
- Liu SJ, Cull-Candy SG. (2002). Activity-dependent change in AMPA receptor properties in cerebellar stellate cells. *J. Neurosci.* **22**: 3881-3889.

- Liu SJ, Cull-Candy SG. (2005). Subunit interaction with PICK and GRIP controls Ca^{2+} permeability of AMPARs at cerebellar synapses. *Nat. Neurosci.* **8**: 768-775.
- Liu SQ and Zukin RS. (2007). Calcium permeable AMPA receptors in synaptic plasticity and neuronal death. *Trends Neurosci.* **30**: 126-134.
- Liu SQ, Cull-Candy SG. (2000). Synaptic activity at calcium-permeable AMPA receptors induces a switch in receptor subtype. *Nature.* **405**: 454-458.
- Lledo PM, Hjelmstad GO, Mukherji S, Soderling TR, Malenka RC, Nicoll RA. (1995). Calcium/calmodulin-dependent kinase II and long-term potentiation enhance synaptic transmission by the same mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**: 11175-11179.
- Llinás R, Sugimori M, Lin JW, Cherksey B. (1989). Blocking and isolation of a calcium channel from neurons in mammals and cephalopods utilizing a toxin fraction (FTX) from funnel-web spider poison. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **86**: 1689-1693.
- Longone P, Impagnatiello F, Mienville JM, Costa E, Guidotti A. (1998). Changes in AMPA receptor-spliced variant expression and shift in AMPA receptor spontaneous desensitization pharmacology during cerebellar granule cell maturation in vitro. *J. Mol. Neurosci.* **11**: 23-41.
- Lopez-Jiménez ME, Bartolomé-Martin D, Sánchez-Prieto J, Torres M. (2009). Suppression of guanylyl cyclase ($\beta 1$ subunit) expression impairs neurite outgrowth and synapse maturation in cultured cerebellar granule cells. *Cell Death and Differentiation.* **16**: 1266-1278.
- López-Jiménez ME, González JC, Lizasoain I, Sánchez-Prieto J, Hernández-Guijo JM, Torres M. (2012). Functional cGMP-gated channels in cerebellar granule cells. *J. Cell Physiol.* **227**: 2252-2263.
- Lowe DG, Chang MS, Hellmiss R, Chen E, Singh S, Garbers DL, Goeddel DV. (1989). Human atrial natriuretic peptide receptor defines a new paradigm for second messenger signal transduction. *EMBO J.* **8**: 1377-84.
- Lu W, Ziff EB. (2005). PICK1 interacts with ABP/GRIP to regulate AMPA receptor trafficking. *Neuron.* **47**: 407-421.

- Lu W, Shi Y, Jackson AC, Bjorgan K, During MJ, Sprengel R, Seeburg PH, Nicoll RA. (2009). Subunit composition of synaptic AMP receptors revealed by a single-cell genetic approach. *Neuron*. **62**: 254-268.
- Lu YF, Kandel ER, Hawkins RD. (1999). Nitric oxide signaling contributes to late-phase LTP and CREB phosphorylation in the hippocampus. *J. Neurosci*. **19**: 10250-10261.
- Lüscher C, Malenka RC. (2011). Drug-evoked synaptic plasticity in addiction: from molecular changes to circuit remodeling. *Neuron*. **69**: 650-663.
- Luo CX, Jin X, Cao CC, Zhu MM, Wang B, Chang L, Zhou QG, Wu HY, Zhu DY. (2010). Bidirectional regulation of neurogenesis by neuronal nitric oxide synthase derived from neurons and neural stem cells. *Stem Cells*. **28**: 2041-2052.
- Maffei A, Prestori F, Shibuki K, Rossi P, Taglietti V, D'Angelo E. (2003). NO enhances presynaptic currents during cerebellar mossy fiber-granule cell LTP. *J. Neurophysiol*. **90**: 2478-2483.
- Mahanty NK, Sah P. (1998). Calcium-permeable AMPA receptor mediate long-term potentiation in interneurons in the amygdala. *Nature*. **394**: 683-687.
- Makino Y, Johnson RC, Yu Y, Takamiya K, Huganir RL. (2011). Enhanced synaptic plasticity in mice with phosphomimetic mutation of the GluA1 AMPA receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*. **108**: 8450-8455.
- Malenka RC, Nicoll RA (1999). Long-term potentiation-a decade of progress? *Science*. **285**: 1870-1874.
- Malenka RC, Bear MF. (2004). LTP and LTD: An embarrassment of riches. *Neuron*. **44**: 5-21.
- Malenka RC, Madison DV, Nicoll RA. (1986). Potentiation of synaptic transmission in the hippocampus by phorbol esters. *Nature*. **8-14**: 175-177.
- Malinow R, Malenka RC. (2002). AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity. *Annu. Rev. Neurosci*. **25**: 103-126.
- Malinow R, Mainen ZF, Hayashi Y. (2000). LTP mechanisms: From silence to four-lane traffic. *Curr. Opin. Neurobiol*. **10**: 352-357.

- Mammen AL, Kameyama K, Roche KW, Huganir RL. (1997). Phosphorylation of the alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid receptor GluR1 subunit by calcium/calmodulin-dependent kinase II. *J. Biol. Chem.* **272**: 32528-32533.
- Man HY, Sekine-Aizawa Y, Huganir RL. (2007). Regulation of AMPA receptor traffic through PKA phosphorylation of the Glu receptor 1 subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**: 3579-3784.
- Marchesi A, Mazzolini M, Torre V. (2012). A ring of Threonines in the inner vestibule of the pore of CNGA1 channels constitutes a binding site for permeating ions. *J Physiol.* (in press).
- Marchetti C, Amico C, Usai C. (1995). Functional characterization of the effect of nimodipine on the calcium current in rat cerebellar granule cells. *J Neurophysiol.* **73**: 1169-1180.
- Marie H, Morishita W, Yu X, Calakos N, Malenka RC. (2005). Generation of silent synapses by acute in vivo expression of CaMKIV and CREB. *Neuron.* **45**: 741-752.
- Matsuda S, Launey T, Mikawa S, Hirai H. (2000). Disruption of AMPA receptor GluR2 clusters following long-term depression induction in cerebellar Purkinje neurons. *EMBO J.* **19**: 2765-2774.
- Matulef K, Zagotta WN. (2003). Cyclic nucleotide-gated ion channels. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* **19**: 23-44.
- Matute C, Domercq M, Sanchez-Gomez MV. (2006). Glutamate mediated glial injury mechanisms and clinical importance. *Glia.* **53**: 212-224.
- Maurice DH. (2005). Cyclic nucleotide phosphodiesterase-mediated integration of cGMP and cAMP signaling in cells of the cardiovascular system. *Front. Biosci.* **10**: 1221-1228.
- McAllister-Lucas LM, Haik TL, Colbran JL, Sonnenburg WK, Seger D, Turko IV, Beavo JA, Francis SH, Corbin JD. (1995). An essential aspartic acid at each of two allosteric cGMP-binding sites of a cGMP-specific phosphodiesterase. *J. Biol. Chem.* **270**: 30671-30679.
- McAllister-Lucas LM, Sonnenburg WK, Kadlecsek A, Seger D, Trong HL, Colbran JL, Thomas MK, Walsh KA, Francis SH, Corbin JD, Beavo J. (1993). The structure of a bovine lung cGMP-binding, cGMP-specific phosphodiesterase deduced from a cDNA clone. *J. Biol. Chem.* **268**: 22863-22873.

- McGlade-McCulloh E., Yamamoto H, Tan SE, Brickey DA, Soderling DR. (1993). Phosphorylation and regulation of glutamate receptors by calcium/calmodulin dependent protein kinase II. *Nature*. **362**: 640–642.
- McKernan MG, Shinnick-Gallagher P. (1997). Fear conditioning induces a lasting potentiation of synaptic currents in vitro. *Nature*. **390**: 607-611.
- Mellor JR, Merlo D, Jones A, Wisden W, Randall AD (1998). Mouse cerebellar granule cell differentiation: electrical activity regulates the GABAA receptor alpha 6 subunit gene. *J. of Neurosci*. **15**: 2822-2833.
- Meriney SD, Gray DB, Pilar GR. (1994). Somatostatin-induced inhibition of neuronal Ca^{2+} current modulated by cGMP-dependent protein kinase. *Nature*. **369**: 336-339. Erratum in: **371**: 812.
- Micheva KD, Buchanan J, Holz RW, Smith SJ. (2003). Retrograde regulation of synaptic vesicle endocytosis and recycling. *Nat. Neurosci*. **6**: 925-932.
- Minc-Golomb D, Schwartz JP. (1994). Expression of both constitutive and inducible nitric oxide synthases in neuronal and astrocyte cultures. *An. N. Y. Acad. Sci*. **738**: 462-467.
- Mogensen HS, Jorgensen OS. (2000). AMPA receptor subunit mRNAs and intracellular $[\text{Ca}^{2+}]$ in cultured mouse and rat cerebellar granule cells. *Int. J. Dev. Neurosci*. **18**: 61-68.
- Moncada S, Rees DD, Schulz R, Palmer RMJ. (1991). Development and mechanism of a specific supersensitivity to nitric oxide donors after inhibition of vascular nitric oxide synthesis in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*. **88**: 2166-2170.
- Monfort P, Muñoz MD, Kosenko EE, Felipe V. (2002). Long-term potentiation in hippocampus involves sequential activation of soluble guanylate cyclase, cGMP-dependent protein kinase, and cGMP-degrading phosphodiesterase. *J. Neurosci*. **22**: 10116-10122.
- Monyer H, Seeburg PH, Wisden W. (1991). Glutamate-operated channels: developmentally early and mature forms arise by alternative splicing. *Neuron* **6**: 799–810.
- Moulder KL, Cormier RJ, Shute AA, Zorumski CF, Mennerick S. (2003). Homeostatic effects of depolarization on Ca^{2+} influx, synaptic signaling, and survival, *J. Neurosci*. **23**: 1825–1831.

- Müller D, Hida B, Guidone G, Speth RC, Michurina TV, Enikolopov G, Middendorff R. (2009). Expression of guanylyl cyclase (GC)-A and GC-B during brain development: evidence for a role of GC-B in perinatal neurogenesis. *Endocrinology*. **150**: 5520-5529.
- Müller D, Hildebrand M, Lübberstedt J, Kuhn M, Middendorff R. (2010). The membrane receptors guanylyl cyclase-A and -B undergo distinctive changes in post-translational modification during brain development. *J. Neurochem*. **115**: 1024-1034.
- Munzel T, Feil R, Mulsch A, Lohmann SM, Hofmann F, Walter U. (2003). Physiology and pathophysiology of vascular signaling controlled by guanosine -cyclic monophosphate-dependent protein kinase. *Circulation*. **108**: 2172-2183.
- Murthy VN, Schikorski T, Stevens CF, Zhu Y. (2001). Inactivity produces increases in neurotransmitter release and synapse size. *Neuron*. **32**: 673-682.
- Nache V, Zimmer T, Wongsamitkul N, Schmauder R, Kusch J, Reinhardt L, Bönigk W, Seifert R, Biskup C, Schwede F, Benndorf K. (2012). CNGA4 and CNGB1b Subunits in Olfactory Cyclic Nucleotide-Gated Channels. *Sci. Signal*. **10**: 5.
- Nakamura Y, Okuno S, Sato F, Fujisawa H. (1995). An immunohistochemical study of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase IV in the rat central nervous system: light and electron microscopic observations. *Neuroscience*. **68**: 181-194.
- Nawy S, Jahr CE. (1990). Suppression by glutamate of cGMP-activated conductance in retinal bipolar cells. *Nature*. **346**: 269-271.
- Newcomb R, Szoke B, Palma A, Wang G, Chen X, Hopkins W, Cong R, Miller J, Urge L, Tarczy-Hornoch K, Loo JA, Dooley DJ, Nadasdi L, Tsien RW, Lemos J, Miljanich G. . (1998). Selective peptide antagonist of the class E calcium channel from the venom of the tarantula *Hysterocrates gigas*. *Biochemistry*. **37**: 15353-15362.
- Newpher TM, Ehlers MD. (2008). Glutamate receptor dynamics in dendritic microdomains. *Neuron*. **58**: 472-497.
- Nguyen T, Brunson D, Crespi CL, Penman BW, Wishnok JS, Tannenbaum SR. (1992). DNA damage and mutation in human cells exposed to nitric oxide in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**: 3030-3034.

- Nishimune A, Isaac JT, Molnar E, Noel J, Nash SR, Tagaya M, Collingridge GL, Nakanishi S, and Henley JM. (1998). NSF binding to GluR2 regulates synaptic transmission. *Neuron*. **21**: 87-97.
- Noh KM, Yokota H, Mashiko T, Castillo PE, Zukin RS, Bennett MV. (2005). Blockade of calcium-permeable AMPA receptors protects hippocampal neurons against global ischemia-induced death. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**: 12230-12235.
- Nong Y, Huang YQ, Ju W, Kalia LV, Ahmadian G, Wang YT, Salter MW. (2003). Glycine binding primes NMDA receptor internalization. *Nature*. **422**: 302-307.
- O'Brien RJ, Kamboj S, Ehlers MD, Rosen KR, Fischbach GD, Huganir RL. (1998). Activity-dependent modulation of synaptic AMPA receptor accumulation. *Neuron*. **21**: 1067-1078.
- O'Dell TJ, Huang PL, Dawson TM, Dinerman JL, Snyder SH, Kandel ER, Fishman MC. (1994). Endothelial NOS and the blockade of LTP by NOS inhibitors in mice lacking neuronal NOS. *Science*. **265**: 542-546.
- Oh MC, Derkach VA, Guire ES, Soderling TR. (2006). Extrasynaptic membrane trafficking regulated by GluR1 serine 845 phosphorylation primes AMPA receptors for long term potentiation. *J. Biol. Chem.* **281**: 752-758.
- Olivera BM, Gray WR, Zeikus R, McIntosh JM, River J, Santos V, Cruz LL. (1985). Peptides neurotoxins from fish-hunting cone snails. *Science*. **230**: 1338-1343.
- Olverman HJ, Jones AW, Watkins JC. (1984). L-glutamate has higher affinity than other amino acids for [3H]-D-AP5 binding sites in rat brain membranes. *Nature*. **307**: 460-462.
- Opazo P, Labrecque S, Tigaret CM, Frouin A, Wiseman PW, De Koninck P, Choquet D. (2010). CaMKII triggers the diffusional trapping of surface AMPARs through phosphorylation of stargazin. *Neuron*. **67**: 239-252.
- Osten P, Srivastava S, Inman GJ, Vilim FS, Khatr L, Lee LM, States BA, Einheber S, Milner TA, Hanson PI, Ziff EB. (1998). The AMPA receptor GluR2 C terminus can mediate a reversible, ATP-dependent interaction with NSF and α and β SNAPs. *Neuron*. **21**: 99-110.

- Paoletti P, Neyton J. (2007). NMDA receptor subunits: function and pharmacology. *Curr. Opin. Pharmacol.* **7**: 39–47.
- Passafaro M, Nakagawa T, Sala C, Sheng M. (2002). Induction of dendritic spines by an extracellular domain of AMPA receptor subunit GluR. *Nature*. **424**: 677-681.
- Passafaro M, Piech V, Sheng M. (2001). Subunit-specific temporal and spatial patterns of AMPA receptor exocytosis in hippocampal neurons. *Nat. Neurosci.* **4**: 917–926.
- Paul C, Schöberl F, Weinmeister P, Micale V, Wotjak CT, Hofmann F, Kleppisch T. (2008). Signaling through cGMP-dependent protein kinase I in the amygdala is critical for auditory-cued fear memory and long-term potentiation. *J. Neurosci.* **28**: 14202-14212.
- Pellegrini-Giampietro DE, Bennett MV, Zukin RS. (1992). Are Ca(2+)-permeable kainate/AMPA receptors more abundant in immature brain? *Neurosc. Lett.* **144**: 65-69.
- Peng PL, Zhong X, Tu W, Soundarapandian MM, Molner P, Zhu D, Lau L, Liu S, Liu F, Lu Y. (2006). ADAR2-dependent RNA editing of AMPA receptor subunit GluR2 determines vulnerability of neurons in forebrain ischemia. *Neuron*. **49**: 719-733.
- Peña-Altamira E, Petazzi P, Contestabile A. (2010). Nitric oxide control of proliferation in Panerve cells and in tumor cells of nervous origin. *Curr. Pharmaceut. Des.* **16**: 440–450.
- Perez JL, Khatri L, Chang C, Srivastava S, Osten P, Ziff EB. (2001). PICK1 targets activated protein kinase C_α to AMPA receptor clusters in spines of hippocampal neurons and reduces surface levels of the AMPA type glutamate receptor subunit 2. *J. Neurosci.* **21**: 5417–5428.
- Pettit DL, Perlman S, Malinow R. (1994). Potentiated transmission and prevention of further LTP by increased CaMKII activity in postsynaptic hippocampal slice neurons. *Science*. **266**: 1881-1885.
- Peunova N, Enikolopov G. (1995). Nitric oxide triggers a switch to growth arrest during differentiation of neuronal cells. *Nature*. **375**: 68–73.
- Pfeifer A, Aszódi A, Seidler U, Ruth P, Hofmann F, Fässler R. (1996). Intestinal secretory defects and dwarfism in mice lacking cGMP-dependent protein kinase II. *Science*. **27**: 2082-2086.
- Pilz RB, Broderick KE. (2005). Role of cyclic GMP in gene regulation. *Front Biosci.* **10**: 1239-1268.

- Pineda J, Kogan JH, Aghajanian GK. (1996). Nitric oxide and carbon monoxide activate locus coeruleus neurons through a cGMP-dependent protein kinase: involvement of a nonselective cationic channel. *J. Neurosci.* **16**: 1389-1399.
- Piven J, Saliba K, Bailey J, Arndt S (1997). An MRI study of autism: the cerebellum revised. *Neurology.* **49**: 546-551.
- Plant K, Pelkey KA, Bortolotto ZA, Morita D, Terashima A, McBain CJ, Collingridge GL, Isaac JT. (2008). Transient incorporation of native GluR2-lacking AMPA receptors during hippocampal long-term potentiation. *Nat. Neurosci.* **9**: 602-604.
- Pollard H, Héron A, Moreau J, Ben-Ari Y, Khrestchatisky M. (1993). Alterations of the GluR-B AMPA receptor subunit flip/flop expression in kainate-induced epilepsy and ischemia. *Neuroscience.* **57**: 545-554.
- Potter LR. (2011). Guanylyl cyclase structure, function and regulation. *Cell Signal.* **23**: 1921-1926.
- Prybylowski K, Chang K, Sans N, Kan L, Vicini S, Wenthold RJ. (2005). The synaptic localization of NR2B-containing NMDA receptors is controlled by interactions with PDZ proteins and AP-2. *Neuron.* **47**: 845-857.
- Puzzo D., Sapienza S, Arancio, O, Palmeri A. (2008). Role of phosphodiesterase 5, in synaptic plasticity and memory. *Neuropsychiatric Disease and Treatment.* **4**: 371-387.
- Rakic P. (1971). Neuron-glia relationship during granule cell migration in developing cerebellar cortex. A Golgi and electronmicroscopic study in Macacus Rhesus. *J. Comp. Neurol.* **141**: 283-312.
- Ramon y Cajal S. (1911). Histology du system nerveux de l'homme et vertebres vol.2.
- Randall A, Tsien RW. (1995). Pharmacological dissection of multiple types of Ca²⁺ channel currents in rat cerebellar granule neurons. *The Journal of Neuroscience.* **15**: 2995-3012.
- Raymond LA, Blackstone CD, Huganir RL. (1993). Phosphorylation of amino acid neurotransmitter receptors in synaptic plasticity. *Trends Neurosci.* **16**: 147-153.
- Reiersen GW, Guo S, Mastronardi C, Licinio J, Wong ML. (2011). cGMP Signaling, Phosphodiesterases and Major Depressive Disorder. *Curr. Neuropsychopharmacol.* **9**: 715-727.

- Reneerkens OA, Rutten K, Akkerman S, Blokland A, Shaffer CL, Menniti FS, Steinbusch HW, Prickaerts J. (2012). Phosphodiesterase type 5 (PDE5) inhibition improves object recognition memory: indications for central and peripheral mechanisms. *Neurobiol. Learn. Mem.* **97**: 370-379.
- Resink A, Villa M, Benke D, Mohler H, Balázs R. (1995). Regulation of the expression of NMDA receptor subunits in rat cerebellar granule cells: effect of chronic K⁺-induced depolarization and NMDA exposure. *J. Neurochem.* **64**: 558-565.
- Reynolds T, Hartell NA. (2001). Roles for nitric oxide and arachidonic acid in the induction of heterosynaptic cerebellar LTD. *Neuroreport.* **12**: 133-136.
- Roche KW, O'Brien RJ, Mammen AL, Bernhardt J, Huganir RL. (1996). Characterization of multiple phosphorylation sites on the AMPA receptor GluR1 subunit. *Neuron.* **16**: 1179-1788.
- Rodrigo J, Alonso D, Fernandez AP, Serrano J, Richart A, Lopez JC, Santacana M, Martínez-Murillo R, Bentura ML, Ghiglione M, Uttenthal LO. (2001). Neuronal and inducible nitric oxide synthase expression and protein nitration in rat cerebellum after oxygen and glucose deprivation. *Brain Res.* **909**: 20-45.
- Rogan MT, Stäubli UV, LeDoux JE. (1997). Fear conditioning induces associative long-term potentiation in the amygdala. *Nature.* **390**: 604-607.
- Rosenmund C, Carr DW, Bergeson SE, Nilaver G, Scott JD, Westbrook GL. (1994). Anchoring of protein kinase A is required for modulation of AMPA/kainate receptors on hippocampal neurons. *Nature.* **368**: 853-856.
- Rossi DJ, Slater NT. (1993). The developmental onset of NMDA receptor channel activity during neuronal migration. *Neuropharmacology.* **32**: 1239-1248.
- Rozov A, Sprengel R, Seeburg PH. (2012). GluA2-lacking AMPA receptors in hippocampal CA1 cell synapses: evidence from gene-targeted mice. *Front. Mol. Neurosci.* **5**:22.
- Russwurm M, Wittau N, Koesling D. (2001). Guanylyl cyclase/PSD-95 interaction: targeting of the nitric oxide-sensitive $\alpha 2\beta 1$ guanylyl cyclase to synaptic membranes. *J. Biol. Chem.* **276**: 44647-44652.

- Russwurm M, Koesling D. (2004). NO activation of guanylyl cyclase. *EMBO J.* **23**: 4443-4450.
- Ryder EF, Cepko CL. (1994). Migration patterns of clonally related granule cells and their progenitors in the developing chick cerebellum. *Neuron.* **12**: 1011-1028.
- Sans NA, Montcouquiol ME, Raymond J. (2000). Postnatal developmental changes in AMPA and NMDA receptors in the rat vestibular nuclei. *Brain Res. Dev. Brain. Res.* **123**: 41-52.
- Sanhueza M, McIntyre CC, Lisman JE. (2007). Reversal of synaptic memory by Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II inhibitor. *J. Neurosci.* **27**: 5190-5199.
- Schmidt HHW, Lohmann SM, Walter U. (1993). The nitric oxide and cGMP signal transduction system: regulation and mechanism of action. *Bioch. Et Bioph. Acta.* **1178**: 153-175.
- Schuman EM, Madison DV. (1991). A requirement for the intercellular messenger nitric oxide in long-term potentiation. *Science.* **254**: 1503-1506.
- Scott DB, Blanpied TA, Ehlers MD. (2003). Coordinated PKA and PKC phosphorylation suppresses RXR-mediated ER retention and regulates the surface delivery of NMDA receptors. *Neuropharmacology.* **45**: 755-767.
- Scott DB, Blanpied TA, Swanson GT, Zhang C, Ehlers MD. (2001). An NMDA receptor ER retention signal regulated by phosphorylation and alternative splicing. *J. Neurosci.* **21**: 3063-3072.
- See V, Boutillier AR, Bito H, Loefer JP. (2001). Calcium/calmodulin dependent protein kinase IV (CaMKIV) inhibits apoptosis induced by potassium deprivation in cerebellar granule neurons. *FASEB J.* **15**: 134-144.
- Seeburg PH. (1996). The role of RNA editing in controlling glutamate receptor channel properties. *J Neurochem.* **66**: 1-5.
- Serulle Y, Zhang S, Ninan I, Puzzo D, McCarthy M, Khatri L, Arancio O, Ziff EB. (2007). A GluR1-cGKII interaction regulates AMPA receptor trafficking. *Neuron.* **56**: 670-688.

- Setou M, Seog DH, Tanaka Y, Kanai Y, Takei Y, Kawagishi M and Hirokawa N. (2002). Glutamate receptor- interacting protein GRIP1 directly steers kinesin to dendrites. *Nature*. **417**: 83–87.
- Shen L, Liang F, Walensky LD, Huganir RL. (2000). Regulation of AMPA receptor GluR1 subunit surface expression by a 4.1N-linked actin cytoskeletal association. *J. Neurosci*. **20**: 7932–7940.
- Sheng M, Pak DT. (2000). Ligand-gated ion channel interactions with cytoskeletal and signalling proteins. *Annu. Rev. Physiol*. **62**: 755-778.
- Shi Y, Lu W, Milstein AD, Nicoll RA. (2011). The stoichiometry of AMPA receptors and TARPs varies by neuronal cell type. *Neuron*. **62**: 633-640.
- Shibuki K, Kimura S. (1997). Dynamic properties of nitric oxide release from parallel fibres in rat cerebellar slices. *J. Physiol*. **498**: 443– 452.
- Sierksma AS, Rutten K, Sydlík S, Rostamian S, Steinbusch HW, van den Hove DL, Prickaerts J. (2012). Chronic phosphodiesterase type 2 inhibition improves memory in the APPswe/PS1dE9 mouse model of Alzheimer's disease. *Neuropharmacology*. (In press).
- Smeyne RJ, Chu T, Lewin A, Bian F, S-Crisman S, Kunsch C, Lira SA, Oberdick J. (1995). Local control of granule cell generation by cerebellar Purkinje cells. *Mol. Cell. Neurosci*. **6**: 230-251.
- Snutch TP, Peloquin JB, Mathews E, and McRory JE. (2005). Molecular properties of voltage-gated calcium channels, in Voltage-Gated Calcium Channels (Zamponi GW ed) vol 1, pp 61–94, Georgetown, TX, Landes Bioscience.
- Sommer B, Keinänen K, Verdoorn TA, Wisden W, Burnashev N, Herb A, Köhler M, Takagi T, Sakmann B, Seeburg PH. (1990). Flip and flop: a cell-specific functional switch in glutamate-operated channels of the CNS. *Science*. **249**: 1580–1585.
- Sommer B, Kohler M, Sprengel R, and Seeburg PH. (1991). RNA editing in brain controls a determinant of ion flow in glutamate-gated channels. *Cell*. **67**: 11–19.
- Sossa KG, Beattie JB, Carroll RC. (2005). AMPAR exocytosis through NO modulation of PICK1. *Neuropharmacology*. **53**: 92-100.

- Stefansson H, Sigurdsson E, Steinthorsdottir V, Bjornsdottir S, Sigmundsson T, Ghosh S, Brynjolfsson J, Gunnarsdottir S, Ivarsson O, et al. (2002). Neuregulin 1 and susceptibility to schizophrenia. *Am. J. Hum. Genet.* **71**: 877–892.
- Steinberg JP, Huganir RL, Linden DJ. (2004). N-ethylmaleimide-sensitive factor is required for the synaptic incorporation and removal of AMPA receptors during cerebellar long-term depression. *PNAS.* **52**: 18212–18216.
- Steinert JR, Kopp-Scheinflug C, Baker C, Challiss RA, Mistry R, Haustein MD, Griffin SJ, Tong H, Graham BP, Forsythe ID. (2008). Nitric oxide is a volume transmitter regulating postsynaptic excitability at a glutamatergic synapse. *Neuron.* **60**: 642–656.
- Shepherd JD, Huganir RL. (2007). The cell biology of synaptic plasticity: AMPA receptor trafficking. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* **23**: 613–43.
- Strijbos PJ, Pratt GD, Khan S, Charles IG, Garthwaite J. (1999). Molecular characterization and in situ localization of a full-length cyclic nucleotide-gated channel in rat brain. *Eur. J. Neurosci.* **11**: 4463–4467.
- Su F, Huang H, Akieda K, Occhipinti G, Donadello K, Piagnerelli M, De Backer D, Vincent JL. (2010). Effects of a selective iNOS inhibitor versus norepinephrine in the treatment of septic shock. *Shock.* **34**: 243–249.
- Suarez I, Bodega G, Rubio M, Felipe V, Fernandez B. (2005). Neuronal and inducible nitric oxide synthase expression in the rat cerebellum following portacaval anastomosis. *Brain Res.* **1047**: 205–213.
- Sun X, Zhao Y, Wolf ME. (2005). Dopamine receptor stimulation modulates AMPA receptor synaptic insertion in prefrontal cortex neurons. *J. Neurosci.* **25**: 7342–7351.
- Sunico CR, Portillo F, González-Forero D, Moreno-López B. (2005). Nitric-oxide-directed synaptic remodeling in the adult mammal CNS. *J. Neurosci.* **26**: 1448–1458.
- Sutton MA, Ito HT, Cressy P, Kempf C, Woo JC, and Schuman EM. (2006). Miniature neurotransmission stabilizes synaptic function via tonic suppression of local dendritic protein synthesis. *Cell.* **125**: 785–799.
- Swope SL, Moss SJ, Raymond LA, Huganir RL. (1999) Regulation of ligand-gated ion channels by protein phosphorylation. *Adv. Sec. Mess. Phosph. Res.* **33**: 49–78.

- Taqatqeh F, Mergia E, Neitz A, Eysel UT, Koesling D, Mittmann T. (2009). More than a retrograde messenger: nitric oxide needs two cGMP pathways to induce hippocampal long-term potentiation. *J. Neurosci.* **29**: 9344-9350.
- Takita M, Kaneko H, Suzuki SS, Akamatsu M. (1997). Lasting effect of NO on glutamate release in rat striatum revealed by continuous brain dialysis. *Neuroreport.* **8**: 567-570.
- Tanabe T, Takeshima H, Mikami A, Flockerzi V, Takahashi H, Kangawa K, Kojima M, Matsuo H, Hirose T, Numa S. (1987). Primary structure of the receptor for calcium channel blockers from skeletal muscle. *Nature* **328**: 313-331.
- Tanaka H, Grooms SY, Bennett MV, Zukin RS. (2000). The AMPAR subunit GluR2: still front and center-stage. *Brain Res.* **886**: 190-207.
- Tegenge MA, Bicker G. (2009). Nitric oxide and cGMP signal transduction positively regulates the motility of human neuronal precursor (NT2) cells. *J. Neurochem.* **110**: 1828-1841.
- Thiagarajan TC, Lindskog M, Tsien RW. (2005). Adaptation to synaptic inactivity in hippocampal neurons. *Neuron.* **47**: 725-737.
- Tomiyam M, Rodriguez-Puertas R, Cortes R, Pazos A, Palacios JM, Mengod G. (2002) Flip and flop splice variants of AMPA receptor subunits in the spinal cord of amyotrophic lateral sclerosis. *Synapse.* **45**: 245-249.
- Tomita S, Stein V, Stocker TJ, Nicoll RA, Brecht DS. (2005). Bidirectional synaptic plasticity regulated by phosphorylation of stargazin-like TARPs. *Neuron.* **45**: 269-277.
- Tovar KR, Westbrook GL. (2002). Mobile NMDA receptors at hippocampal synapses. *Neuron.* **34**: 255-264.
- Traynelis SF, Wollmuth LP, McBain CJ, Menniti FS, Vance KM, Ogden KK, Hansen KB, Yuan H, Myers SJ, Dingledine R. (2010). Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. *Pharmacol. Rev.* **62**: 405-496.
- Tsien RW, Lipscombe D, Madison DV, Bley KR, and Fox AP. (1988). Multiple types of neuronal calcium channels and their selective modulation. *Trends Neurosci.* **11**: 431-438.

- Turrigiano GG, Nelson SB. (2000). Hebb and homeostasis in neuronal plasticity. *Curr. Opin. Neurobiol.* **10**: 358–364.
- Turrigiano GG, Leslie KR, Desai NS, Rutherford LC, Nelson SB. (1998). Activity-dependent scaling of quantal amplitude in neocortical neurons. *Nature.* **391**: 892-896.
- Turrigiano GG, Nelson SB. (2004). Homeostatic plasticity in the developing nervous system. *Nat. Rev. Neurosci.* **5**: 97-107.
- Ungless MA, Whistler JL, Malenka RC, Bonci A. (2001). Single cocaine exposure in vivo induces long-term potentiation in dopamine neurons. *Nature.* **411**: 583-587.
- Usai C, Barberis A, Moccagatta L, Marchetti C. (1999). Pathways of cadmium influx in mammalian neurons. *J. Neurochem.* **72**: 2154-2161.
- Van Staveren WC, Steinbusch HW, Markerink-Van Ittersum M, Repaske DR., Goy MF, Kotera J, Omori K, Beavo JA, De Vente J. (2004). mRNA expression patterns of the cGMP hydrolyzing phosphodiesterases types 2, 5, and 9 during development of the rat brain. *J. Comp. Neurol.* **467**: 566-580.
- Viani P, Giussani P, Riboni L, Bassi R, Tettamanti G. (1997). Behaviour of nitric oxide synthase in rat cerebellar granule cells differentiating culture. *FEBS Lett.* **408**: 131-134.
- Villalobo A. (2006). Nitric oxide and cell proliferation. *FEBS J.* **273**: 2329–2344.
- Virgili M, Facchinetti F, Sparapani M, Tregnago M, Lucchi R, Dall’Olio R, Gandolfi O, Contestabile A. (1998). Neuronal nitric oxide synthase is permanently decreased in the cerebellum of rats subjected to chronic neonatal blockade of N-methyl-D-aspartate receptors. *Neuroscience Lett.* **258**: 1-4.
- Vissel B, Krupp JJ, Heinemann SF, Westbrook GLA. (2001). Use-dependent tyrosine dephosphorylation of NMDA receptors is independent of ion flux. *Nat. Neurosci.* **4**: 587–596.
- Von Lewinski F, Keller BU. (2005). Ca²⁺, mitochondria and selective motoneuron vulnerability: implications for ALS. *Trends Neurosci.* **28**: 494-500.

- Waldman R, Bauer S, Göbel C, Hofmann F, Jakobs KH, Walter U. (1986). Demonstration of cGMP-dependent protein kinase and cGMP-dependent phosphorylation in cell free extracts of platelets. *Eur. J. Biochem.* **158**: 203-208.
- Wall ME, Francis SH, Corbin JD, Grimes K, Richie-Jannetta R, Kotera J, Macdonald BA, Gibson RR, Trewhella J. (2003). Mechanisms associated with cGMP binding and activation of cGMP-dependent protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**: 2380-2385.
- Wang J, Gilbert J, Man HY. (2012). AMPA receptor trafficking in homeostatic synaptic plasticity: functional molecules and signalling cascades. *Neural. Plast.* 825364.
- Wang L-Y, Dudek EM, Browning MD, MacDonald JF. (1994). Modulation of AMPA/kainate receptors in cultured murine hippocampal neurones by protein kinase C. *J. Physiol.* **475**: 431-437.
- Wang W, Nakayama T, Inoue N, Kato T. (1998). Quantitative analysis of nitric oxide synthase expressed in developing and differentiating rat cerebellum. *Brain Res. Dev. Brain. Res.* **111**: 65-75.
- Wang H, Liu H, Zhang ZW. (2011). Elimination of redundant synaptic inputs in the absence of synaptic strengthening. *J. Neurosci.* **31**: 16675-16684
- Watanabe M, Nakagawa S, Takayama C, Nagashima M, Inoue K, Ichikawa R, Mishina M and Inouem Y. (1995). Cerebellum of the adult reeler mutant mouse contains two Purkinje cell populations with respect to gene expression for the N- methyl-D-aspartate receptor channel. *Neurosci. Res.* **22**: 335-345.
- Watt AJ, Sjöström PJ, Häusser M, Nelson SB, Turrigiano GG. (2004). A proportional but slower NMDA potentiation follows AMPA potentiation in LTP. *Nat. Neurosci.* **7**: 518-524.
- Wayman GA, Lee YS, Tokumitsu H, Silva AJ, Soderling TR. (2008). Calmodulin-kinases: modulators of neuronal development and plasticity. *Neuron.* **59**: 914-931.
- Weimin P, Zhen H, Congzhou W, Yan H, Jae SP, and Li N. (2009) Flip and Flop: A Molecular Determinant for AMPA Receptor Channel Opening. *Biochemistry.* **48**: 3767-3777.
- Weiss JH. (2011). Ca²⁺ permeable AMPA channels in diseases of the nervous system. *Front. Mol. Neurosci.* **4**: 42.

- Welsh N, Eizirik DL, Bendtzen K, Sandler S. (1991). Interleukin-1 beta induced nitric oxide production in isolated rat pancreatic islets requires gene transcription and may lead to inhibition of the Krebs cycle enzyme aconitase. *Endocrinology*. **129**: 3167-3173.
- Wenthold RJ, Prybylowski K, Standley S, Sans N, Petralia RS. (2003). Trafficking of NMDA receptors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **43**: 335-358.
- Whitney NP, Peng H., Erdmann NB, Tian C, Monaghan DT, Zheng, JC. (2008). Calcium-permeable AMPA receptors containing Q/R-unedited GluR2 direct human neural progenitor cell differentiation to neurons. *FASEB J.* **22**: 2888-2900.
- Wierenga CJ, Ibata K, Turrigiano GG. (2005). Postsynaptic expression of homeostatic plasticity at neocortical synapses. *J. Neurosci.* **25**: 2895-2905.
- Wierenga CJ, Walsh MF, Turrigiano GG. (2006). Temporal regulation of the expression locus of homeostatic plasticity. *J. Neurophysiol.* **96**: 2127-2133.
- Winger JA, Marletta MA. (2005). Expression and characterization of the catalytic domains of soluble guanylate cyclase: interaction with the heme domain. *Biochemistry.* **44**: 4083-4090.
- Wolf E, Wagner JP, Black IB, DiCicco-Bloom E. (1997). Cerebellar granule cells elaborate neuritis before mitosis. *Dev. Brain. Res.* **102**: 305-308.
- Wright A, Vissel B. (2012). The essential role of AMPA receptor GluR2 subunit RNA editing in the normal and diseased brain. *Front. Mol. Neurosci.* **5**: 34.
- Xiao MY, Wasling P, Hanse E, Gustafsson B. (2004). Creation of AMPA-silent synapses in the neonatal hippocampus. *Nat. Neurosci.* **7**: 236-243.
- Yang Y, Wang XB, Frerking M, Zhou Q. (2008). Delivery of AMPA receptors to perisynaptic sites precedes the full expression of long-term potentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**: 11388-11393.
- Yaka R, Thornton C, Vagts AJ, Phamluong K, Bonci A, Ron D. (2002). NMDA receptor function is regulated by the inhibitory scaffolding protein, RACK1. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* **99**: 5710-5715.

- Zabel U, Kleinschnitz C, Oh P, Nedvetsky P, Smolenski A, Muller H, Kronich P, Kugler P, Walter U, Schnitzer JE, Schmidt HH. (2002). Calcium-dependent membrane association sensitizes soluble guanylyl cyclase to nitric oxide. *Nat. Cell Biol.* **4**: 307–311.
- Zaccolo M, Movsesian MA. (2007). cAMP and cGMP signaling crosstalk: role of phosphodiesterases and implications for cardiac pathophysiology. *Circ. Res.* **100**: 1569–1578.
- Zajackowski W, Frankiewicz T, Parsons CG, Danysz W. (1997). Uncompetitive NMDA receptor antagonists attenuate NMDA-induced impairment of passive avoidance learning and LTP. *Neuropharmacology.* **36**: 961–971.
- Zhao J, Peng Y, Xu Z, Chen RQ, Gu QH, Chen Z, Lu W. (2008). Synaptic metaplasticity through NMDA receptor lateral diffusion. *J. Neurosci.* **28**: 3060–3070.
- Zheng X, Zhang L, Wang AP, Bennett MVL, Zukin RS. (1999). Protein kinase C potentiation of N-methyl- D-aspartate receptor activity is not mediated by phosphorylation of N-methyl-D-aspartate receptor subunits. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* **96**: 15262–15267.
- Zheng Z, Sabirzhanov B, Keifer J. (2012). Two-stage AMPA receptor trafficking in classical conditioning and selective role for glutamate receptor subunit 4 (tGluA4) flop splice variant. *J. Neurophysiol.* **108**: 101–111.
- Zhuo M, Hu Y, Schultz C, Kandel ER, Hawkins RD. (1994). Role of guanylyl cyclase and cGMP-dependent protein kinase in long-term potentiation. *Nature.* **368**: 635–639.