

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular IV



TESIS DOCTORAL

**Regulación del ciclo vesicular sináptico por las quinasas dependientes
de GMPc en neuronas grabulares de cerebelo**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

Marina Andrea Collado Alsina

Directora

Magdalena Isabel Torres Molina

Madrid, 2016

Universidad Complutense de Madrid

Facultad de Veterinaria

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular IV



UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE
MADRID

**Regulación del ciclo vesicular sináptico por las
quinasas dependientes de GMPc en neuronas
granulares de cerebelo**

Tesis Doctoral

Marina Andrea Collado Alsina

Madrid, 2015

Universidad Complutense de Madrid

Facultad de Veterinaria

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular IV

**Regulación del ciclo vesicular sináptico por
las quinasas dependientes de GMPc en
neuronas granulares de cerebelo**

**Memoria presentada por Da. Marina Andrea Collado Alsina
para optar al grado de Doctora.**

Directora de Tesis: Magdalena Isabel Torres Molina

Vº Bº Directora

Magdalena Isabel Torres Molina

Este trabajo ha sido realizado en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular IV de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid.

La autora del trabajo lo ha realizado disfrutando de una beca para la Formación de Personal Investigador (FPI) del Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN), BFU2009/07092.

La financiación necesaria para llevar a cabo este trabajo se ha obtenido de los siguientes proyectos:

- MICINN. BFU2009-07092
- MICINN. BFU2012-32105
- S2011/BMD-2349 (Comunidad de Madrid)
- RD06/0026/0001 (Redes. Instituto de Salud Carlos III)
- RD12/0014/0003 (Redes. Instituto de Salud Carlos III)

Índice

ÍNDICE DE FIGURAS	5
ÍNDICE DE TABLAS	7
RESUMEN	9
SUMMARY	11
ABREVIATURAS	13
I - INTRODUCCIÓN.....	19
1. El cerebelo	19
1.1. Estructura del cerebelo	19
1.2 Neuronas granulares del cerebelo.....	21
2. La sinapsis glutamatérgica	22
2.1 La zona activa	24
2.2 El ciclo vesicular	25
2.2.1 Exocitosis	25
2.2.1.1 Fusión de las vesículas dependiente de calcio.....	27
2.2.2 Endocitosis	30
2.2.2.1 Endocitosis mediada por clatrina.....	31
2.2.2.2 Endocitosis masiva	34
2.2.2.3 Endocitosis ultrarrápida.....	37
2.3 Pools vesiculares	38
3. Señalización por NO/GMPc	40
3.1 Óxido nítrico sintasas	41
3.2 Guanilato ciclasa	43
3.3 Sistemas efectores del GMPc.....	45
3.3.1 Canales iónicos	45
3.3.2 Fosfodiesterasas	46
3.3.3 Proteínas quinasas dependientes de GMPc.....	46
3.4 El papel del NO como mensajero retrógrado.....	50

Índice

3.5 Función de la vía NO/cGMP en las células granulares de cerebelo.....	53
II - OBJETIVOS.....	59
III - MATERIALES Y MÉTODOS.....	63
1. Materiales	63
1.1. Material Biológico	63
1.2. Material de cultivo.....	63
1.3. Genotipado.....	64
1.4. Equipos	64
1.4.1. Adquisición de imágenes	64
1.4.2. Detección de proteínas.....	65
1.5. Reactivos y fármacos.....	65
1.5.1 Microscopía Electrónica	65
1.5.2. Anticuerpos primarios.....	65
1.5.3. Anticuerpos secundarios, portaobjetos y cubreobjetos.....	66
1.5.4. Extracción y detección de proteínas	66
1.5.5. Experimentos de imagen en célula viva	66
1.5.6. Fármacos.....	67
1.5.7. Silenciamiento de proteínas.....	67
2. Métodos.....	67
2.1. Cultivo de neuronas granulares como modelo de estudio de la sinapsis glutamatérgica	67
2.1.1. Polilisinado de cubreobjetos y/o placas de cultivo.....	68
2.1.2. Protocolo de cultivo	68
2.1.3. Transfección mediante electroporación.....	69
2.2 Silenciamiento de proteínas mediante siRNAs específicos.....	70
2.2.1. Transfección del siRNA.....	72
2.2.2. Medidas de silenciamiento	73
2.2.2.1 Extracción de ARN.....	73
2.2.2.2 Reacción de Transcripción Inversa.....	74
2.2.2.3 PCR cuantitativa. Método de las sondas Taqman	74

Índice

2.3. Genotipado.....	76
2.4. Western Blot.....	77
2.4.1 Extracción de proteínas.....	77
2.4.2. Electroforesis, transferencia y cuantificación.....	78
2.5. Análisis del ciclo vesicular	79
2.5.1. FM1-43.....	79
2.5.2. vGlut1-pHluorina	83
2.6. Microscopía electrónica	88
3. Procesamiento de datos.....	90
3.1 Análisis de <i>western blot</i>	90
3.2 FM1-43	90
3.3. vGlut1-pHluorina	92
3.4. Microscopía electrónica	93
3.5. Tests estadísticos.....	93
IV - RESULTADOS.....	97
1. El bloqueo de los receptores NMDA altera el reciclamiento vesicular en una población de botones ante un estímulo intenso y sostenido.....	97
2. La inhibición y/o el silenciamiento de la proteína quinasa dependiente de GMPc tipo II (cGKII) altera el reciclamiento vesicular.....	100
3. El tratamiento agudo con KT5823 también altera el reciclamiento vesicular	105
4. Análisis del ciclo vesicular en ratones de cepa salvaje (WT) y carentes de la proteína cGKII (cGKII KO).....	108
5. Análisis ultraestructural de las sinapsis en condiciones de inhibición o silenciamiento de la proteína dependiente de GMPc tipo II.	111
6. Análisis ultraestructural sináptico en neuronas granulares de cerebelo de ratón de cepa salvaje y cGKII KO.....	115

Índice

7. La inhibición prolongada de cGK aumenta el tamaño del pool vesicular movilizable y enlentece la endocitosis tras un estímulo intenso y prolongado en neuronas granulares de cerebelo de rata...	118
8. Las neuronas granulares de cerebelo de ratón cGKII KO muestran alteraciones en el reciclamiento de sus membranas.	127
V - DISCUSIÓN.....	139
1. La activación de los receptores NMDA aumenta la eficacia del reciclamiento vesicular.	139
2. Quinasas dependientes de GMPc como sistemas efectores.....	140
3. El análisis ultraestructural de los terminales sinápticos revelan la presencia de endosomas en las sinapsis de células estimuladas y el aumento de estas estructuras cuando la actividad cGKII está ausente.	146
4. La actividad cGK es necesaria para que la endocitosis sea rápida tras un estímulo intenso y prolongado.....	148
5. Estudio del reciclamiento vesicular en ratones WT y cGKII KO..	151
VI - CONCLUSIONES.....	161
VII - BIBLIOGRAFÍA	165

ÍNDICE DE FIGURAS

1. Introducción

Figura 1: Esquema del circuito cerebelar básico.....	20
Figura 2: Migración de las células granulares de cerebelo.....	22
Figura 3: Esquema de la sinapsis glutamatérgica.....	23
Figura 4: Ciclo del complejo SNARE.....	27
Figura 5: Fusión vesicular calcio dependiente.....	29
Figura 6: Modelos de endocitosis.....	30
Figura 7: Reclutamiento de proteínas durante la CME.....	34
Figura 8: Modelo molecular de la CME y la endocitosis masiva.....	36
Figura 9: Distribución de los pools sinápticos.....	39
Figura 10: Cascada de señalización de NO/cGMP.....	40

2. Materiales y Métodos

Figura 1: Silenciamiento génico inducido por ARN interferente.....	71
Figura 2: Eficacia de transfección con siRNA fluorescente.....	72
Figura 3: Detección de productos PCR con las sondas Taqman.....	75
Figura 4: Análisis del genotipado.....	77
Figura 5: Protocolo habitual de FM1-43.....	81
Figura 6: Protocolo de doble descarga de FM1-43.....	82
Figura 7: Protocolo de FM1-43 con perfusión de fármacos.....	82
Figura 8: Variaciones de fluorescencia de la vGlut1-pH.....	84
Figura 9: Protocolo de estímulo simple con vGlut1-pH.....	86
Figura 10: Protocolo de estímulo múltiple con vGlut1-pH.....	87
Figura 11: Protocolo de vGlut1-pH con aplicación de Bafilomicina.....	88
Figura 12: Análisis informático de FM1-43.....	91
Figura 13: Análisis informático de vGlut1-pH.....	92

3. Resultados

Figura 1: Campos de carga y descarga de FM1-43.....	98
--	----

Índice de Figuras y Tablas

Figura 2: Efecto del bloqueo de receptores NMDA.....	99
Figura 3: Efecto del KT5823 a largo plazo.....	100
Figura 4: PCR cuantitativa para cGKII.....	102
Figura 5: Efecto del silenciamiento de cGKII.....	103
Figura 6: Efecto de la combinación del silenciamiento de cGKII con KT5823....	104
Figura 7: Efecto del tratamiento agudo con KT5823.....	105
Figura 8: Experimentos de doble descarga con FM1-43.....	107
Figura 9: Análisis de neuronas WT y cGKII KO con FM1-43.....	109
Figura 10: Efecto del KT5823 en neuronas WT y cGKII.....	110
Figura 11: Análisis ultraestructural de neuronas granulares de rata.....	114
Figura 12: Análisis ultraestructural de neuronas granulares de ratón.....	116
Figura 13: Análisis pools vesiculares con Bafilomicina.....	119
Figura 14: Enlentecimiento endocitótico tras incubación con KT5823.....	120
Figura 15: Efectos del KT5823 tras estímulos de 50 segundos con vGlut1-pH.....	121
Figura 16: Efectos del KT5823 tras estímulos de 15 segundos con vGlut1-pH.....	123
Figura 19: Distribución de poblaciones tras estímulos de 50 y 15 segundos.....	126
Figura 20: Fluorescencias máxima e iniciales tras 50 segundos de estímulo en neuronas de ratón WT y cGKII KO.....	128
Figura 21: Efectos del KT5823 entre estímulos en neuronas WT y cGKII KO tras 50 segundos de estimulación.....	129
Figura 22: Fluorescencias máxima e iniciales antes y después del primer y segundo estímulo en neuronas WT y CGKII KO.....	130
Figura 23: Distribución de poblaciones tras el primer y segundo estímulo de 50 segundo en neuronas WT y cGKII KO.....	131
Figura 24: Efectos del KT5823 entre estímulos en neuronas WT y cGKII KO tras 15 segundos de estimulación.....	133
Figura 25: Distribución de poblaciones tras el primer y segundo estímulo de 15 segundos en neuronas WT y cGKII KO.....	135

ÍNDICE DE TABLAS

1. Materiales y Métodos

Tabla I: Oligonucleótidos usados en la PCR cuantitativa.....75

Tabla II: Anticuerpos primarios utilizados en *Western Blot*.....78

2. Resultados

Tabla I: Constantes de decaimiento de la fluorescencia tras 50 segundos de estímulo.....122

Tabla II: Constantes de decaimiento de la fluorescencia tras 15 segundos de estímulo.....124

RESUMEN

La comunicación entre las neuronas ocurre en regiones anatómicamente identificables denominadas sinapsis. Existen dos tipos de transmisión sináptica, las sinapsis químicas y las eléctricas, aunque predominan las sinapsis químicas. En este tipo de sinapsis, la comunicación neuronal ocurre en zonas especializadas de los axones, denominados terminales sinápticos, los cuales almacenan en su interior pequeñas vesículas que contienen un neurotransmisor. Ante la llegada de un potencial de acción al terminal presináptico, el flujo de calcio, generado a través de la apertura de canales de calcio voltaje-dependientes, provoca la fusión de las vesículas con la membrana del terminal presináptico, y la liberación del neurotransmisor a la hendidura sináptica. La fusión vesicular tiene lugar en regiones de membrana del terminal presináptico, molecularmente especializadas para dicho evento exocitótico, denominadas Zonas Activas. Este neurotransmisor liberado difunde por la hendidura sináptica y se une a receptores específicos ubicados en la membrana de la neurona postsináptica, propagándose así el impulso nervioso.

Tras este evento exocitótico, que implica la fusión de multitud de vesículas, es necesario un proceso de endocitosis, que ocurre en las zonas perisinápticas, y que está encargado de recuperar las fracciones de membrana que formaban las vesículas sinápticas, con dos objetivos: 1. Impedir el aumento de la superficie de la zona activa, lo cual llevaría a su desestructuración, y 2. La formación de nuevas vesículas que se rellenen de neurotransmisor y puedan prepararse para una nueva ronda de exocitosis. La endocitosis que sigue a un estímulo moderado, está mediada por clatrina y recicla vesículas independientes preparadas para el relleno con neurotransmisor. Tras estímulos intensos que provocan exocitosis de múltiples vesículas, la retirada de membrana ocurre a través de otro mecanismo más lento y menos eficaz, denominado endocitosis en masa, el cual recicla grandes fragmentos de membrana y acumula estructuras endosomales en el interior del terminal, los cuales no siempre rinden vesículas funcionales inmediatamente.

Por otro lado, existen cada vez más evidencias de una comunicación bidireccional en la sinapsis, donde mensajeros sintetizados en la postsinapsis difunden a la presinapsis para regular diferentes mecanismos presinápticos como el ciclo vesicular. En sinapsis glutamatérgicas, uno de estos mensajeros es el óxido

Resumen

nítrico, sintetizado en la postsinapsis por la óxido nítrico sintasa que se activa por el calcio que entra a través de receptores NMDA. En sinapsis hipocámpales y en Calyx de Held, se ha demostrado que acelera la etapa endocitótica del reciclamiento vesicular, incrementando las concentraciones de PIP₂ mediante la activación de la quinasa responsable de su síntesis, la PIP5K. En neuronas granulares de cerebelo, experimentos con la sonda FM1-43 mostraron que, la inhibición de la guanilato ciclasa soluble o el silenciamiento de esta proteína, producía un enlentecimiento muy significativo del reciclamiento vesicular en una población de botones.

En esta Tesis Doctoral, se ha demostrado que tanto los antagonistas de los receptores NMDA, que previenen la síntesis de NO, como la inhibición de las quinasas de GMPc, o el silenciamiento de la cGKII, se traducen en un enlentecimiento del reciclamiento vesicular cuando las células son sometidas a un estímulo intenso. Además, se ha observado un enlentecimiento de la endocitosis en estas células con diferentes técnicas de imagen, empleo de la sonda FM1-43 o el reportero genético vGlut1-pH. Análisis ultraestructurales han evidenciado la presencia de estructuras endosomales tras el estímulo en subpoblaciones de botones, que ayudan a explicar el enlentecimiento del ciclo vesicular en éstos. Finalmente, estudios realizados con células procedentes de un ratón carente de cGKII también han mostrado alteraciones en el reciclamiento vesicular.

Summary

SUMMARY

Communication between neurons takes place in anatomically recognizable regions called synapses. There are two types of synaptic transmission, chemical and electrical synapses, although chemical synapses are the ones that predominate. At this kind of synapses, interneuronal communication occurs at specialized regions of the axon, called synaptic terminals, structures that contain small vesicles filled with neurotransmitter. Upon the arrival of an action potential to the synaptic terminal, the calcium influx, which it's generated through the opening of voltage-dependent calcium channels, induces the fusion of the small synaptic vesicles with the plasmatic membrane, and the release of the neurotransmitter to the synaptic cleft. This group of events, that includes vesicle fusion, takes place at specialized regions of the synaptic terminal, named Active Zones. The neurotransmitter that has been released, binds to its specific receptors at the post synaptic element, spreading the nerve impulse.

After the exocytotic event, that involves multi vesicular fusion, it's required an endocytic process, that takes place at perisynaptic regions, with a main objective: the recovery of membrane fractions that formed synaptic vesicles, with two main purposes: 1. The prevention of the increase in the surface of the active zone, an event that will lead to the loss of its structure. 2. The formation of new vesicles to be filled with neurotransmitter, so they can be prepared to a new exocytotic event. The endocytosis process that follows middle stimulation, it's mediated by a protein named clathrin, and recycles independent vesicles ready to be refilled with neurotransmitter. Stronger stimulus, which induces the fusion of a large number of vesicles, leads to a slower and less efficient endocytotic mechanism, named bulk endocytosis. This kind of endocytosis accumulated endosomal structures inside the synaptic terminal, endosomes that not always render new functional vesicles.

Among the studies related to synaptic functionality, there are several evidences supporting a bidirectional communication within the synapse, regulated by retrograde messengers. Those messengers, synthetized at the postsynaptic compartment, diffuse to the presynapsis, where they can mediate different presynaptic mechanisms as the vesicular cycle. In glutamatergic synapses, one of those retrograde messengers it's the nitric oxide, synthetized by the nitric oxide synthase, which is activated at the postsynaptic compartment by the calcium that

Summary

gets inside the cell through NMDA receptors. At hippocampal synapses and Calyx of Held, it's been demonstrated that nitric oxide accelerates the endocytotic phase of vesicular recycling, by increasing PIP_2 concentrations, through the activation of the kinase responsible of its synthesis, PIP5K. At cerebellar granule cells, FM1-43 experiments showed that, guanylate cyclase inhibition or silencing, lead to a significant slowdown of vesicular recycling at a group of boutons.

In this project, we have demonstrated that, both, the NMDAR antagonists, which prevent nitric oxide synthesis, and inhibition or silencing of cGKII, provokes a great reduction in the efficiency of vesicular recycling, under strong stimulation. This slowing down of the endocytosis it's been observed with different live cell imaging techniques, FM1-43 and the pHluorin vGlut1-pH. Also, ultrastructural studies showed the presence of endosomes after the stimulation in a population of the terminals, evidence that explains the loss of efficiency at recycling. These alterations at vesicular recycling have been also studied at cerebellar granule cells from cGKII KO mice.

Abreviaturas

ABREVIATURAS

ADBE: del inglés, *Activity Dependent Bulk Endocytosis*. Endocitosis masiva

AGO2: Argonauta-2. Proteína implicada en el procesamiento de ARN de interferencia.

AMPA: Ácido- α -Amino-3-hidroxil-5-metil-4-isoxazol-propiónico.

AMPA: Receptor ionotrópico activado por AMPA.

AMPc: Adenosín monofosfato cíclico

AP1/AP2/AP3/AP180: del inglés, *Adaptor Protein 1/2/3/180*. Proteínas adaptadoras de clatrina.

BAR (dominio): Bin-Amfifisina-Rv.

8-Br-GMPc: 8-Bromo-guanosín monofosfato cíclico (análogo permeable de GMPc).

CaMKII: Calcio-calmodulina quinasa tipo II.

Cdk5: del inglés, *cyclin-dependent kinase 5*. Quinasa 5 dependiente de ciclina.

cGKs: Proteínas quinasas dependientes de GMPc.

CME: del inglés, *Clathrin Mediated Endocytosis*. Endocitosis mediada por clatrina.

CNGC: del inglés, *Cyclic Nucleotide Gated Channels*. Canales activados por nucleótidos cíclicos.

CPARs: del inglés, *Calcium Permeable AMPA Receptors*. Receptores AMPA permeables a calcio.

D-APV: ácido 2-Amino-5-fosfonovaleriánico. Antagonista competitivo de receptores NMDA.

DIV: Días in vitro.

Abreviaturas

EBSS: del inglés, *Earle's Balanced Salt Solution*. Solución de sales estabilizada de Earle.

EGL: del inglés, *External Granule Layer*. Capa granular externa.

FAD: Flavín adenín dinucleótido.

FM1-43: Fei Mao 1-43.

FMN: Flavín monoclueótido.

GABA: Ácido Gamma Amino Butírico.

GABAR: Receptores de GABA.

GAPDH: Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa

GCs: Guanilato ciclasa soluble.

GFP: del inglés, *Green Fluorescent Protein*. Proteína verde fluorescente.

GluA1: Subunidad A1 del receptor AMPA.

GMPc: Guanosín monofosfato cíclico.

GSK3: Glucógeno sintasa quinasa 3.

GTP: Guanosín trifosfato.

HBM: del inglés, *HEPES Buffer Medium*. Medio tamponado con HEPES.

IGL: del inglés, *Inner Granule Layer*. Capa granular interna.

IP3Rs: Receptores de Inositol trifosfato.

KD: *Knock-down*.

KO: *Knock-out*.

KT5823: Inhibidor de proteínas quinasas dependientes de GMPc.

LTP: del inglés. *Long Term Potentiation*. Potenciación a largo plazo.

MAPK: del inglés, *Mitogen-Activated Protein Kinases*. Proteínas quinasas activadas por mitógeno.

MET: Microscopía electrónica de transmisión.

Abreviaturas

MK801: Antagonista no competitivo de receptores NMDA.

MUNC: del inglés, *Mammalian homologue of UNcoordinated phenotype*. Homólogo mamífero de fenotipo descoordinado.

NADPH: Dinucleótido fosfato de nicotinamida y adenina

NMDA: N-metil-D-Aspartato.

NMDAR: Receptor ionotrópico activado por NMDA.

NO: Óxido nítrico.

NOS: Óxido nítrico sintasa.

ODQ: Inhibidor de la guanilato ciclasa soluble.

PBS: del inglés, *Phosphate Buffer Saline*. Tampón fosfato salino.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

PDE: Fosfodiesteras.

PI(4,5)P₂: Fosfatidil inositol 4,5 difosfato.

PIP5K: Fosfatidil inositol 4-fosfato 5 quinasa.

PKA: Proteína quinasa A.

PKC: Proteína quinasa C.

PSD: del inglés, *Post Synaptic Density*. Densidad postsináptica.

RIM: del inglés, *Rab Interacting Molecule*. Molécula de interacción con Rab.

RIM-BP: del inglés, *RIM-Binding Protein*. Proteína de unión a RIM.

RISC: del inglés, *RNA-induced silencing complex*. Complejo de silenciamiento inducido por ARN.

RRP: del inglés, *Ready Releasable Pool*. Conjunto de vesículas preparadas para su liberación.

SDS: Dodecil sulfato sódico.

siRNA: del inglés, *small interfering RNA*. ARN pequeño de interferencia.

Abreviaturas

- SM:** del inglés, *Sec1/Munc18 like proteins*. Proteínas similares a Sec1/Munc18.
- SNAP:** del inglés, *Soluble NSF Attachment Protein*. Proteína unida a NSF soluble.
- SNARE:** del inglés, *SNAP Receptors*. Receptores de SNAP.
- SNC:** Sistema Nervioso Central.
- SV2:** del inglés, *Synaptic Vesicle 2*. Proteína de la vesícula sináptica 2.
- Syt1:** Sinaptotagmina 1.
- UBC:** del inglés, *Unipolar Brush Cells*. Células unipolares en cepillo.
- VAMP:** del inglés, *Vesicle Associated Membrane Protein*. Proteína asociada a membranas vesiculares.
- v-ATPasa:** del inglés, *vacuolar-ATPase*. ATPasa vacuolar.
- vGlut:** del inglés, *vesicular Glutamate transporter*. Transportador de glutamato vesicular.
- vGlut1-pH:** fluorina asociada al transportador de glutamato vesicular.
- WT:** del inglés, *wild type*. Fenotipo salvaje.
- ZA:** Zona activa.

I - INTRODUCCIÓN

1. El cerebelo

El cerebelo es un órgano impar y medio, que ocupa tan sólo el 10% del volumen total del encéfalo a pesar de que contiene más de la mitad de sus neuronas. Dichas neuronas se encuentran organizadas de forma regular en unidades repetidas. Sin embargo, a pesar de esta estructura regular anatómica, el cerebelo está dividido en diferentes regiones, que a su vez reciben proyecciones de distintas partes del encéfalo y la espina dorsal (Kandel, 2000).

1.1. Estructura del cerebelo

El cerebelo está compuesto por una capa externa de materia gris denominada *corteza cerebelosa*, una capa más interna de materia blanca y tres pares de núcleos internos: *dentado*, *fastigial* e *interpuesto*. Está conectado con los núcleos basales a través de tres pares de tractos simétricos denominados pedúnculos inferior, medio y superior. El pedúnculo superior contiene la gran mayoría de las proyecciones eferentes.

La corteza cerebelosa está organizada en una estructura en tres capas que contienen multitud de tipos celulares: neuronas inhibitorias, neuronas excitatorias y células de la glía. Entre las neuronas excitatorias encontramos principalmente las neuronas granulares y las células unipolares en cepillo, UBCs, del inglés *Unipolar Brush Cells*. Entre las neuronas inhibitorias cabe destacar las células de Purkinje y numerosos tipos de interneuronas entre las que se encuentran las células de Golgi, las células en cesta y las células estrelladas. En cuanto a las células no neuronales encontramos las células de glía de Bergman, así como multitud de astrocitos, oligodendrocitos y células microgliales (Xu y cols., 2013).

La capa más externa, denominada *capa molecular* está compuesta principalmente por los axones de las neuronas granulares, denominados fibras paralelas, y el entramado dendrítico de las células de Purkinje. En esta red de fibras se pueden distinguir también interneuronas en cesta y estrelladas y prolongaciones de la glía de Bergman (Ramon y Cajal, 1899).

Bajo la capa molecular se encuentra la *capa de las células de Purkinje*, denominada de esta forma debido a que alberga los somas de estas células, cuyas dendritas arborizan hacia la capa molecular, y cuyos axones proyectan hacia la

Introducción

sustancia blanca, donde sinaptan con algunos núcleos cerebelosos o vestibulares, y algunas ramificaciones contactan con las células en cesta o estrelladas. Estos contactos son siempre inhibitorios y están mediados por la liberación del ácido γ -aminobutírico (GABA) (Kandel, 2000).

Por último, la *capa de células granulares* contiene los somas de las neuronas granulares. Estas neuronas establecen contactos con las fibras musgosas y con algunas interneuronas de Golgi (Figura 1).

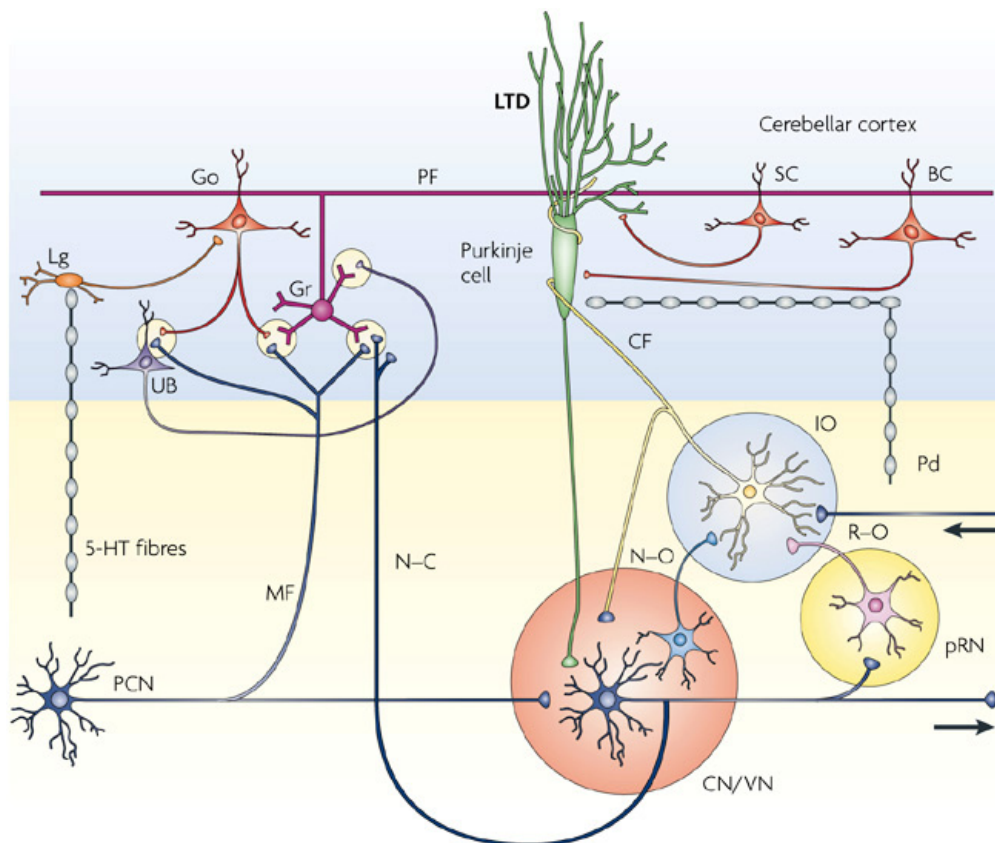


Figura 1: Esquema del circuito cerebelar básico. Lg: células de Lugaro. Go: célula de Golgi. UB: célula unipolar en cepillo. Gr: células granular. PF: fibras paralelas. SC: célula estrellada. BC: célula en cesta. MF: fibras musgosas. CF: fibras trepadoras. PCN: núcleos precerebelares. CV/CN: núcleos cerebelares/ vestibulares. Modificado de (Ito, 2008)

Bajo estas tres capas que conforman la corteza cerebelosa se encuentra la sustancia blanca, que alberga el entramado de fibras que conecta el cerebelo con otras regiones del encéfalo. Encontramos tres tipos de fibras: intrínsecas, aferentes y eferentes. Las fibras intrínsecas no abandonan el cerebelo y conectan diferentes regiones del mismo. Las fibras aferentes terminan en la corteza, donde forman las

Introducción

fibras musgosas que sinaptan con las neuronas granulares. Las fibras eferentes conforman la salida de información del cerebelo hacia el tálamo (Ito, 1984).

1.2 Neuronas granulares del cerebelo

Las células granulares son neuronas glutamatérgicas y constituyen el tipo celular más abundante del cerebelo, llegando a representar aproximadamente un 90% del total. Son células cuyos axones carecen de recubrimiento de mielina y sus somas poseen un gran núcleo y apenas citoplasma.

A lo largo del desarrollo sufren distintas modificaciones y migraciones. En la rata, tras la mitosis (día 10-12 embrionario) y hasta el día 15 residen en la capa granular externa o EGL (del inglés *External Granule Layer*), que desaparecerá hacia la tercera semana de vida, cuando las neuronas migrarán hacia el interior (Ryder y Cepko, 1994). Esta capa granular externa prolifera hasta el estadio posnatal P10 (Xu y cols., 2013). El pico proliferativo se produce a P7, momento elegido para la realización de los cultivos celulares por conservar dos características esenciales como son la pluripotencia y cierta capacidad proliferativa.

A partir de P5 y aproximadamente hasta P15, las células sufren un proceso migratorio a través de la capa de células de Purkinje ayudadas por las prolongaciones de la glía de Bergmann (Xu y cols., 2013). Durante esta etapa, la supervivencia de las células granulares es dependiente de actividad, generada por la entrada de calcio, presumiblemente, mediada por los receptores NMDA (Jurado y cols., 2003). El glutamato necesario para la activación de estos receptores durante el proceso migratorio proviene de la inervación aferente que reciben estas células, motivo por el que el cultivo de neuronas granulares de cerebelo ha de realizarse en condiciones despolarizantes, con el objetivo de simular el estado de excitación de las membranas en este estadio (Gallo y cols., 1987).

De forma paralela a este proceso migratorio hacia el interior, las neuronas granulares van extendiendo su axón hacia la capa molecular (Xu y cols., 2013). Aproximadamente en el estadio P15, casi la totalidad de las neuronas que formaban la capa granular externa han ingresado en la capa granular interna o IGL (del inglés *Internal Granule Layer*), y a partir de P21 la capa granular externa ha desaparecido completamente, formándose así la estructura trilaminar característica del cerebelo adulto (Figura 2).

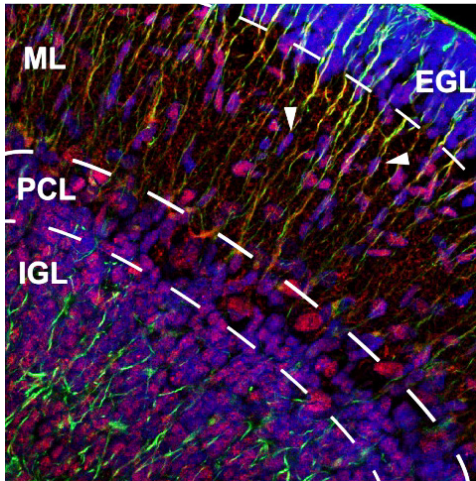


Figura 2: Migración de las celulares granulares de cerebelo. Laminilla cerebelosa a P14 que muestra la migración desde la capa granular externa (EGL) hacia la capa granular interna (IGL). Se observan a su vez la capa molecular (ML) y la capa de las células de Purkinje (PCL). Adaptado de (Incontro y cols., 2011).

2. La sinapsis glutamatérgica

La comunicación entre las neuronas es necesaria para el correcto funcionamiento del SNC y dichas interacciones funcionales ocurren en regiones anatómicamente identificables denominadas sinapsis. Existen principalmente dos tipos de sinapsis, las sinapsis químicas y las eléctricas. En las sinapsis eléctricas, la transmisión se produce de forma directa ya que las neuronas se encuentran en contacto físico gracias a uniones intercelulares de tipo *gap* que unen sus citoplasmas. En el caso de las sinapsis químicas, la transmisión ocurre a través de la liberación de un neurotransmisor por parte de la neurona presináptica y su recepción por parte de receptores específicos ubicados en la membrana de la neurona postsináptica (Pereda, 2014).

En la sinapsis química, la separación espacial entre la neurona presináptica y la postsináptica, denominada hendidura sináptica, tiene una anchura de aproximadamente 30nm. En este tipo de sinapsis, la liberación de neurotransmisor ocurre en los terminales presinápticos, zonas especializadas del axón presináptico. Estos terminales contienen grupos de vesículas en cuyo interior se almacena el neurotransmisor (Kandel, 2000) (Figura 3).

La cronología de la transmisión nerviosa empezaría con la llegada de un potencial de acción al terminal presináptico, el cual genera una entrada de calcio (debido a la apertura de canales de calcio voltaje-dependientes). Esta elevación en la concentración de calcio provoca la fusión de las vesículas con la membrana del

Introducción

terminal presináptico, y, por lo tanto, la liberación del neurotransmisor a la hendidura sináptica. Este neurotransmisor liberado difunde por la hendidura sináptica y se une a receptores específicos ubicados en la membrana de la neurona postsináptica. Todo este conjunto de procesos ocurren en un lapso de tiempo de aproximadamente un 1ms (Kandel, 2000).

Entre la gran cantidad de moléculas que actúan como neurotransmisores, el glutamato es el principal neurotransmisor excitatorio. La acumulación de glutamato en el interior de las vesículas secretoras está mediada por los transportadores de glutamato (VGLUTs). Estos transportadores VGLUT1, VGLUT2 y VGLUT3 pertenecen a la familia de transportadores vesiculares SCL17, encargada del transporte de neurotransmisores aniónicos (Omote y cols., 2011).

Este proceso de carga de glutamato al interior de las vesículas (a cargo de sus transportadores específicos) ocurre mediante un antiporte que incorpora glutamato en contra de gradiente, gracias a la disipación de un gradiente electroquímico de H^+ establecido previamente por las V-ATPasas (del inglés *Vacuolar ATPases*) (Omote y cols., 2011).

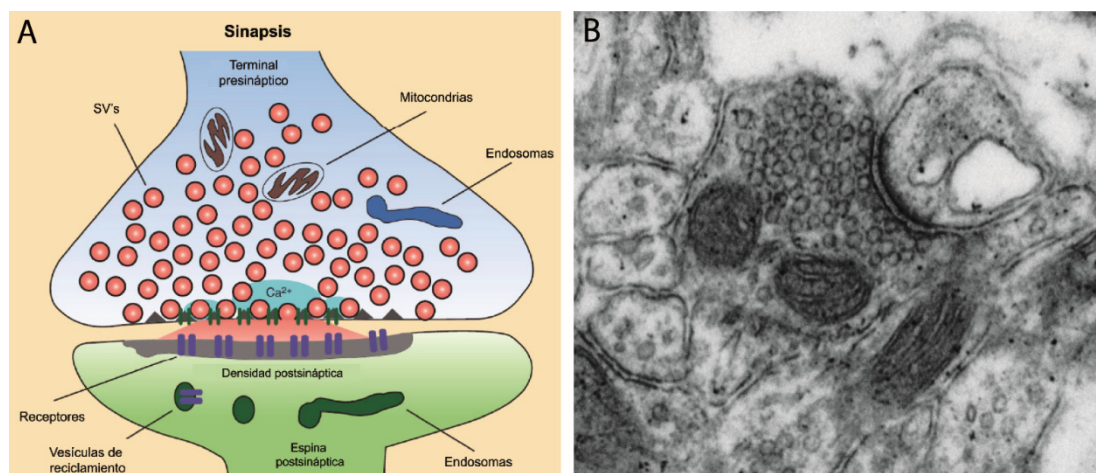


Figura 3: Esquema representativo de una sinapsis glutamatergica (Panel A) en el que se ilustran tanto el elemento presináptico, dónde podemos observar las vesículas sinápticas cargadas de neurotransmisor, como el elemento postsináptico con sus correspondientes receptores. Adaptado de (Sudhof, 2012a). Micrografía electrónica de una sinapsis glutamatergica (Panel B).

Introducción

Tras la carga con neurotransmisor, las vesículas se agrupan y colocan en la zona activa próximas a canales de calcio, de forma que sea posible un rápido acoplamiento entre el calcio y la maquinaria exocitótica (Sudhof, 2004).

2.1 La zona activa

El término Zona Activa (ZA) hace referencia a aquellas zonas especializadas de la membrana plasmática donde se produce la fusión de las vesículas sinápticas para la posterior liberación de neurotransmisor a la hendidura sináptica. Esta ZA se caracteriza por poseer una compleja red proteica electrodensa, así como un alineamiento muy fino con la maquinaria presente en el elemento postsináptico, la llamada densidad postsináptica o PSD (del inglés *PostSynaptic Density*) (Michel y cols., 2015).

Para alcanzar la alta precisión espacio-temporal necesaria en la transmisión sináptica, es imprescindible que el proceso de fusión vesicular esté altamente regulado. Antes de que las vesículas puedan fusionarse con la membrana plasmática en respuesta a la entrada de calcio a través de los canales de calcio voltaje-dependientes, deben ser reclutadas y colocadas en la ZA a través de un proceso de maduración que les otorga competencia para la fusión (Sudhof, 2013). Además de la preparación de las vesículas para su fusión, la especialización de la ZA cumple otras funciones esenciales como son: el reclutamiento hacia la membrana plasmática de canales de calcio voltaje-dependientes que crean microdominios de calcio y permiten un proceso de fusión calcio-dependiente rápido y sincrónico, contribuyen a la localización exacta de las maquinarias pre y postsinápticas (que deben estar enfrentadas) a través de diferentes moléculas de adhesión celular, y por último, median multitud de procesos de plasticidad a corto y largo plazo, bien respondiendo ante la acción de segundos mensajeros (como el diacilglicerol, cuya producción es responsable de algunos procesos de plasticidad sináptica), bien reclutando otras proteínas que sean responsables de dicha plasticidad (Sudhof, 2012b).

La ZA está compuesta por una matriz de proteínas difícil de disolver y purificar, sin embargo, las evidencias experimentales han mostrado que el núcleo de la zona activa está formado por una serie de proteínas conservadas a lo largo de la evolución: RIM (del inglés *Rab3 Interacting Molecule*), Munc-13 (del inglés

Introducción

Mammalian homologue of UNCoordinated phenotype), RIM-BP (del inglés *RIM-Binding Protein*) y las proteínas ELKS/CAST (del inglés *Cytomatrix at the Active zone STructural protein*) y α -liprinas (Sudhof, 2012b). A estas cinco proteínas se les unen otras dos en sinapsis de vertebrados: Piccolo y Basson (tom Dieck y cols., 1998).

Micrografías electrónicas de las ZA muestran un aspecto de rejillas hexagonales formadas por proyecciones electrodensas que contienen intercaladas las vesículas sinápticas (Limbach y cols., 2011). Estudios combinados de inmunodetección y ultraestructura han mostrado que las proteínas Munc-13 y RIM están localizadas cerca de la membrana plasmática y distribuidas entre las proyecciones electrodensas, mientras que Piccolo y Bassoon se encuentran más alejadas de la membrana plasmática y tan sólo conforman las zonas distales de las proyecciones electrodensas (Dani y cols., 2010; Limbach y cols., 2011).

2.2 El ciclo vesicular

La transmisión sináptica se inicia cuando un potencial de acción induce la liberación del neurotransmisor desde el terminal presináptico. Dicho potencial de acción induce la apertura de canales de calcio, el cual estimula la exocitosis de las vesículas sinápticas. Después de la fase exocitótica, las vesículas se reciclan a través de un proceso de endocitosis, tras el cual se produce una reacidificación de su interior y posterior relleno de neurotransmisor preparándose así para una nueva ronda de exocitosis (Sudhof, 2004). A este conjunto de fenómenos se le denomina ciclo vesicular, cuyos pasos se describirán a continuación.

2.2.1 Exocitosis

De forma previa a la fusión calcio dependiente de las vesículas sinápticas, estas experimentan un proceso de preparación para su liberación. Dicho proceso se compone de dos pasos: el primero es un acercamiento espacial a la zona activa y en concreto a las regiones de la zona activa donde se han generado microdominios de calcio, conocido como amarre a la zona activa (del inglés *docking*), y un segundo paso en el que ocurre el ensamblaje del complejo SNARE, denominado preparación de las vesículas (del inglés *priming*) (Sudhof, 2012a).

El complejo SNARE lo conforman un grupo de proteínas, altamente conservadas evolutivamente, y con multitud de papeles en diferentes vías de tráfico

Introducción

de membranas intracelular. Sin embargo, son aquellas involucradas en la fusión vesicular las mejor caracterizadas. Principalmente son tres: la proteína de la vesícula sináptica sinaptobrevina o VAMP (del inglés *Vesicle Associated Membrane Protein*), y las proteínas de la membrana plasmática Sintaxina-1 y SNAP-25 (Fasshauer y cols., 1998).

La formación del complejo SNARE conlleva una unión física entre la membrana plasmática y las vesículas sinápticas necesaria para la fusión vesicular. Este complejo está constituido por cuatro hélices, dos de ellas aportadas por SNAP-25, otra por Sintaxina-1 y otra por sinaptobrevina. El ensamblaje de este complejo es un proceso exergónico, lo cual aporta la energía necesaria para la torsión y fusión de membranas, haciendo de esta forma a las proteínas SNARE auténticos motores para la fusión vesicular (Sudhof y Rizo, 2011).

En relación al proceso de preparación (o *priming*) existen cinco proteínas implicadas en la zona activa, a saber, Munc13, RIM, RIM-BP, las proteínas α -liprinas y la proteína de la familia de las SM, Munc18.

Munc13 y RIM son las mejor caracterizadas y ambas son proteínas con varios dominios expresados en diferentes isoformas. Munc13 es funcionalmente esencial para el proceso de preparación de las vesículas. Su función, la cual está estrechamente regulada por calcio (gracias a su dominio C2), por diacilglicerol (gracias a su dominio C1) y por RIM, implica su interacción, a través de uno de sus dominios, con otras proteínas SNARE o SM (Ma y cols., 2011). En el caso de RIM, su estructura contiene dos α -hélices que interaccionan con Rab3, separadas por un dedo de zinc que interacciona con el dominio C2A de Munc13, formando un complejo heterotrimérico entre Rab3 y el heterodímero RIM/Munc13 que ancla la vesícula a la zona activa (Lu y cols., 2006). Por otro lado, RIM se une de forma directa a canales de calcio tipo N y P/Q a través de su dominio PDZ, e indirectamente a través de RIM-BP. La eliminación de RIM lleva a una pérdida de canales de calcio en la zona activa y a un descenso en las corrientes de calcio inducidas por potenciales de acción, fenotipo que sólo se rescata con fragmentos de RIM que contengan el dominio PDZ y el dominio de unión a RIM-BP (Kaeser y cols., 2011).

Introducción

Una vez que la vesícula está anclada a la zona activa y próxima a los canales de calcio, la activación de Munc13 por calcio y diacilglicerol aproxima la vesícula a su sitio final de fusión y a continuación Munc18 inicia la formación del complejo SNARE (Figura 4).

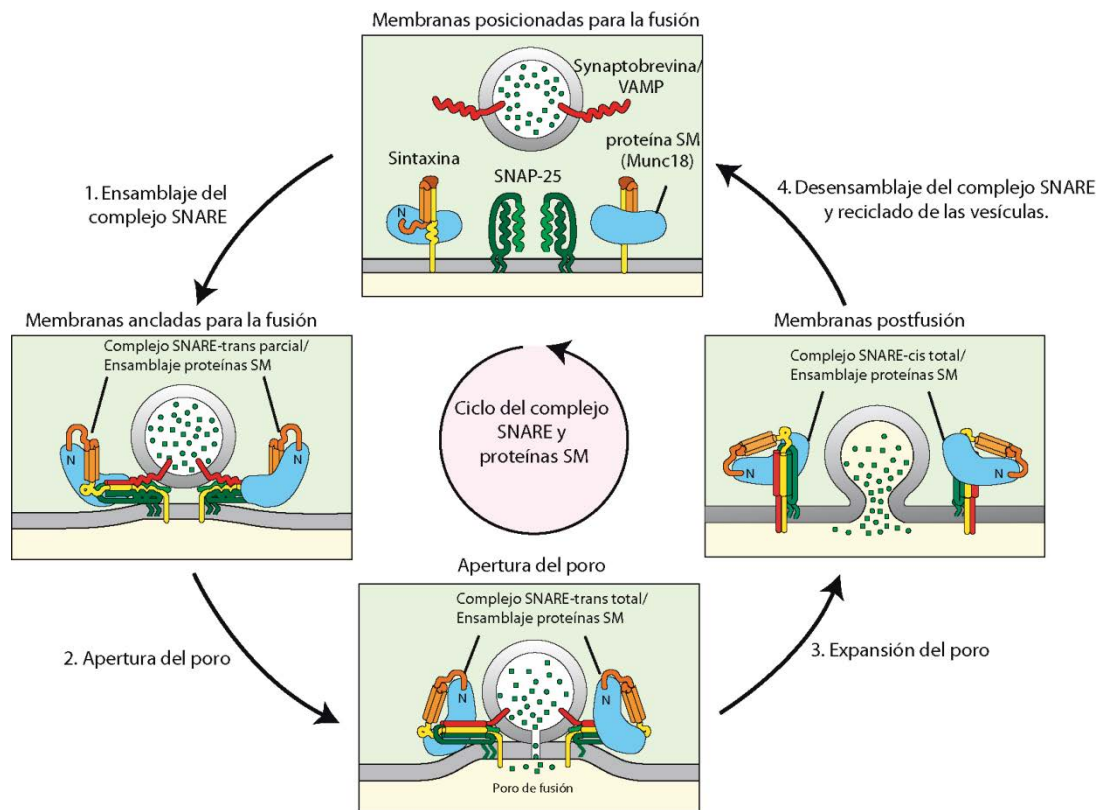


Figura 4: El diagrama representa el ciclo del complejo SNARE desde la colocación de la vesícula. Durante la preparación, las proteínas SNARE se ensamblan en complejos *trans*, a los cuales se asocian proteínas SM a través de la sintaxina. El complejo completo tira de las membranas formando el poro de fusión, el cual se expande provocando el colapso completo de la vesícula en la membrana plasmática. Esto convierte al complejo SNARE a una conformación *cis*, a partir de la cual se desensambla para que la vesícula se recicle y prepare para una nueva ronda exocitótica. Adaptado de (Sudhof y Rizo, 2011).

2.2.1.1 Fusión de las vesículas dependiente de calcio

Diversos estudios electrofisiológicos, a lo largo de las últimas décadas, han revelado que el potencial de acción presináptico y la fusión de las vesículas

Introducción

sinápticas están estrechamente ligados al flujo de calcio, hasta el punto de que, en condiciones fisiológicas, el calcio induce la fusión vesicular en menos de 1 ms (Sabatini y Regehr, 1996). La velocidad y precisión con la que el calcio induce la liberación del neurotransmisor están reguladas principalmente por la proteína sinaptotagmina (presente en la vesícula sináptica), que actúa como sensor de calcio y su cofactor citosólico, la complexina (Sudhof, 2012a).

Las sinaptotagminas son una familia de proteínas transmembrana, altamente conservadas a lo largo de la evolución, que poseen dos dominios C2 citoplasmáticos denominados C2A y C2B. Ambos dominios poseen sitios de unión a calcio y, de forma dependiente de calcio, C2A se une a membranas ricas en fosfolípidos ácidos y C2B a membranas enriquecidas en fosfatidil inositol-4,5-bisfosfato (PI(4,5)P₂) (Jahn y Fasshauer, 2012). Además, en el caso de la sinaptotagmina 1 (syt1), estos dominios C2 constituyen complejos de unión a proteínas como syntaxina 1 y complejo SNARE (Perin y cols., 1990).

Pero las sinaptotagminas no actúan solas en el proceso de fusión vesicular, y necesitan de las complexinas actuando como cofactores. Se ha postulado que las complexinas podrían actuar tanto como activadoras del ensamblaje del complejo SNARE, promoviendo la fusión vesicular, como frenando dicho ensamblaje y estabilizando el complejo SNARE hasta el momento de la llegada de calcio, donde lo liberarían para permitir la fusión completa (Yang y cols., 2010).

Un modelo plausible sobre la mecánica de la fusión vesicular dependiente de calcio propone que tanto la sinaptotagmina como la complexina interactúan con el complejo SNARE y con fosfolípidos de la membrana plasmática en un momento previo a la entrada de calcio (Sudhof, 2013). Inicialmente, los complejos SNARE estarían parcialmente ensamblados manteniendo a la vesícula en un estado de alta energía (Jahn y Fasshauer, 2012). Es en este punto de ensamblaje parcial cuando la complexina se une al complejo SNARE, que es esencial para la preparación y activación de la fusión vesicular (McMahon y cols., 1995). En este momento, la sinaptotagmina vesicular estaría unida a la membrana plasmática a través de interacciones con membranas enriquecidas en PI(4,5)P₂ como ocurre en la zona activa. La entrada de calcio, provocada por la llegada de un potencial de acción, activa la sinaptotagmina, la cual, en su estado activo, desplaza a la complexina de su unión al complejo SNARE y promueve la apertura del poro de fusión (Sudhof, 2013) (Figura 5).

Introducción

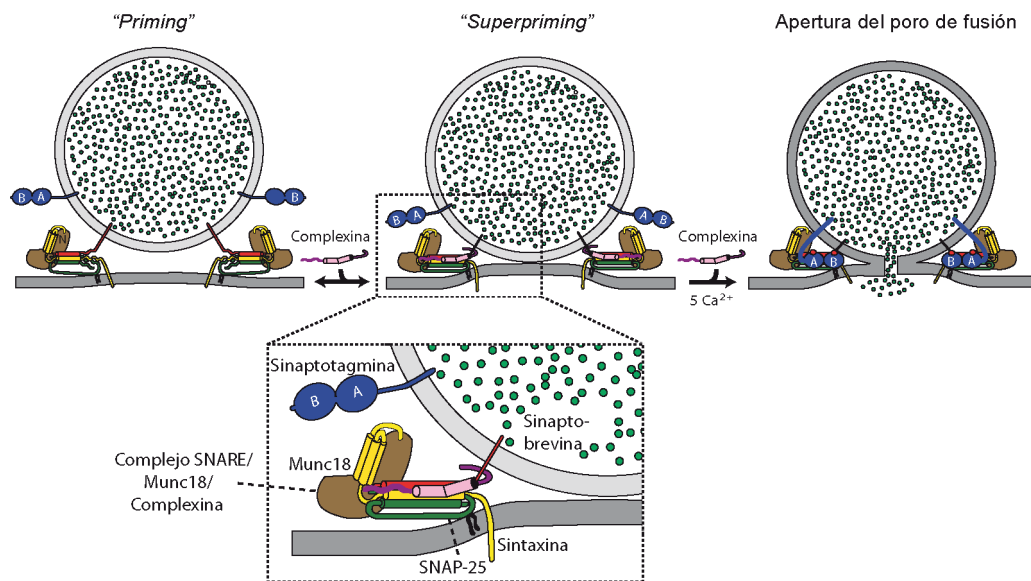


Figura 5: Dinámica del mecanismo de acción de la sinaptotagmina y las complexinas en la fusión vesicular calcio dependiente. Representa una primera fase de preparación (*priming*) con el ensamblaje parcial del complejo SNARE, la unión de la complexinas al complejo SNARE preensamblado (*superpriming*), y la apertura del poro de fusión tras la entrada de calcio y activación de la sinaptotagmina. Adaptado de (Sudhof, 2012a).

Previamente al desplazamiento de la complexina, la unión de iones calcio a la sinaptotagmina provoca un cambio conformacional en ésta que acerca la vesícula aún más a la membrana plasmática, permitiendo de ese modo la entrada de la sinaptobrevina al complejo SNARE para completar su ensamblaje. Esto muestra que tanto el final de la preparación de la vesícula como el inicio de la fusión son procesos dependientes de calcio, haciendo muy difícil separarlos como fenómenos independientes. Este modelo asume como paso limitante y promotor de la exocitosis la posición de la sinaptobrevina, indicando que, si la distancia entre ella y un complejo SNARE preensamblado es lo suficientemente pequeña, ocurrirá el evento exocitótico (Jahn y Fasshauer, 2012).

2.2.2 Endocitosis

La comunicación interneuronal se basa en la liberación de neurotransmisor a través de la fusión vesicular dependiente de calcio. Teniendo en cuenta la distancia desde el terminal presináptico al soma neuronal, el reemplazo de las vesículas fusionadas por nuevas vesículas, proceso que implicaría la síntesis y el transporte axonal, sería extraordinariamente lento para mantener la actividad neuronal. Por otro lado, la continua fusión de vesículas sinápticas con la membrana plasmática en ausencia de un proceso compensatorio de retirada de membrana, acabaría causando un aumento en la superficie de la zona activa que conllevaría multitud de consecuencias deletéreas para la función sináptica, como la pérdida de la tensión en la membrana, la desestructuración de la maquinaria de la ZA o la pérdida de alineación con el elemento postsináptico (Kononenko y Haucke, 2015).

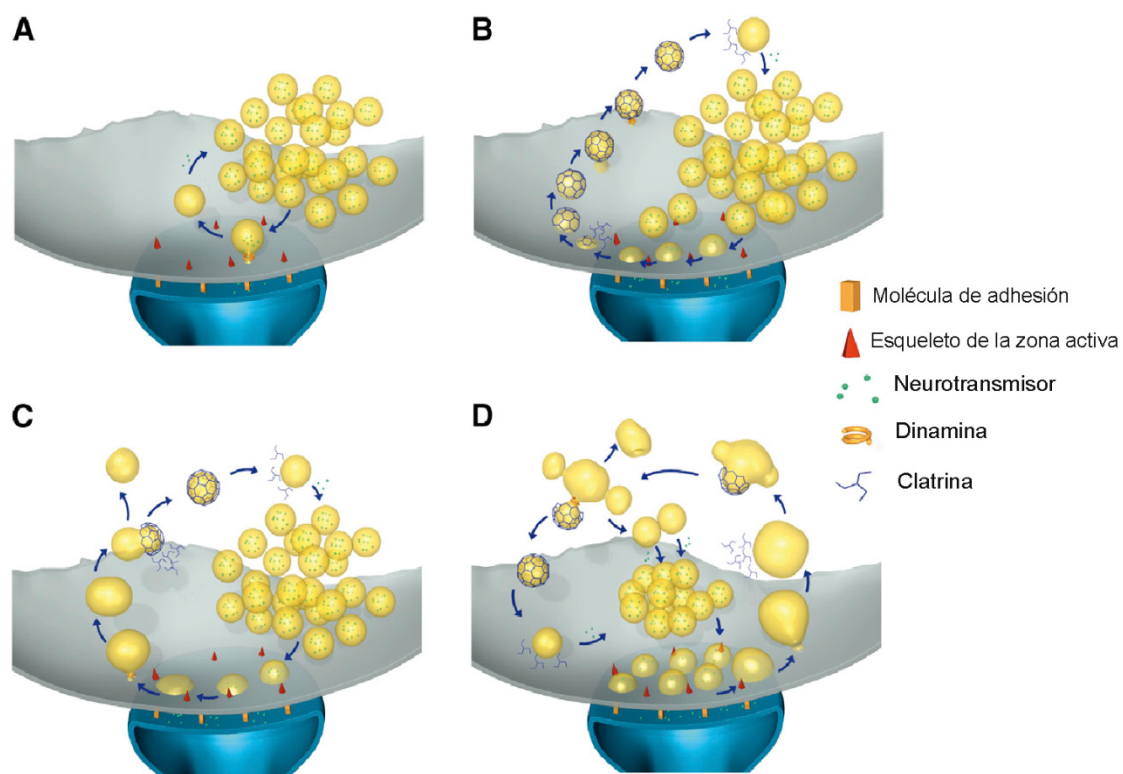


Figura 6: Modelos de endocitosis. En la figura se ilustran los cuatro tipos de reciclaje de membranas previamente mencionados. A) Modo *kiss and run*; B) La endocitosis “clásica” mediada por clatrina. C) Endocitosis ultrarrápida. D) Endocitosis masiva o tipo *bulk*. Adaptado de (Kononenko y Haucke, 2015).

Introducción

Fue en los años 70 cuando apareció por primera vez el concepto de reciclamiento de fragmentos de membrana, que previamente se habían fusionado con la membrana plasmática, gracias a los trabajos de microscopía electrónica de Heuser y Reese (Heuser y Reese, 1973). Desde ese estudio, y gracias a trabajos posteriores, se han descrito fundamentalmente cuatro tipos de endocitosis: “*kiss and run*”, endocitosis ultrarrápida (del inglés *ultrafast endocytosis*), endocitosis mediada por clatrina y endocitosis en masa (del inglés *bulk endocytosis*) (Kononenko y Haucke, 2015) (Figura 6).

En el fenómeno de “*kiss and run*” no podemos hablar de endocitosis propiamente dicha ya que la fusión vesicular no es completa. Ocurre directamente en la zona activa e implica un rápido, y transitorio, ciclo de apertura y cierre del poro de fusión sin que ocurra el colapso completo de la vesícula, la cual mantiene su identidad molecular y, por lo tanto, no es necesario un proceso de fisión y reciclado vesicular en sí mismo (Alabi y Tsien, 2013).

Los conceptos de endocitosis mediada por clatrina, endocitosis masiva y endocitosis ultrarrápida serán ampliados a continuación.

2.2.2.1 Endocitosis mediada por clatrina

En este tipo de reciclamiento, tras la fusión vesicular con la membrana presináptica, la acción de distintas proteínas adaptadoras genera una invaginación cubierta de clatrina que, tras su desensamblaje, acaba formando una nueva vesícula preparada para rellenarse, de nuevo, con neurotransmisor.

La endocitosis mediada por clatrina comienza con la unión de proteínas adaptadoras a zonas de membrana enriquecidas en PI(4,5)P₂, lo cual conlleva la invaginación de esa región de membrana y ayuda a la unión de las moléculas de clatrina, que interaccionan con PI(4,5)P₂ (Owen y cols., 2004). Tras ese ensamblaje, denominado nucleación de la malla de clatrina, se forma, en la membrana plasmática, una profunda invaginación cubierta de clatrina, aún unida a la membrana por un cuello estrecho. La fisión de este cuello, para la completa gemación de la vesícula, depende de la actividad GTPasa de la dinamina. Una vez liberada, la vesícula pierde rápidamente su cobertura de clatrina, cuyo

Introducción

desensamblaje ocurre gracias a la actividad fosfatasa de la sinaptojanina, que elimina el fosfato de la posición 5 del PI(4,5)P₂ (Saheki y De Camilli, 2012).

La malla de clatrina está compuesta por dos capas, una interna que la conforman proteínas adaptadoras y una externa formada por la clatrina propiamente dicha. Entre las proteínas adaptadoras cabe destacar el papel de AP-2 que interacciona con motivos ricos en tirosina como los de la proteína de la vesícula sináptica SV2 (Haucke y De Camilli, 1999), y con motivos ricos en dileucinas como los presentes en los transportadores de neurotransmisores (Fei y cols., 2008).

Otra proteína adaptadora mayoritaria es AP180, que interacciona con sinaptobrevina a través de su dominio SNARE (Miller y cols., 2011). La proteína estonina-2 es otra proteína adaptadora, que junto con AP-2, juega un papel importante en la internalización del sensor de calcio, sinaptotagmina (Kononenko y cols., 2013). Teniendo en cuenta sus tipos de interacciones, parece que la función de las proteínas adaptadoras es la selección del fragmento de membrana a internalizar, atendiendo a la carga proteica que dicho fragmento presente.

En cuanto al motor que aporta la fuerza mecánica necesaria para la gemación de la vesícula, se atribuyó tradicionalmente a la propia clatrina, ya que el ensamblaje que adopta en forma de trisquel, parecía ser el motor molecular para esta reacción (Ungewickell y Branton, 1981). Sin embargo, en los últimos años se han descubierto diversas proteínas, denominadas “factores endocitóticos”, que parecen estar implicadas en la inducción de la curvatura de la membrana para la posterior gemación vesicular (Ford y cols., 2002), a través de la interacción de sus dominios BAR y F-BAR (Frost y cols., 2008). Entre las proteínas con dichos dominios BAR capaces de inducir curvatura en la membrana cabe destacar a la endofilina, implicada tanto en la coordinación de la curvatura de la membrana, como en la posterior fisión de la vesícula y desensamblaje de la malla de clatrina a través de interacciones con dinamina y sinaptojanina (Ringstad y cols., 2001). Pero, dado que se ha observado la formación de vesículas en ausencia de endofilina (aunque de forma menos eficiente), otras proteínas pueden asumir el papel de endofilina en la inducción de la curvatura de la membrana, como la anfifisina (Itoh y De Camilli, 2006). La sindapina es una proteína con la peculiaridad de poseer un dominio F-BAR distinto al canónico, lo que hace que pueda provocar curvaturas notablemente más abiertas en la membrana. Por este motivo se la ha relacionado

Introducción

con fenómenos de endocitosis en masa y formación de endosomas (Clayton y Cousin, 2009).

A pesar de que la malla de clatrina y sus adaptadores y proteínas asociadas, puedan inducir curvatura de la membrana plasmática y hacer que un punto de endocitosis se convierta en una profunda invaginación, la separación física de la vesícula cubierta de clatrina para formar una vesícula sináptica libre requiere la acción de la GTPasa dinamina (Saheki y De Camilli, 2012). La dinamina forma oligómeros en espiral en el cuello de las vesículas y media la fisión, un proceso que implica la hidrólisis de GTP (Ferguson y cols., 2007). La dinamina forma parte de la familia de GTPasas cuya actividad catalítica es dependiente de la dimerización del monómero con dicha actividad GTPasa (Chappie y cols., 2010; Ferguson y De Camilli, 2012; Gasper y cols., 2009). Diversos estudios han demostrado que dicha dimerización ocurre exclusivamente entre anillos paralelos de la espiral que se forma alrededor del cuello de la vesícula, y que la hidrólisis de GTP resulta en un cambio conformacional de dominios vecinos, lo cual provoca la contracción de la espiral de dinamina, esta contracción aporta la fuerza necesaria para la escisión final de la vesícula de la membrana plasmática (Chappie y cols., 2011; Ford y cols., 2011) (Figura 7). Muchas de las proteínas encargadas de reclutar a la dinamina son proteínas con dominios BAR encargadas de inducir la curvatura en la membrana. Estas, a su vez, tienen dominios de interacción con sinaptojanina, cuya actividad PI(4,5)P₂ fosfatasa coordina el proceso de desensamblaje de la malla de clatrina sugiriendo una unión funcional de ambos procesos (Itoh y De Camilli, 2006).

La sinaptojanina promueve la hidrólisis de PI(4,5)P₂ de la membrana plasmática lo cual elimina los sitios de unión de las proteínas adaptadoras de clatrina (Cremona y cols., 1999; Hayashi y cols., 2008). De forma paralela, es necesaria la acción de la ATPasa Hsc70 y de su cofactor, la auxilina (Guan y cols., 2010; Xing y cols., 2010). Es la acción combinada de ambas proteínas lo que convierte el desensamblaje de la clatrina en un proceso irreversible (Saheki y De Camilli, 2012). La auxilina se une a clatrina y a AP-2 y además interacciona con monofosfoinosítidos. Dado que la sinaptojanina es reclutada por la endofilina una vez concluida la fisión de la membrana, y que su acción fosfatasa transforma el PI(4,5)P₂ en PI4P, su acción no sólo elimina los sitios de unión para los adaptadores de clatrina, sino que además promueve la aparición de sitios de unión para auxilina (Guan y cols., 2010).

Introducción

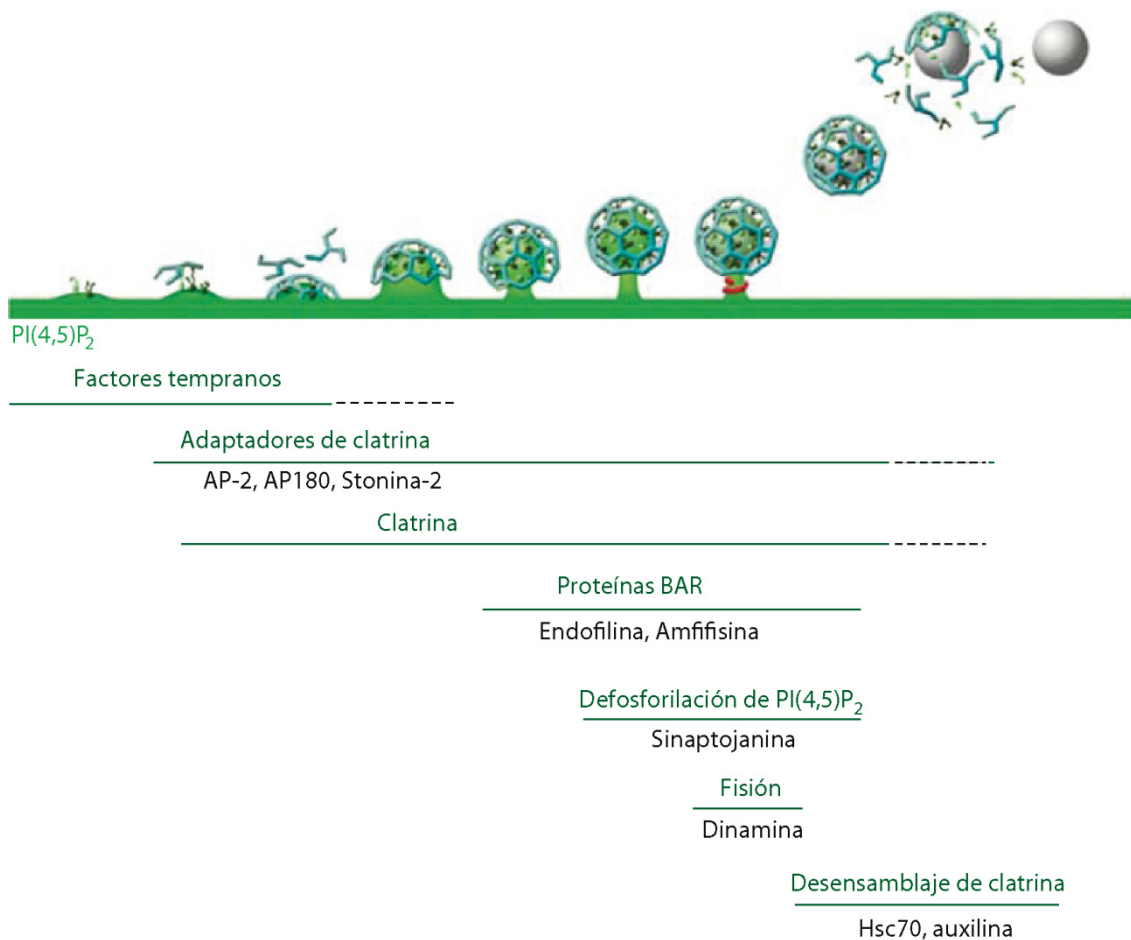


Figura 7: Reclutamiento secuencial de proteínas endocíticas durante la endocitosis mediada por clatrina, desde el inicio del proceso hasta la fisión completa de la vesícula y su liberación, así como el desensamblaje de la malla de clatrina. Adaptado de (Saheki y De Camilli, 2012).

2.2.2.2 Endocitosis masiva

La endocitosis en masa (del inglés *bulk endocytosis*) opera predominantemente con intensas condiciones de estimulación, dónde un elevado número de vesículas se funden con la membrana plasmática en un corto intervalo de tiempo. El exceso de membrana se recupera a través de la formación de grandes invaginaciones de membrana que después se fisionan y generan intermediarios endosomales (Clayton y cols., 2008; Hayashi y cols., 2008; Heuser y Reese, 1973).

Parece ser que la función prioritaria de este mecanismo de endocitosis no es la formación de vesículas para su inmediata disponibilidad, sino la de recuperar el exceso de membrana fusionada y, de esa manera, evitar un incremento de la

Introducción

superficie de la ZA, que sería de letéreo para el terminal presináptico (Clayton y Cousin, 2009). Varios trabajos sobre este tipo de endocitosis muestran que la endocitosis mediada por clatrina es un proceso saturable (Sankaranarayanan y Ryan, 2000) y que, una vez alcanzado el nivel de saturación, se dispara el proceso de endocitosis masiva (Clayton y Cousin, 2009).

El destino de estos endosomas formados en la endocitosis en masa es controvertido. Mientras que algunos trabajos muestran evidencias de la gemación de nuevas vesículas a partir de estas estructuras (Clayton y cols., 2009; Clayton y cols., 2008), otros, sin embargo, demuestran que dichos endosomas se acumulan sin rendir nuevas vesículas en los tiempos estudiados (Bartolome-Martin y cols., 2012; Perez Bay y cols., 2007).

Como muchos aspectos relacionados con este tipo de endocitosis, la maquinaria molecular que lo promueve, activa y desarrolla no está totalmente clara. Varios trabajos han mostrado evidencias de que el fenómeno que activa el mecanismo de endocitosis masiva es un ciclo de fosforilación/defosforilación de la dinamina 1, siendo la quinasa GSK3 la encargada de fosforilar la dinamina, y la calcineurina la fosfatasa correspondiente (Clayton y cols., 2009; Clayton y cols., 2010). La calcineurina, además, actuaría como sensor de actividad prolongada (Clayton y Cousin, 2009), y parece estar implicada en la gemación de nuevas vesículas a partir de los endosomas (Cheung y Cousin, 2013). A pesar de esto último, la dinamina parece un elemento prescindible en el fenómeno de la endocitosis masiva dado que se ha observado la formación de endosomas tras una actividad intensa en ausencia de dinamina 1 (Ferguson y cols., 2007; Hayashi y cols., 2008). Lo que parece fundamental es su interacción con la sindapina (Clayton y Cousin, 2009), otorgándole un papel más posicional que catalítico.

En el ciclo de fosforilación/defosforilación de la dinamina, la calcineurina promueve la defosforilación, dependiente de la entrada de calcio en el terminal presináptico, de las serinas 774 y 778 de la dinamina 1 (Clayton y Cousin, 2009; Clayton y cols., 2010) lo que promueve la interacción con la sindapina, proteína que gracias a sus dominios BAR característicos llevaría a la torsión y recuperación de grandes superficies de membrana (Figura 8). Tras el estímulo, la dinamina sufriría una refosforilación secuencial; primero se refosforila su residuo S778 a cargo de la Cdk5, y después S774 a cargo de GSK3 (Clayton y cols., 2010).

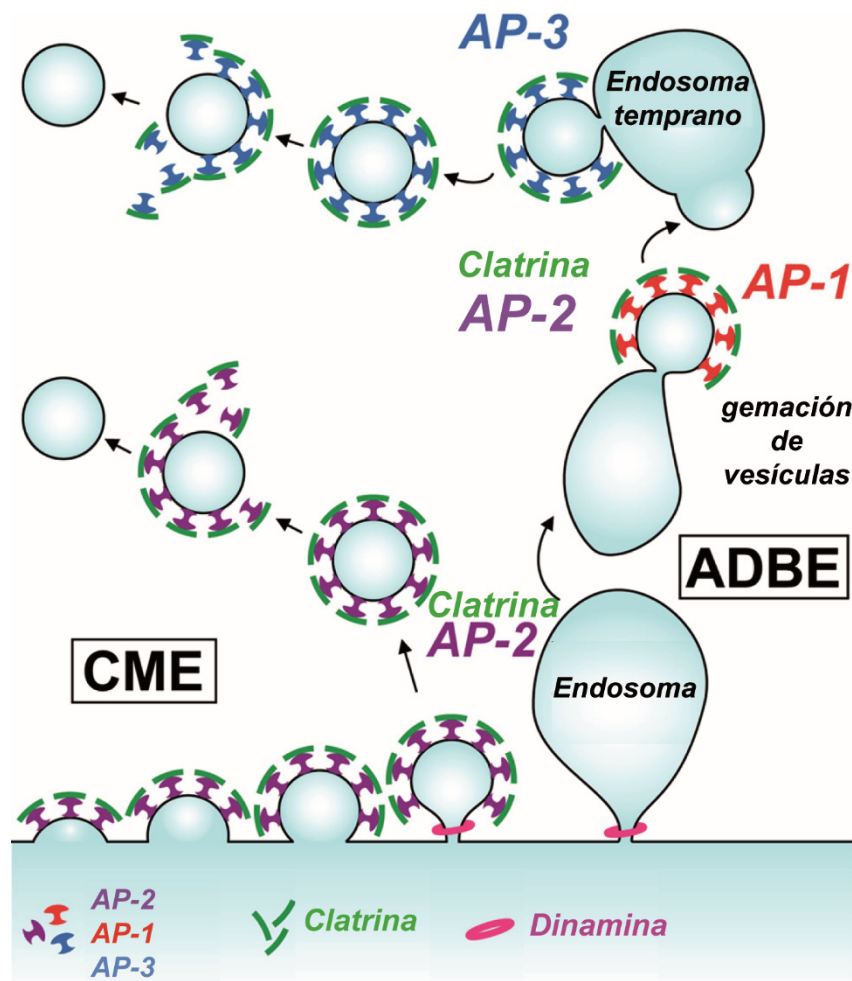


Figura 8: Modelo de los mecanismos moleculares que rigen la endocitosis mediada por clatrina (CME), en la que aparecen implicadas la clatrina y la proteína adaptadora AP-2, y la endocitosis masiva (ADBE, del inglés *Activity Dependent Bulk Endocytosis*), en la que la formación de endosomas puede implicar a dinamina, y cuya posterior gemación de vesículas podría implicar a las proteínas AP-1 y AP-3, o ser un mecanismo similar a la CME. Adaptado de (Cheung y Cousin, 2012).

Otro aspecto controvertido son las proteínas adaptadoras que intervienen en la gemación de vesículas a partir de estos endosomas. Existen evidencias de la implicación de las proteínas adaptadoras AP-1 y AP-3 en la gemación de nuevas vesículas desde estos endosomas, proceso que parece ser independiente de dinamina (Cheung y Cousin, 2012). Sin embargo, trabajos más recientes han demostrado la necesidad de AP-2 y clatrina en la formación de vesículas (sugiriendo que la gemación de vesículas desde los endosomas es un fenómeno

Introducción

similar, si no igual, a la endocitosis mediada por clatrina), aunque no son necesarias para la invaginación y formación de los endosomas desde la membrana (Kononenko y cols., 2014; Watanabe y cols., 2014). Otros autores defienden la tesis de que dicho proceso de reciclamiento vesicular a través de intermediarios endosomales, es un proceso independiente de dinamina-1, dinamina-3 y clatrina (Wu y cols., 2014).

2.2.2.3 Endocitosis ultrarrápida

Este modelo de endocitosis ha sido descrito recientemente en trabajos realizados en *C. Elegans* y neuronas hipocampales, combinando las técnicas de estimulación optogenética y análisis ultraestructurales tras una rápida congelación de la muestra sometiéndola a alta presión (Watanabe y cols., 2013a; Watanabe y cols., 2013b).

La endocitosis ultrarrápida ocurre inmediatamente después del estímulo que produce que las vesículas preparadas se fusionan completamente con la membrana plasmática, las membranas de dichas vesículas se recapturan a través de invaginaciones de aproximadamente 80 nm de diámetro, que aparecen entre 50 y 100 ms después del estímulo, flanqueando la zona activa. A pesar de la rapidez del proceso, se descartó que dichas estructuras se originaran mediante un mecanismo de *kiss and run*, ya que las estructuras originadas, en tamaño, eran equivalentes a unas cuatro vesículas, es decir, mucho más grandes que una vesícula sináptica (Watanabe y cols., 2013b). En estudios más recientes, los mismos autores observaron que la formación ultrarrápida de estas estructuras se mantenía en ausencia de clatrina, aunque dicha proteína era necesaria para la gemación de nuevas vesículas a partir de los endosomas (Watanabe y cols., 2014).

Los mecanismos moleculares que están detrás de este modelo de endocitosis, aún hoy, no están muy claros. Watanabe y colaboradores, usando diferentes estrategias farmacológicas, sugirieron la implicación en este proceso de la polimerización de actina y de la actividad GTPasa de la dinamina (Watanabe y cols., 2013b), aunque se necesitan evidencias más específicas para confirmarlo. Uno de los aspectos que más sorprende es la extrema velocidad de la fisión de membranas. Otros estudios han mostrado que el tiempo necesario para la fisión completa de las membranas, aunque depende de la cantidad de GTP disponible o

Introducción

de la elasticidad de la membrana, puede alcanzar segundos e incluso decenas de segundos (Morlot y cols., 2012), lo cual es significativamente más lento.

Por tanto, parece probable que este mecanismo de endocitosis ultrarrápida requiera, además de la dinamina, factores adicionales como la actina (Watanabe y cols., 2013b) o factores endocitóticos con dominios BAR, como la endofilina (Kononenko y cols., 2014).

2.3 Pools vesiculares

En el terminal presináptico existen diferentes tipos de vesículas, agrupadas en función de su susceptibilidad a ser liberadas ante la llegada de un estímulo. Estos diferentes tipos de vesículas con diferentes probabilidades de fusión se agrupan en los llamados “pools” (Rizzoli y Betz, 2005).

La clasificación aceptada separa las vesículas en tres grupos: el RRP (del inglés *Ready Releasable Pool*) o vesículas de liberación inmediata; las vesículas que, ante la llegada del estímulo, se movilizan y alcanzan la membrana para fusionarse con ella y, por lo tanto, contribuyen al evento exocitótico, conforman el pool de reciclamiento y por último, aquellas vesículas que no se movilizan durante el estímulo y que por lo tanto no contribuyen a la liberación de neurotransmisor al no sufrir exocitosis, componen el denominado pool de reserva (Alabi y Tsien, 2012).

Las vesículas del RRP son las que más alta probabilidad de liberación tienen ya que están molecularmente preparadas para ello. Por definición, son las primeras en liberarse, lo cual puede inducirse con un estímulo mínimo o con perfusión de sacarosa (Rosenmund y Stevens, 1996).

El pool de reciclamiento lo conforman vesículas que contribuyen a la neurotransmisión ante la llegada de un estímulo (Richards y cols., 2003). Por lo general este pool no supera el 15% de las vesículas de un terminal presináptico.

Por último, el pool de reserva está formado por vesículas que no sufren exocitosis ante estimulaciones de baja frecuencia y cuya movilización sólo se consigue con estimulaciones de alta intensidad (Rizzoli y Betz, 2005). Este pool parece constituir el 80-90% de las vesículas del terminal, aunque con experimentos que analizan la exocitosis acumulada durante un estímulo de alta intensidad se ha podido determinar que conforma el 50-60% del total vesicular (Kim y Ryan, 2010).

Introducción

Es importante destacar que el porcentaje del total vesicular que abarca cada grupo varía notablemente según la aproximación metodológica que se utilice para analizarlo. En concreto, en relación al pool de reciclamiento, con técnicas de microscopía electrónica se estima que no constituye más del 20% del total vesicular (Alabi y Tsien, 2012; Richards y cols., 2003; Rizzoli y Betz, 2005), y, sin embargo, mediante técnicas de imagen se ha calculado que prácticamente la totalidad de las vesículas se fusionan con la membrana y por lo tanto entran a formar parte de este grupo (Rose y cols., 2013) (Figura 9).

A día de hoy, se discute si es una cuestión posicional (Holderith y cols., 2012; Park y cols., 2012) o molecular (Hua y cols., 2011; Ramirez y Kavalali, 2012) lo que determina que una vesícula pertenezca a un pool o a otro. Algunos autores han descrito que el pool de reserva pudiera ser un reservorio de proteínas sinápticas para las vesículas de nueva formación (Denker y cols., 2011). Y estudios más recientes han mostrado que las vesículas se transportan de un terminal a otro redistribuyendo, de esta forma, el peso sináptico entre los terminales. Estos datos sugieren la existencia de un nuevo pool, denominado “superpool”, a partir del cual las vesículas pueden distribuirse entre los terminales presinápticos (Darcy y cols., 2006).

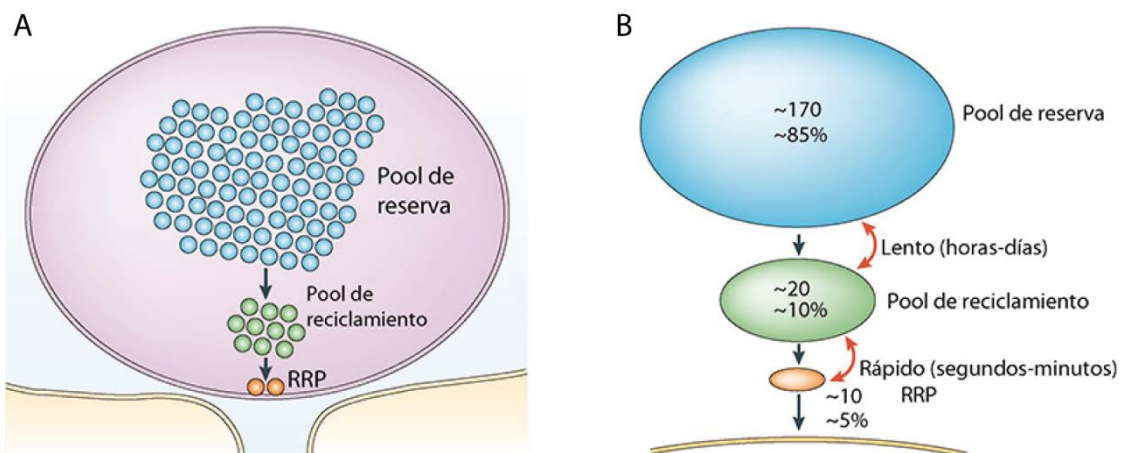


Figura 9: A) Esquema de la distribución de los distintos pools de vesículas sinápticas en un terminal. B) Proporción de los distintos pools de vesículas. Adaptado de (Rizzoli y Betz, 2005).

3. Señalización por NO/GMPc

En neuronas, el óxido nítrico (NO) es sintetizado por la enzima, dependiente de calcio/calmodulina, óxido nítrico sintasa (NOS), en respuesta a la entrada de calcio a través de los receptores NMDA. El NO es un mensajero gaseoso que estimula la síntesis de GMPc a través de su unión al grupo hemo de la guanilato ciclasa soluble (GCs), la cual, al activarse, cataliza la conversión de GTP en GMPc. El GMPc es un segundo mensajero que actúa a diferentes niveles en la fisiología celular, como regulando la activación de fosfodiesterasas, la apertura de canales iónicos sensibles a nucleótidos cíclicos y, fundamentalmente, la activación de proteínas quinasas dependientes de GMPc (Kandel, 2000) (Figura 10).

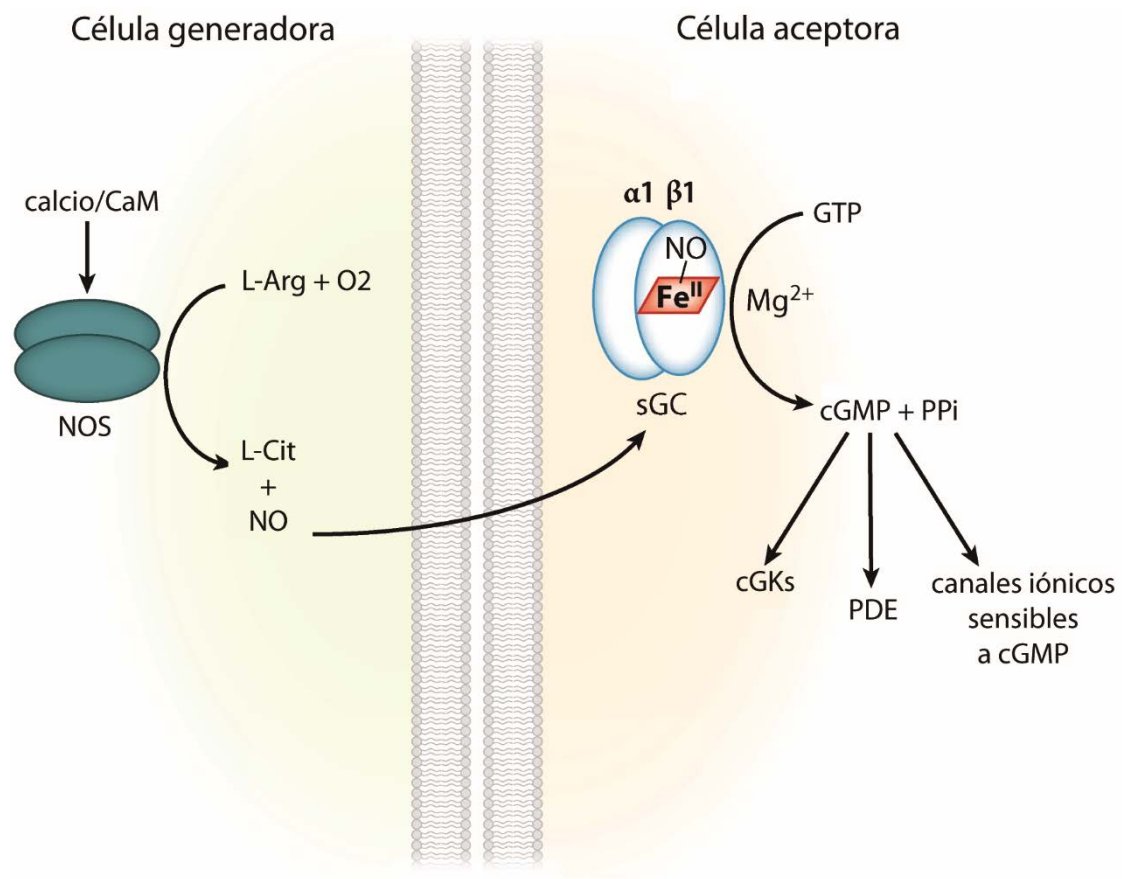


Figura 10: Diagrama de la cascada de señalización del NO/GMPc. El complejo Ca²⁺/CaM se une a la NOS. Al activarse, NOS cataliza la reacción de oxidación de la L-arginina, resultando como producto L-citulina y liberándose NO. El NO se une a la guanilato ciclasa soluble (sGC) la cual transforma el GTP presente en GMPc. El GMPc resultante actúa como segundo mensajero activando diferentes fosfodiesterasas, canales iónicos y proteínas quinasas. Adaptado de (Derbyshire y Marletta, 2012).

3.1 Óxido nítrico sintasas

Las óxido nítrico sintasas se describieron por primera vez en 1989 y sus tres principales isoformas fueron clonadas y purificadas entre 1991 y 1994. Estas tres isoformas son productos de diferentes genes y tienen diferente localización, regulación, propiedades catalíticas y sensibilidad a la inhibición por diferentes agentes farmacológicos. La NOSI o NOS neural (nNOS), fue la primera isoforma caracterizada y se encuentra predominantemente en tejido nervioso. La NOSII o NOS inducible (iNOS) se denomina así porque, si la NOSI y la NOSIII son constitutivas, la expresión de NOSII es inducida por la acción de diferentes citocinas en un amplio abanico de tejidos. La NOSIII o NOS endotelial (eNOS) se encuentra fundamentalmente en las células endoteliales del tejido vascular. Además de la expresión inducible de NOSII frente a la expresión constitutiva de NOSI y NOSIII, otra característica que las diferencia es la dependencia de calcio para su activación. Tanto NOSI como NOSIII exhiben una baja actividad basal y se estimulan en respuesta al incremento intracelular de calcio y la unión del complejo calcio/calmodulina. La NOSII tiene una gran afinidad por calmodulina pero su unión no depende de calcio y, por tanto, su actividad tampoco (Alderton y cols., 2001).

Todos los genes de las NOS tienen una estructura genómica similar, lo que sugiere un origen común. La estructura proteica se divide en dos dominios fundamentales: el dominio oxigenasa en el extremo N-terminal, región donde también se encuentran los sitios de unión para L-Arginina, el grupo hemo y la proteína calmodulina, y el dominio reductasa en el extremo C-terminal, dónde se encuentran sitios de unión para cofactores de óxido-reducción como FAD, FMN y NADPH (McMillan y Masters, 1995).

La clasificación de las sintasas purificadas en tres tipos se basa en sus propiedades físicas y bioquímicas, así como en su regulación por calcio, y su localización celular. Como muestra su estructura, todas las isoformas tienen sitios de unión a calmodulina, e interaccionan con ella de forma dependiente de calcio, en el caso de NOSI y NOSIII, o calcio independiente, en el caso de NOSII. En el caso de NOSI y III, las isoformas constitutivas, a bajas concentraciones de calcio están inactivas, y no unen calmodulina.

Todas ellas son estructuras homodiméricas y catalizan la misma reacción enzimática, la oxidación del grupo guanidinio de la L-arginina, utilizando O₂.

Introducción

Como resultado de esta reacción se libera L-citrulina y un radical libre, el NO (Schmidt y cols., 1993).

Aunque las tres isoformas están presentes en SNC, en neuronas granulares de cerebelo, el modelo de estudio de este trabajo, es la NOSI (NOS neural) la enzima que se expresa mayoritariamente (Contestabile, 2012). Existen varias isoformas de la NOSI, productos de procesamientos de *corte y empalme* alternativos de su RNAm. La forma más larga de NOS es la α NOSI, que contiene un dominio de unión PDZ que le permite unirse al dominio PDZ2 de la proteína PSD95 (Brenman y cols., 1996; Eliasson y cols., 1997) y localizarse en la postsinapsis. Los dominios PDZ son módulos proteicos de aproximadamente 100 aminoácidos que suelen aparecer en proteínas del citoesqueleto, y funcionan como adaptadores moleculares para formar complejos funcionales con las proteínas con las que interaccionan a través de sus extremos C-terminal (Russwurm y cols., 2001). PSD-95 fue de las primeras proteínas en las que se describió la presencia de este dominio PDZ. Existen otras dos isoformas de NOSI más cortas que carecen del dominio PDZ, la β NOSI y la γ NOSI, aunque esta última presenta bajos niveles de expresión en cerebro. En neuronas excitatorias la isoforma mayoritaria es la α NOSI, aunque también está presente la β NOSI, que se localiza tanto en la fracción citosólica soluble, como unida a complejos multiproteicos asociados a receptores NMDA y la masa molecular del monómero es de alrededor de 150 KDa. Se activa por la entrada de calcio, y, en concreto hay evidencias de su activación por la entrada de calcio a través de receptores NMDA en diferentes tipos neuronales (Contestabile, 2012; Jurado y cols., 2006). En neuronas granulares de cerebelo se ha demostrado que la activación de los receptores NMDA regula su expresión (Virgili y cols., 1998), la cual aumenta significativamente con el desarrollo de estas células en cultivo (Jurado y cols., 2004, 2005), de manera similar a lo que ocurre en el cerebelo *in vivo* (Jurado y cols., 2005; Wang y cols., 1998).

En este tipo neuronal, la inhibición de la NOSI se traduce en una inducción de la apoptosis mediante una disminución en la actividad de CREB y un bloqueo de la cascada Akt/PKB (Ciani y cols., 2002; Virgili y cols., 1998). En otros tipos neuronales se han encontrado evidencias del efecto de donadores de NO promoviendo el crecimiento y migración celular (Tegenge y Bicker, 2009). Este conjunto de datos evidencian la importancia de esta molécula en la supervivencia

Introducción

celular. La mayoría de estas acciones están mediadas por el GMPc sintetizado por la guanilato ciclasa soluble, principal diana fisiológica del NO.

3.2 Guanilato ciclasa

La enzima guanilato ciclasa (GC) cataliza la conversión de GTP en GMPc. Existen dos familias de esta enzima, la particulada y la soluble. La guanilato ciclasa particulada se encuentra localizada en la membrana plasmática y, a día de hoy, hay identificadas siete isoformas distintas (GC-A a GC-G), que están distribuidas en diferentes tejidos y se clasifican según su especificidad de ligando. La GC-A y GC-B son receptores de péptidos natriuréticos, GC-C de péptidos intestinales, y el resto se activan por unión a péptidos de distinta naturaleza (Muller y cols., 2009; Muller y cols., 2010). Todas las isoformas poseen una estructura homodimérica y cada monómero consiste en un extremo N-terminal extracelular, donde se localiza el sitio de unión a ligandos, y un extremo citoplasmático C-terminal, donde se localiza el centro catalítico. Ambos dominios están unidos por un dominio transmembrana (Derbyshire y Marletta, 2012).

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 (Budworth y cols., 1999; Harteneck y cols., 1991). 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 (Derbyshire y Marletta, 2012; Potter, 2011)

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 (Derbyshire y Marletta, 2012; Russwurm y Koesling, 2004; Zabel y cols., 2002). 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

Introducción

entre el Fe^{2+} y un residuo de His (105) de la subunidad β_1 (Derbyshire y Marletta, 2012; Winger y Marletta, 2005).

La GCs es la diana fisiológica más sensible para el NO, con una EC_{50} en el rango del nM bajo (Roy y cols., 2008), por ello cumple un papel crucial en la cascada de señalización iniciada por la síntesis de NO. Al unirse al grupo hemo de la GCs, el NO promueve un aumento en la actividad de la enzima. El consiguiente aumento en la concentración de GMPc resulta en la activación de sus sistemas efectores correspondientes, los cuales median los efectos inducidos por NO (Russwurm y cols., 2001). Además de su papel en la relajación muscular y sistema cardiovascular, el NO actúa como mensajero gaseoso difusible en numerosos mecanismos del sistema nervioso central y periférico (Garthwaite y Boulton, 1995).

El mecanismo de activación de la GCs por NO es complejo e implica la unión de éste al grupo hemo de la enzima. Para que el NO pueda unirse al grupo hemo de la GC, el hierro debe estar en estado ferroso (Fe^{2+}). El NO se une a la sexta posición de coordinación del Fe^{2+} , el cual está unido por su quinta posición de coordinación al residuo His 105 de la subunidad β_1 . La formación de este enlace lleva a la ruptura del enlace entre el Fe^{2+} y la Histidina, lo que provoca un cambio conformacional y la consiguiente activación de la enzima (Russwurm y Koesling, 2004).

En el SN se expresan las dos isoformas activas, $\alpha_1\beta_1$ y $\alpha_2\beta_1$, aunque no están igualmente distribuidas en todas las regiones, ni presentan una expresión constante a lo largo del desarrollo (Gibb y Garthwaite, 2001; Jurado y cols., 2003; Mergia y cols., 2003).

En cuanto a la localización subcelular de la guanilato ciclasa, se ha sugerido que el extremo C-terminal de la subunidad α_2 contiene una secuencia que permite su interacción con dominios PDZ. Las evidencias de interacción entre PSD-95 y NOS en sistema nervioso (Cho y cols., 1992), y posteriormente de su interacción con la GCs (Russwurm y cols., 2001), sugieren cual es la localización subcelular de la GCs. Por otro lado, diferentes trabajos han demostrado la localización sináptica de la guanilato ciclasa, tanto en soma como en axones y dendritas, en diferentes tipos neuronales (Burette y cols., 2002; Ding y Weinberg, 2006; Lopez-Jimenez y cols., 2009).

3.3 Sistemas efectores del GMPc

La activación de la guanilato ciclasa supone la transformación de GTP en GMPc. El incremento del GMPc promueve diferentes respuestas en la fisiología celular que están mediadas, fundamentalmente, por tres sistemas efectores: la apertura de canales iónicos activados por nucleótidos cíclicos, la activación o inhibición de fosfodiesterasas, y la activación de las proteínas quinasas dependientes de GMPc.

3.3.1 Canales iónicos

Los canales iónicos sensibles a GMPc (CNGC) son canales permeables a cationes, que se activan por la unión de nucleótidos cíclicos, y una vez abiertos, permiten el paso, principalmente, de Ca^{2+} y Na^+ al interior celular. Tienen estructura heterotetramérica, compuesta por combinaciones de subunidades tipo A (CNGA1-A4) y tipo B (CNGB1 y B3). Las diferentes combinaciones de subunidades les confieren diferente conductancia a calcio, observando ejemplos en los canales olfativos, donde las corrientes de calcio son significativamente mayores que en los canales de los fotorreceptores (Frings y cols., 1995; Hackos y Korenbrot, 1999). A diferencia de los receptores de neurotransmisores, no se desensibilizan por la continua interacción con sus ligandos (Kaupp y Seifert, 2002).

Aunque los CNGC se describieron originalmente en neuronas sensoriales, como fotorreceptores de la retina y neuronas del epitelio olfativo, están también presentes en neuronas no sensoriales (Kingston y cols., 1996, 1999; Lopez-Jimenez y cols., 2012) y, dado su alta permeabilidad a Ca^{2+} y Na^+ es lógico deducir que puedan tener un papel importante en la fisiología neuronal, afectando a mecanismos calcio dependientes. En los últimos años, se ha descrito la expresión de diferentes subunidades de estos canales en cerebelo, en concreto, en neuronas granulares de cerebelo se ha observado la presencia de subunidades de CNGA1 y CNGB1 y de canales sensibles a GMPc y su bloqueo crónico durante 96 horas reduce significativamente la densidad de los botones funcionales en células de 8DIV (Lopez-Jimenez y cols., 2012).

3.3.2 Fosfodiesterasas

Las fosfodiesterasas (PDEs) constituyen una compleja familia de enzimas que catalizan la hidrólisis de nucleótidos cíclicos a sus correspondientes nucleótidos 5'-monofosfato, regulando de esta manera las concentraciones celulares de dichos nucleótidos cíclicos. Las múltiples PDEs difieren en su especificidad de sustrato, la sensibilidad a inhibidores, sus mecanismos de regulación y su distribución tisular (Charbonneau y cols., 1986).

Todos los miembros de esta familia de enzimas contienen un dominio regulador y un dominio catalítico. Este último está constituido por un segmento de aproximadamente 250 aminoácidos altamente conservado entre todas las PDEs de mamíferos. Dicho segmento que contiene el dominio catalítico está localizado en el extremo C-terminal, y los dominios que interactúan con factores reguladores de su actividad están localizados en el extremo amino terminal (McAllister-Lucas y cols., 1995).

En mamíferos se han identificado 11 familias de PDEs. Mientras que las familias 1, 2, 3, 10 y 11 hidrolizan tanto AMPc como GMPc, las familias 5, 6 y 9 hidrolizan de forma específica GMPc. Las PDEs 5 se expresan de forma abundante en neuronas de Purkinje en el cerebelo, así como en neuronas piramidales de las regiones CA1, CA2 y CA3 y en giro dentado del hipocampo (van Staveren y cols., 2004). Las PDE de la familia 6 se describieron originalmente en retina aunque posteriormente se ha encontrado expresión de su ARNm en hipocampo (Jarnaess y Tasken, 2007). En relación a las PDEs de tipo 9, son las más abundantes en cerebelo y bulbo olfatorio (Andreeva y cols., 2001) y entre todas las PDE, son aquellas que presentan la más alta afinidad por el GMPc. Este hecho sugiere que podría ser la familia de PDE realmente implicada en la regulación de la vía NO/GMPc en cerebelo (Cudeiro y cols., 2000).

3.3.3 Proteínas quinasas dependientes de GMPc

Las proteínas quinasas dependientes de GMPc (cGKs) son otra de las dianas que actúan como sistema efector celular ante el incremento de GMPc. Estas proteínas son serina/treonina quinasas de las que se han identificado dos variantes, la tipo I (cGKI), localizada fundamentalmente en el citoplasma, y la tipo II (cGKII) asociada a membranas. La actividad de estas quinasas está implicada en multitud

Introducción

de procesos fisiológicos como son: agregación plaquetaria, relajación del músculo liso, secreción intestinal de agua, reabsorción de agua y sales en el túbulo distal de las nefronas, e integración de señales nerviosas (Hofmann y cols., 1992).

La cGKI es un dímero compuesto por dos subunidades idénticas de 75 KDa. Se han identificado dos isoformas (cGKI α y cGKI β), las cuales se generan por un procesamiento de *corte y empalme* alternativo del mismo gen. Estas dos isoformas son idénticas a excepción del extremo amino terminal, el cual contiene diferentes motivos de cremallera de leucina, los cuales son críticos para la interacciones con distintas proteínas (Kato y cols., 2012). Las isoformas de cGKI se encuentran en determinadas fracciones de membrana subcelulares, formando complejos con proteínas citosólicas, y libres en el citoplasma, aunque también pueden traslocarse de manera reversible de unos compartimentos a otros en respuesta a un incremento de GMPc (Wilson y cols., 2008). Su expresión en neuronas granulares de cerebelo disminuye a lo largo del desarrollo (Jurado y cols., 2004).

La cGKII es un dímero formado por dos subunidades idénticas de 80 KDa (Gamm y cols., 1995) y su expresión en cerebelo se encuentra localizada en células de la glía, así como en terminaciones neuronales (van Staveren y cols., 2004). En su estructura proteica se distinguen seis dominios, el segundo y el tercero son sitios de unión a GMPc, los cuales se diferencian en su afinidad por el ligando. Mientras que uno de ellos tiene mayor afinidad por el GMPc y por lo tanto, una velocidad de disociación más lenta, el segundo presenta menor afinidad y su velocidad de disociación es más rápida. Además de los sitios de unión a GMPc, presentan un dominio de dimerización, un dominio catalítico, uno autoinhibitorio y uno de autofosforilación (Lu y cols., 1999).

En ausencia de GMPc, el dominio catalítico de la cGKII está unido al dominio autoinhibitorio, manteniéndola inactiva. Cuando el GMPc se une a la quinasa, provoca un cambio conformacional que lleva a la autofosforilación del dominio autoinhibitorio lo cual disminuye su afinidad por el dominio catalítico, activando de esta manera la enzima (Wall y cols., 2003). El dominio N-terminal de cGKII está miristoilado, anclando a la enzima a la membrana plasmática u otras membranas celulares (Vaandrager y cols., 1996).

La función que estas enzimas desempeñan en la regulación de diferentes procesos del sistema digestivo y cardiovascular está ampliamente demostrada y contrastada por el trabajo de diferentes grupos de investigación (Hofmann y cols.,

Introducción

2006). En los últimos años se ha extendido su estudio al sistema nervioso, tanto con el empleo de herramientas farmacológicas, como con el diseño de ratones carentes de una, o de las dos isoformas de cGKs.

En el caso de la cGKI, hay evidencias de su implicación en la LTP en el hipocampo, dicha LTP se incrementaba en presencia de activadores de cGKs y su magnitud disminuía con la aplicación de inhibidores de cGKs (Zhuo y cols., 1994). Sin embargo, en contraste con estos resultados, la LTP hipocampal mostraba una magnitud normal en el ratón carente de cGKI o de cGKII (Kleppisch y cols., 1999). Análisis más profundos, utilizando estos ratones carentes de cGKI, mostraron que, a pesar de mostrar una transmisión sináptica y una LTP normal durante los primeros estímulos tetanizantes, se observaron defectos tras varios estímulos intensos y tetanizantes en las fibras de Schaffer. Esto sugería que, pese a que cGKI no desempeña ninguna función crítica en las primeras fases de la LTP, parecía fundamental en las fases más avanzadas, que necesitan la activación de procesos de síntesis proteica, la cual, presumiblemente, puede depender de la generación de NO y cGMP (Kleppisch y cols., 2003).

El estudio de las cGK ha llevado a hallazgos como su implicación en la regulación del reciclamiento vesicular (Eguchi y cols., 2012), a través del control de la síntesis de PI(4,5)P₂ (Taoufiq y cols., 2013).

Diferentes estudios llevados a cabo con el ratón KO para cGKII mostraron defectos comportamentales, como un incremento en la ansiedad, así como una sensibilidad reducida a los efectos hipnóticos del etanol (Werner y cols., 2004). Estudios más recientes han mostrado que el ratón que carece de cGKII muestra mayor coordinación motora en el test de *Rotating Rod*, así como un aprendizaje espacial reducido y una elevada sensibilidad a los estímulos sonoros cuando se compara con ratones de la cepa salvaje (Wincott y cols., 2013). Estos test comportamentales también mostraron déficits de memoria, así como, el previamente mencionado, incremento en el grado de ansiedad, ambos procesos regulados por la corteza prefrontal. Estos datos parecen indicar que la función de la corteza prefrontal es defectuosa en este ratón, esta región es fundamental en la integración de las señales y percepciones ambientales (Wincott y cols., 2014).

Por otro lado, el grupo de Wincott y colaboradores, como complemento a la batería de test comportamentales, realizó algunos ensayos bioquímicos que mostraron resultados sorprendentes. En concreto, analizaron la fosforilación de la

Introducción

subunidad GluA1 de los receptores AMPA, en su residuo de serina845, ya que cGKII fosforila este residuo. Curiosamente, GluA1 se mantenía fosforilada en neuronas hipocampales procedentes del ratón carente cGKII (Wincott y cols., 2013). Los autores, en ese momento, argumentaron que la ausencia del fenotipo esperado, posiblemente se debiera a la compensación por parte de otras quinasas. Recientemente, han descrito un mecanismo de compensación notablemente más complejo del esperado inicialmente, en neuronas hipocampales de ratones carentes de cGKII, que implica a los receptores AMPA permeables a calcio (CPARs) y los receptores de inositol 1,4,5 trifosfato (IP3Rs) y a la calcineurina (Kim y cols., 2015). En neuronas WT, un estímulo tetanizante induce la entrada de calcio a través de los receptores NMDA (Malenka y Bear, 2004), lo cual activa PKA y cGKII. La cGKII fosforila, entre otros, GluA1 para incrementar la expresión de receptores AMPA durante la LTP (Lee, 2006), e IP3Rs, lo cual incrementa la salida de calcio procedente del retículo endoplasmático. Este incremento de calcio activa la fosfatasa calcineurina, proteína que defosforila IP3Rs, creando un ciclo autorregulador (Heindorff y Baumann, 2014), y GluA1, promoviendo su endocitosis.

En neuronas cGKII KO, la fosforilación de IP3Rs está inhibida, lo cual lleva a una reducción en la salida de calcio del retículo. El bloqueo en la salida de calcio, suprime la actividad de calcineurina y esto estabiliza la fosforilación de GluA1 en Ser845 promoviendo la expresión de CPARs en membrana. Los autores, además, mostraron que estos CPARs promueven una forma de LTP independiente de la actividad de CaMKII y PKA, pero dependiente de los receptores NMDA y de la actividad PKC, lo cual forma parte del mecanismo de compensación que muestran estos ratones y cuya maquinaria molecular detallada está aún por definir (Kim y cols., 2015).

La actividad de cGKII también se ha relacionado con otro tipo de procesos como el crecimiento de las células de glioma, ya que se demostró la disrupción del gen de la cGKII, entre otros, en estas células (Johansson y cols., 2004). Esta disrupción del gen que codifica para cGKII, hizo pensar si la ausencia de actividad de esta proteína podría aportar una ventaja al crecimiento y avance del glioma. Poco después, se describió que la activación de cGKII bloqueaba a las células del glioma en fase G1, además de suprimir la fosforilación del proto-oncogen Akt (Swartling y cols., 2009). En humanos, se ha descrito en la clínica de los últimos años, un nuevo síndrome que cursa con retraso mental severo y deficiencias

motoras y físicas, asociado a deleciones en la región del cromosoma 4q21, donde se encuentra, entre otros, el gen de la cGKII (Bonnet y cols., 2010).

3.4 El papel del NO como mensajero retrógrado

El descubrimiento del óxido nítrico (NO) abrió un campo de investigación muy importante que ha contribuido al conocimiento de diferentes mecanismos de comunicación entre distintos tipos celulares. Algunos de los primeros estudios sobre el posible papel del NO en plasticidad sináptica pusieron de manifiesto que actuaba a nivel presináptico, sugiriendo su acción como mensajero retrógrado (O'Dell y cols., 1991). Su papel como mensajero retrógrado, sintetizado postsinápticamente tras la activación de receptores NMDA, ha sido claramente demostrado a lo largo de las dos últimas décadas, en las que numerosos trabajos han evidenciado sus acciones presinápticas y además se ha avanzado en el conocimiento de los mecanismos moleculares implicados (Feil y Kleppisch, 2008) debido a su posible implicación en la regulación de la excitabilidad neuronal. Diferentes trabajos a lo largo de los años han demostrado que el NO puede regular la excitabilidad neuronal (Prast y Philippu, 2001), o promover y aumentar la liberación de neurotransmisores (Arancio y cols., 1995). Aunque muchos de los estudios que han proporcionado evidencia sobre la acción retrógrada del NO se han llevado a cabo en cultivos celulares, que tienen la desventaja de ser células inmaduras, éstos se han podido confirmar utilizando otras preparaciones de neuronas maduras en cortes de hipocampo (O'Dell y cols., 1991), amígdala (Lange y cols., 2012) y cerebelo (Qiu y Knopfel, 2007), entre otros.

El NO regula la función presináptica actuando a varios niveles de forma coordinada o de manera sinérgica; se han descrito acciones sobre la zona activa y canales iónicos, sobre el reciclamiento vesicular, sobre el tamaño del RRP y sobre el crecimiento presináptico (Hardingham y cols., 2013).

En cuanto al mecanismo molecular implicado en la regulación del reciclamiento vesicular, se ha propuesto que el NO ajusta la velocidad del ciclo a la actividad sináptica (Lindskog y cols., 2010), de tal forma que el NO sintetizado en la región postsináptica a través de la activación de los receptores NMDA, difunde, y promueve un aumento en las concentraciones de PI(4,5)P₂ presináptico, como consecuencia de la activación de la PIP5K (Micheva y cols., 2001). El incremento

Introducción

del PI(4,5)P₂ acelera la endocitosis, y en general el reciclamiento vesicular (Cremona y De Camilli, 2001).

Este papel quedó demostrado por el grupo de Micheva y colaboradores cuando, tras demostrar, en neuronas hipocampales, la acción retrógrada del NO, que aumentaba los niveles de PI(4,5)P₂ presináptico (Micheva y cols., 2001), mostraron las siguientes evidencias: 1) Limitar la cantidad de PI(4,5)P₂, inhibiendo la quinasa implicada en su síntesis, se traducía en una notable reducción de la velocidad de endocitosis. 2) El bloqueo de los receptores NMDA o de la guanilato ciclasa reducía la velocidad de endocitosis de igual forma, efecto que quedaba eliminado al incubarse con donadores de NO o análogos de GMPc (Micheva y cols., 2003). Este efecto retrógrado de NO también lo sugerían otros trabajos en los que se mostró una localización postsináptica de NMDA y NOS, y presináptica de la guanilato ciclasa (Burette y cols., 2002).

La acción del NO y su vía de señalización dependiente de GMPc a nivel presináptico, y en concreto la regulación que ejerce sobre el reciclamiento vesicular, ha seguido estudiándose y, se han acumulado diversas evidencias de defectos endocitóticos tras el bloqueo de la ruta de señalización del NO en diferentes puntos, como ocurre al inhibir a la GCs. Experimentos en neuronas granulares con la sonda FM1-43 para monitorizar la eficacia de reciclamiento ante el estímulo, mostraron que, en presencia de ODQ, un inhibidor selectivo de la GCs, se enlentecía significativamente el reciclamiento vesicular (Lopez-Jimenez y cols., 2009).

En esta Tesis doctoral, se han observado resultados similares en células granulares, en las que el bloqueo de la vía se realizó a nivel de la proteína quinasa dependiente de GMPc tipo II (cGKII). En este caso, tanto la inhibición de la quinasa con estrategias farmacológicas, como su silenciamiento con siRNA específicos, se tradujeron en notables defectos endocitóticos monitorizados con distintas técnicas de imagen y corroborados con análisis ultraestructurales (Collado-Alsina y cols., 2014).

En los últimos años han aparecido diversos trabajos centrados en el estudio de las cGKs y su papel en la regulación del reciclamiento vesicular. Medidas de capacitancia en la sinapsis de Calyx de Held mostraron la implicación directa del NO sintetizado en la postsinapsis, sobre la regulación de la velocidad de endocitosis presináptica, demostrando el efecto enlentecedor sobre la endocitosis de diferentes sustancias farmacológicas como, quelantes de NO, bloqueantes de los receptores

Introducción

NMDA o inhibidores de cGKs, efectos que eran contrarrestados con la aplicación directa de GMPc. Por otro lado, se mostraron también evidencias de la implicación del PI(4,5)P₂ en esta vía, cuando la endocitosis presináptica se alteraba la inhibir la quinasa responsable de la síntesis de PI(4,5)P₂, fosfolípido que veía incrementada su síntesis con la activación de cGK (Eguchi y cols., 2012).

Estos datos, junto con los obtenidos por nuestro grupo en neuronas granulares de cerebelo, corroboran la importante función reguladora de la vía del NO/GMPc sobre el reciclamiento vesicular, actuando como mensajero retrógrado.

Aún con todo, el mecanismo por el cual la cGK actúa sobre la síntesis del PI(4,5)P₂, regulando de esta forma la velocidad y eficiencia de la endocitosis, es todavía objeto de estudio. Trabajos recientes apuntan a la implicación de la GTPasa monomérica RhoA, que también está implicada en diversos procesos sinápticos, como el crecimiento de las neuritas (Bito y cols., 2000), liberación de neurotransmisión (Gonzalez-Forero y cols., 2012) o el mantenimiento y consolidación de la potenciación a largo plazo o LTP (del inglés *Long Term Potentiation*), regulando la síntesis proteica necesaria para que dicha potenciación ocurra (Briz y cols., 2015). En otros tipos celulares, se ha descrito la acción de la ruta NO/GMPc incrementando la expresión de RhoA (Sauzeau y cols., 2003) y el efecto activador de RhoA sobre la quinasa PIP5K, enzima responsable de la síntesis de PI(4,5)P₂ (Oude Weernink y cols., 2000; Weernink y cols., 2004). Es por esta razón que se pensó en RhoA como probable nexo de unión entre la ruta del NO y la acción del PI(4,5)P₂ en la regulación del reciclamiento vesicular.

En la sinapsis de Calyx de Held, medidas de capacitancia mostraron una endocitosis notablemente enlentecida tras la aplicación del inhibidor farmacológico de RhoA, efecto que fue revertido con la coaplicación de PI(4,5)P₂. Por otro lado, el activador de RhoA contrarrestó los efectos del inhibidor de cGKs tanto en la velocidad endocitótica, como en la reducción de los niveles de PI(4,5)P₂ (Taoufiq y cols., 2013).

El conjunto de todos estos estudios muestran evidencias de la implicación de la vía del óxido nítrico en la regulación del reciclamiento vesicular, a través de su difusión y acción retrógrada sobre la presinapsis, así como de que, tanto la proteína RhoA y el PI(4,5)P₂ participan en el mecanismo molecular tras la activación de la GCs, síntesis de GMPc y activación de cGKs.

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

De las tres isoformas de enzimas que producen NO, las dos isoformas constitutivas, neural y endotelial (tipo I y tipo II), se expresan abundantemente en cerebelo (Campese y cols., 2007; Ihara y cols., 2006), y 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 NOSI es la isoforma que más se expresa, 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 NOSI aumenta a lo largo del desarrollo, de forma lenta durante la primera semana postnatal y solamente se muestran unos niveles detectables de inmunorreactividad 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 NOSI 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 GCs, también está presente en las neuronas granulares, habiéndose detectado las dos isoformas activas, $\alpha_1\beta_1$ o $\alpha_2\beta_1$ (Garthwaite, 2005; Jurado y cols., 2003; Wykes y Garthwaite, 2004). 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 (Jones y cols., 2008; Zabel y cols., 2002). 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 NOSI, 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 (Lopez-Jimenez y cols., 2009). Por otra parte, la acumulación de GMPc en respuesta a una estimulación con NMDA, también se observa tanto

Introducción

en el soma como en las fibras, indicando la presencia de GCs funcionales. 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; Lopez-Jimenez y cols., 2009).

El óxido nítrico es un importante modulador de la proliferación celular y de la neurogénesis (Pena-Altamira y cols., 2010; Peunova y Enikolopov, 1995; Villalobo, 2006). 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., 2006; Ciani y cols., 2004).

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; Lopez-Jimenez y cols., 2009). La expresión de NOS1 y GCs aumenta durante el desarrollo de las células granulares *in vitro*, así como en cerebelo (Jurado y cols., 2006; Jurado y cols., 2003). 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., 2006). 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). Así mismo, el GMPc sintetizado activa CNGC y la activación de estos canales es necesaria para la formación/estabilización de botones sinápticos funcionales (Lopez-Jimenez y cols., 2012).

Las neuronas granulares expresan los dos tipos de cGKs, la expresión de la cGKII aumenta con el desarrollo siguiendo un patrón similar al de la NOS1 y las subunidades α_2 y β_1 de GCs, mientras que la expresión de la cGKI disminuye (Jurado y cols., 2005). En trabajos previos del grupo se ha demostrado que en neuronas granulares mantenidas en cultivo 7-8 días, la activación de cGKII se traduce en un incremento de la subunidad GluA1 en membrana, acompañado de una mayor entrada de calcio en respuesta a la estimulación con AMPA (Incontro y cols., 2013). El hecho de que la expresión de cGKII aumente con el desarrollo de estas células, que se localice fundamentalmente en los terminales sinápticos, y los antecedentes bibliográficos anteriormente descritos, es lo que ha motivado que el

Introducción

presente trabajo de investigación se haya enfocado al estudio de la posible función de la cGKII en la regulación del ciclo vesicular.

II - OBJETIVOS

“Cree a aquellos que buscan la verdad.
Duda de los que la encuentran”

André Gide

II – OBJETIVOS

La implicación de la ruta de señalización NO/GMPc en fenómenos de plasticidad sináptica a largo plazo, supervivencia y desarrollo neuronal ha sido y, aún hoy sigue siendo, objeto de estudio en numerosos laboratorios de investigación. En muchos de estos procesos el NO actúa como mensajero retrógrado, sintetizado en la postsinapsis, regulando diferentes mecanismos presinápticos. Las neuronas granulares de cerebelo expresan distintas proteínas que integran esta vía de señalización de forma dependiente con el desarrollo y muchas de ellas se localizan en los compartimentos sinápticos. Los mecanismos bioquímicos iniciados por el óxido nítrico y su principal molécula efectora, el GMPc, forman parte de un complejo mecanismo que regula diferentes procesos presinápticos y han acaparado un enorme interés científico en las últimas décadas. En trabajos previos del grupo, se había demostrado que los niveles presinápticos de GMPc regulaban el reciclamiento vesicular, aunque no se había analizado el sistema efector implicado, ni la/s etapa/s del ciclo regulada/s. Por tanto, consideramos que sería importante analizar la implicación de las quinasas dependientes de GMPc, como principal sistema efector de este nucleótido cíclico, en el mecanismo de regulación y la/s etapa/s del ciclo afectada/s. En el presente trabajo de investigación se fijaron los siguientes objetivos:

1. Estudiar el reciclamiento vesicular sináptico en neuronas granulares de cerebelo de rata y analizar cómo afecta el bloqueo prolongado de los receptores NMDA a la eficacia del mismo.
2. Evaluar, con diferentes técnicas de imagen, la implicación de las quinasas dependientes de GMPc (cGKs), mediante su inhibición farmacológica, en la regulación del ciclo vesicular, estudiando las etapas del ciclo afectadas.
3. Analizar cómo afecta el silenciamiento de cGKII al reciclamiento vesicular inducido por estímulos intensos de diferente duración.
4. Estudiar el reciclamiento vesicular en neuronas granulares de cerebelo de ratón de una cepa salvaje (WT) o carentes de cGKII (cGKII KO) y analizar, en estas células, el efecto de la inhibición de la cGKI.

Objetivos

5. Realizar un estudio ultraestructural, mediante microscopia electrónica, en las diferentes condiciones experimentales, que facilite la interpretación de los resultados funcionales.

III - MATERIALES Y MÉTODOS

“No puedes crear la experiencia, debes experimentarla”

Albert Camus

III – MATERIALES Y MÉTODOS

1. Materiales

1.1. Material Biológico

Para la realización de los cultivos celulares, se utilizaron ratas albinas de la cepa Wistar de 7 días postnatales, que fueron suministradas por el animalario de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid. Los animales se mantuvieron con la madre hasta una hora antes del sacrificio.

Así mismo, se realizaron cultivos celulares de ratones de la cepa Sv/129, bien de genotipo silvestre (WT, del inglés, wild type), o bien carentes del gen que codifica para la quinasa dependiente de GMPc tipo II (cGKII^{-/-}). Estos animales fueron cedidos por el Dr. Franz Hofmann de la Universidad de Munich, y se han establecido y mantenido las colonias en el animalario de la Facultad de Medicina de la UCM.

Todos los procedimientos utilizados en este trabajo, tanto el manejo como el sacrificio de los animales, se realizó siguiendo las directrices éticas para la experimentación con animales y la normativa establecida tanto por la Comisión Europea (86/609/CEE), como por el Parlamento Europeo (2010/63/UE), que fueron aprobadas por el comité ético de la UCM.

1.2. Material de cultivo

El kit de digestión enzimática con papaína (Papain Dissociation System) se adquirió de Worthington (NJ, EE.UU.; nº cat: LK003160).

El medio de cultivo Neurobasal A (nº cat: 10888-022), el suplemento del medio de cultivo B-27 (nº cat: 17504044) y la fuente de glutamina de liberación lenta Glutamax (nº cat: 35050038) se adquirieron de Invitrogen, Life Technologies (CA, EE.UU.)

De Sigma-Aldrich (MO, EE.UU.) se adquirió: citosina β -D-arabinofuranósido, inhibidor de la replicación del DNA (cat nº: C1768), solución antibiótica-antimicótica (nº cat: A5955), EBSS (Earle's Balanced Salt Solution; nº cat: E6267) y Poli-L-lisina como sustrato adherente (cat nº: P4707).

Para la realización de los cultivos se usó un agitador orbital modelo WY-100 de COMECTA (Barcelona, España), un incubador HERACell de Thermo Fisher

Materiales y Métodos

Scientific (NC, EE.UU.), y una cabina de flujo PV-30 de Telstar (Terrassa, España).

Cuando fue necesario transfectar se utilizó el equipo Amaxa Nucleofector II de Amaxa Biosystems (Colonia, Alemania), así como el Kit para electroporación de neuronas de rata, Rat Neuron Nucleofector Kit, de Lonza (Basilea, Suiza; n° cat: VPG-1003).

1.3. Genotipado

El genotipado de los ratones se realizó con el kit comercial Wizard SV Genomic DNA Purification System (n° cat: A2361). Tanto el kit como la Taq polimerasa (n° cat: M7805), proteinasa K (n° cat: V3021) y la mezcla de nucleótidos (n° cat: C1141) se compraron a Promega Corporation (Madison, EE.UU.).

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se realizó en un termociclador modelo Mastercycler personal de Eppendorf (Madrid, España).

La agarosa se compró a Sigma-Aldrich (MO, EE.UU.) (n° cat: A9539)

La tinción del gel para electroforesis se llevó a cabo con SYBR Safe de Invitrogen (n° cat: S33102; CA, EE.UU.), y el marcador de pesos moleculares (100-1250 pares de bases) se obtuvo de Real Durviz S.L. (Valencia, España).

La electroforesis de los geles se realizó empleando el sistema Hoefer miniVe alimentado por una fuente modelo EPS 601 de Amersham Pharmacia (Reino Unido).

Para la toma de imágenes de los geles se empleó el dispositivo Fluor S Multimager de Bio-Rad Laboratories (CA, EE.UU.).

1.4. Equipos

1.4.1. Adquisición de imágenes

Tanto para la realización de experimentos de imagen en célula viva como para la adquisición de imágenes de inmunofluorecencia, se utilizó un microscopio Nikon (Japón) modelo Eclipse TE-2000S con un objetivo de inmersión en aceite Nikon CFI plan Apo VC 60x con apertura numérica de 1.4 y una cámara CCD modelo iXon^{EM}+DU885 de Andor Technology (Belfast, Irlanda).

Las muestras con fluoróforos fueron excitadas con un monocromador de la marca Kinetic Imaging (Nottingham, Reino Unido).

En los experimentos de imagen en célula viva, las células se mantuvieron en perfusión continua utilizando una cámara de perfusión modelo PH5, y un sistema de perfusión VC6. La temperatura se mantuvo constante a 37°C empleando un termostizador modelo TC-344B. Todo ello de la marca Warner Instruments (CT, EE.UU.).

Las imágenes de microscopía electrónica se tomaron empleando un microscopio JEM1010 de la marca JEOL (Tokyo, Japón) del Centro Nacional de Microscopía Electrónica.

1.4.2. Detección de proteínas

Para la electroforesis en geles de poliacrilamida y transferencia a membranas se usó el sistema Mini-Protean Tetra Cell de Bio-Rad (CA, EE.UU.), y para la posterior detección de proteínas en membranas se empleó el sistema Odyssey de Li-Cor Biosciences (NE, EE.UU.).

1.5. Reactivos y fármacos

1.5.1 Microscopía Electrónica

Merck (Ma, EE.UU) suministró el óxido de propileno (n° cat: 818567), necesario para despegar la monocapa de células de la placa de cultivo, y ferrocianuro potásico (n° cat: 104971).

De Sigma-Aldrich (MO, EE.UU) se obtuvo glutaraldehído grado I para microscopía electrónica (n° cat: G5882).

De Electron Microscopy Sciences (PA, EE.UU) se adquirió tetróxido de osmio (OsO₄; n° cat: 19170).

El kit de resina SPURR (n° cat: S024D) utilizado para la inclusión de las muestras de obtuvo de TAAB (Berkshire, Reino Unido).

1.5.2. Anticuerpos primarios

Los anticuerpos primarios utilizados en este trabajo fueron suministrados por las siguientes casas comerciales:

- MBL International Corporations (MA, EE.UU.): anticuerpo policlonal de conejo anti-cGKs (proteínas quinasas dependientes de GMPc I y II; n° cat: JM-3452-100)
- Sigma-Aldrich (MO, EE.UU.): anticuerpo monoclonal de ratón anti- β tubulina (n° cat: TO198)

1.5.3. Anticuerpos secundarios, portaobjetos y cubreobjetos

Los anticuerpos secundarios marcados con fluoróforos excitables en el infrarrojo utilizados en la técnica de western blot se obtuvieron de Li-Cor Biosciences (NE, EE.UU.): anticuerpo policlonal de cabra anti-ratón IRDye 680 (n° cat: 926-32220) y anticuerpo policlonal de cabra anti-conejo IRDye 800 CW (n° cat: 926-32211).

Los cubreobjetos de vidrio de 15mm de diámetro (n° cat: CB00150RA1) y los portaobjetos de vidrio de 26x76 mm (n° cat: AD00000112E) los suministró Mentzel-Gläser (Braunschweig, Alemania).

1.5.4. Extracción y detección de proteínas

La extracción de proteínas totales se llevó a cabo utilizando tampón RIPA (n° cat: 11834141) y un kit de inhibidores de proteasas y fosfatasa (n° cat: 10085973), ambos de Thermo-Fisher Scientific (NC, EE.UU).

De Bio-Rad (CA, EE.UU) se adquirió la solución de acrilamida/bisacrilamida 37,5:1 al 40% (n° cat: 161-0148), el dodecil sulfato sódico (SDS, n° cat: 161-0301), TEMED (n° cat: 161-0800), persulfato de amonio (APS; n° cat: 161-0700), tris base purificado (n° cat: 161-0716), membranas de nitrocelulosa (n° cat: 162-0115), β -mercaptoetanol (n° cat: 161-0710), glicina (n° cat: 161-0718), patrones de peso molecular 10-250 KDa (n° cat: 161-0373) y reactivo Bradford para la cuantificación de proteínas (n° cat: 500-0205).

La solución de bloqueo Odyssey blocking Buffer se obtuvo de Li-Cor Bioscience (NE, EE.UU; n° cat: 927-40000).

1.5.5. Experimentos de imagen en célula viva

Todas las sales se adquirieron a Merck-Milipore.

La sonda fluorescente FM1-43 utilizada como trazador del ciclo vesicular se adquirió de Invitrogen Life Technologies (CA, EE.UU.) (n° cat: T35356).

1.5.6. Fármacos

- Ascent Scientific (Cambridge, Reino Unido): Bafilomicina A1, inhibidor de V-ATPasas (nº cat: Asc-497).
- Biolog (Bremen, Alemania): 8-Br-GMPc (-8-bromoguanosina 3',5' -monofosfato cíclico), análogo de GMPc (nº cat: B004).
- Calbiochem (CA, EE.UU): KT5823, inhibidor de las proteínas quinasas dependientes de GMPc (nº cat: 420321).
- Sigma-Aldrich (MO, EE.UU): D-APV (D-2-amino-5-fosfonopentanoico), antagonista competitivo del receptor NMDA (nº cat: A8054), y MK-801, inhibidor no competitivo dependiente de actividad del receptor NMDA (nº cat: M107).

1.5.7. Silenciamiento de proteínas

- Thermo Scientific -Dharmacon (CA, EE.UU): ARN de interferencia para silenciar PKGII (proteína quinasa dependiente de GMPc tipo II; nº cat: A-092722-15) y ARN de interferencia control, secuencia aleatoria que no tiene diana en el genoma de la rata (nº cat: D-001960-01-05). Medio de cultivo para la incubación con el ARN de interferencia (Accell siRNA Delivery Media; nº cat: B-005000-100) y tampón 5x para la reconstitución de ambos ARN de interferencia (5x siRNA Buffer; nº cat: B-002000-UB-100).
- Qiagen Iberia (Madrid, España): RNeasy Plus Mini Kit (nº cat: 74134) para la extracción de ARN.
- Applied Biosystems Life Technologies (CA, EE.UU): High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (nº cat: 4368814), para la reacción de transcripción inversa del ARNm. TaqMan® Gene Expression Master Mix Reagents (nº cat: 4369016).

2. Métodos

2.1. Cultivo de neuronas granulares como modelo de estudio de la sinapsis glutamatérgica

Todos los experimentos descritos en este trabajo se realizaron sobre cultivos primarios de neuronas granulares de cerebelo, utilizado como modelo de estudio del funcionamiento de la sinapsis glutamatérgica. Se realizaron cultivos tanto de ratas Wistar de 7 días postnatales, como de ratones Sv/129, WT o cGKII^{-/-} de 5

días postnatales. Este tipo neuronal puede obtenerse a varios días postnatales debido a la amplia ventana temporal proliferativa de estas células.

2.1.1. Polilisinado de cubreobjetos y/o placas de cultivo

Para la correcta adhesión de las células sobre el vidrio de los cubreobjetos es necesario un pretratamiento con poli-L-lisina, de forma que se forme una matriz sobre la cual las neuronas se adhieran. Para ello, los cubreobjetos se sumergieron en HCl 1,5M durante 20 minutos, se lavaron 3 veces con abundante agua estéril y cuando se secaron se cubrieron con, aproximadamente, 100µl de poli-L-lisina 0,1 mg/ml cada cubreobjetos y se mantuvo durante 3 horas a 37°C. Posteriormente, se lavaron de nuevo 3 veces con agua estéril y, tras el último lavado, los cubreobjetos se colocaron en los pocillos de las placas de cultivo y se dejaron secar al aire en condiciones de esterilidad.

En las placas de cultivo de 6 pocillos no es necesario el tratamiento con HCL 1,5M, de forma que se procedió a cubrir el fondo del pocillo con poli-L-lisina 0,1 mg/ml directamente y, tras mantenerla 3 horas se lavaron con agua estéril y se dejaron secar.

2.1.2. Protocolo de cultivo

Los animales se sacrificaron por decapitación, se extrajo el cerebelo y se eliminaron las meninges, vasos y capilares sanguíneos en EBSS frío. Una vez limpio el tejido, se transfirió a una solución con 12,5U/ml de papaína, 600U de DNAasa I, 2mM CaCl₂ y 2mM MgCl₂, procediendo, en primer lugar, a una digestión mecánica, los cerebelos se trituraron con tijeras de punta curva, y posteriormente se realizó una digestión enzimática durante 50 minutos a 37°C en un agitador orbital (250 r.p.m.), que ayuda a la disgregación del tejido.

Transcurridos los 50 minutos, la mezcla de células y tejido se pipeteó varias veces con una pipeta de 10ml, evitando la formación de burbujas, para finalizar la disgregación celular y la mezcla resultante se centrifugó durante 5 minutos a 110xg. El sobrenadante se descartó y el precipitado se resuspendió en una solución de ovomucoide a 1 mg/ml en EBSS. Dicha solución se añadió sobre una solución de ovomucoide a 10 mg/ml en EBSS y se centrifugó 5 minutos a 110xg. El precipitado resultante, que contiene las células, se resuspendió en medio de cultivo Neurobasal A y se procedió al conteo.

Materiales y Métodos

Se preparó una dilución 1:10 (v/v) de las células del paso anterior. De esta dilución 1:10 se preparó otra dilución 1:2 (v/v) con azul tripán y se contaron las células en una cámara de Neubauer. La densidad celular obtenida (en cel/ml), se calculó según la siguiente fórmula:

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

Donde el factor de dilución es 20 (1:10 en la primera dilución y 1:2 en la dilución con azul tripán), y 10^4 se obtiene de dividir el número de células contadas entre el volumen de cada cuadro de la cámara Neubauer, que es 10^{-4} ml.

Posteriormente, las células se sembraron en medio Neurobasal A suplementado con B27 1x, solución antibiótica-antimicótica 1x y concentración final de KCl de 25mM. Dependiendo del tipo de experimento a realizar, las densidades de siembra fueron distintas. Para imagen en célula viva, microscopía electrónica en cubreobjetos, e inmunocitofluorescencia, la densidad fue 3×10^5 células/cubreobjeto. Para extracción de proteínas, extracción de ARNm y microscopía electrónica en monocapa levantada, $3-4 \times 10^6$ células/pocillo en placas de 6 pocillos. A las 24 horas de cultivo, se sustituyó el medio por medio fresco con todos los suplementos correspondientes, al que se le añadió citosina arabinósido $10 \mu\text{M}$ para evitar la proliferación de la glía.

2.1.3. Transfección mediante electroporación

Determinados cultivos requirieron de una electroporación a 0 DIV para transfectar con un plásmido que contiene el cDNA del transportador vesicular de glutamato unido a una GFP modificada. Esto permite monitorizar el ciclo exo/endocitótico registrando cambios en la fluorescencia de GFP, asociados a los cambios de pH que ocurren en el interior vesicular durante los diferentes eventos de exo y endocitosis que conforman el ciclo vesicular. Se le denomina plásmido vGlut1-pHluorina.

Para llevar a cabo la electroporación de este plásmido, de la suspensión de células en Neurobasal A obtenida se separaron $4-5 \times 10^6$ células por electroporación, en distintos tubos eppendorf de 1,5ml. Posteriormente se centrifugaron durante 2 minutos a $245 \times g$ y las células se resuspendieron en $100 \mu\text{l}$ de Rat Nucleofector

Materiales y Métodos

Solution a los que se añadió 1µg de plásmido. La mezcla se incubó durante 10 minutos y se traspasó a una cubeta de electroporación estéril. La electroporación se llevó a cabo en un equipo AMAXA con el programa O-003, con el que se obtiene una elevada eficiencia de transfección y elevada viabilidad según habían descrito previamente López-Jiménez y colaboradores (Lopez-Jimenez y cols., 2009).

A la cubeta en la que se ha realizado la transfección se añadieron 500µl de Neurobasal A atemperado a 37°C y con todos los suplementos necesarios para el cultivo, e inmediatamente se transfirieron los 600µl totales a un tubo eppendorf de 1,5ml limpio y estéril hasta la siembra. Las células se sembraron en placas de 6 pocillos, con 3 cubreobjetos por pocillo. Es recomendable realizar esta siembra sobre cubreobjetos previamente sumergidos en medio de cultivo atemperado y no sobre cubreobjetos secos. Pasadas 2 horas se añadió Neurobasal A suplementado y atemperado hasta completar 3 ml por pocillo. El cambio de medio por medio fresco a las 24 horas de la siembra se realizó sin añadir citosina arabinósido.

2.2 Silenciamiento de proteínas mediante siRNAs específicos

El silenciamiento génico es un mecanismo de vigilancia que está presente en la mayoría de los organismos eucariotas para controlar la expresión de genes endógenos y exógenos, en animales se denomina interferencia de ARN (RNAi). El componente más importante del mecanismo de silenciamiento es el ARN de pequeño tamaño, que puede ser introducido exógenamente o sintetizado intracelularmente. Cuando estas moléculas de ARN alcanzan el citoplasma, sus extremos 5' son fosforilados y son, entonces, reconocidas por la ARNasa III *Dicer* que corta esta molécula en fragmentos más pequeños denominados pequeños ARN interferentes (pARNi) (del inglés, small interference RNA, siRNA). La proteína *Dicer*, actúa junto con el factor de unión a ARN de doble cadena, *R2D2*. La interacción de ambos conduce a estos pARNi hacia el complejo *RISC* (*RNA-induced silencing complex*).

Los pARNi se incorporan al complejo RISC a través de su componente AGO2 (Argonauta 2) y es en este momento cuando la cadena acompañante es cortada por la mitad, dejando exclusivamente la cadena guía de ARN unida a AGO2. En esta situación, el complejo RISC está activo y la cadena guía reconocerá

Materiales y Métodos

por complementariedad de bases el fragmento de ARN mensajero (ARNm) al cual unirse.

Una vez el pARNi está unido al ARNm, RISC se vale de la capacidad endonucleasa de AGO2 para fragmentar el ARNm impidiendo de esta forma su traducción.

Al liberarse los fragmentos de ARNm generados, el complejo RISC vuelve a estar activo y preparado para reconocer otra molécula de ARNm y degradarla. De esta forma se entiende la gran capacidad de silenciamiento de este proceso, ya que una única molécula de pARNi es capaz de degradar múltiples copias de ARNm, y su gran especificidad, ya que esta degradación ocurre gracias al reconocimiento de cadenas por complementariedad de bases (Figura 1) (Dominska y Dykxhoorn, 2010).

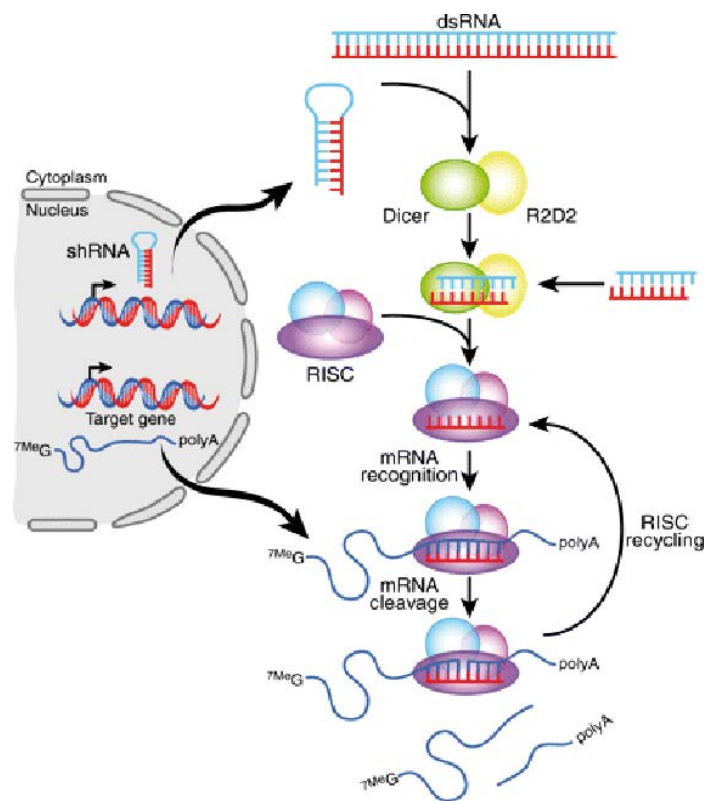


Figura 1: Mecanismo de silenciamiento génico inducido por ARN de interferencia (Modificado de (Dominska y Dykxhoorn, 2010)).

2.2.1. Transfección del siRNA

En la realización de este trabajo se han utilizado los siRNAs de Dharmacon, que están modificados químicamente para aumentar su permeabilidad y su estabilidad. Las recomendaciones del fabricante indican que el mayor silenciamiento se alcanza a las 72 o 96 horas después de la transfección. Seleccionamos 96 horas post-transfección para realizar los experimentos funcionales, tras comprobar el silenciamiento, de modo que para realizar experimentos a 7 DIV era necesario proceder con la transfección a 3DIV.

La transfección se llevó a cabo, bien con un siRNA diseñado para silenciar la expresión de la cGKII (secuencia diana: CUUUCAAGGACAAUAAUA), o bien con un siRNA de secuencia aleatoria, que no presenta complementariedad con ninguna secuencia del genoma de la rata, como control negativo. Los siRNAs se diluyeron en el medio de aplicación a una concentración 1 μ M y se realizó un cambio de medio a las células sustituyendo el Neurobasal por este medio con todos los suplementos (B27, solución antibiótica-antimicótica, KCl y Glutamax) y el siRNA correspondiente. El siRNA control se utilizó marcado fluorescentemente, de forma que pudiera utilizarse para determinar la eficacia de incorporación a las células (Figura 2).

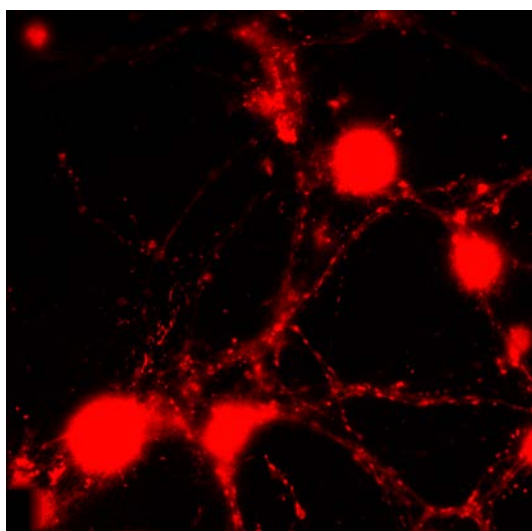


Figura 2: Eficacia de transfección utilizando siRNA fluorescentes.

2.2.2. Medidas de silenciamiento

Para confirmar el silenciamiento, se midieron los niveles de ARNm a las 24 y 96 horas después de la transfección mediante PCR cuantitativa utilizando oligonucleótidos y sondas Taqman. Se utilizaron TaqMan Gene Expression Assay (Applied Biosystems; Life Technologies) Rn00435938 para cGKII y Rn01775763 para GAPDH (Jurado y cols., 2003), utilizado como control endógeno.

2.2.2.1 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 mantenidas en cultivo en placas de 6 pocillos, sembradas a una densidad de 3×10^6 células/pocillo ó células recién aisladas. Se utilizó el kit (RNAeasy Mini kit) 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 desnaturalizante 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 5, 8S, 5S y de transferencia quedaron en el eluido. Tras una serie de lavados se extrajo el ARN en agua libre de ARNasas.

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

2.2.2.2 Reacción de Transcripción Inversa

Una vez obtenido el ARN se procedió a realizar la reacción de transcripción inversa. Esta reacción se llevó a cabo utilizando el kit de retrotranscripción de Applied Biosystems. Para ello se usaron, en un tampón apropiado, 3,125U/ μ l de transcriptasa inversa, 0,5U/ μ l de inhibidor de ARNasa, MgCl₂5,5mM, dATP/dCTP/dGTP/dUTP (0,5mM cada uno), hexanucleótidos 2,5mM y 1 μ g de ARN, para un volumen final de 50 μ L por tubo.

El protocolo de la reacción fue el siguiente:

- Incubación: 10 minutos, 25°C
- Transcripción inversa: 30 minutos, 48°C
- Inactivación de la enzima: 5 minutos, 95°C

2.2.2.3 PCR cuantitativa. Método de las 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 se está desarrollando la reacción en cadena de la polimerasa. La cuantificación se basa en la detección del producto de ADN molde amplificado, siendo su aparición 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 está relacionada con la cantidad de ARNm codificante para el gen objeto de estudio. Las sondas Taqman son oligonucleótidos complementarios a una secuencia de la región a amplificar. Estas sondas tienen unidos a sus extremos dos fluoróforos, FAM o VIC en el extremo 5' y TAMRA en el extremo 3'. Cuando ambos fluoróforos están lo suficientemente cercanos, el fluoróforo TAMRA absorbe la luz emitida por FAM o VIC, pero cuando la sonda se degrada por el extremo 5', FAM o VIC se liberan, alejándose de TAMRA, de forma que la fluorescencia que emiten es detectable (Figura 3). Para ello es necesario usar una polimerasa con actividad 5' exonucleasa. En este trabajo utilizamos la polimerasa AmplitaqGold de Applied Biosystems.

En el momento en el que se libera FAM comienza a detectarse fluorescencia, sin embargo, es necesario que se acumule una cierta cantidad de amplicón para que la fluorescencia que se detecta sea significativamente diferente a la fluorescencia basal. Esto ocurre en el ciclo en el que comienza la fase exponencial de la PCR y su eficiencia es máxima, a este valor se le denomina Ct.

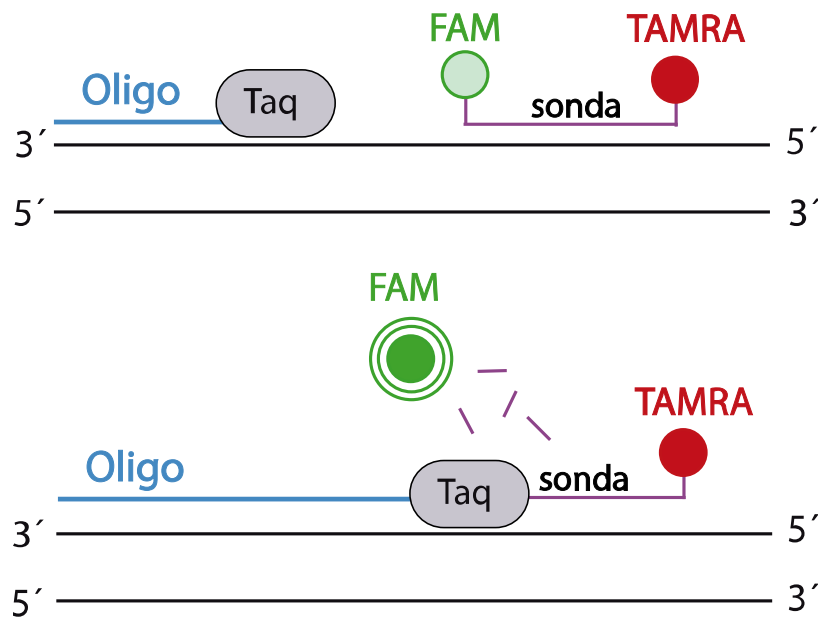


Figura 3: Esquema del mecanismo de detección de los productos PCR por el método de las sondas Taqman

Paralelamente al gen de interés, se analiza otro gen cuya expresión no varíe temporalmente ni como consecuencia de los tratamientos utilizados. Este gen se utiliza como control interno para evitar que problemas de pipeteo o imprecisiones de la técnica afecten a la cuantificación. En este trabajo utilizamos como control interno la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH). Con este control interno, se procede a la normalización de los Ct de las muestras a analizar con el Ct obtenido en la amplificación de la GAPDH, eliminando de esta forma variaciones debidas a pequeñas variaciones en el ADNc de partida.

<i>PROTEÍNA</i>	<i>ENSAYO</i>	<i>AMPLICÓN</i>
cGKII	Rn00435938_m1	99 pb
GAPDH	Rn01775763_g1	174 pb

Tabla I: Oligonucleótidos utilizados en la técnica de PCR cuantitativa.

Materiales y Métodos

Para llevar a cabo la reacción se utilizó kit comercial Taqman Universal Master Mix que contenía 5mM MgCl₂, 200μM dATP, 200μM dGTP, 400μM de oligonucleótidos específicos y 300nM de sondas Taqman. Se inició la reacción añadiendo 5 μl de ADNc.

El protocolo de reacción fue el siguiente:

- Activación de la amperasa: 2 minutos, 50°C
- Activación de la polimerasa: 10 minutos, 95°C
- 40 ciclos de PCR:
 - Desnaturalización: 15 segundos, 95°C
 - Hibridación: 1 minuto, 60°C
 - Elongación: 2 minutos, 70°C
- Mantenimiento a 4°C

2.3. Genotipado

El genotipado de los ratones se realizó a partir de fragmentos de oreja de los animales, de las que se purificó ADN mediante el kit comercial Wizard SV Genomic DNA Purification System. Para la amplificación del gen que codifica para la cGKII, completo o interrumpido, se utilizaron los oligonucleótidos AV3R (5'-ATT AAG GGC CAG CTC ATT CC-3'), AV9R (5'-CTG CTT AAT GAC GTA GCT GCC-3') y E2FB-AV (5'-GGT GAA GTT TTA GGT GAA ACC AAG-3').

El protocolo de amplificación utilizado fue el siguiente:

- Activación: 5 minutos; 94°C
- 35 ciclos de PCR:
 - . Desnaturalización: 30 segundos, 94°C
 - . Hibridación: 30 segundos, 55°C
 - . Elongación: 2 minutos, 72°C
- Elongación: 10 minutos, 72°C

El ADN amplificado se analizó por electroforesis en un gel de agarosa al 2% teñido con SYBR Safe y analizado en un Fluor S de Bio-Rad (Figura 4).

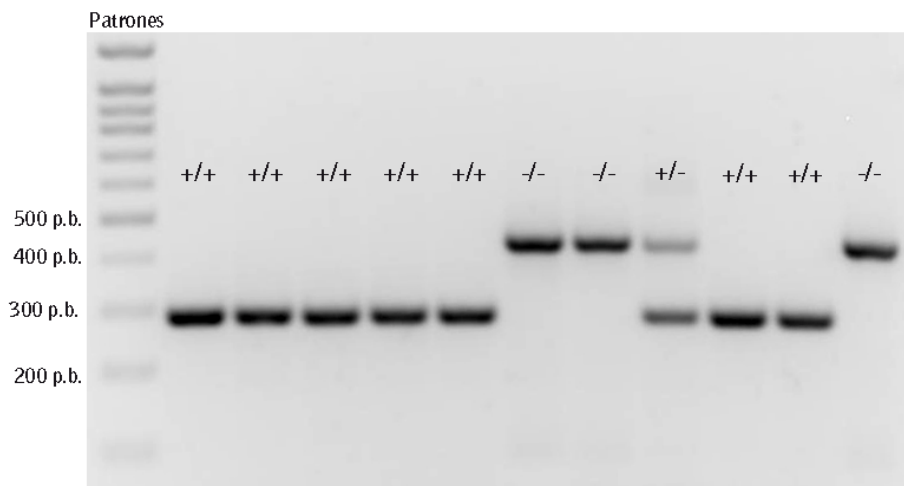


Figura 4: Análisis del genotipado. Imagen de un gel de agarosa tras la electroforesis del ADN purificado y amplificado a partir de muestras biológicas de los ratones. Se observan dos bandas de distinto tamaño, una de 450 pares de bases y otra de 275 pares de bases. En el caso de los heterocigotos (+/-) observamos la presencia de ambas bandas. Los animales de genotipo silvestre (+/+) muestran exclusivamente la banda correspondiente a 275 pares de bases, y los animales homocigotos para el gen que codifica para cGKII interrumpido (-/-) muestran sólo la banda de 450 pares de bases.

2.4. Western Blot

Para la detección y cuantificación de proteínas utilizamos la técnica de Western Blot e inmunodetección en membrana como se describe a continuación.

2.4.1 Extracción de proteínas

Las células se cultivaron en placas de 6 pocillos a una densidad de $3-4 \times 10^6$ células/pocillo. Se eliminó el medio de cultivo y las células se lavaron con PBS 1x (137mM NaCl; 27mM KCl; 100mM Na₂HPO₄; 18mM KH₂PO₄, pH 7,4) a temperatura a 37°C. Posteriormente, se añadieron 200µl de tampón RIPA, al que se previamente se habían adicionado inhibidores de proteasas, por pocillo y, tras raspar el fondo del pocillo para levantar la monocapa de células, se mantuvieron 15 minutos a 4°C. Los extractos se recogieron en tubos eppendorf de 1,5ml limpios y se centrifugaron durante 10 minutos a 10.000xg. Se reservó el sobrenadante y se descartó el precipitado. La concentración de proteínas en las diferentes muestras se determinó mediante el método Bradford.

Materiales y Métodos

2.4.2. Electroforesis, transferencia y cuantificación

La electroforesis se realizó en geles de acrilamida al 8%, para ello se prepararon dos disoluciones de acrilamida: para el gel concentrador (4% Acrilamida; 125mM Tris; 0,1% SDS (p/v); 0,05% Persulfato amónico (p/v) en un volumen final de 10ml. Añadir 12 μ l de TEMED como catalizador de la reacción de polimerización) y para el gel separador (8% Acrilamida; 375mM Tris; 0,1 % SDS (p/v); 0,05% Persulfato amónico (p/v) en un volumen final de 12ml. Añadir 6 μ l de TEMED como catalizador de la reacción de polimerización).

A las muestras obtenidas previamente se les añadió tampón de carga 5x (10% SDS (p/v); 50% Glicerol (v/v); 312mM Tris; 0,01% Azul de Bromofenol (p/v); 25% β -Mercaptoetanol (v/v)) hasta tener una dilución 1x del tampón de carga con la suspensión de proteínas. Las proteínas se desnaturalizaron por calor, manteniéndolas 10 minutos a 90°C.

Las muestras, así como los patrones de pesos moleculares se cargaron en los pocillos del gel y se corrió la electroforesis a un amperaje constante de 20mA/gel en tampón de electroforesis (25mM Tris; 192mM Glicina; 0,1% SDS).

Para realizar la transferencia a membranas de nitrocelulosa, éstas se hidrataron con agua ultrapura y posteriormente se equilibraron en tampón de transferencia (25mM Tris; 192mM Glicina; 20% Metanol (v/v)). Finalizada la electroforesis, los geles se equilibraron en tampón de transferencia durante 5-10 minutos y se realizó la transferencia con un amperaje constante de 300mA durante 2 horas a 4°C en el tampón anteriormente indicado.

<i>PROTEÍNA</i>	<i>ESPECIE</i>	<i>DILUCIÓN</i>
cGKs	Conejo	1:1000
β -tubulina	Ratón	1:2000

Tabla II: Anticuerpos primarios utilizados en la técnica de *Western Blot*.

Acabada la transferencia las membranas se lavaron con PBS para eliminar el exceso de metanol y se bloquearon en Odyssey Blocking Buffer durante 1 hora a temperatura ambiente, asegurándose de que la solución cubría toda la membrana. Tras el bloqueo, las membranas se incubaron con los anticuerpos primarios (a la

dilución correspondiente en cada caso) en Odyssey Blocking Buffer al que se añadió Tween-20 al 0,1%, a 4°C durante toda la noche.

Posteriormente se realizaron 4 lavados con PBS/Tween-20 al 0,1% y las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente durante 1 hora a temperatura ambiente, en oscuridad. Los anticuerpos secundarios (marcados con fluoróforos que absorben en el infrarrojo) se utilizaron a una dilución 1:15000 en Odyssey Blocking Buffer /Tween-20 0,1% / SDS 0,01%. Finalizada la incubación se realizaron 4 lavados con PBS/Tween-20 0,1% y un último lavado con PBS sin Tween para eliminar su exceso. La membrana se dejó secar y se escaneó en un Odyssey Infrared Imaging System, cuyo software permite el análisis y cuantificación de las bandas.

2.5. Análisis del ciclo vesicular

En este trabajo se utilizó el sistema de imagen en célula viva para monitorizar el ciclo vesicular de neuronas granulares de cerebelo de rata bajo diferentes condiciones y protocolos de estimulación. Esta monitorización del ciclo vesicular se realizó utilizando dos estrategias distintas: la sonda fluorescente FM1-43 y el reportero genético VGlut1-phluorina.

2.5.1. FM1-43

La sonda FM1-43 es una molécula anfipática que cuenta con una cabeza polar y una cola hidrofóbica que le permite insertarse en las membranas biológicas. Posee además la característica de ser fluorescente en ambientes hidrofóbicos y de no serlo en solución acuosa, propiedad de la que nos valemos para poder monitorizar la dinámica del ciclo vesicular sináptico.

La sonda se incorpora a las membranas de las vesículas, cuando las neuronas se estimulan en presencia de la misma. Se utilizó un estímulo químico (elevada concentración de KCl extracelular) que provoca la exocitosis de las vesículas sinápticas, que lleva asociada una endocitosis compensatoria. Esta endocitosis atraparà la sonda presente en el medio de estimulación incorporándola a la membrana vesicular. La sonda que queda unida a la membrana plasmática se

Materiales y Métodos

lava para poder visualizar exclusivamente la sonda internalizada en la membrana vesicular.

Transcurrido el periodo de lavado, se comienza la monitorización de las células, adquiriendo imágenes durante 30 segundos para observar el estado de reposo de los botones sinápticos marcados fluorescentemente, a continuación las células se sometieron a un segundo estímulo con 50mM KCl, que provoca la exocitosis de aquellas vesículas que habiendo completado el ciclo vesicular, liberaran su contenido exponiendo sus membranas al medio extracelular y produciéndose un lavado de la sonda y, por tanto, un apagamiento de la fluorescencia.

Posteriormente, el análisis informático permitirá analizar de forma individualizada la respuesta de cada región sináptica al segundo estímulo, pudiendo obtener en un mismo experimento varios cientos de respuestas independientes.

Para estos experimentos se utilizaron dos tampones distintos: HBM de reposo, utilizado para los lavados y las líneas bases, y HBM de estimulación, utilizado para la incorporación de la sonda al interior vesicular y para la descarga de la sonda.

HBM de reposo: NaCl 140mM, KCl 5mM, NaHCO₃ 5mM, NaH₂PO₄ 1,2mM, MgCl₂ 1mM, glucosa 10mM y HEPES 10mM; pH 7,4

HBM de estimulación: NaCl 95mM, KCl 50mM, NaHCO₃ 5mM, NaH₂PO₄ 1,2mM, MgCl₂ 1mM, glucosa 10mM y HEPES 10mM; 1,33mM CaCl₂; pH 7,4

Para este tipo de experimentos, se utilizaron células de 7-8 DIV, que se lavaron durante 10 minutos en medio HBM de reposo a 37°C, para eliminar el medio de cultivo.

Posteriormente, se incubaron con la sonda FM1-43 10µM durante 3 minutos en medio HBM de estimulación. Pasados los 3 minutos el cubreobjetos se enjuagó en medio HBM de reposo e inmediatamente se montó en la cámara de perfusión donde se conectó al sistema de perfusión (37°C, 1ml/min) y se montó en la pletina del microscopio.

Materiales y Métodos

Conectada la cámara al sistema de perfusión se realizó un lavado de 10 minutos con HBM de reposo para eliminar el exceso de sonda retenida en las membranas plasmáticas, tras el cual comienza la adquisición de imágenes en las siguientes condiciones:

Objetivo: 60x

λ excitación: 479nm

Ventana: 1004x1002 pixeles

Tiempo de exposición 0.067 segundos

Ganancia electrónica: 50

Pre-Amplificación de la ganancia: 3.80

Profundidad en bits: 14

Tasa de adquisición de imágenes: 1Hz

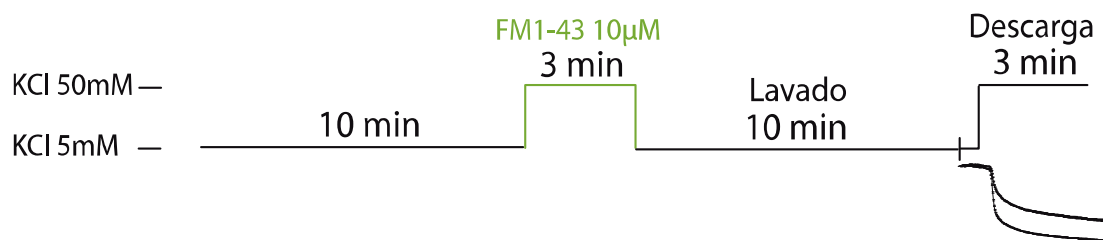


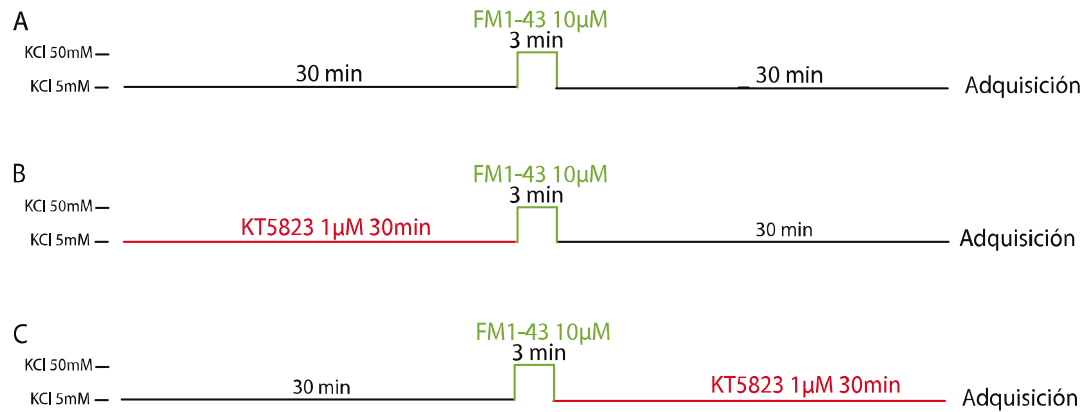
Figura 5: Esquema del protocolo habitual de FM1-43, que consta de 10 minutos de lavado, 3 minutos de carga de FM1-43 en presencia de solución de estimulación, 10 minutos de lavado de exceso de sonda y 3 minutos de estimulación continua para provocar la descarga de la sonda.

Las imágenes se adquirieron durante 30 segundos, obteniéndose una línea base y, a continuación, se procedió a la perfusión continua de HBM de estimulación (50mM KCl, 1,33mM CaCl₂) durante 3 minutos (Figura 5).

En otra serie de experimentos, se realizó un protocolo alternativo en el que, tras la adquisición de la línea base durante 30 segundos, se procedió a una breve estimulación de 10 segundos seguida de un periodo de reposo durante 1 minuto, y se finaliza con 2 minutos de perfusión continua de HBM de estimulación para provocar una descarga completa de la sonda (Figura 6).

Materiales y Métodos

Protocolo previo a adquisición de imágenes



Protocolo de adquisición de imágenes

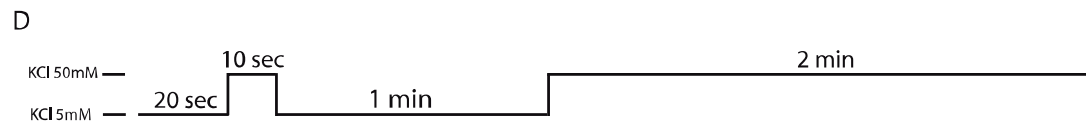


Figura 6: Esquema del protocolo utilizado en aquellos experimentos en los que se realizaron dos periodos de descarga de la sonda. Previo a la adquisición de imágenes tenemos: A) situación control; B) Aplicación del inhibidor de cGK, KT5823 previa a la carga de FM1-43, seguida de la carga de la sonda y su correspondiente lavado; y C) Aplicación del inhibidor de cGK tras la carga de la sonda. D) Protocolo de adquisición de imágenes, tras la línea base, una primera estimulación breve de 10 segundos y una segunda estimulación continua de 2 minutos precedida por una fase de reposo de 1 minuto.

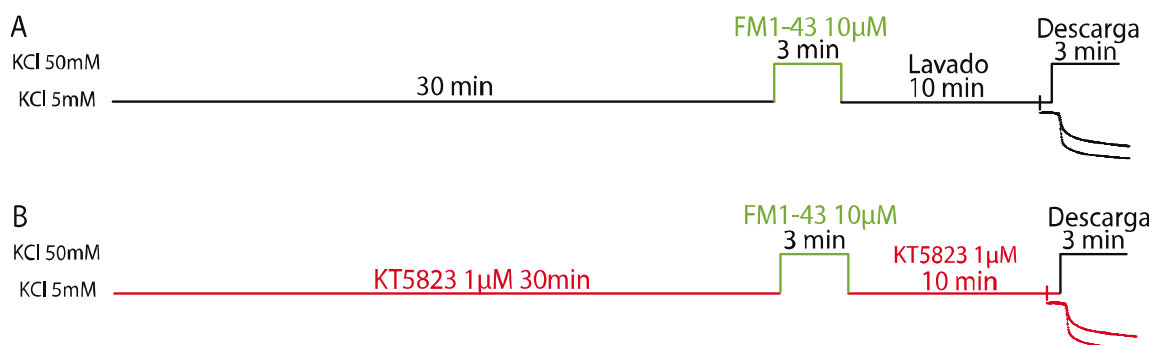


Figura 7: Protocolo de FM1-43 utilizado para el estudio del efecto del inhibidor farmacológico de cGKs. A) Control. B) Aplicación del inhibidor farmacológico de cGK previo a la carga y durante el período de lavado.

Ambos protocolos se han realizado tanto para las condiciones control, así como en las que se han incluido tratamientos en periodos previos o posteriores a la carga, o incluso, en periodos de lavado (Figuras 6 y 7).

2.5.2. vGlut1-pHluorina

La *pHluorina* es una EGFP (del inglés, Enhanced Green Fluorescent Protein) sensible al pH. Esta proteína fluorescente puede estar unida al dominio luminal de proteínas de las vesículas sinápticas sirviendo, por tanto, para etiquetar estas proteínas y poder hacer un seguimiento de las mismas durante el ciclo vesicular. El lumen de una vesícula sináptica tiene normalmente un pH ácido, aproximadamente de 5,5, punto en el que la fluorescencia de la pHluorina está apagada. Cuando las vesículas se fusionan con la membrana plasmática, la etiqueta luminal se expone al pH extracelular, aproximadamente 7,4, lo cual se traduce en un marcado aumento en su fluorescencia. Después de la fusión, la proteína etiquetada con pHluorina puede difundir lateralmente en la membrana plasmática o sufrir endocitosis, en cuyo caso la fluorescencia de la pHluorina se apaga rápidamente cuando el lumen de las vesículas se re-acidifica por la acción de la ATPasa vacuolar (v-ATPasa). Esta característica las hace herramientas enormemente útiles para la monitorización del ciclo vesicular.

En este trabajo se ha utilizado una pHluorina unida entre los bucles 1 y 2 transmembrana del transportador vesicular de glutamato tipo I, vGlut1, de forma que queda orientada hacia el lumen vesicular. Esta pHluorina se conoce como vGlut1-pHluorina (Voglmaier y cols., 2006).

En estado de reposo, con la pHluorina internalizada en el lumen vesicular, no emite fluorescencia debido al pH ácido del interior vesicular. La estimulación de las neuronas (mediante perfusión de una solución con elevada concentración de KCl) provoca la fusión vesicular con la membrana plasmática y la consiguiente neutralización del pH. Este cambio de pH se traduce en un incremento de la fluorescencia de la GFP seguido de un descenso progresivo de la misma, debido a la endocitosis compensatoria de las vesículas exocitadas y su re-acidificación.

La perfusión de NH_4Cl , con el objetivo de neutralizar el interior vesicular, se traduce en un incremento de la fluorescencia de GFP, que permite obtener la

Materiales y Métodos

máxima señal a la que poder relativizar el porcentaje de vesículas excitadas con el estímulo aplicado (Figura 8).

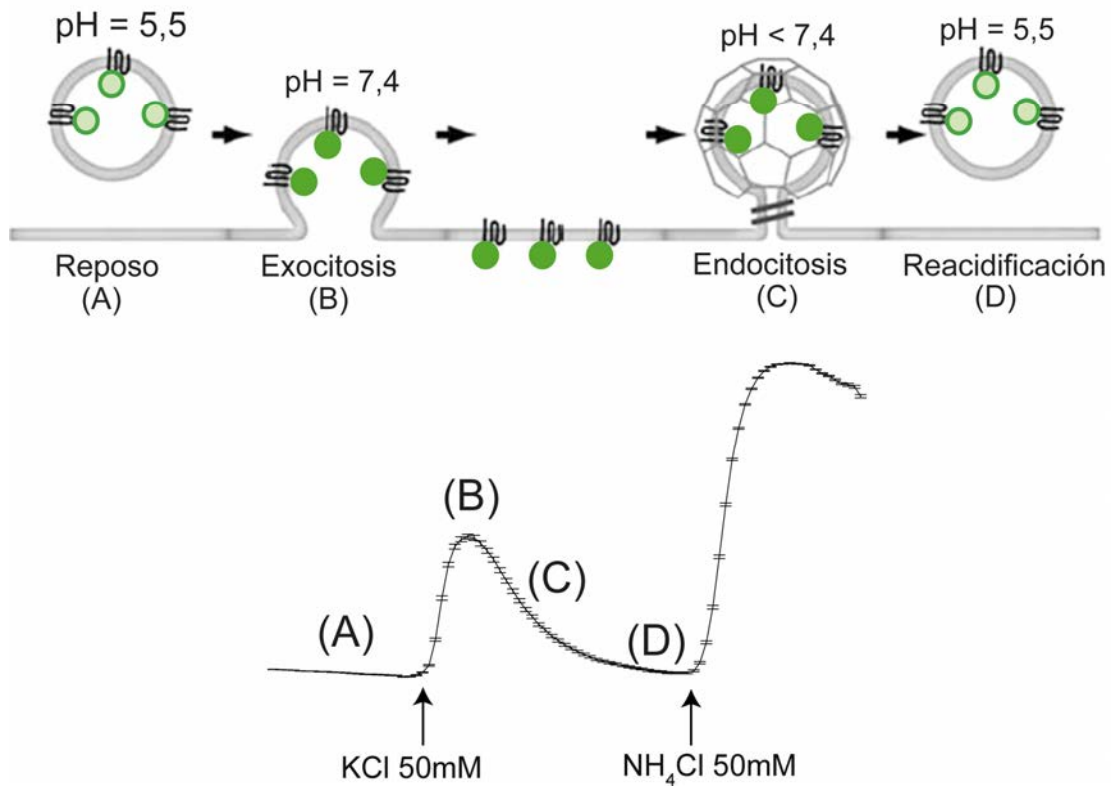


Figura 8: Esquema de las variaciones en fluorescencia de la vGlut1-pHlorina paralelas a los cambios de pH que suceden en el lumen vesicular a lo largo de todas las fases del ciclo vesicular. En estado de reposo la fluorescencia está apagada. Se registra un pico de fluorescencia cuando, tras la fusión vesicular con la membrana plasmática, el contacto con el medio extracelular neutraliza el pH. La fluorescencia vuelve a apagarse tras endocitarse la vesícula y reacidificarse de nuevo el lumen. Por último se observa el máximo de señal obtenido por perfusión de NH₄Cl (Adaptado de (Dreosti y Lagnado, 2011)).

Esta estrategia de monitorización del ciclo vesicular presenta diferentes ventajas frente al uso de la sonda FM1-43. En primer lugar, es posible analizar las células y su respuesta al estímulo sin necesidad de que hayan sido sometidas a un estímulo previo, como ocurre en el caso de la carga de la sonda. Por otro lado, permite analizar la fase de endocitosis compensatoria del ciclo vesicular. Además, permite también la aplicación de diferentes estímulos sucesivos (algo imposible en el caso de la FM1-43 debido a la pérdida de la sonda una vez excitada y lavada), lo cual aporta un control interno a la hora de realizar tratamientos farmacológicos.

Materiales y Métodos

Para este tipo de experimentos se utilizaron tres tampones distintos: HBM de reposo, para las líneas bases y tiempo de reposo tras el estímulo; HBM de estimulación, y HBM con NH_4Cl , utilizado al final del experimento para obtener el máximo de señal. Su composición es la siguiente:

HBM de reposo: NaCl 140mM, KCl 5mM, NaHCO_3 5mM, NaH_2PO_4 1,2mM, MgCl_2 1mM, glucosa 10mM y HEPES 10mM; pH 7,4

HBM de estimulación: NaCl 95mM, KCl 50mM, NaHCO_3 5mM, NaH_2PO_4 1,2mM, MgCl_2 1mM, glucosa 10mM y HEPES 10mM; 1,33mM CaCl_2 ; pH 7,4

HBM NH_4Cl : NaCl 90mM, NH_4Cl 50mM, NaHCO_3 5mM, NaH_2PO_4 1,2mM, MgCl_2 1mM, glucosa 10mM, HEPES 10mM; pH 7,4

Los experimentos se realizaron con células de 7-8 DIV que habían sido transfectadas con el plásmido que contiene la construcción vGlut1-pHluorina mediante electroporación a 0 DIV. En primer lugar, las células se lavaron durante 10 minutos en medio HBM de reposo a 37°C para eliminar el medio de cultivo.

A continuación, se montó el cover, con las células, en la cámara de perfusión y ésta se conectó al sistema perfusión (37°C, 1ml/min) y se montó en la pletina del microscopio, comenzando la adquisición de imágenes en las siguientes condiciones:

Objetivo: 60x

λ excitación: 475nm

Ventana: 1004x1002 pixeles

Tiempo de exposición 0.250 segundos

Ganancia electrónica: 100

Pre-Amplificación de la ganancia: 3.80

Profundidad en bits: 14

Materiales y Métodos

Tasa de adquisición de imágenes: 4Hz, donde las 4 imágenes se promedian para mejorar la relación señal-ruido, dando lugar a una tasa real de aproximadamente 1 Hz.

Se adquirieron 20 o 30 segundos de línea base, seguidos del período de estimulación. Los tiempos de estimulación variaron, pudiendo ser de 15 o 50 segundos (Figura 9), según se quisiera analizar el comportamiento de las neuronas ante un estímulo más suave o intenso y sostenido. Posteriormente se perfundió, de nuevo, solución de reposo para permitir la recuperación de las células antes de proceder con la alcalinización de las vesículas con NH_4Cl durante 30 segundos. Esta señal máxima se utilizó, cuando fue necesario, en el análisis informático para la normalización de la señal.

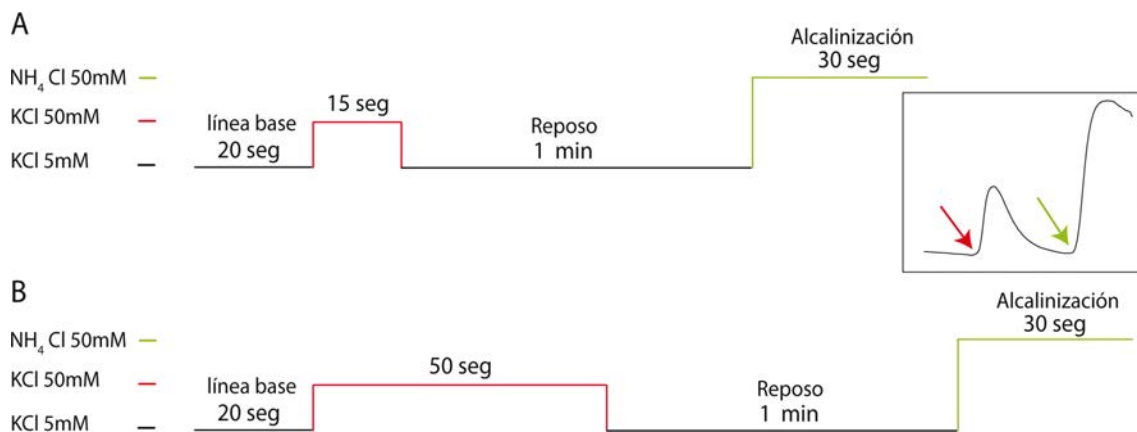


Figura 9: Esquema del protocolo experimental realizado en los experimentos de vGlut1-pHluorina. Panel A: protocolo experimental típico para el análisis de la respuesta sináptica ante un estímulo de 15 segundos con perfusión de KCl 50mM. Panel B: variación del protocolo anterior, para el estudio de la respuesta celular ante un estímulo intenso como son 50 segundos de solución de KCl 50mM.

Este protocolo admite múltiples variaciones. En este trabajo se llevaron a cabo principalmente dos. Por un lado, se procedió a realizar sobre un mismo campo de neuronas repeticiones del protocolo de estimulación, llevando a cabo tratamientos farmacológicos entre ambos protocolos de estimulación, de forma que

Materiales y Métodos

se cuenta con un control interno con el que comparar el efecto del fármaco (Figura 10).

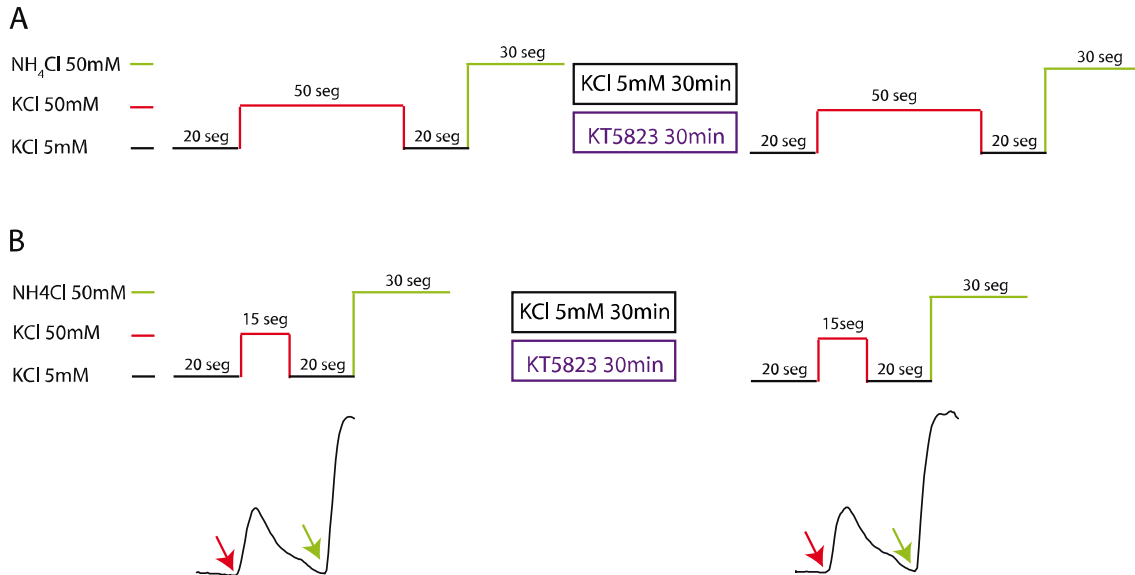


Figura 10: Esquema del protocolo utilizado para la aplicación de múltiples rondas de estimulación sobre el mismo campo. A) Protocolo con un primer estímulo de 50 segundos, seguidos de 30 minutos con perfusión de HBM de reposo en el caso de las células control, o con el inhibidor de cGKs, KT5823, en el caso de las células tratadas. Seguidamente se repite el protocolo de estimulación de forma que pueda compararse el efecto del fármaco en las mismas regiones sinápticas. B) Protocolo para el análisis del efecto del fármaco KT5823 sobre las mismas regiones sinápticas, en este caso, con estimulaciones de 15 segundos.

Por otro lado, con intención de estudiar la fase de exocitosis aislada, esto es, sin que la señal de fluorescencia esté compuesta por la relación exocitosis/endocitosis, se procedió a añadir a los medios de perfusión la droga Bafilomicina. La Bafilomicina es un inhibidor de la ATPasa vesicular, de forma que su presencia inhibe la reacidificación del interior vesicular. Esto se traduce en que la señal fluorescente que queda registrada refleja exclusivamente la fase excitotóxica (Figura 11).

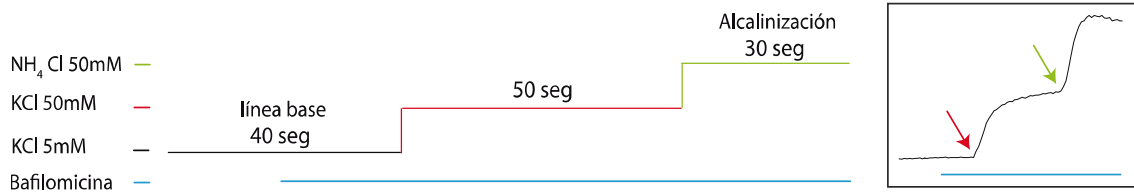


Figura 11: Esquema del protocolo experimental utilizado en los experimentos en presencia de Bafilomicina. La Bafilomicina está presente durante la adquisición de la línea base, 20 segundos previos al estímulo y, a partir de ese momento, todas las soluciones la contenían.

2.6. Microscopía electrónica

Los tampones que se utilizaron en este trabajo para la realización de las preparaciones de microscopía electrónica fueron los siguientes:

- Tampón Milloning (Tampón fosfato 0.13M, pH 7,3):** 1,87% NaH_2PO_4 (p/v), 0,38% NaOH (p/v);
- Solución de fijación:** Paraformaldehído 4%, Glutaraldehído 2,5% en tampón Milloning
- Solución de osmicación:** OsO_4 1,5%, $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 1,5% en agua destilada.
- Soluciones de deshidratación:** soluciones crecientes de etanol/agua, partiendo de etanol 30% hasta etanol absoluto.

En la realización de este trabajo se emplearon dos protocolos para la preparación de las células para microscopía electrónica. Se realizaron preparaciones partiendo bien de células sembradas en placas de 6 pocillos, monocapa que se levantó íntegra tras deshidratar, o bien partiendo de células sembradas en cubreobjetos, donde el cubreobjetos se mantuvo intacto hasta el final del protocolo. Las diferencias se indican en los pasos correspondientes.

Se utilizaron neuronas de 7DIV a las que se retiró el Neurobasal y se sustituyó por HBM de reposo atemperado a 37°C durante 10 minutos. Posteriormente, con la intención de emular los protocolos de estimulación y reposo utilizados en los experimentos de imagen, parte de las células se mantuvieron en

Materiales y Métodos

HBM de reposo durante 13 minutos más (condición basal) o se procedió al protocolo de estimulación (condición estimulación). El protocolo de estimulación consta, al igual que la carga de sonda FM1-43, de 3 minutos en presencia de HBM de estimulación (carga de la sonda) y 10 minutos en HBM de reposo (lavado de la sonda previo a la descarga). Ambas situaciones, basal y estimulado, se realizaron en condiciones control, y con los diferentes tratamientos farmacológicos o de silenciamiento. Finalizado el protocolo de estimulación, las células se lavaron brevemente con tampón Milloning atemperado a 37°C.

Las células se fijaron en solución de fijación durante 3 horas a 4°C y se lavaron con tampón Milloning a 4°C (x2), dejándose en tampón de Milloning fresco a 4°C o/n. Posteriormente se procedió a la osmicación. Para ello, las células se mantuvieron en solución de osmicación durante 1 hora. Transcurrido el tiempo, se retiró la solución y se inactivó con leche en polvo. Las células se lavaron tres veces con agua destilada, después se deshidrataron en concentraciones crecientes de etanol, incubándolas durante 10 minutos en cada solución. Etanol 30% /Etanol 50% /Etanol 70% /Etanol 80% /Etanol 90% /Etanol 95% /Etanol 100% (x2).

Una vez realizadas las deshidrataciones correspondientes, se procedió a la inclusión en resina. En el caso de las células sembradas sobre cubreobjetos, el cubreobjetos intacto con la monocapa adherida se sumergió en la resina. El cubreobjetos se retiró finalizado el proceso de inclusión. En el caso de las células sembradas en placa de 6 pocillos, una vez realizados todos los pasos de deshidratación se procedió a despegar y recolectar la monocapa de células. Para ello se realizaron fuertes pipeteos con óxido de propileno hasta recolectar la monocapa en un tubo eppendorf. La preparación se centrifugó durante 2 minutos a 750xg y se descartó el sobrenadante.

La monocapa de células del precipitado se incluyó en concentraciones crecientes de resina SPURR.

Resina/etanol 1/3 incubación de 1 hora
Resina/etanol 1/1 incubación de 1 hora
Resina/etanol 3/1 incubación de 2 horas
Resina pura incubación o/n

Después se cambió la resina pura por resina pura fresca y se mantuvo 48h a 70°C para que polimerizase.

En el caso de las células sembradas en cubreobjetos, una vez que hubo polimerizado la resina y la monocapa de células había quedado embebida en la resina, los cubreobjetos se retiraron sumergiéndolos en nitrógeno líquido.

Los bloques se cortaron en secciones ultrafinas en el Centro Nacional de Microscopía Electrónica, para su posterior análisis.

3. Procesamiento de datos

3.1 Análisis de *western blot*

Las imágenes obtenidas en el escaneo de las membranas de nitrocelulosa se analizaron con el software de Li-Cor (Odyssey). Se midió la densidad integrada de las bandas de las proteínas de interés. Este dato se normalizó con la densidad integrada medida en las bandas correspondientes a las proteínas utilizadas como control de carga.

3.2 FM1-43

Para analizar los experimentos de FM1-43 el primer paso fue la creación de una máscara binaria en la que quedaran seleccionadas las regiones sinápticas. Para ello se utilizó el método automatizado diseñado por Bergsman (Bergsman y cols., 2006) con alguna modificación (Bartolome-Martin y cols., 2012).

Este método selecciona regiones cuyo comportamiento es compatible con el de una región sináptica, basándose en tres parámetros: 1. estabilidad de la señal durante el periodo de registro de línea base; 2. relación señal/ruido en la línea base; 3. grado de descarga tras la estimulación.

Esta rutina desarrollada por Bergsman, corre en el programa IgorPro y genera un archivo **.ibw** que alberga una máscara binaria con la selección específica de las regiones sinápticas del campo analizado (Figura 12B). Por otro lado, durante la generación de esta máscara binaria, el mismo programa IgorPro genera una carpeta que contiene la descomposición en imágenes independientes del experimento que se está analizando. Estas imágenes han sufrido una sustracción iterativa de fondo (Figura 12A).

Materiales y Métodos

Este archivo **.ibw** se importa en el programa ImageJ junto con la carpeta de imágenes con el fondo sustraído. Se aplica la máscara binaria sobre el experimento y se procede a medir la fluorescencia en cada una de las regiones identificadas por IgorPro en cada una de las imágenes que componen el experimento a lo largo del tiempo.

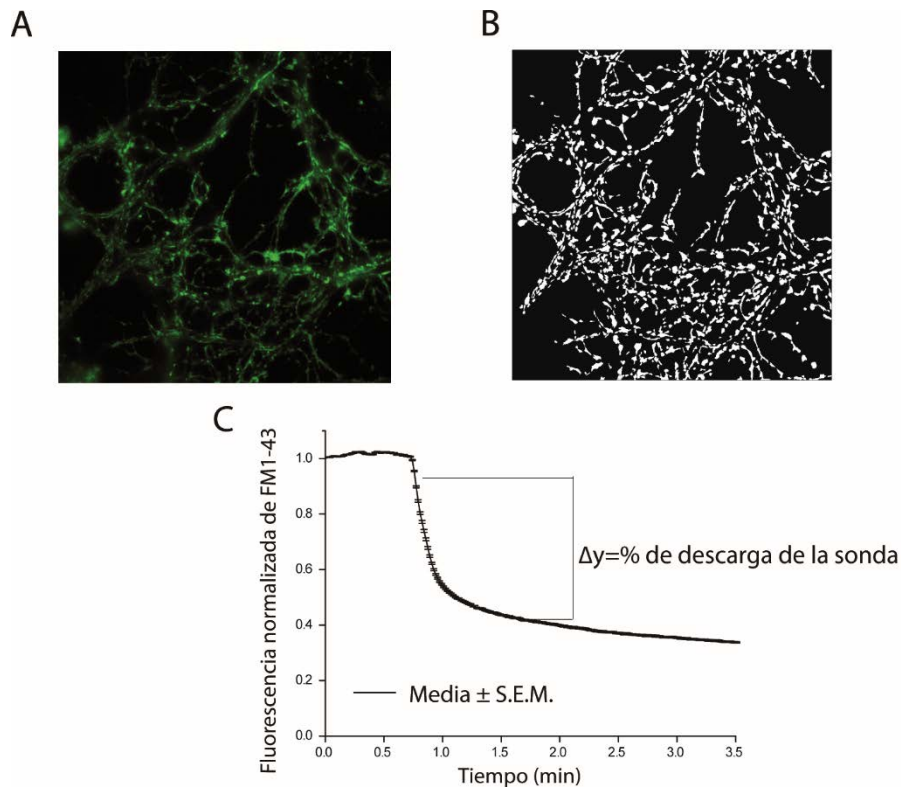


Figura 12: Análisis informático de imágenes de FM1-43. A) Campo a t_0 de un experimento de FM1-43; B) Máscara binaria obtenida con el programa IgorPro. C) Ejemplo de cinética de un experimento de FM1-43 donde observamos el periodo de línea base y la descarga de fluorescencia tras el estímulo.

Los datos obtenidos se normalizaron al valor inicial de fluorescencia y se copiaron en una hoja de cálculo del programa Origin 8.0. De esta forma se obtiene un registro independiente para cada región sináptica. En dichos registros se observa la línea base y la descarga de fluorescencia tras la estimulación a lo largo del tiempo y sirven para analizar diferentes parámetros cinéticos (grado de descarga, cinética de decaimiento) (Figura 12C).

3.3. vGlut1-pHluorina

En el caso de la vGlut1-pHluorina, con el programa ImageJ se seleccionaron las regiones sinápticas manualmente y se restauró la selección en una imagen nueva. Esta selección se convirtió a imagen binaria para obtener una máscara que se aplicó sobre las imágenes originales. Se procedió de la misma forma para seleccionar regiones de fondo cuyo valor se sustrajo a los valores de fluorescencia obtenidos al medir las regiones sinápticas.

Una vez restados los valores de fondo, en Microsoft Excel se resta a todos los datos la media de los 10 primeros valores de línea base, de forma que se obtiene un valor de línea base próximo a cero.

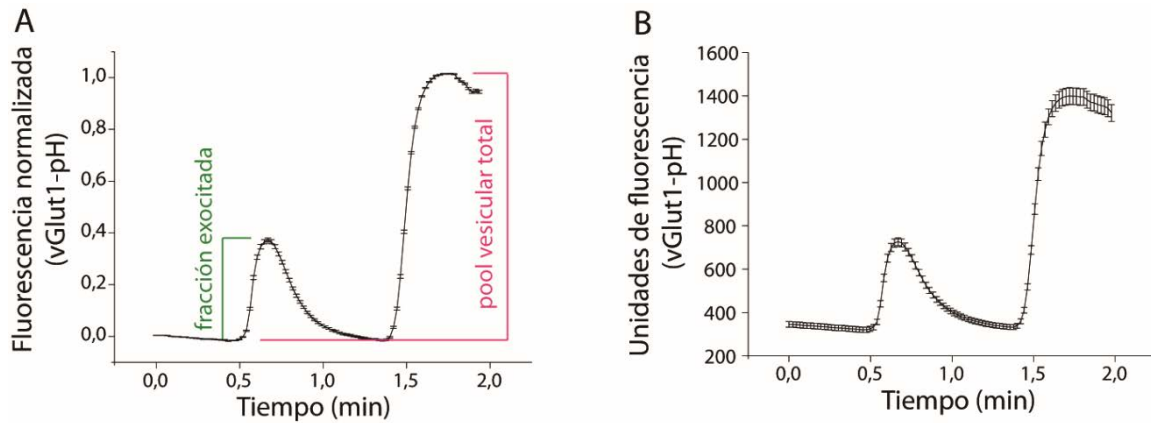


Figura 13: Procesamiento matemático de los datos de experimentos de vGlut1-pH. A) Datos normalizados de 0 a 1, siendo 0 los valores de línea base y 1, los máximos obtenidos con la perfusión de NH_4Cl ; B) Datos crudos sin normalizar, con el fondo sustraído.

Por último, se dividen todos los datos entre la media de los valores máximos obtenidos con la perfusión de NH_4Cl . De esta forma se obtienen registros normalizados de cero a uno, con la línea base cercana a cero, y los valores correspondientes a NH_4Cl cercanos a uno (Figura 13A). De esta forma se puede determinar la fracción de vesículas que se excitan debido al estímulo.

En otras ocasiones, dependiendo de los parámetros que se quieran analizar, se trabajó con los datos sin normalizar, simplemente con el fondo sustraído (Figura 13B).

3.4. Microscopía electrónica

Todas las medidas se realizaron con el programa ImageJ. Los datos se multiplicaron por el factor de conversión adecuado para obtener nm desde píxeles. En nuestro caso, las imágenes fueron tomadas a 80.000 aumentos. En esta situación la relación fue de 0,71 pixels/nm.

3.5. Tests estadísticos

- Ajuste lineal ($y=a+bx$) y ajuste de decaimiento exponencial ($y=y_0+Ae^{-x/T}$): Origin Pro 8.0
- Test t-Student, Comparaciones múltiples ANOVA (con test de Bonferroni), Test de Kolmogorov-Smirnov y Test de Mann-Whitney: Origin Pro 8.0
- Distribución de probabilidad acumulada: SigmaPlot 10.0

IV - RESULTADOS

“When you make the finding yourself, even if you are the last person on Earth to see the light, you ’ll never forget it”

Carl Sagan

IV - RESULTADOS

1. El bloqueo de los receptores NMDA altera el reciclamiento vesicular en una población de botones ante un estímulo intenso y sostenido.

Como se ha descrito anteriormente, resultados previos del grupo (Bartolome-Martin y cols., 2012) habían demostrado que, ante un estímulo prolongado con una elevada concentración de potasio para la incorporación de la sonda FM1-43, la descarga de dicha sonda por un segundo estímulo se traducían en una cinética claramente bifásica. Además, los botones se segregaban en dos poblaciones o grupos con diferentes tasas de descarga de la sonda. Estas diferencias en la descarga se atribuyeron a diferencias en la eficiencia de reciclamiento sináptico ante el estímulo, apareciendo un primer grupo (grupo de descarga fuerte o grupo 1) con mayor grado de descarga (superior al 40%) y eficiencia de reciclamiento, y el denominado grupo de descarga débil (o grupo 2), con menor grado de descarga (menor que el 40%) y una menor eficiencia de reciclamiento. Esta ineficiencia en el reciclamiento vesicular se atribuyó a la activación de mecanismos de endocitosis consistentes en la recuperación de grandes fracciones de membrana, provocado por una exocitosis masiva. A 7 días *in vitro* (DIV), alrededor de un 60% de los botones pertenecían al grupo de descarga fuerte, mientras que el resto pertenecían al grupo de descarga débil.

En la Figura 1A podemos observar un campo de células a t0, marcadas con la sonda FM1-43, y el mismo campo al final del experimento, tras la descarga de dicha sonda (Figura 1B).

La distribución porcentual de los grupos de descarga fuerte y débil varía con el estado de maduración del cultivo y, también, puede modificarse por diferentes tratamientos farmacológicos, como ocurre con la inhibición prolongada de la sGC con ODQ, situación en la que aumentaba muy significativamente el grupo de descarga débil o grupo 2, el efecto de la inhibición de la sGC se abolió completamente con la adición de 8-Br-GMPc (Lopez-Jimenez y cols., 2009).

Resultados

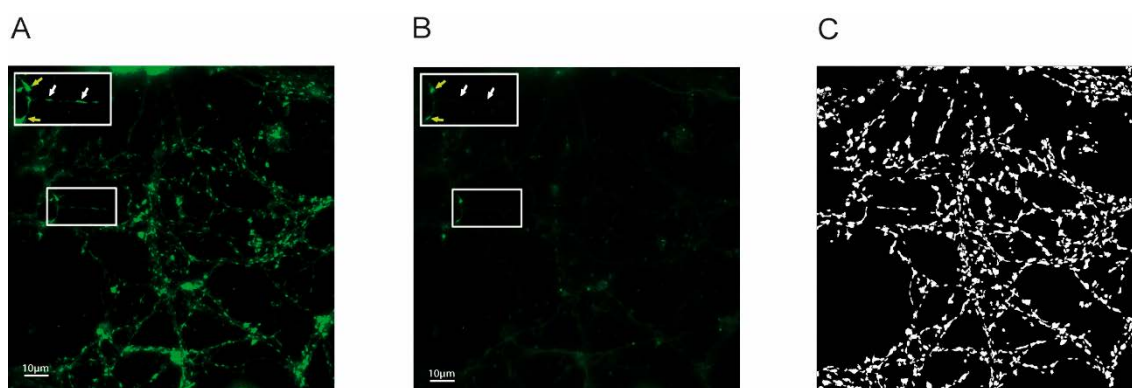


Figura 1: Campo de neuronas granulares de cerebelo marcadas con la sonda FM1-43 durante un experimento tipo, a t_0 (A), y al final del experimento tras la descarga de la sonda (B), así como imagen de la máscara binaria utilizada para el análisis de las respuestas sinápticas individuales (C). Las puntas de flecha blancas indican ejemplos de botones que pertenecen al grupo 1 y las cabezas de flecha amarillas ejemplos de botones que pertenecen al grupo 2.

En neuronas granulares de cerebelo la sGC se activa por el NO producido tras la estimulación de los receptores NMDA (Jurado y cols., 2003). Si la activación de sGC se debe a una estimulación de los receptores NMDA y, como ya se ha indicado anteriormente, su inhibición afecta al reciclamiento vesicular, el bloqueo de los receptores NMDA debería, también, afectar a este proceso. Con el objetivo de analizar el papel de los receptores de NMDA en la regulación del reciclamiento vesicular, dichos receptores se bloquearon durante 24 horas añadiendo al medio de cultivo una mezcla del antagonista competitivo D-APV ($50\mu\text{M}$) y el antagonista no competitivo dependiente de actividad MK-801 ($1\mu\text{M}$), y se realizaron experimentos con la sonda FM1-43. Dicho tratamiento se tradujo en un notable incremento del grupo de botones de descarga débil o grupo 2. Este defecto en el reciclamiento vesicular provocado por el bloqueo de los receptores NMDA se previno mediante la aplicación del análogo de GMPc, 8-Br-GMPc.

En la Figura 2A se ilustran las cinéticas de descarga del grupo de descarga fuerte tanto en la situación control, como en presencia de los bloqueantes de los receptores NMDA (MK-801+APV) y su combinación con el análogo de GMPc (MK-801+APV+8-Br-GMPc). De igual forma, en la Figura 2B se representan las cinéticas de descarga del grupo de descarga débil. Se observa que, a pesar de que dentro de cada subpoblación de botones no haya diferencias en el grado de

Resultados

descarga entre el control y los diferentes tratamientos, la distribución porcentual de botones pertenecientes a cada grupo (Figura 2C) está claramente alterada. En la situación control, el $59,17 \pm 4,74\%$ de los botones pertenecen al grupo de descarga fuerte o grupo 1. En presencia de los fármacos bloqueantes de los receptores NMDA el porcentaje de botones pertenecientes al grupo de descarga fuerte disminuye hasta el $21,45 \pm 2,19\%$. (ANOVA $p < 0,01$). Este efecto se previene por la coincubación con el análogo de GMPc, 8-Br-GMPc, donde el $51,5 \pm 2,5\%$ de los botones pertenecen al grupo de descarga fuerte (ANOVA $p < 0,01$ comparado con MK-801+APV; ANOVA $p = 0,20198$ comparado con la situación control). Estos resultados muestran que el bloqueo de los receptores de NMDA se traduce en un enlentecimiento del reciclamiento vesicular en una población de botones debido a la disminución de GMPc en los mismos.

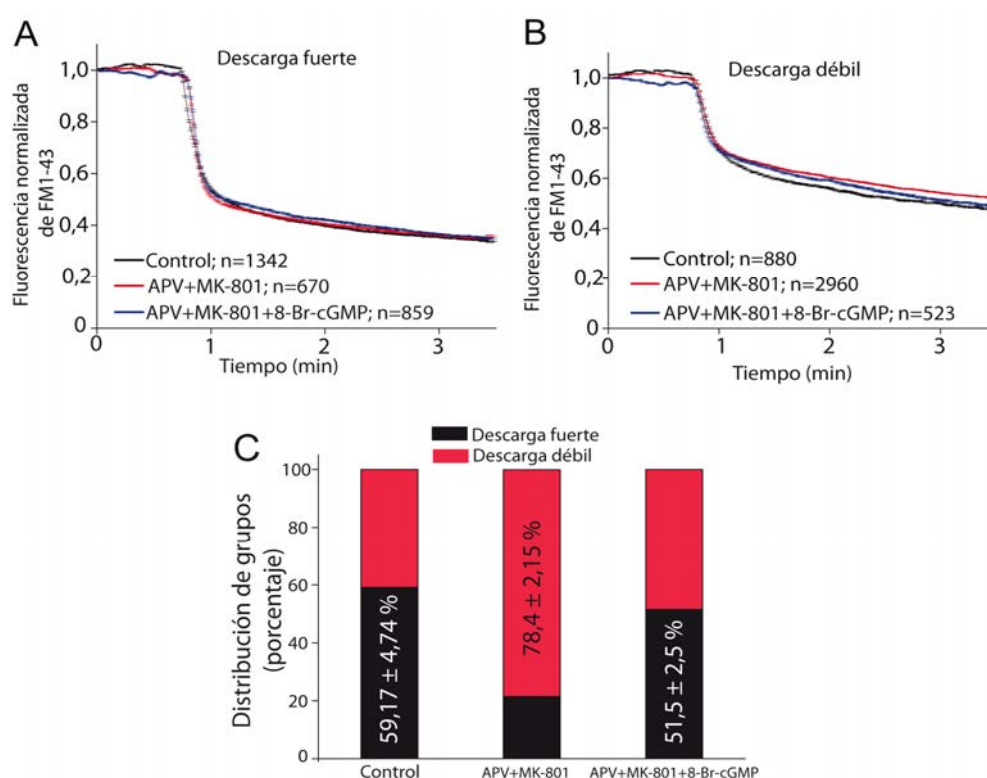


Figura 2: Perfiles de descarga de la sonda tanto del grupo de descarga fuerte (Panel A), como del grupo de descarga débil (Panel B), en situación Control, en presencia de los bloqueantes de receptores NMDA, APV y MK-801, y coincubando dichos bloqueantes con el análogo de GMPc, 8-Br-GMPc. En el panel C se ilustra la distribución porcentual de botones en ambos grupos de descarga para las tres condiciones.

Resultados

2. La inhibición y/o el silenciamiento de la proteína quinasa dependiente de GMPc tipo II (cGKII) altera el reciclamiento vesicular.

En la cascada de señalización activada por el GMPc, el principal efector del GMPc son las proteínas quinasas dependientes de GMPc (cGKs), de forma que nuestro siguiente objetivo fue analizar si estas quinasas estaban implicadas en la regulación del ciclo vesicular. En primer lugar, y con objeto de inhibir durante un tiempo prolongado las cGKs, se añadió KT5823 (1 μ M) al medio de cultivo 96h o 24h antes de realizar los experimentos con la sonda FM1-43.

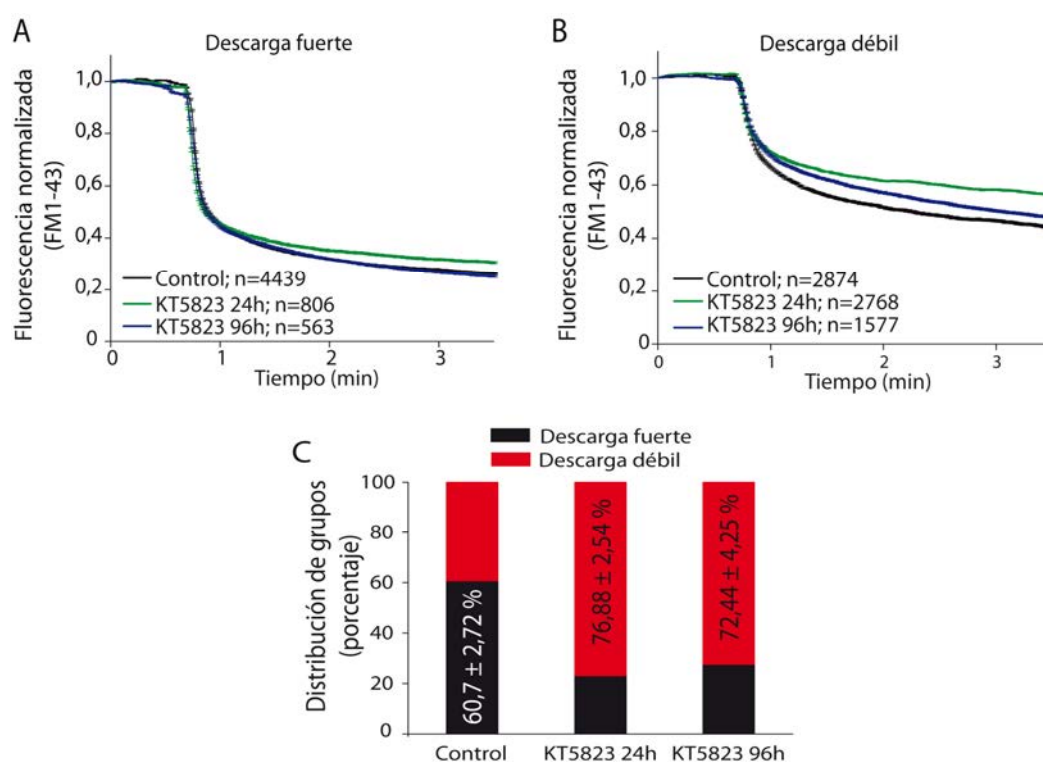


Figura 3: Perfil de descarga de la sonda para las tres condiciones experimentales (control, células tratadas con el inhibidor de cGKs, KT5823, durante 24 y 96 horas) de los botones del grupo de descarga fuerte (Panel A), y del grupo de descarga débil (Panel B). Distribución porcentual de botones sinápticos en los grupos de descarga fuerte y débil en las tres condiciones experimentales (Panel C).

Esta inhibición a largo plazo de las cGKs arrojó el mismo tipo de resultado que el bloqueo de los receptores NMDA. La distribución porcentual de botones en ambos grupos de descarga se vio alterada (Figura 3C), disminuyendo el porcentaje

Resultados

de botones pertenecientes al grupo 1 desde un $60,70 \pm 2,72\%$ en control, a un $23,12 \pm 2,55\%$ después de 24h en presencia del inhibidor (ANOVA $p < 0,01$), y $27,56 \pm 4,26\%$ tras 96h en presencia del inhibidor (ANOVA $p < 0,01$).

Además de encontrar una inversión en la distribución en ambos grupos de descarga tras el tratamiento con KT5823, en el caso de los botones pertenecientes al grupo de descarga débil se observó un menor grado de descarga de la sonda al final del experimento, aunque la velocidad de liberación no se vio modificada.

Estos resultados sugerían que la actividad de las cGKs es crucial para mantener un reciclamiento vesicular eficiente en estas condiciones de estimulación (intensa y prolongada), lo cual era coherente con resultados obtenidos en otros tipos celulares (Eguchi y cols., 2012; Taoufiq y cols., 2013).

Las células granulares de 7 DIV expresan los dos tipos de cGKs, tipo I y tipo II, (Jurado y cols., 2005) y KT5823 no es inhibidor selectivo para ninguna de ellas. El hecho de que la expresión de cGKII aumente con el desarrollo de estas células y que su localización sea fundamentalmente sináptica (van Staveren y cols., 2004) podía sugerir su implicación en la regulación de procesos sinápticos como el ciclo vesicular. Para analizarlo, procedimos a silenciar la expresión de cGKII con un siRNA específico.

Dependiendo de la vida media de la proteína, el mayor silenciamiento proteico se produce pasadas 72 o 96 horas tras la adición del siRNA, aunque la disminución en el nivel de ARNm sea mucho más rápida. Al no disponer de ningún buen anticuerpo frente a esta proteína, el silenciamiento se analizó mediante la cuantificación del ARNm por PCR cuantitativa a las 24 o 96 horas después de la adición del siRNA o de un siRNA de secuencia aleatoria, que no produce el silenciamiento de ningún gen (utilizado como control negativo). Además, se verificó la especificidad del siRNA midiendo los niveles de cGKI mediante *western blot* a las 96 horas de la adición del siRNA. Los experimentos funcionales también se realizaron a las 96 horas.

En la Figura 4 se muestran las medidas de cantidad de ARN mensajero para la cGKII (Figura 4A), en las que se observa una reducción de $81,36 \pm 3,39\%$ y $81,00 \pm 1,65\%$ a las 24 y 96 horas después de la adición del siRNA, respectivamente. Las imágenes y cuantificación del *western blot* para la cGKI (Figura 4B) revelan que la incubación durante 96 horas con este siRNA no afecta a

Resultados

los niveles de dicha proteína ni en extractos totales ni en extractos enriquecidos en la fracción de membrana (obtenida tras centrifugar a 30.000xg).

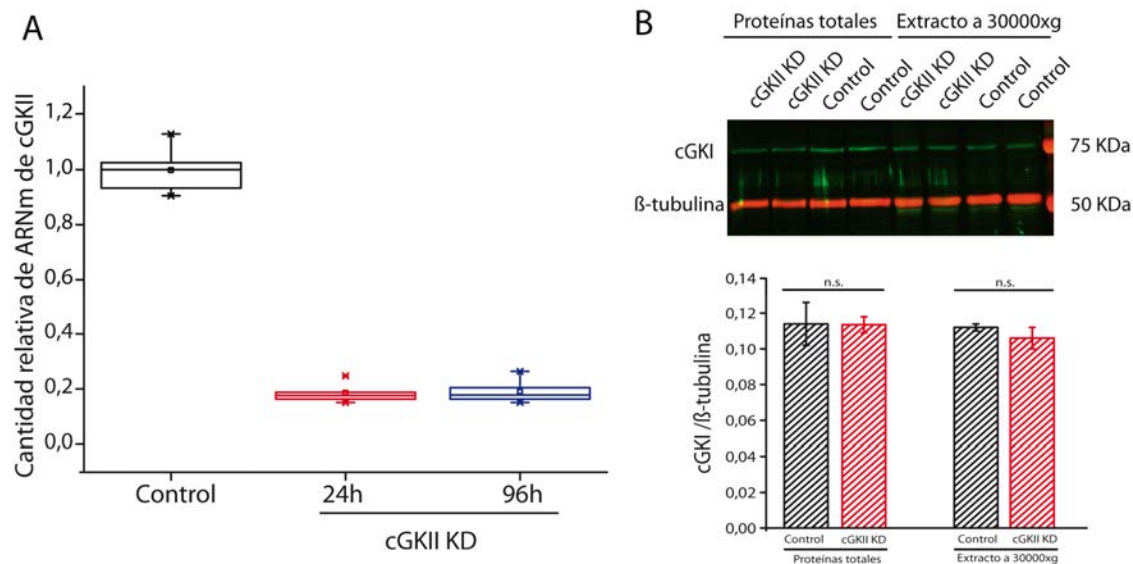


Figura 4: Cuantificación del análisis por PCR a tiempo real de la cantidad relativa de ARN mensajero que codifica para cGKII, en el que se observa una notable reducción tanto a 24 como a 96 horas tras la aplicación del siRNA específico (Panel A). El Panel B muestra el análisis mediante *Western Blot* de los niveles de la proteína cGKI en ausencia o presencia del siRNA específico de la cGKII.

Mediante experimentos funcionales con la sonda FM1-43 se comprobó la consecuencia del silenciamiento de la expresión de cGKII en la eficacia del ciclo vesicular. El silenciamiento de la cGKII (cGKII KD) se tradujo, de nuevo, en un notable aumento de los botones de descarga débil o reciclamiento ineficaz, pasando de un $39,30 \pm 2,73\%$ en células control a un $80,74 \pm 3,12\%$ en el caso de la células cGKII KD (ANOVA $p < 0,01$; Figura 5C). Sin embargo, en las células incubadas con un siRNA de secuencia aleatoria, que no silencia el producto de ningún gen en la rata (control negativo), no se alteró este porcentaje, siendo de $38,50 \pm 2,29\%$ (ANOVA $p = 0,84811$ con respecto al control).

En las Figuras 5A y 5B se ilustran las cinéticas de descarga de ambos grupos para células control así como para células cGKII KD o células incubadas con el siRNA utilizado como control negativo. En ambas gráficas se observa que el

Resultados

siRNA control no altera la descarga de ninguno de los grupos, mientras que en las células cGKII KD se observa una reducción en el grado de descarga de la sonda, siendo mucho mayor en el grupo de descarga débil.

Estos resultados sugerían que el sistema efector del GMPc para la regulación del reciclamiento vesicular es la cGKII.

El hecho de que el silenciamiento de cGKII produjera efectos similares a los observados con el inhibidor de las cGKs sugería que los efectos de éste estaban mediados por la inhibición de cGKII. Con el fin de analizar si KT5823 tenía algún efecto en células con la cGKII silenciada, se combinaron ambos tratamientos. En la Figura 6 se ilustran los resultados obtenidos tras la incubación con KT5823 durante 24h de células que previamente se habían transfectado para silenciar la proteína cGKII.

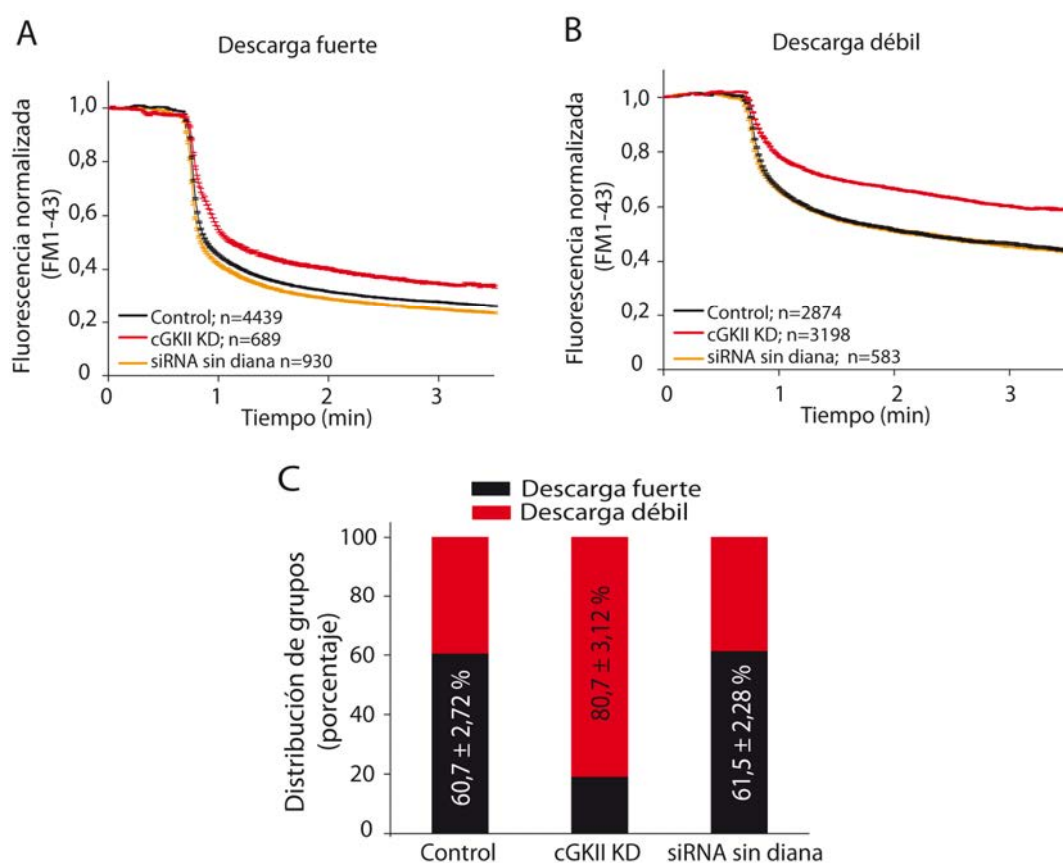


Figura 5: Se muestra el perfil de descarga de la sonda para las tres situaciones de los botones sinápticos del grupo de descarga fuerte (Panel A), y del grupo de descarga débil (Panel B). Distribución porcentual de botones sinápticos en los grupos de descarga fuerte y débil en células control, células cGKII KD y células tratadas con un siRNA sin diana en el genoma de la rata (Panel C).

Resultados

Este doble tratamiento no se tradujo en una suma de los efectos y no observamos diferencias ni en la distribución porcentual de grupos ni en el grado de descarga de la sonda a los encontrados en células cGKII KD, confirmando que los defectos en el reciclamiento observados con el tratamiento con KT5823 eran producidos, principalmente, por su acción inhibitoria sobre la cGKII. Con la combinación de ambos tratamientos se observó que un $84,80 \pm 1,50\%$ de los botones analizados pertenecían al grupo de descarga débil frente a un $80,74 \pm 3,12\%$ en el caso de las células cGKII KD (ANOVA $p= 0,39556$), y a un $39,30 \pm 2,73\%$ en las células control (ANOVA $p<0,01$).

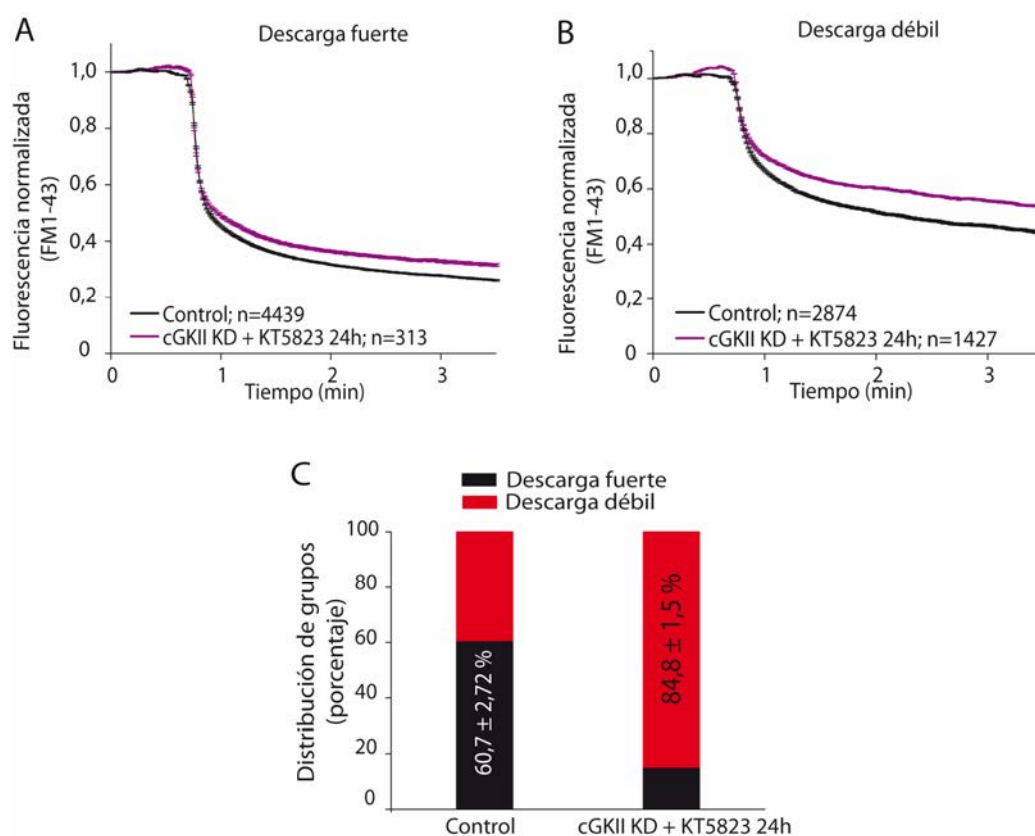


Figura 6: Perfil de descarga de la sonda, para las dos condiciones experimentales, del grupo de botones de descarga fuerte (Panel A) así como del grupo de descarga débil (Panel B). Distribución porcentual de botones sinápticos en los grupos de descarga fuerte y débil en células control y células cGKII KD tratadas a su vez con el inhibidor de cGKs, KT5823 durante 24 horas (Panel C).

Resultados

3. El tratamiento agudo con KT5823 también altera el reciclamiento vesicular

Los resultados anteriores mostraron que tanto el silenciamiento de cGKII como una inhibición prolongada con KT5823 enlentecían el reciclamiento vesicular. Con el fin de determinar si era necesaria una inhibición tan prolongada para que se alterase el reciclamiento vesicular se llevaron a cabo experimentos en los que se redujo considerablemente el tiempo de inhibición. Para ello, se realizaron experimentos con la sonda FM1-43 tras 30 minutos de incubación en presencia del inhibidor. Los resultados obtenidos con dicho tratamiento fueron muy similares a los obtenidos con una incubación larga (24 horas) con KT5823 o silenciando la proteína cGKII.

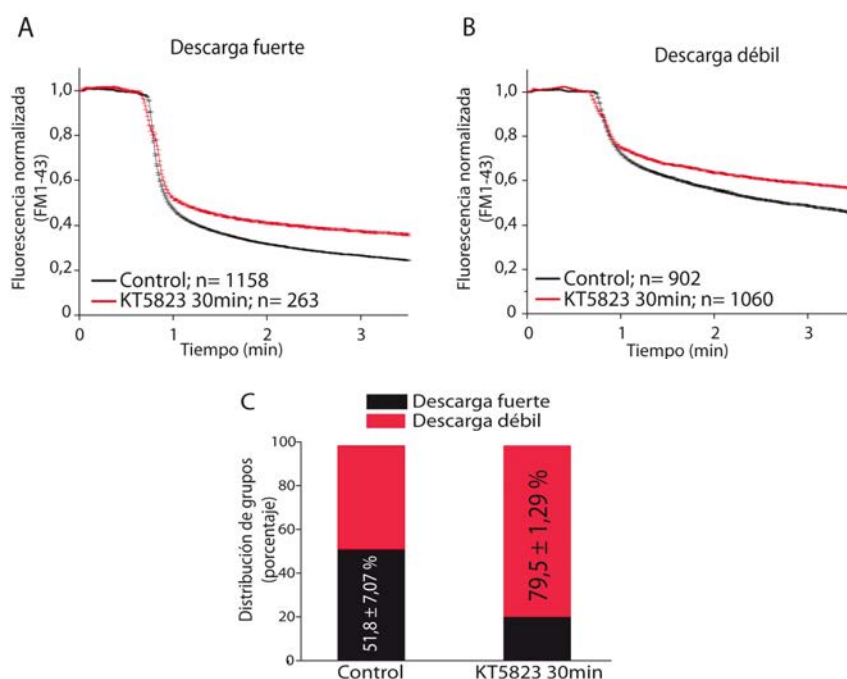


Figura 7: Los perfiles de descarga de la sonda de los dos grupos de botones, en ambas condiciones experimentales, se muestran en los paneles A (grupo de descarga fuerte) y B (grupo de descarga débil). En el Panel C se muestra el porcentaje de botones analizados (en células control y tratadas durante 30 minutos con KT5823) que pertenecen a cada grupo de descarga.

En la Figura 7C se muestra la distribución de botones en ambos grupos de descarga. En células control el grupo de descarga fuerte suponía un $51,8 \pm 7,07\%$ de los botones analizados, mientras que en células incubadas durante 30 minutos en

Resultados

presencia del inhibidor KT5823 tan sólo el $20,45 \pm 1,3\%$ de los botones analizados pertenecían a dicho grupo (ANOVA $p= 0,00614$). En relación al grupo de descarga débil, un $48,2 \pm 7,07\%$ de los botones analizados pertenecían a este grupo en células control y un $79,55 \pm 1,3\%$ en células incubadas con el inhibidor (ANOVA $p= 0,00614$).

La incubación durante 30 minutos con KT5823 también alteró de forma significativa el grado de descarga en ambos grupos. En la Figura 7A se pueden observar las cinéticas de los botones de descarga fuerte (Control y KT5823 30 minutos), y en el panel 7B las cinéticas de los botones de descarga débil. Se observa que en ambos casos, el tratamiento con KT5823 se traduce en una reducción importante del grado total de descarga de la sonda, modificando significativamente su cinética.

El ciclo vesicular es un proceso complejo en el que pueden distinguirse varias etapas que están muy reguladas. La disminución en la descarga de sonda observada tras la incubación (prolongada o aguda) con KT5823 podía deberse a una inhibición de la exocitosis, a una inhibición de la endocitosis, a una inhibición de ambos procesos, etc. Con objeto de analizar cuál de las fases del ciclo vesicular se estaba afectando se introdujeron modificaciones en el protocolo de los experimentos de FM1-43.

En primer lugar, sustituimos el estímulo sostenido durante 3 minutos para la descarga de la sonda por un protocolo de doble estimulación. Para ello aplicamos un estímulo inicial de 10 segundos de KCl 50mM, seguidos de 1 minuto de reposo, y un segundo estímulo mantenido durante 2 minutos para descargar por completo el remanente de la sonda (Figura 8A). Este protocolo nos permite analizar, en primer lugar, la exocitosis de las vesículas de rápida movilización (inducida por los primeros 10 segundos de estímulo), y la liberación del total de vesículas movilizables (inducida por los 2 minutos de estímulo sostenido). Se realizó este protocolo incubando con el inhibidor de cGKs, KT5823, antes de la carga de la sonda, y después de la carga de la sonda y se analizaron las diferentes respuestas (Figura 8B).

Cuando la incubación con el inhibidor se realizó antes de la carga de la sonda, se observó una fuerte reducción tanto del grado de descarga inducida por 10 segundos de estimulación (Figura 8C; $38,63 \pm 0,22\%$ en el Control; $27,19 \pm 0,23\%$ al aplicar KT5823 previo a la carga de la sonda; Kolgomorov-Smirnov

Resultados

$p < 0,01$), como del grado de descarga total tras 2 minutos de estímulo continuo (Figura 8D; $60,64 \pm 0,25\%$ en el Control; $44,26 \pm 0,3\%$ con KT5823; Kolmogorov-Smirnov $p < 0,01$), con respecto al grado de descarga observado en las células control tras los mismos estímulos. Cuando la incubación con KT5823 se realizó después de la carga de la sonda, no se encontraron diferencias significativas en el grado de descarga, con respecto al control, en la primera fase de descarga inducida por 10 segundos de estímulo (Figura 8C; $38,63 \pm 0,22\%$ en el Control; $37,99 \pm 0,33\%$ tras la aplicación de KT5823 posterior a la carga de la sonda; Kolmogorov-Smirnov $p = 0,155$) y tan sólo una leve reducción en el grado de descarga total de la sonda (Figura 8D; $60,64 \pm 0,25\%$ en el Control; $56,66 \pm 0,37\%$ tras la aplicación de KT5823 posterior a la carga; Kolmogorov-Smirnov $p < 0,01$).

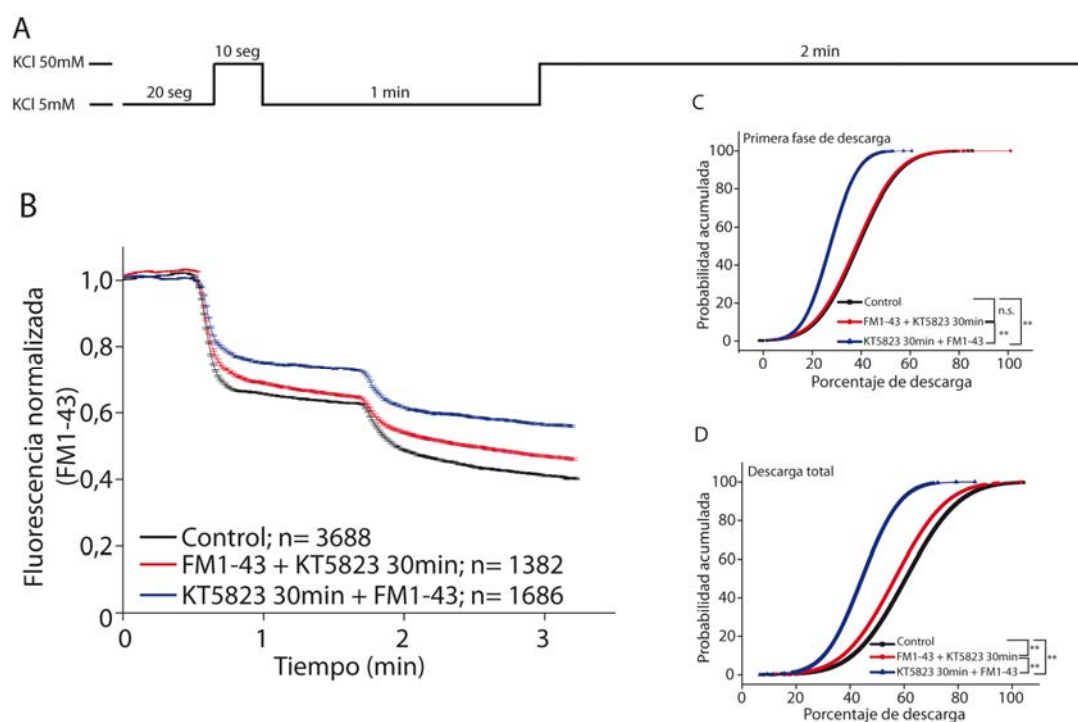


Figura 8: Protocolo de aplicación de estimulación y reposo durante la adquisición de imágenes para el análisis de la primera fase de exocitosis de vesículas rápidamente movilizables, y del total de vesículas movilizables (Panel A). Perfil de descarga de la sonda durante las dos fases en células control y células tratadas con KT5823 durante 30 minutos antes de la carga de la sonda y después de la carga de la sonda (Panel B). Distribución de la probabilidad acumulada de los porcentajes de descarga en las tres condiciones durante la primera fase de descarga (Panel C) y al final del experimento tras la descarga total de la sonda (Panel D).

Resultados

Estos resultados sugieren la participación de la cGKII en la regulación de las etapas iniciales de la endocitosis de membrana y de la formación de nuevas vesículas ya que, si la incubación con el inhibidor se realiza después de la carga la magnitud de su efecto es mucho menor que el producido cuando la incubación es anterior a la carga. Por otra parte, estos resultados ponen de manifiesto que la inhibición de la cGKII se traduce en una reducción de las vesículas rápidamente movilizables y también del total de vesículas movilizables.

4. Análisis del ciclo vesicular en ratones de cepa salvaje (WT) y carentes de la proteína cGKII (cGKII KO).

Una vez demostrada la implicación de la cGKII en la regulación del ciclo vesicular, mediante su inhibición farmacológica y/o silenciamiento de su expresión, el siguiente paso fue estudiar el reciclamiento vesicular en neuronas granulares de ratón WT o KO para la proteína cGKII, y analizar si existe alguna alteración del mismo en las células carentes de cGKII, así como el efecto de la inhibición de la quinasa dependiente de cGMP tipo I.

Los experimentos funcionales realizados con la sonda FM1-43 arrojaron resultados diferentes a los observados en las células de rata. En primer lugar, la distribución porcentual de los botones en los dos grupos de descarga mostró que, en células WT, los botones pertenecientes al grupo de descarga fuerte suponían un 80% del total y tan sólo un 20% de botones pertenecía al grupo de descarga débil o grupo 2, mientras que en las células de rata el grupo de descarga fuerte suponía un 60% (Figura 9C). Resultados previos del grupo (Bartolome-Martin y cols., 2012) describieron que el porcentaje de botones pertenecientes al grupo 1 o de descarga fuerte aumentaba con los días de desarrollo, relacionando el nivel de eficacia de reciclamiento con el estadio de maduración celular. Dado que en ratones el desarrollo es ligeramente más rápido que en ratas (Lee y cols., 2009), y que los experimentos funcionales están realizados a los mismos días *in vitro* con células procedentes de rata o de ratón (7-9 DIV), esta diferencia podría deberse a que los cultivos de las neuronas granulares de ratón fuesen más maduros que los de rata y que esa mayor madurez se tradujese en una mayor eficiencia en el reciclamiento.

Resultados

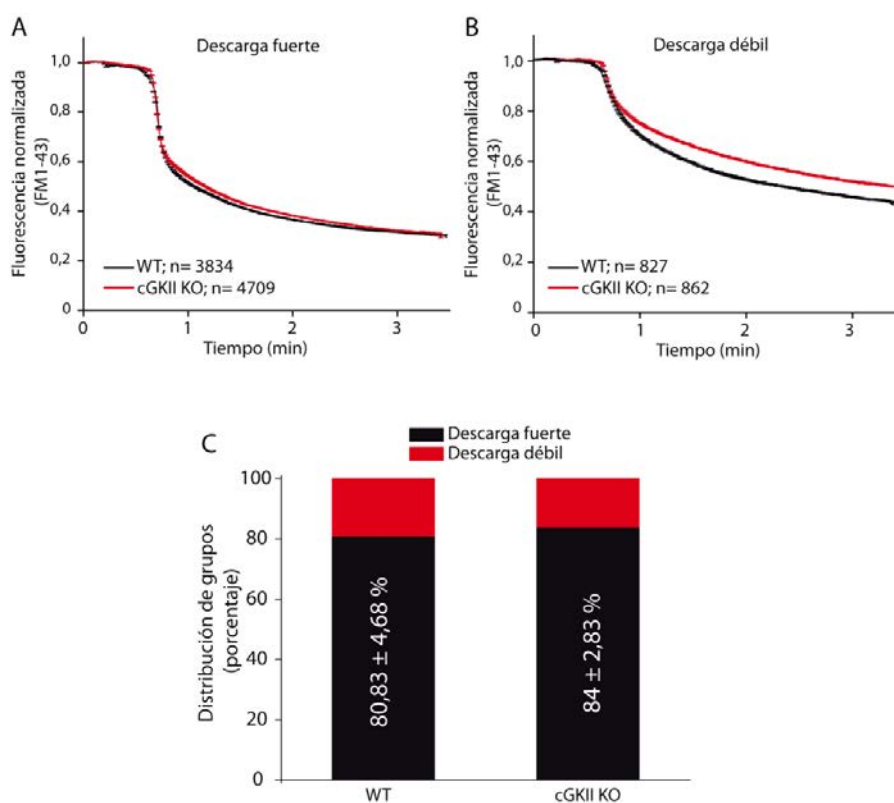


Figura 9: Perfil de descarga de la sonda FM1-43 de la media de los botones pertenecientes al grupo de descarga fuerte tanto en células procedentes de ratones WT, como en células procedentes de ratones cGKII KO (Panel A). Perfil de descarga de la sonda FM1-43 de la media de los botones pertenecientes al grupo de descarga débil tanto en células procedentes de ratones WT, como en células procedentes de ratones cGKII KO (Panel B). Distribución porcentual de los botones sinápticos analizados en los grupos de descarga fuerte y débil en células procedentes de ratones WT, como en células procedentes de ratones cGKII KO (Panel C).

Por otro lado, encontramos que la distribución porcentual de los botones en los dos grupos, tanto en células procedentes de ratones WT como en las procedentes de ratones cGKII KO, no variaba significativamente ($80,83 \pm 4,68\%$ de los botones pertenecen al grupo 1 en células WT y $84 \pm 2,84\%$ en células cGKII KO; ANOVA $p=1$). Sin embargo, al observar los perfiles de descarga de ambos tipos celulares encontramos que, si bien en el grupo 1 no había diferencias, en el caso del grupo 2, las neuronas carentes de cGKII liberaban menos sonda que las células WT. Estos resultados demuestran, que si bien la distribución de botones en ambos grupos no variaba, los botones pertenecientes al grupo de descarga débil reciclaban sus vesículas de manera menos eficiente en ausencia de la cGKII.

Resultados

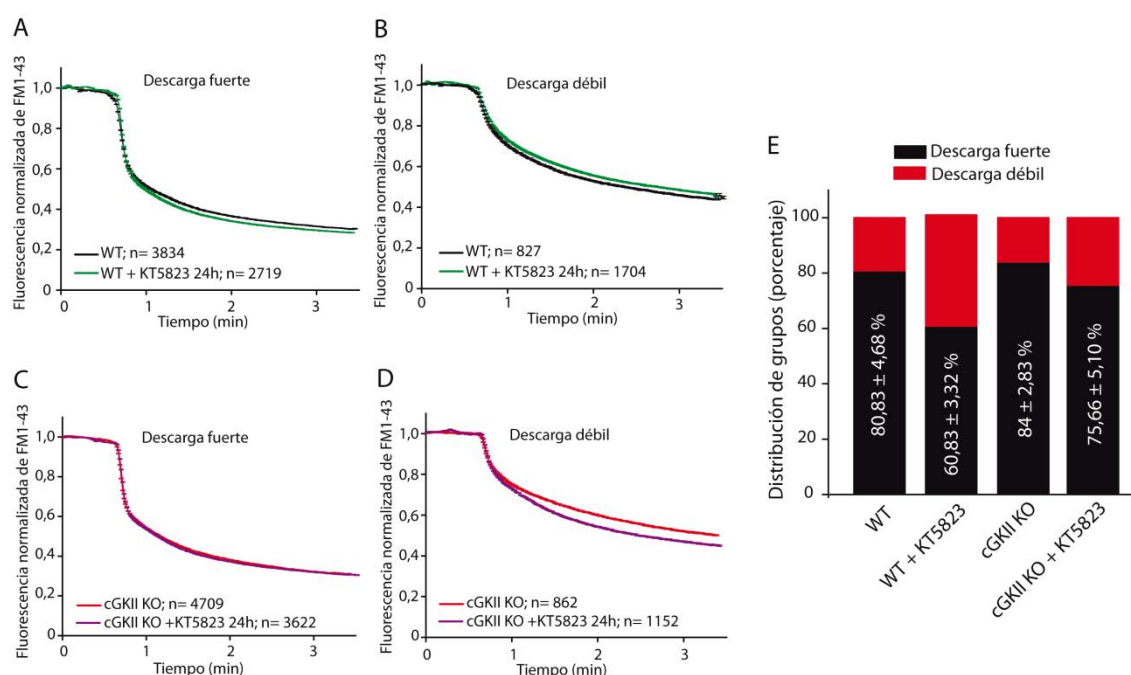


Figura 10: Perfil de descarga de la sonda FM1-43 de la media de los botones pertenecientes al grupo de descarga fuerte en células WT control y tratadas con KT5823 durante 24h (Panel A), y cGKII KO control y tratadas con KT5823 (Panel C). Perfil de descarga de la sonda FM1-43 de la media de los botones pertenecientes al grupo de descarga débil en células WT control y tratadas con KT5823 durante 24h (Panel B), y cGKII KO control y tratadas con KT5823 (Panel D). Distribución porcentual de los botones sinápticos analizados en los grupos de descarga fuerte y débil para todas las condiciones experimentales (Panel E)

Al someter a las neuronas a un tratamiento con KT5823 durante 24h, encontramos que, en el caso de las células WT, el KT5823 provocó un aumento en el porcentaje de botones pertenecientes al grupo de descarga débil de forma similar a lo que ocurre en el caso de las neuronas de rata, pasando de un $19,16 \pm 4,68\%$ de botones pertenecientes al grupo 2 en células WT control, a un $40,16 \pm 3,09\%$ tras el tratamiento con KT5823 durante 24h (Figura 10E; ANOVA $p < 0,05$).

En el caso de las células cGKII KO se observó un ligero aumento, aunque no significativo, del grupo de botones de grupo 2 ($16 \pm 2,83\%$ en células cGKII KO control frente a $24,33 \pm 5,10\%$ en neuronas cGKII KO tratadas con KT5823 durante 24h; ANOVA $p = 1$). Este efecto del KT5823 en células carentes de cGKII

Resultados

podría ser atribuible a la inhibición de la proteína cGKI, dado que el KT5823 no es selectivo de cGKII y actúa como inhibidor específico de ambas quinasas (Figura 10E).

5. Análisis ultraestructural de las sinapsis en condiciones de inhibición o silenciamiento de la proteína dependiente de GMPc tipo II.

Trabajos previos del grupo habían demostrado que la existencia de la población de botones de descarga débil en los experimentos realizados con la sonda FM1-43 se debía a una baja eficacia del reciclamiento en estos botones (Bartolome-Martin y cols., 2012). Tras la estimulación de alta intensidad, realizada para la carga de la sonda, se activan mecanismos de endocitosis para la recuperación de grandes fracciones de membrana que dan lugar a estructuras endosomales en el interior del terminal sináptico

La formación de este tipo de estructuras clásicamente se ha relacionado con la posterior gemación de vesículas desde los endosomas para asegurar el reabastecimiento de vesículas ante la llegada de un nuevo estímulo (Cheung y Cousin, 2012, 2013). Sin embargo, los resultados del grupo están más en concordancia con otras formas de endocitosis en masa descritas, a partir de las cuales, aparentemente, no se produce la gemación de nuevas vesículas sinápticas, al menos, en el espacio de tiempo analizado en estos experimentos (Perez Bay y cols., 2007). En este caso la hipótesis es que dicho mecanismo de reciclamiento se activa para preservar el tamaño de la zona activa ante un aumento masivo de su superficie, fenómeno potencialmente deletéreo para su funcionalidad.

La aparición de este tipo de estructuras endosomales, sin la gemación de nuevas vesículas funcionales, durante el estímulo de carga de la sonda FM1-43 se traduciría en la presencia de una cantidad de fluorescencia que quedaría atrapada dentro del botón sináptico sin posibilidad de ser liberada ante un nuevo estímulo, dando cuenta del grupo de descarga débil, cuya característica principal es un remanente de fluorescencia que no se libera.

Realizamos análisis ultraestructurales, con el objetivo de estudiar si el aumento de botones pertenecientes al grupo de descarga débil (y por lo tanto baja eficacia de reciclamiento), tanto en condiciones de inhibición como de

Resultados

silenciamiento de la proteína cGKII, era causado por un aumento de estas estructuras endosomales acumuladas en el botón sináptico.

Para ello, realizamos preparaciones de microscopía electrónica en neuronas granulares de rata en las siguientes condiciones: células control en reposo y fijadas tras un estímulo con KCl 50mM, incubación durante 30 minutos con KT5823 en reposo y estimuladas, incubación con KT5823 durante 24h en reposo y estimuladas, y células cGKII KD en reposo y estimuladas.

Se analizó el número total de orgánulos clasificándolos como vesículas sinápticas (<40nm diámetro) o endosomas (>40nm diámetro) de entre 20 y 50 terminales por condición.

En condiciones control, en reposo, los terminales aparecieron ocupados, principalmente, por vesículas sinápticas (n=22; $37,86 \pm 3,56$ sSV/zona activa), y en muy pocos casos aparecieron endosomas (n=20; $1,36 \pm 0,32$ endosomas/zona activa).

La inhibición o silenciamiento de la cGKII no modificó significativamente el número de endosomas por zona activa encontrados en situación de reposo. Después de 30 minutos o 24 horas de tratamiento con KT5823 se encontraron $1,05 \pm 0,21$ endosomas/zona activa (ANOVA $p=0,6775$), y $0,48 \pm 0,15$ endosomas/zona activa (ANOVA $p=0,2266$), respectivamente. Un valor similar se encontró silenciando cGKII ($0,96 \pm 0,38$ endosomas/zona activa, ANOVA $p=0,7654$). Al analizar el porcentaje de zonas activas que presentaban endosomas respecto del total analizado, encontramos que se mantenía prácticamente constante para todas las condiciones (Figura 11B).

La despolarización sostenida durante 3 minutos, en condiciones control, aumentó tanto el porcentaje de zonas activas que presentaban organelas de mayor tamaño (Figura 11B), como el número de endosomas encontrados ($3,15 \pm 0,4$ endosomas/zona activa).

En la Figura 11C se ilustra este aumento en el número de endosomas, representando gráficamente la relación endosomas/vesículas sinápticas para cada condición. En condiciones control, encontramos una relación de $0,087 \pm 0,014$ tras la estimulación ($0,032 \pm 0,007$ en reposo, Mann-Whitney $p<0,01$). En condiciones de silenciamiento o inhibición de la proteína cGKII, si bien en condiciones de reposo no se observaron diferencias, el número de endosomas y su relación con el número de vesículas sinápticas aumenta significativamente tras el

Resultados

estímulo con KCl 50mM, siendo $0,261 \pm 0,062$ en células cGKII KD (Mann-Whitney $p < 0,01$), $0,213 \pm 0,063$ en células incubadas durante 30 minutos con KT5823 (Mann-Whitney $p < 0,05$) y $0,230 \pm 0,076$ en células incubadas 24 horas con KT5823 (Mann-Whitney $p < 0,05$).

Este aumento en el número de endosomas por zona activa, tras un estímulo intenso y sostenido, en células en las que se ha silenciado o inhibido cGKII podían explicar el drástico descenso en los niveles de descarga de FM1-43 en dichas condiciones experimentales.

Tanto los resultados obtenidos con la sonda FM1-43 como los de MET, pusieron de manifiesto que hay botones con un reciclamiento muy eficiente (no se observan endosomas o se observan muy pocos y liberan un elevado porcentaje de la sonda) en todas las condiciones experimentales, mientras que en otros botones ese reciclamiento es menos eficiente (mayor número de endosomas y menor grado de liberación de la sonda). En estos últimos botones el aumento en el número de endosomas debería ir acompañado de una disminución en el número de vesículas, mientras que en los primeros no se modificaría con respecto a una situación de no estimulación. Por tanto analizamos, para cada condición, el número de vesículas sinápticas presentes en aquellas zonas activas cuya relación endosomas/vesículas era igual o mayor a la media observada en dicha condición, es decir, en las que aumentaba el número de endosomas.

En la Figura 11D se representan los datos obtenidos en los que se puede observar que, en condiciones control tras el estímulo, el número de vesículas en estas zonas activas es menor que en condiciones de reposo ($28,77 \pm 5,18$ vesículas/zona activa frente a $40,3 \pm 6,07$ vesículas/zona activa). Este efecto es notablemente más marcado en células tratadas durante 24 horas con KT5823 ($57,9 \pm 10,70$ vesículas/zona activa en reposo frente a $17,16 \pm 4,73$ vesículas/zona activa tras el estímulo, Mann-Whitney $p < 0,01$) y en células cGKII KD ($62,9 \pm 10,20$ vesículas/zona activa en reposo frente a $22 \pm 4,87$ vesículas/zona activa tras el estímulo, Mann-Whitney $p < 0,01$).

Esta reducción en el número de vesículas sinápticas en aquellas zonas activas donde aumenta significativamente el número de endosomas, confirma la incapacidad de este tipo de reciclamiento en masa para mantener constante el número de vesículas, y la importancia de cGKII en el mantenimiento de un reciclamiento de membrana eficaz.

Resultados

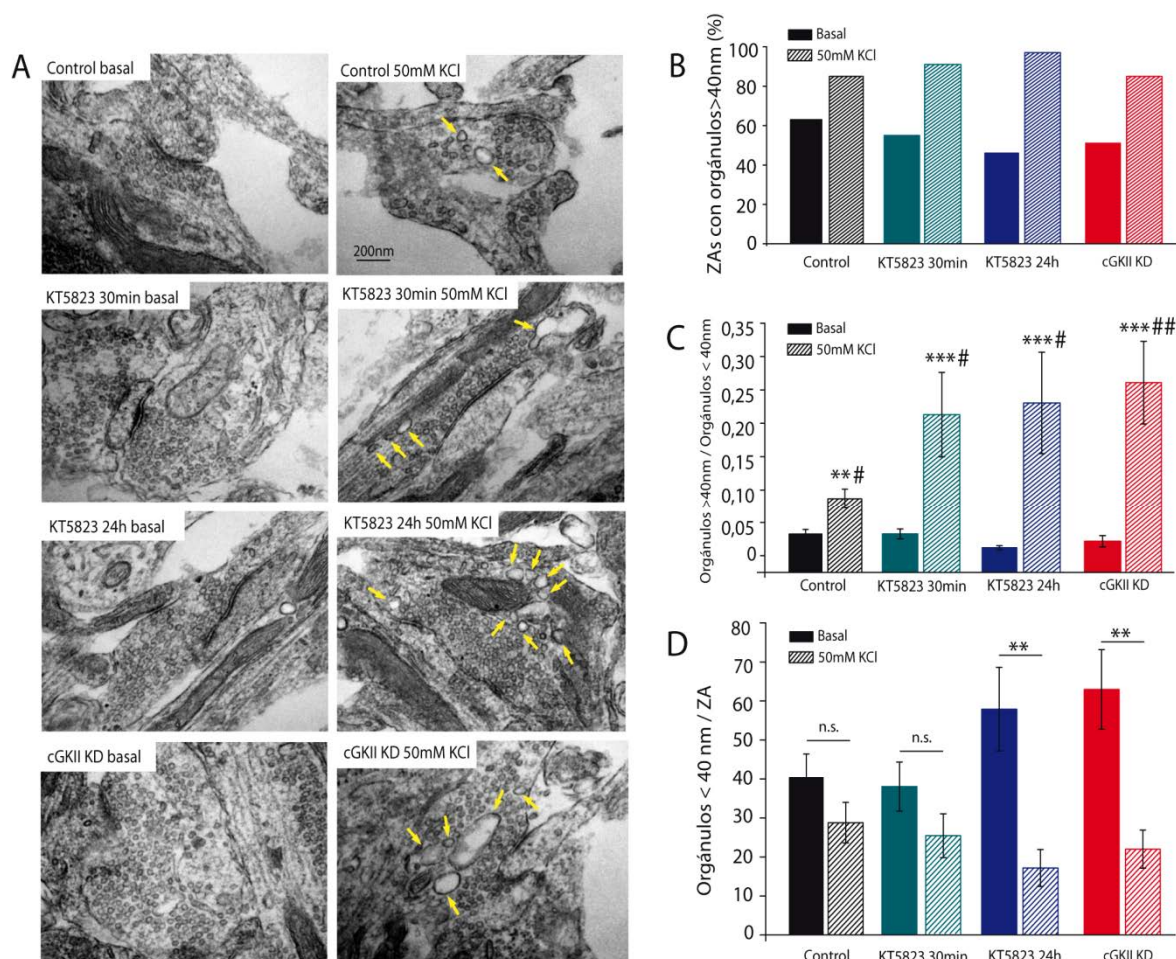


Figura 11: La inhibición o silenciamiento de cGKII promueve la formación de estructuras endosomales ante un estímulo intenso y prolongado. Micrografías de neuronas granulares de cerebelo en reposo (columna izquierda) y estimuladas con 50mM KCl (columna derecha), tanto en condiciones control como en presencia de KT5823 (30 minutos o 24 horas) y en células cGKII KD (Panel A). Distribución porcentual del número de Zonas Activas (ZAs) que presentan estructuras endosomales, en reposo y tras la estimulación, en todas las condiciones experimentales (Panel B). Relación endosomas/vesículas sinápticas en reposo y tras estimulación; * representa la significación estadística entre las condiciones de reposo y estimulación para cada condición experimental; # representa la significación estadística de cada condición con su control (Panel C). Los datos representan la media \pm S.E.M de todas las ZAs analizadas en control (reposo n= 22, estimuladas n= 27), KT5823 30 minutos (reposo n= 43, estimuladas n= 55), KT5823 24h (reposo n= 26, estimuladas n= 38) y células cGKII KD (reposo n= 31, estimuladas n=27). Número de vesículas, en reposo y tras estimulación, en aquellas zonas activas cuya relación endosomas/vesículas sinápticas es igual o mayor a la media (Panel D). * representa la significación entre las condiciones de reposo y estimulación para cada condición experimental. Los datos representan la media \pm S.E.M.

Resultados

6. Análisis ultraestructural sináptico en neuronas granulares de cerebelo de ratón de cepa salvaje y cGKII KO.

Para el análisis ultraestructural de las neuronas granulares de ratón se procedió de la misma manera que con neuronas granulares de rata. Se analizaron diferentes zonas activas, tanto en condiciones de reposo como en condiciones de estimulación, que imitaban el proceso de carga de la sonda. Dicho análisis se llevó a cabo en neuronas WT, con y sin tratamiento previo durante 24 horas con KT5823, y cGKII KO, con y sin tratamiento con KT5823.

Se analizó el número total de orgánulos clasificándolos como vesículas sinápticas (<40nm diámetro) o endosomas (>40nm diámetro) de entre 14 y 38 terminales por condición.

En células WT, en condiciones de reposo, se observó que los botones sinápticos se encontraban principalmente ocupados por vesículas ($98,13 \pm 8,04$ vesículas/zona activa) encontrándose muy pocos endosomas ($0,83 \pm 0,22$ endosomas /zona activa).

Ni la ausencia de cGKII ($0,31 \pm 0,11$ endosomas/zona activa; ANOVA $p>0,05$), ni el tratamiento farmacológico con KT5823 en células WT ($0,62 \pm 0,19$ endosomas / zona activa; ANOVA $p>0,05$) y cGKII KO ($0,35 \pm 0,16$ endosomas/zona activa; ANOVA $p>0,05$) modificó significativamente el número de endosomas por zona activa en condiciones de reposo. De igual forma, el análisis del porcentaje de zonas activas que presentaban endosomas no mostró diferencias entre las distintas condiciones experimentales (Figura 12B).

El estímulo sostenido durante 3 minutos, en neuronas WT, aumentó tanto el porcentaje de zonas activas que presentaban organelas de mayor tamaño (Figura 12B) como el número de endosomas en dichas zonas activas ($3,05 \pm 0,49$ endosomas/zona activa).

En la Figura 12C se ilustra este aumento en el número de endosomas, representando gráficamente la relación endosomas/vesículas sinápticas para cada condición. En condiciones de reposo, en células WT se observó una relación de $0,012 \pm 0,004$ y de $0,048 \pm 0,008$ tras la estimulación (Mann-Whitney $p<0,001$). En ausencia de la proteína cGKII, si bien en condiciones de reposo no se observaban diferencias, el número de endosomas en relación al número de vesículas sinápticas aumentó significativamente tras el estímulo con KCl 50mM, siendo de $0,059 \pm 0,019$

Resultados

en células cGKII KO (Mann-Whitney $p < 0,001$), aunque no era significativamente diferente al valor encontrado en células WT.

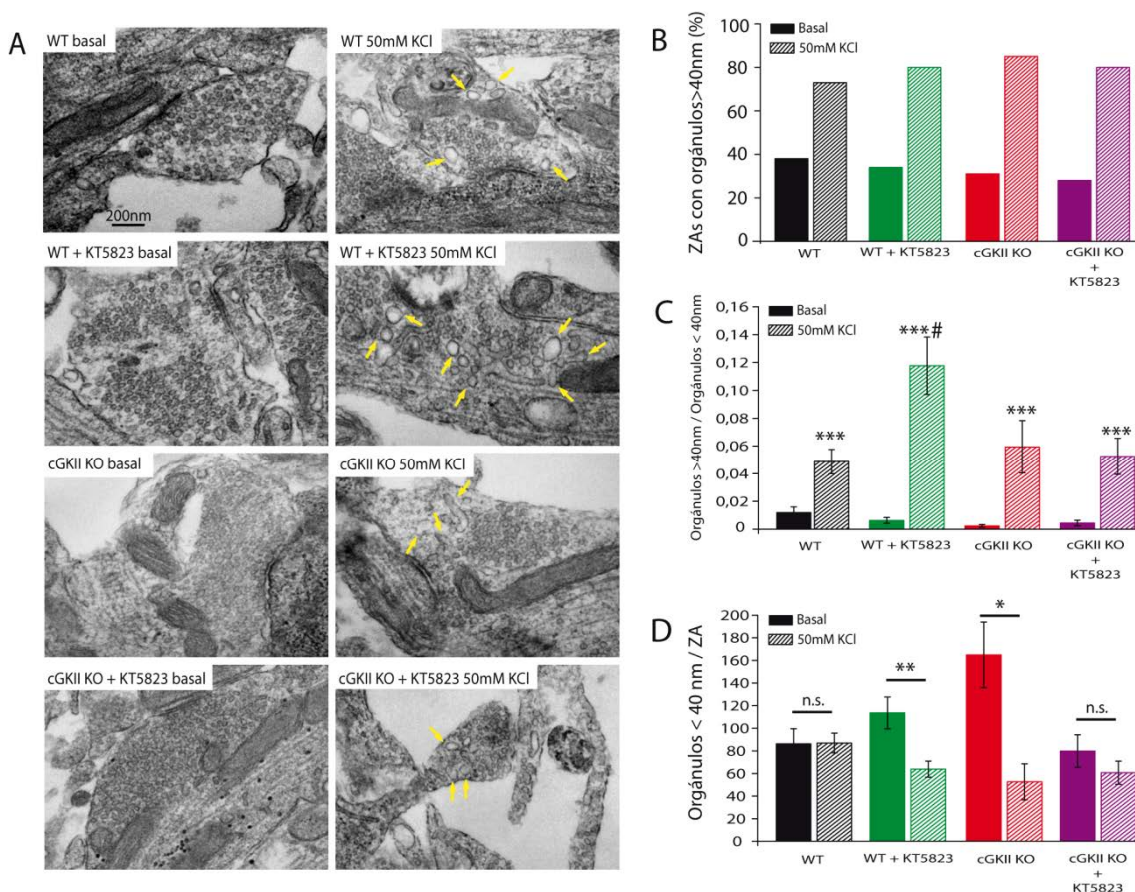


Figura 12: Micrografías de neuronas granulares de cerebelo en reposo (columna izquierda) y estimuladas con 50mM KCl (columna derecha), tanto de neuronas WT y cGKII KO como en presencia de KT5823 (Panel A). Distribución porcentual del número de Zonas Activas (ZAs) que presentan estructuras endosomales, en reposo y tras la estimulación, en todas las condiciones experimentales (Panel B). Relación endosomas/vesículas sinápticas en reposo y tras estimulación; * representa la significación estadística entre las condiciones de reposo y estimulación para cada condición experimental; # representa la significación estadística de cada condición con su control (Panel C). Los datos representan la media \pm S.E.M de todas las ZAs analizadas en neuronas WT (reposo $n = 30$, estimuladas $n = 38$), WT con KT5823 (reposo $n = 29$, estimuladas $n = 34$), cGKII KO (reposo $n = 16$, estimuladas $n = 14$) y células cGKII KO con KT5823 (reposo $n = 14$, estimuladas $n = 21$). Número de vesículas, en reposo y tras estimulación, en aquellas zonas activas cuya relación endosomas/vesículas sinápticas es igual o mayor a la media (Panel D). * representa la significación entre las condiciones de reposo y estimulación para cada condición experimental. Los datos representan la media \pm S.E.M

Resultados

También se observó un aumento de la relación endosomas/vesículas en células cGKII KO incubadas 24 horas con KT5823 ($0,052 \pm 0,01$; Mann-Whitney $p < 0,001$) y en células WT incubadas durante 24 horas con KT5823 ($0,12 \pm 0,02$; Mann-Whitney $p < 0,001$), donde el incremento fue significativamente mayor que en las células WT no tratadas con KT5823.

Estos resultados mostraban un aumento en el número de endosomas y su relación con las vesículas sinápticas en células WT incubadas con KT5823, dato que explicaba el aumento encontrado en los experimentos de FM1-43 de los botones pertenecientes al grupo de descarga débil en esta condición. De igual forma, ni en condiciones de ausencia de cGKII ni en células cGKII KO tratadas con KT5823 encontramos diferencias significativas en el número de endosomas y en la relación endosomas/vesículas sinápticas con respecto a las células WT.

Cuando se analizó el número de vesículas sinápticas presentes en aquellas zonas activas cuya relación endosomas/vesículas era igual o mayor a la media observada en dicha condición, es decir, en las que aumentaba el número de endosomas, para cada condición (Figura 19D), en neuronas WT tras el estímulo, no se encontraron diferencias en el número de vesículas en estas zonas activas en comparación con la condición de reposo ($86,97 \pm 8,67$ vesículas/zona activa frente a $86,22 \pm 13,41$ vesículas/zona activa; Mann-Whitney $p > 0,05$). Una situación similar se observa en las células cGKII KO tratadas con KT5823 ($79,8 \pm 14,39$ vesículas/zona activa en reposo, frente a $60,62 \pm 10,21$ vesículas/zona activa tras el estímulo; Mann-Whitney $p > 0,05$). Sin embargo, en el caso de las zonas activas procedentes de cGKII KO y de neuronas WT tratadas con KT5823, se observó que en aquellas zonas activas donde se incrementaba el número de endosomas, dicho incremento iba acompañado de una fuerte reducción del número de vesículas sinápticas ($63,93 \pm 7,07$ vesículas/zona activa frente a $113,6 \pm 14,08$ vesículas/zona activa en neuronas WT tratadas con KT5823; Mann-Whitney $p < 0,01$ y $52,66 \pm 15,94$ vesículas/zona activa frente a $164,84 \pm 29,05$ vesículas/zona activa en neuronas cGKII KO; Mann-Whitney $p < 0,05$).

Resultados

7. La inhibición prolongada de cGK aumenta el tamaño del pool vesicular movilizable y enlentece la endocitosis tras un estímulo intenso y prolongado en neuronas granulares de cerebelo de rata.

La formación de estructuras endosomales suele estar asociada con la exocitosis masiva de una gran cantidad de vesículas, y su presencia en el interior del botón indica que, en el tiempo analizado, estas estructuras no han dado lugar a nuevas vesículas. El aumento de estas estructuras en determinadas zonas activas, como consecuencia de la inhibición o el silenciamiento de cGKII, podría deberse a un incremento de las vesículas exocitadas durante el primer estímulo, pero también a un enlentecimiento de la endocitosis y el procesamiento posterior de estos endosomas. El siguiente objetivo fue monitorizar el ciclo vesicular, utilizando la herramienta molecular vGlut1-pH, que permite analizar la exocitosis y la endocitosis en células no estimuladas previamente. En presencia de Bafilomicina, el incremento de fluorescencia registrado en los botones sinápticos en respuesta a una despolarización con KCl 50mM, corresponde al total de vesículas movilizadas por el estímulo, aislando la componente exocitótica de la endocitótica compensatoria. El máximo de fluorescencia (reflejo del total de vesículas presentes en el botón) se obtiene mediante la perfusión de NH₄Cl, para alcalinizar el interior vesicular, que produce un gran incremento de la fluorescencia.

En la Figura 13 (Panel A) se representa como, por un lado, el tiempo necesario para alcanzar la mitad de la fluorescencia máxima (dato representativo de la velocidad de exocitosis) era menor en el caso de las células incubadas con KT5823 durante 24 horas ($\tau_{\text{control}}=5,74\pm 0,19\text{s}$; $\tau_{\text{KT5823}}=3,97\pm 0,17\text{s}$, ANOVA $p<0,01$), y, en segundo lugar, que la magnitud de la fracción relativa de vesículas movilizables (obtenido al normalizar el incremento de fluorescencia observado tras la despolarización a la fluorescencia obtenida al perfundir con el NH₄Cl) no varía entre la situación control y las células tratadas durante 24 horas con KT5823.

Sin embargo, los datos de fluorescencias absolutas (Figura 13 B) mostraron que en el caso de las células incubadas con KT5823, tanto la fracción de vesículas movilizables como el contenido total de vesículas era mayor, sugiriendo que la exocitosis de un mayor número de vesículas podía dar lugar a un mayor número de endosomas en las células con cGK inhibida.

Resultados

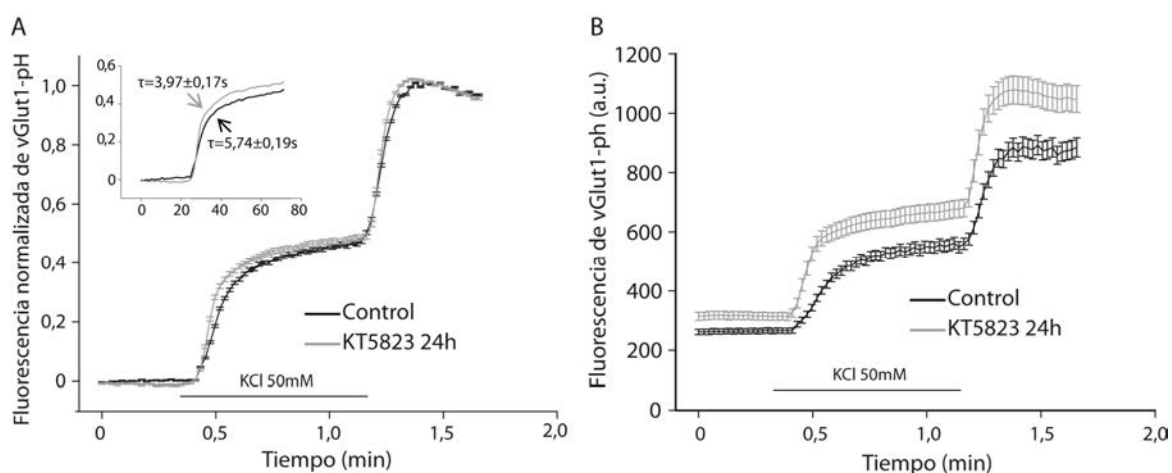


Figura 13: Perfiles medios del incremento de fluorescencia de vGlut1-pH inducido por la despolarización con KCl 50mM, en presencia de Bafilomicina, normalizados al máximo de señal obtenido con NH_4Cl 50mM, en situación Control y en células tratadas con KT5823 24 horas (Panel A). La figura insertada muestra las cinéticas de exocitosis para ambas condiciones, con sus τ . Valores medios de fluorescencia sin normalizar (u.a.) para ambas condiciones (B).

Con el objetivo de analizar con más profundidad la mecánica de reciclamiento de membranas y el efecto que pudiera tener la inhibición de cGK, se siguió el protocolo descrito por Ryan y colaboradores en 1993 (Ryan y cols., 1993). En dicho protocolo las células se estimulan durante un minuto mediante despolarización con KCl 50mM, y se incuban un minuto con la sonda FM1-43, bien de forma simultánea a la despolarización o retrasando dicha incubación progresivamente con respecto al estímulo (Δt). De esta forma, al retrasar la incubación con la sonda, los botones en los que la endocitosis es rápida y tiene lugar durante o inmediatamente después de la estimulación incorporarán menos FM1-43 que aquellos botones en los que la endocitosis sea más lenta que incorporarán mayor cantidad de sonda y aparecerán marcados aunque la incubación con FM1-43 se retrase en relación al estímulo.

En la Figura 14 se muestran los resultados de este estudio, obtenidos tanto en células control como en células incubadas con KT5823 durante 24 horas, en función del tiempo de retraso con el que se incuban las células con la sonda FM1-43 en relación al estímulo, siendo: $\Delta t=0$ sin retraso, incubación con la sonda al mismo tiempo que la estimulación; $\Delta t=30$ incubación con la sonda durante los últimos 30 segundos de estímulo más 30 segundos con sonda y sin estímulo

Resultados

despolarizante; $\Delta t=60$ inicio de incubación con la sonda inmediatamente después de acabar el minuto de estimulación; $\Delta t=90$ inicio de incubación con la sonda 30 segundos después de acabar el minuto de estimulación; $\Delta t=120$ inicio de incubación con la sonda 60 segundos después de acabar el minuto de estimulación (Figura 14 A).

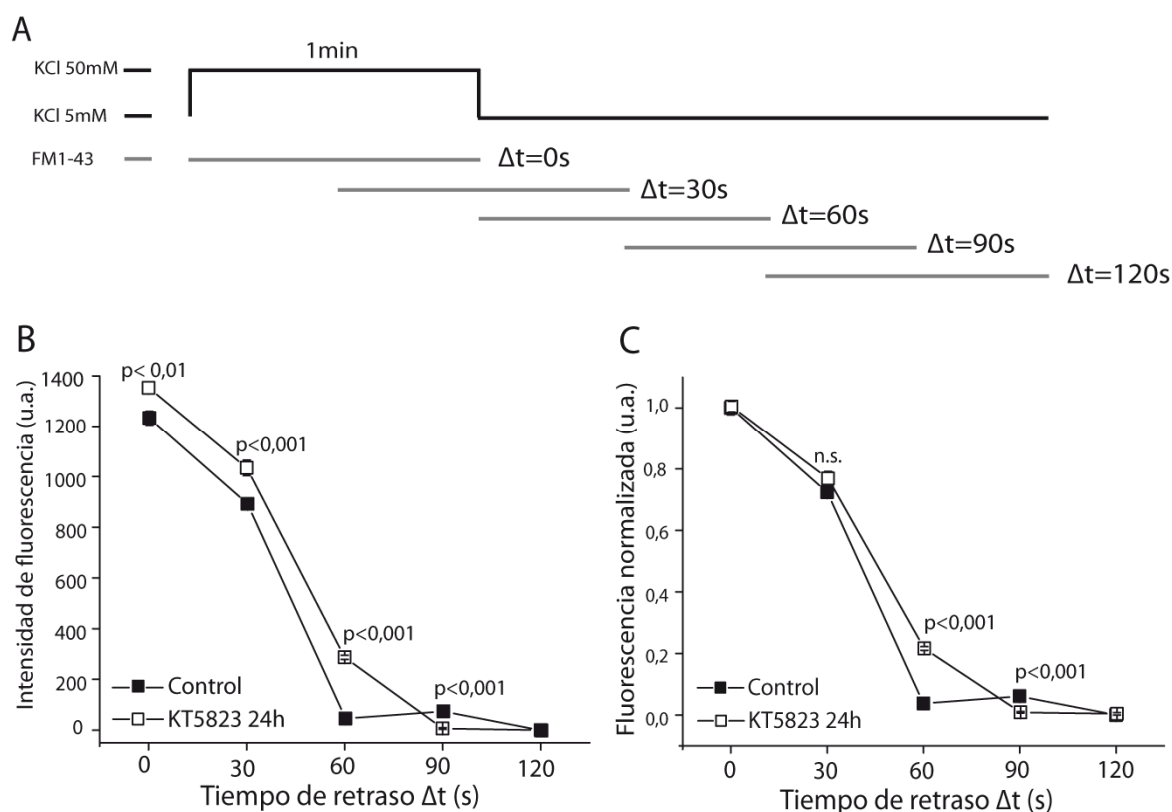


Figura 14: Protocolo seguido para la realización del experimento, indicando el tiempo de estimulación y el momento de incubación con la sonda para cada punto de Δt (Panel A). Intensidad de fluorescencia en valores absolutos observada a los diferentes Δt , en botones de células control o de células incubadas con KT5823 (Panel B). Intensidad de fluorescencia normalizada a los valores de $\Delta t = 0$ para los diferentes Δt , en botones de células control o de células incubadas con KT5823 (Panel C). El número de botones analizado para cada condición fue: $\Delta t=0$ (Control $n=1105$, KT5823 24h $n=1246$), $\Delta t=30s$ (Control $n=1816$, KT5823 24h $n=1660$), $\Delta t=60s$ (Control $n=1200$, KT5823 24h $n=2250$), $\Delta t=90s$ (Control $n=1216$, KT5823 24h $n=2324$), $\Delta t=120s$ (Control $n=893$, KT5823 24h $n=1606$).

La Figura 14 B muestra las fluorescencias obtenidas en niveles absolutos (u.a.) y el panel C los valores normalizados al primer punto. En ambos perfiles se

Resultados

puede observar que los botones de las células incubadas con KT5823 durante 24 horas incorporaban mayor cantidad de sonda que los de las células control, cuando la incubación de la sonda se iniciaba un minuto después de haber finalizado el estímulo, indicando que la inhibición de la cGK se traduce, por una parte en una mayor exocitosis/endocitosis reflejada en el mayor nivel en valores absolutos de fluorescencia y, por otra parte, en un enlentecimiento de la endocitosis.

Por otra parte, se utilizaron células transfectadas con vGlut1-pH para estudiar la cinética de endocitosis, en este caso en ausencia de Bafilomicina, de forma que fuera posible analizar la recuperación de la fluorescencia hasta niveles basales. Dicha recuperación se corresponde con la endocitosis y reacidificación de las vesículas sinápticas.

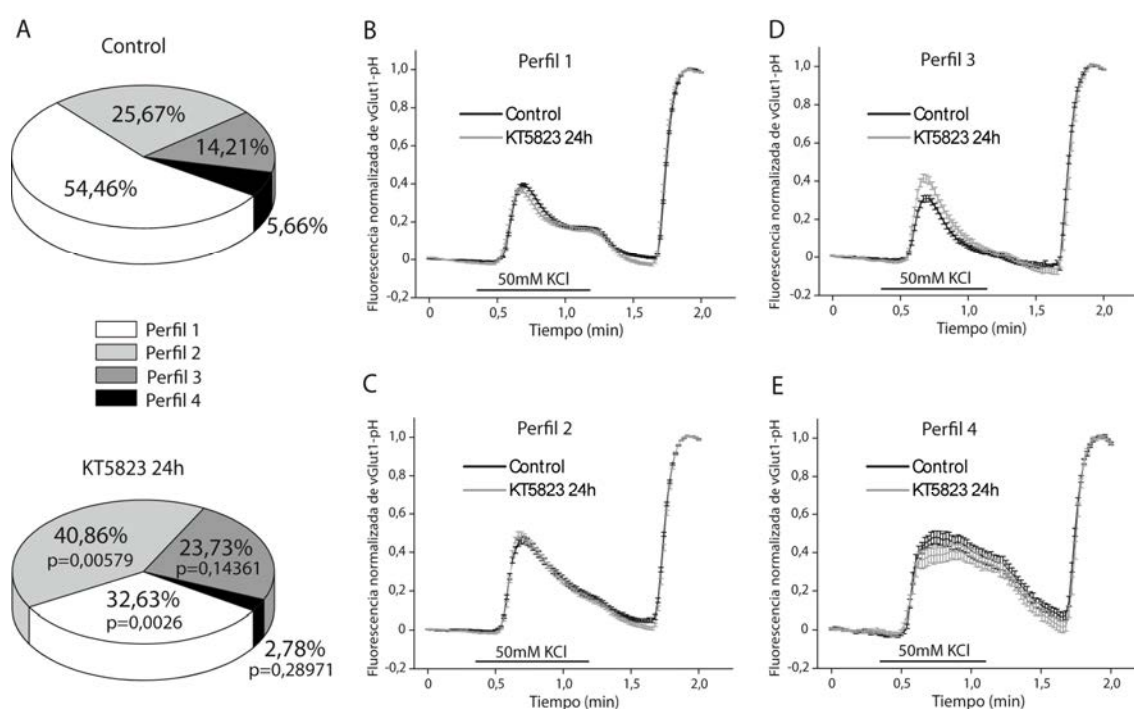


Figura 15: Heterogeneidad de respuestas en la recuperación de la fluorescencia basal de vGlut1-pH tras una estimulación intensa y prolongada. Distribución porcentual de los botones analizados en función de sus respuestas en células control y células incubadas con KT5823 durante 24 horas (Panel A). Perfiles de exocitosis (incremento de fluorescencia) y endocitosis compensatoria tras el estímulo (recuperación de la fluorescencia) en ambas situaciones experimentales (Paneles B-E). Control: Perfil 1 n=222 botones; Perfil 2 n=116 botones; Perfil 3 n=60 botones; Perfil 4 n= 21 botones. KT5823 24h: Perfil 1 n= 134 botones; Perfil 2 n= 168 botones; Perfil 3 n= 96 botones; Perfil 4 n= 14 botones.

Resultados

Cuando las células se estimularon durante 50 segundos con KCl 50mM se encontró una gran heterogeneidad en las cinéticas de recuperación de los botones individuales, que podían agruparse en cuatro perfiles diferentes, cuya distribución porcentual (Figura 15 A) era diferente en las células control y en las incubadas durante 24 horas con KT5823.

Las constantes de decaimiento de cada perfil para ambas condiciones están recogidas en la Tabla I. Se observaron dos variaciones significativas en la distribución de perfiles; en el caso de las células tratadas con KT5823 el perfil 1 (Figura 15B) disminuía a favor de un incremento de botones pertenecientes a los perfil 2 y 3 (Figura 15C y 15D), que muestran una recuperación de la fluorescencia más lenta. Además, en las células incubadas con KT5823, la constante de recuperación de la segunda componente del perfil 1 aumentaba de forma muy significativa con respecto del valor encontrado en las condiciones control.

	Constantes de decaimiento τ_1 and τ_2 (segundos)	
	Control	KT5823
PERFIL 1	13,50±1,71 9,32±0,76	10,24±0,69 19,71±4,34
PERFIL 2	35,39±1,41	37,62±1,38
PERFIL 3	14,57±0,46	19,07±0,72
PERFIL 4	32,91±6,62	37,77±6,59

Tabla I: Constantes de decaimiento para la recuperación de la fluorescencia para los 4 perfiles de respuesta observados tras 50 segundos de estimulación, tanto en células mantenidas en condiciones control como en células incubadas durante 24 horas en presencia de KT5823.

Para analizar si el efecto observado de la inhibición de cGKs sobre la endocitosis era dependiente del estímulo aplicado, se realizaron experimentos en células transfectadas con vGlut1-pH aplicando, en este caso, 15 segundos de estímulo despolarizante con KCl 50mM (Figura 16).

Resultados

En esta situación encontramos que, el tratamiento con KT5823 no enlentecía la endocitosis, si no que, en la media total de las respuestas de todos botones analizados, la constante de recuperación de la fluorescencia era menor que en el caso de las células control ($\tau_{\text{Control}}=12,6\pm 0,4\text{s}$; $\tau_{\text{KT5823}}=7,99\pm 0,14\text{s}$).

También se observó una gran heterogeneidad de respuestas, agrupadas en cinco tipos, y la incubación previa con KT5823 modificó la distribución porcentual de las mismas. En este caso, en las células incubadas con KT5823 aumentaron los botones de perfil 1, cuya constante de recuperación es menor, como se muestra en la tabla II.

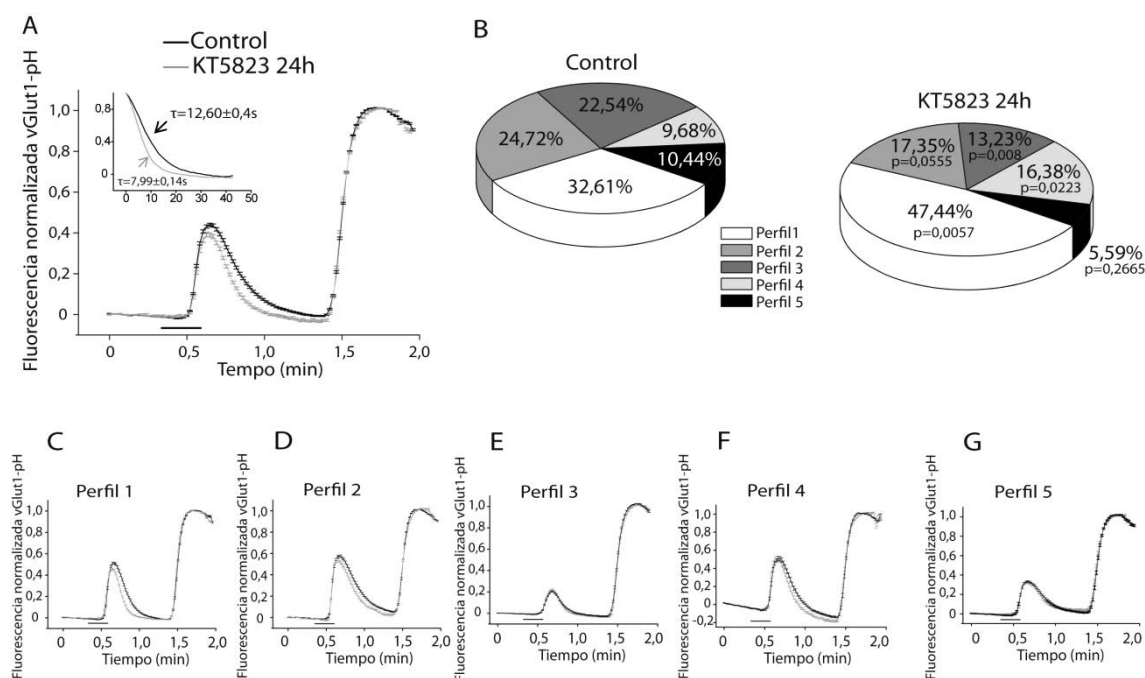


Figura 16: Variación de la fluorescencia de vGlut1-pH tras un estímulo despolarizante de 15 segundos (media de todos los botones analizados $n= 646$ botones en células control y $n= 362$ en células tratadas con KT5823 durante 24h) (Panel A). Distribución porcentual de los botones analizados en función de sus respuestas en células control y células incubadas con KT5823 durante 24 horas (Panel B). Cinéticas de exocitosis y endocitosis de cada uno de los perfiles analizados (Paneles C-G).

Resultados

	Constantes de decaimiento (τ ;segundos)	
	Control	KT5823
PERFIL 1	12.30 \pm 0.83	7.45 \pm 0.44
PERFIL 2	19.20 \pm 1.10	14.69 \pm 0.68
PERFIL 3	10.95 \pm 1.04	9.42 \pm 0.76
PERFIL 4	13.29 \pm 0.41	11.01 \pm 0.27
PERFIL 5	15.07 \pm 0.89	10.58 \pm 0.63

Tabla II: Constantes de decaimiento para la recuperación de la fluorescencia para los 5 perfiles de respuesta observados tras 15 segundos de estimulación, tanto en células mantenidas en condiciones control como en células incubadas durante 24 horas en presencia de KT5823

Para analizar el efecto de un tratamiento agudo con KT5823, considerando la ventaja que supone el sistema vGlut1-pH que permite registrar la respuesta de un mismo campo a varios estímulos, se diseñó un protocolo de doble estimulación perfundiendo el inhibidor entre los dos estímulos. Este tipo de protocolo permite tener un control interno, de forma que se puede analizar el efecto del fármaco sobre los mismos botones que se analizan en condiciones control.

Cuando la duración del estímulo fue de 50 segundos se observó que, cuando entre las dos estimulaciones se perfundía HBM durante 30 minutos (Figura 17A), las dos respuestas (promedio de todas las respuestas individuales) eran prácticamente idénticas, tanto en su magnitud, como en la cinética de recuperación de la fluorescencia basal.

Sin embargo, cuando se añadió KT5823 al HBM de perfusión (Figura 17B) y las células se perfundieron durante 30 minutos tras el primer estímulo, la magnitud de la respuesta al segundo estímulo, de los botones analizados, no se vio afectada pero la disminución de la fluorescencia (endocitosis) fue mucho más lenta y no se recuperó completamente la fluorescencia basal durante el tiempo del experimento, permaneciendo un 12% del total de la fluorescencia en membrana, mientras que en las células control sí disminuía hasta el valor basal.

Resultados

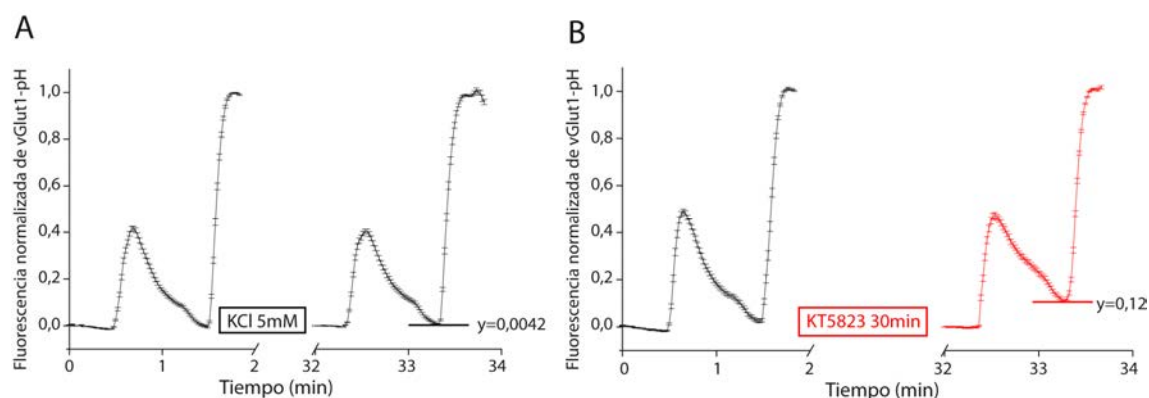


Figura 17: Se muestran los perfiles de exocitosis y endocitosis compensatoria tras el estímulo en situación Control (Panel A; n= 279 botones) y en células tratadas con KT5823 entre los estímulos (Panel B; n=243 botones), aplicando 50 segundos de estímulo despolarizante.

Al realizar el mismo protocolo de doble estimulación, pero aplicando 15 segundos de estímulo, analizando todas las respuestas en conjunto, encontramos que, al igual que en la situación control (Figura 18A), la segunda respuesta (tras la perfusión de KT5823; Figura 18B) no mostraba diferencias significativas con respecto a la primera, ni en cuanto al grado de exocitosis, ni en cuanto al grado de recuperación de la fluorescencia basal (endocitosis) tras el estímulo.

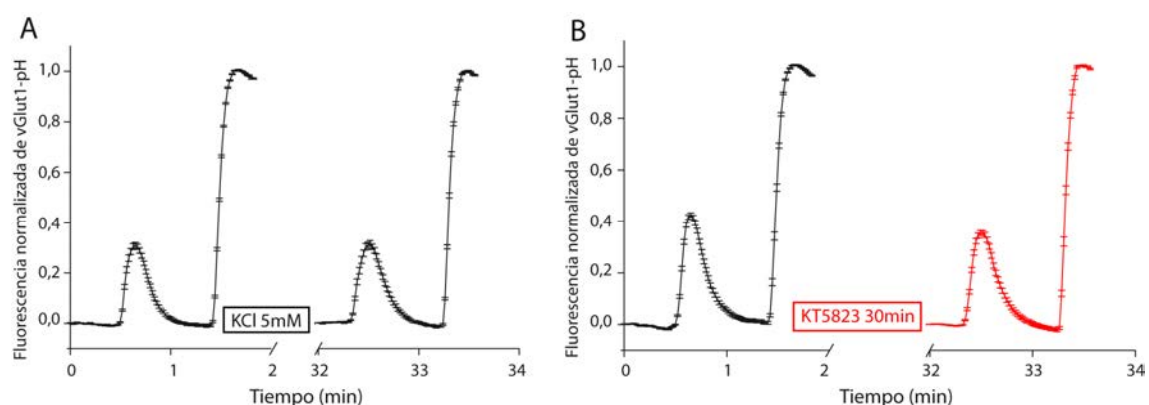


Figura 18: Se muestran los perfiles de exocitosis y endocitosis compensatoria tras el estímulo en situación Control (Panel A; n= 338 botones) y en células tratadas con KT5823 entre los estímulos (Panel B; n= 250 botones), aplicando 15 segundos de estímulo despolarizante.

Resultados

En conjunto, estos datos no sólo confirman el requerimiento de las proteínas quinasas dependientes de GMPc para el reciclamiento eficaz de las vesículas sinápticas, en concreto para el proceso de recuperación de membrana tras la exocitosis, aumentando el número de botones con tasas lentas de endocitosis cuando se inhiben estas quinasas, si no que dichos efectos se observan únicamente cuando el estímulo es intenso y sostenido y no con estímulos más suaves.

Se analizaron los diferentes tipos de respuesta (de igual forma que en los experimentos de un solo estímulo mostrados en las Figuras 15 y 16) tanto en la primera respuesta como en la segunda y su distribución porcentual en las diferentes condiciones experimentales (Figura 19).

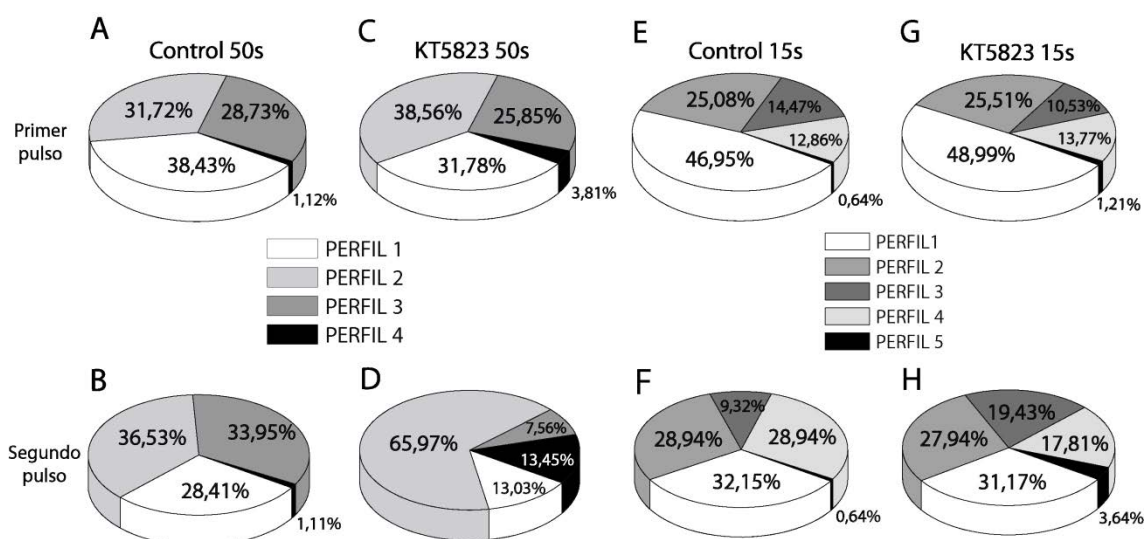


Figura 19: Distribución porcentual correspondiente al primer (Paneles superiores) y al segundo (Paneles inferiores) estímulo despolarizante de 50 y 15 segundos de los botones analizados en los diferentes perfiles de respuesta en todas las condiciones experimentales.

Cuando el estímulo es intenso y prolongado, como es el de 50 segundos, en situación control, aunque no se encontraron diferencias significativas de la distribución porcentual cuando se analizaron la primera y la segunda respuestas, si se observó una ligera disminución del perfil 1 y un incremento del 2 y el 3 (Figura 19 A y B). Sin embargo, cuando se perfundió KT5823 durante 30 minutos después del primer estímulo, y se analizaron las respuestas a una segunda estimulación, la distribución porcentual mostró un significativo aumento de los botones con un

Resultados

perfil de respuesta tipo 2 y, en paralelo, una notable reducción de los perfiles 1, 3 y 4 (Figura 19C y D). El incremento de botones con una respuesta tipo 2 (perfil 2), con una endocitosis mucho más lenta (Figura 15C) y, por tanto, una constante de endocitosis mayor que las del resto respuestas/perfiles (Tabla I), explicaría el que no se recupere el nivel basal de fluorescencia en las células incubadas con KT5823.

Cuando el estímulo fue más moderado, 15 segundos, el segundo estímulo en la situación control mostró una disminución del porcentaje de botones cuya respuesta se ajustaba al perfil 1 y un ligero incremento de los botones con respuesta tipo 4 (Figura 19E y F). La perfusión con el inhibidor KT5823 entre las dos estimulaciones no afectó a la disminución de botones con respuesta tipo 1 con respecto al control, pero esa disminución, en este caso, se acompañó de un ligero incremento de los botones con un perfil de respuesta 4 y de un significativo incremento de los botones con perfil 3 (Figura 19G y H), indicando que en una subpoblación de botones la incubación con KT5823 se tradujo en una inhibición de la respuesta excitotónica.

8. Las neuronas granulares de cerebelo de ratón cGKII KO muestran alteraciones en el reciclamiento de sus membranas.

Con el objetivo de analizar si las neuronas procedentes de ratones cGKII KO también mostraban alteraciones en la endocitosis tras estímulos prolongados, se realizaron experimentos similares a los descritos en el apartado anterior con neuronas transfectadas con vGlut1-pH, procedentes tanto de ratones WT como cGKII KO.

Se realizaron experimentos de doble estimulación, con estímulos despolarizantes de 15 y 50 segundos de duración con KCl 50mM. Entre ambos estímulos las células se perfundieron durante 30 minutos con HBM o con HBM más 1 μ M KT5823, con objeto de analizar el efecto de la inhibición de las cGKs en las células procedentes de ratones WT y de la inhibición de cGKI en las células procedentes de cGKII KO, por si la cGKI compensa la ausencia de cGKII . Después de cada estímulo, se perfundió NH₄Cl para obtener el valor máximo de fluorescencia. Cuando se analizaron los valores máximos de fluorescencia, se observó que en los botones de las células cGKII KO, el valor de la fluorescencia era

Resultados

ligeramente mayor que en los botones de las células WT (Figura 20A). Algo similar ocurría con el nivel de fluorescencia en membrana, que también fue mayor en los botones de estas células, tanto en valores absolutos (Figura 20B) como en porcentaje de la fluorescencia máxima (Figura 20C). El mayor nivel de fluorescencia se explicaría por un mayor número de vesículas como sugieren los resultados de microscopía electrónica ($143,75 \pm 17,99$ vesículas/zona activa en neuronas cGKII KO frente a $98,13 \pm 8,04$ vesículas/zona activa en neuronas WT, $p < 0,05$). Mientras que el mayor nivel de fluorescencia en membrana podría deberse a una mayor exocitosis espontánea, a una endocitosis menos eficiente, o ambas.

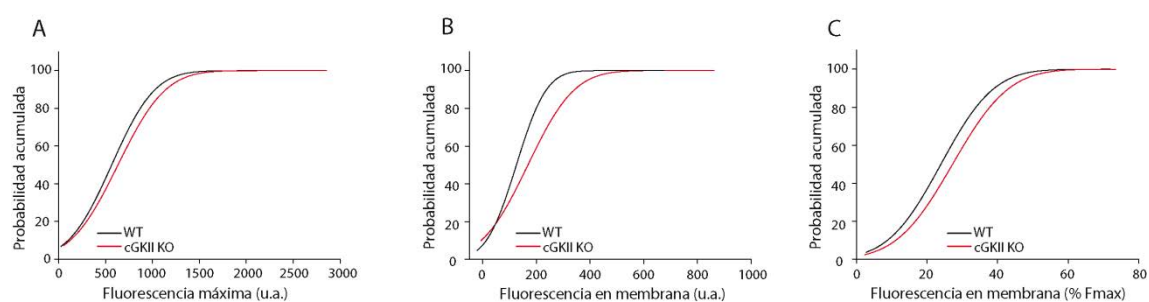


Figura 20: Distribución de probabilidad acumulada que ilustra la fluorescencia máxima de vGlut1-pH obtenida con la perfusión de NH_4Cl (Panel A), la fluorescencia inicial en membrana (Panel B), y el porcentaje de la fluorescencia máxima encontrado inicialmente en membrana (Panel C), de todos los botones analizados de neuronas WT y cGKII KO.

En el caso de las estimulaciones prolongadas (50 segundos), cuando se analizaron todas las respuestas en conjunto observamos que, después del primer estímulo, tanto en las células WT (Figura 21A) como en las cGKII KO (Figura 21C), se recuperaron sus respectivos niveles basales de fluorescencia. La perfusión de HBM durante 30 minutos y un nuevo estímulo de 50 segundos hizo que la recuperación del nivel basal de fluorescencia fuese más lenta en los botones de las células WT que en los de las células cGKII KO.

Al perfundir KT5823 durante 30 minutos, en el caso de las células WT, se observaron resultados similares a los obtenidos en neuronas granulares de rata. El segundo estímulo, tras la aplicación del fármaco, no presentaba diferencias en el grado de exocitosis. Sin embargo, la endocitosis se enlenteció notablemente, no llegando a alcanzar los niveles basales de fluorescencia en el tiempo de recuperación previo a la perfusión de NH_4Cl (20% de fluorescencia remanente tras

Resultados

la recuperación), niveles que sí se alcanzaron en la situación control, al perfundir HBM (Figura 21B). Al analizar las neuronas cGKII KO se observó que la perfusión de KT5823 durante 30 minutos entre los dos estímulos no sólo no enlenteció la recuperación de los niveles basales de fluorescencia, si no que dichos valores disminuyeron muy por debajo del basal (Figura 21D).

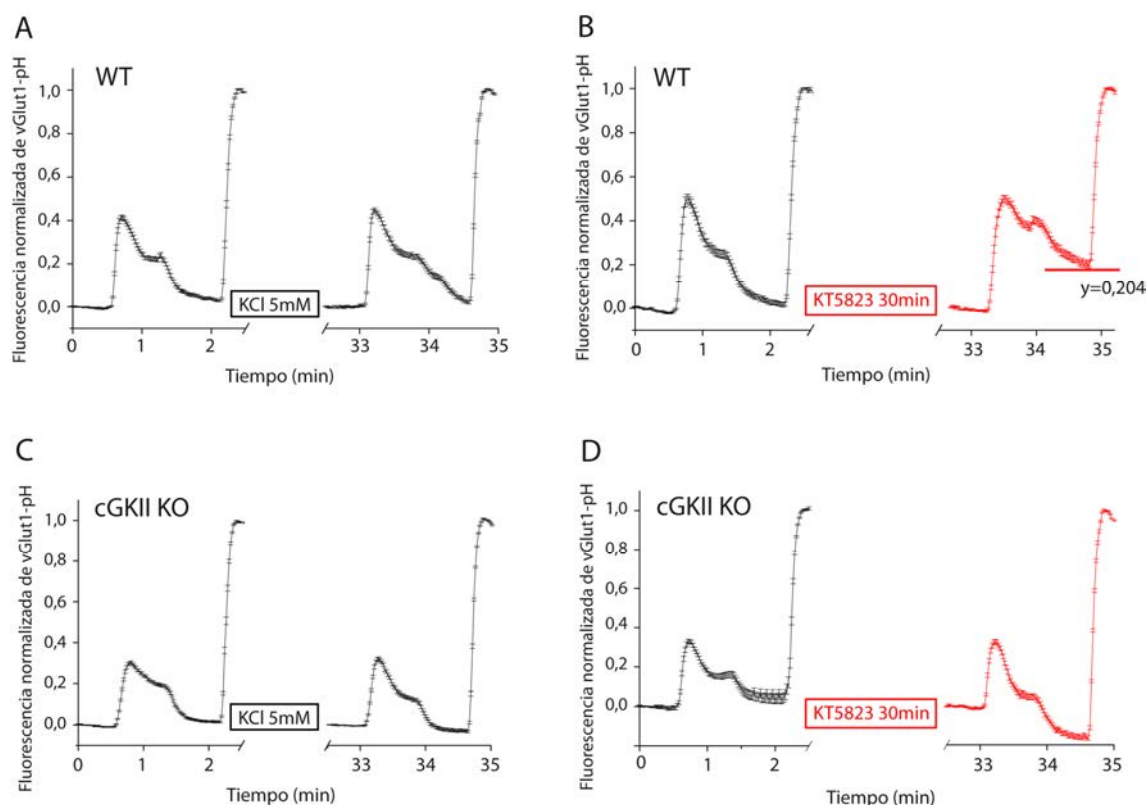


Figura 21: Perfiles de exocitosis y endocitosis, de la media de todos los botones analizados, tras la aplicación de un estímulo despolarizante de 50 segundos. Células WT control (n= 224 botones; Panel A). Células WT perfundiendo KT5823 durante 30 minutos entre los estímulos (n=175 botones; Panel B). Células cGKII KO control (n= 319 botones; Panel C). Células cGKII KO perfundiendo KT5823 durante 30 minutos entre los estímulos (n= 185 botones; Panel D).

Para todas las condiciones, se analizaron tanto la fluorescencia en membrana antes de cualquier estímulo así como las fluorescencias máximas después de ambos estímulos (Figura 22). El análisis reveló que en los botones de células WT la Fluorescencia máxima alcanzaba valores similares, tras la perfusión con NH_4Cl , tanto después del primer estímulo, como después del segundo estímulo. La adición de KT5823 tampoco afectó (Figura 22A).

Resultados

Sin embargo, cuando se analizó la fluorescencia en membrana (tanto en valores absolutos como en porcentaje de F_{max}) antes del primer o segundo estímulo, se observó un ligero pero significativo incremento de dicha fluorescencia antes del segundo estímulo en las células perfundidas únicamente con HBM y un notable incremento en las células perfundidas con KT5823 (Figura 22B y C). Estos resultados parecían indicar que la inhibición de cGKs en neuronas granulares de ratón se traducía en un incremento de la exocitosis espontánea, en un enlentecimiento de la endocitosis o en ambas, tal y como ocurría en las células cGKII KO (Figura 20). Es importante señalar que este fenómeno no se observó en las neuronas granulares de rata.

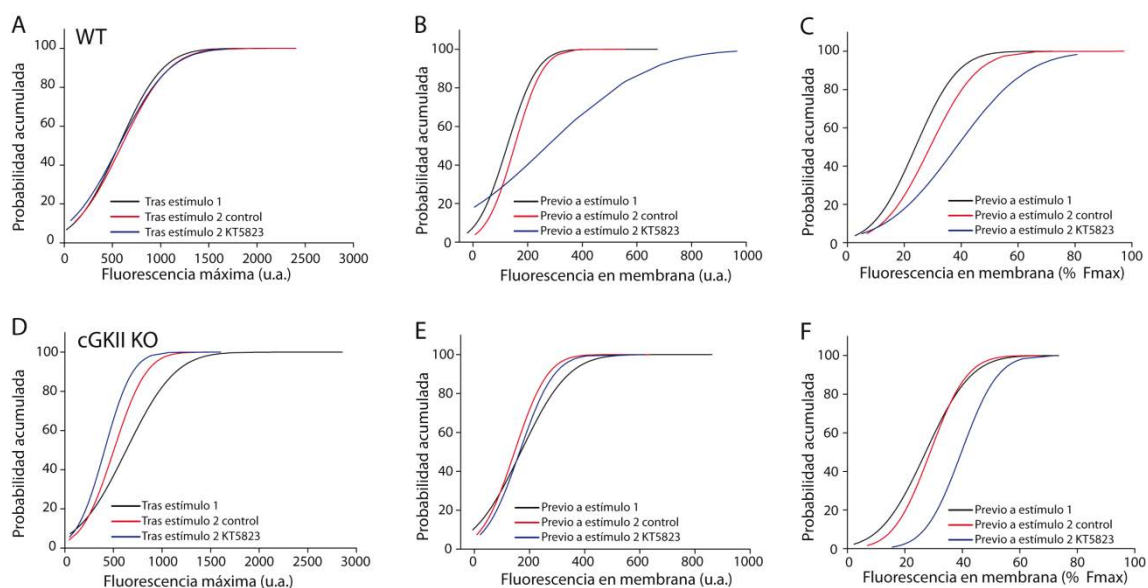


Figura 22: Distribuciones de probabilidad acumulada que ilustran la fluorescencia máxima de vGlut1-pH obtenida con la perfusión de NH_4Cl en células WT (A) y cGKII KO (D), la fluorescencia inicial en membrana en células WT (B) y cGKII KO (E), y el porcentaje de la fluorescencia máxima encontrado inicialmente en membrana en neuronas WT (C) y cGKII (F). Todas representan los datos obtenidos en el primer estímulo y el segundo, en presencia o ausencia de KT5823. *** $p < 0,001$ Mann-Whitney.

Cuando estos mismos parámetros se analizaron en botones de células cGKII KO, se observó una importante disminución de la F_{max} alcanzada tras la perfusión con NH_4Cl después del segundo estímulo cuando las células se perfundieron con HBM, reducción que fue, incluso, mayor cuando el KT5823 estaba presente en el

Resultados

medio de perfusión (Figura 22D). Estos resultados son importantes porque demuestran que, aunque las respuestas normalizadas son similares para ambos estímulos, en términos absolutos, la segunda respuesta es mucho menor en las células cGKII KO. Hecho que podría explicar la mayor velocidad en la recuperación de los niveles basales de fluorescencia.

Por otra parte, aunque la fluorescencia en membrana (valores absolutos) no era muy diferente antes del primer o segundo estímulo, el hecho de que la fluorescencia máxima esté disminuida hace que porcentualmente la fluorescencia en membrana aumente, fundamentalmente cuando KT5823 está presente en el medio de perfusión (Figura 22E y F).

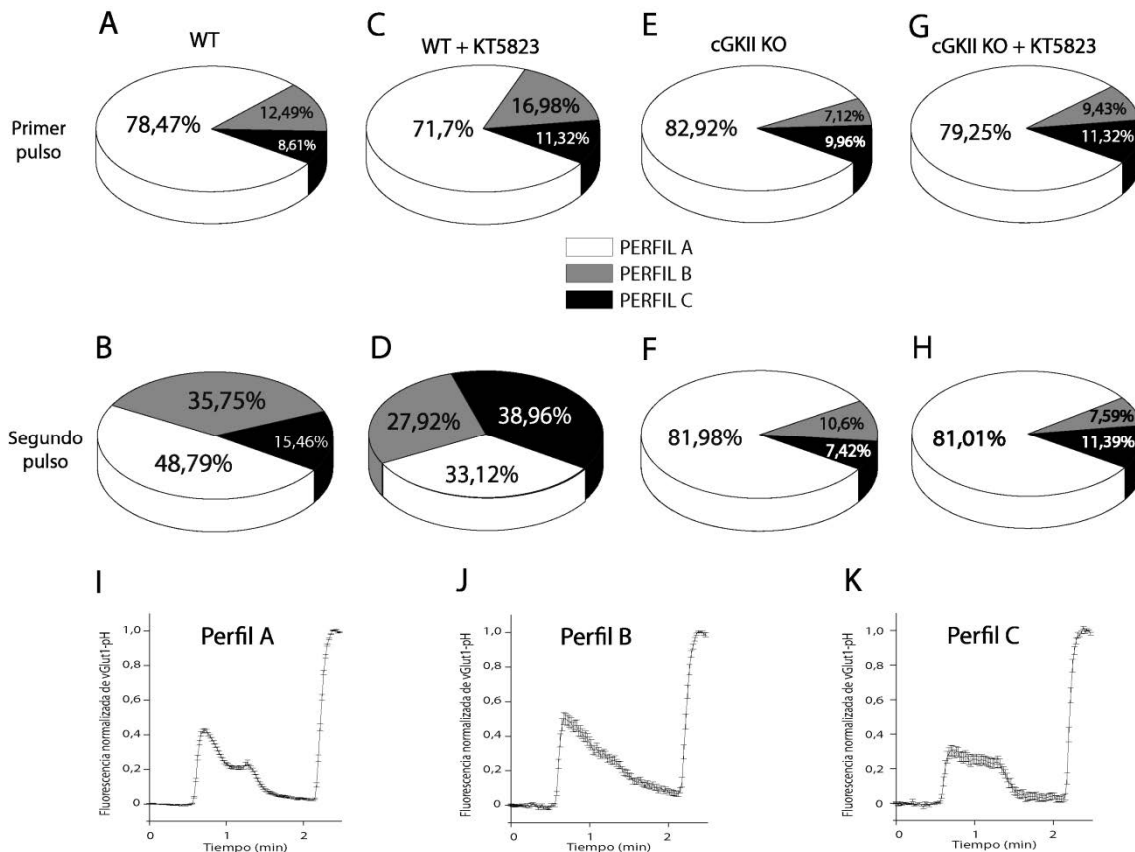


Figura 23: Distribución porcentual en los diferentes perfiles correspondiente al primer y al segundo estímulo de 50 segundos de los botones analizados en células WT y cGKII KO sin y con perfusión de KT5823 (Paneles A-H). Respuestas exo y endocitóticas tipo de los tres perfiles analizados (Paneles I-K).

Resultados

Ante la gran heterogeneidad de respuestas encontradas, se agruparon los botones analizados en distintos perfiles, asumiendo el mismo tipo de clasificación utilizada en las neuronas de rata (Figura 15). Dada la ausencia de botones pertenecientes al perfil tipo 3, la clasificación se realizó en tres perfiles: Perfil A (perfil 1 en rata), Perfil B (perfil 2 en rata) y Perfil C (perfil 4 en rata), tal como se muestra en la Figura 23.

Se observó que, tras un primer estímulo, la distribución porcentual de respuestas de los botones individuales fue similar tanto en células WT como en células cGKII KO (Figura 23A, C, E y G). Sin embargo, después de un segundo estímulo, mientras que la distribución de las respuestas de los botones de las células cGKII KO fue similar a la encontrada tras el primer estímulo, en las células WT disminuyó significativamente el porcentaje de botones con respuesta en el perfil A y aumentaron los que tenían respuestas de los perfiles B y C. La perfusión de KT5823 entre los dos estímulos se tradujo, fundamentalmente, en un incremento notable de botones cuya respuesta se ajustaba al perfil C (Figura 23B, D, F y H). Este incremento explica el gran enlentecimiento observado en la recuperación de los niveles basales de fluorescencia, cuando se analizaban todas las respuestas en conjunto.

De nuevo, con el objetivo de analizar el comportamiento de las neuronas ante un estímulo más moderado, se llevó a cabo el mismo protocolo de doble estimulación, aplicando un estímulo de 15 segundos.

En este caso, en neuronas WT, cuando se observaron las respuestas a los dos estímulos no se encontraron diferencias ni en el grado de exocitosis ni en la tasa de endocitosis cuando se perfundió HBM entre los dos estímulos (Figura 24A), observándose una ligera reducción en la respuesta al segundo estímulo y un ligero enlentecimiento de la recuperación de la fluorescencia basal en los botones de las células perfundidas con KT5823 durante 30 minutos (Figura 24B). Estos resultados, por una parte corroboran que la inhibición farmacológica cGKs se traduce en un enlentecimiento del ciclo vesicular, fundamentalmente en su etapa endocitótica, cuando las células se someten a estímulos despolarizantes intensos. Por otra parte, ponen en evidencia nuevas diferencias con respecto a las células de rata.

Resultados

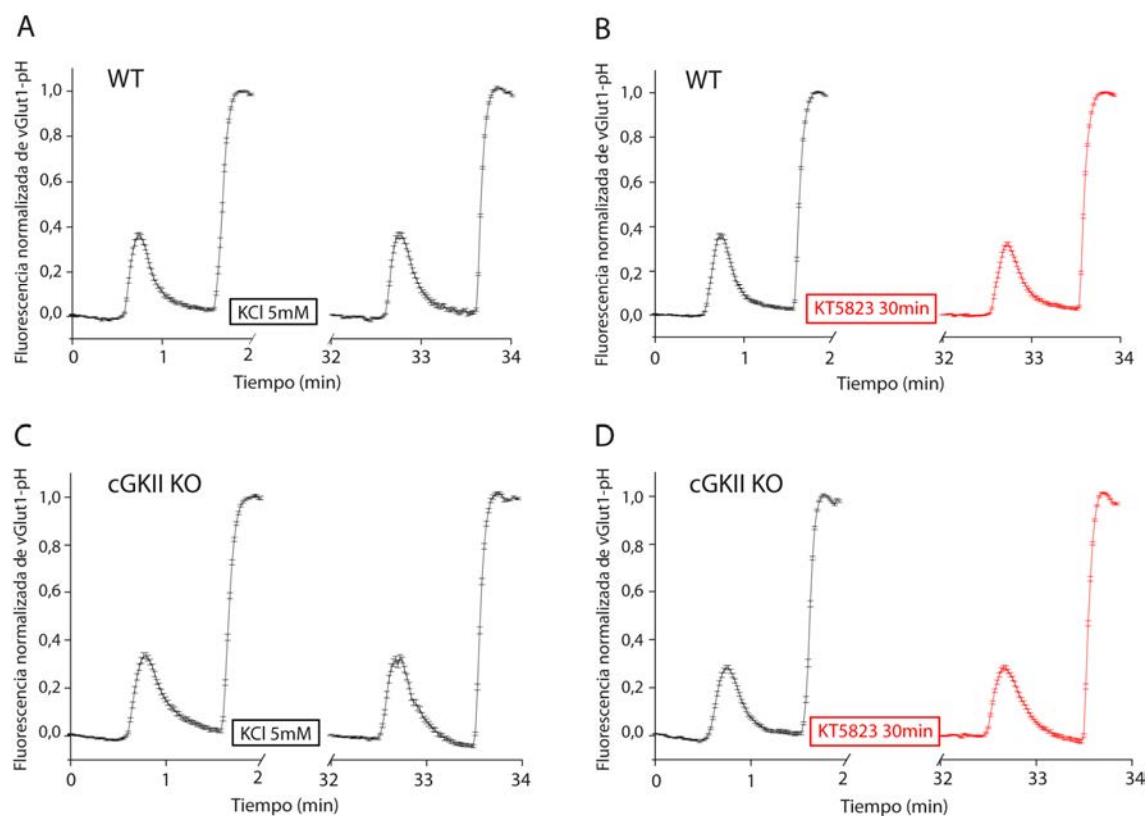


Figura 24: Perfiles de exocitosis y endocitosis, de la media de todos los botones analizados, tras la aplicación de un estímulo despolarizante de 15 segundos. Células WT control (n= 178 botones; Panel A). Células WT aplicando KT5823 durante 30 minutos entre los estímulos (n=159 botones; Panel B). Células cGKII KO control (n= 128 botones Panel C). Células cGKII KO aplicando KT5823 durante 30 minutos entre los estímulos (n= 176 botones; Panel D).

En cuanto a las células cGKII KO, en la respuesta al primer estímulo en situación control (perfusión con HBM durante 30 minutos entre pulsos) no se encontraron diferencias significativas con respecto a las neuronas WT, ni en el grado de exocitosis ni en la tasa de endocitosis (Figura 24C), ya que en ambos casos retornaron a los niveles basales de fluorescencia en el tiempo de recuperación tras el estímulo. Sin embargo, la respuesta al segundo estímulo mostró una recuperación más rápida en las células cGKII KO que en las células WT cayendo la fluorescencia, incluso, por debajo del valor basal.

La perfusión durante 30 minutos de KT5823 entre ambos estímulos (Figura 24D) no pareció modificar la respuesta al segundo estímulo en relación a lo observado cuando las células habían sido perfundidas con HBM.

Resultados

Cuando se analizó la Fmax, tras la perfusión con NH₄Cl, después del primer estímulo o después del segundo estímulo en los botones de células perfundidas con HBM o con KT5823 no se encontraron diferencias ni en las células WT ni en las cGKII KO. La fluorescencia en membrana antes de cualquier estímulo tampoco mostró ninguna variación en los botones de las células WT. Sin embargo, en los botones de células cGKII KO la fluorescencia en membrana (tanto en valores absolutos como en porcentaje de Fmax) antes del segundo estímulo estaba incrementada en las células perfundidas con KT5823 con respecto al valor observado antes del primer estímulo.

Al igual que en células de rata y ante la heterogeneidad de respuestas encontradas, se procedió a una clasificación de todos los botones analizados en diferentes perfiles de respuesta ante el estímulo (Figura 25I-L). El análisis en neuronas de rata se realizó clasificando los botones en 5 perfiles diferentes (Figura 16 C-G), sin embargo, en este caso, la clasificación se hizo en base a 4 perfiles, dado que el perfil 5 (Figura 16 G) estaba prácticamente ausente.

Según se muestra en la Figura 25, tras un primer estímulo, la distribución porcentual de respuestas de los botones individuales fue similar tanto en células WT como en células cGKII KO (Figura 25A, C, E y G). Sin embargo, después de un segundo estímulo, mientras que la distribución de las respuestas de los botones de las células WT fue similar a la encontrada tras el primer estímulo cuando las células habían sido perfundidas con HBM (Figura 25B), cuando el KT5834 se añadió al medio de perfusión, disminuyó el porcentaje de botones cuya respuesta se ajusta al perfil A y aumentaron los que tenían respuestas de perfil B, explicando el leve enlentecimiento de la endocitosis observado cuando se analizaron todas las respuestas en conjunto (Figura 25D).

En las células cGKII KO, tras el segundo estímulo y con independencia de que las células hubieran sido perfundidas con HBM o con KT5823, se encontró un notable incremento de los perfiles B y D, con la consecuente disminución del perfil A (Figura 25 G y H).

Resultados

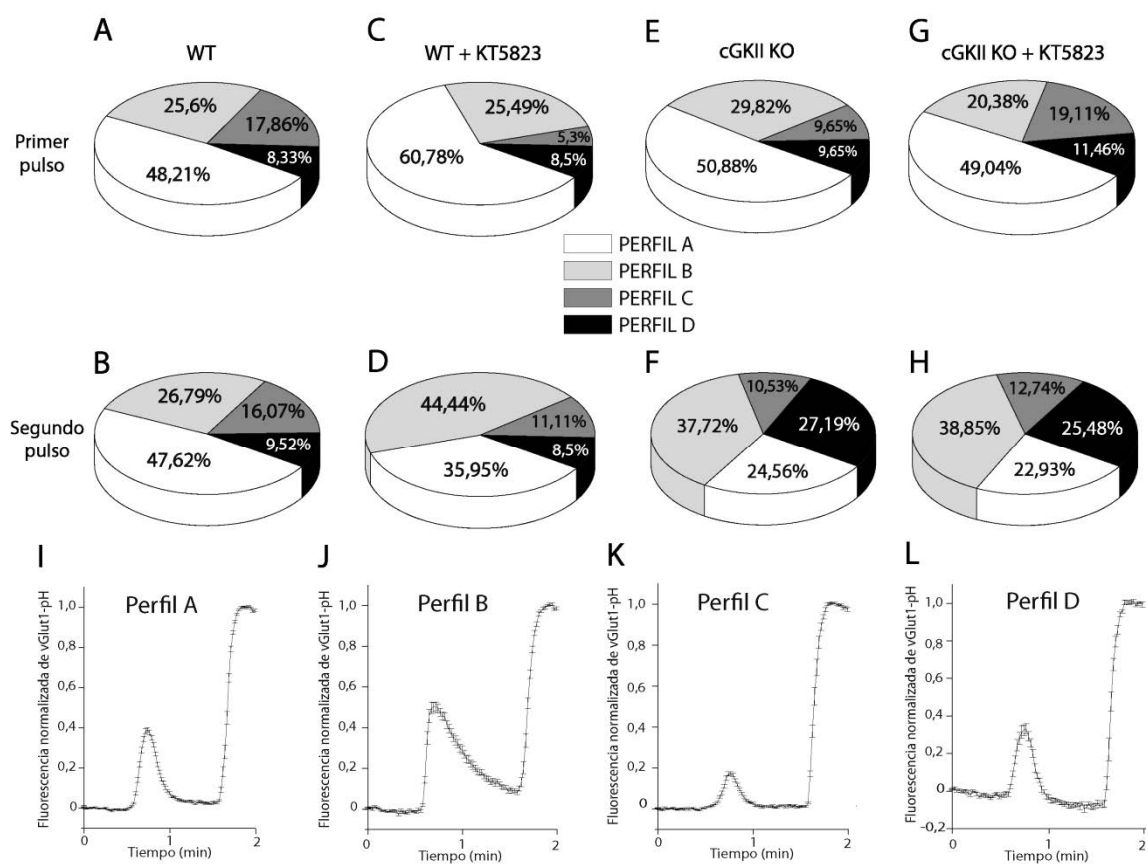


Figura 25: Distribución porcentual correspondiente al primer y al segundo pulso despolarizante de 15 segundos de los botones analizados en los diferentes perfiles en células WT y cGKII KO con y sin tratamiento con KT5823 (Paneles A-H). Respuestas exo y endocitóticas tipo de los cuatro perfiles analizados (Paneles I-L).

V - DISCUSIÓN

“Sólo si nos detenemos a pensar en las pequeñas cosas,
llegaremos a comprender las grandes”

José Saramago

V – DISCUSIÓN

1. La activación de los receptores NMDA aumenta la eficacia del reciclamiento vesicular.

En los resultados obtenidos en este trabajo se ha encontrado que, tal y como se había demostrado previamente en otros trabajos del grupo, tras cargar las vesículas sinápticas con la sonda FM1-43 mediante una estimulación intensa y prolongada, al inducir su descarga con un nuevo estímulo de las mismas características, existe una enorme heterogeneidad de respuestas (Bartolome-Martin y cols., 2012). A pesar de dicha heterogeneidad, un análisis de conglomerados de la población total de respuestas reveló la existencia de dos subpoblaciones, las cuales fueron segregadas en base al porcentaje de descarga de su fluorescencia inicial. De esta forma se observa una subpoblación con una descarga mayor al 40%, denominada grupo de descarga fuerte o grupo 1, y una población con una descarga menor al 40%, denominada grupo de descarga débil o grupo 2 (Bartolome-Martin y cols., 2012). La distribución porcentual de las respuestas en esas dos poblaciones está sujeta a regulación por diferentes mecanismos de señalización, siendo el activado por GMPc uno de ellos (Lopez-Jimenez y cols., 2009). La diferente eficiencia en el reciclamiento vesicular se explica por la coexistencia en un mismo botón de diferentes mecanismos de endocitosis, que pueden estar sujetos a regulación por diferentes vías de señalización (Ryan, 1996).

En neuronas granulares la vía de señalización NO/GMPc se activa por la estimulación de los receptores NMDA (Jurado y cols., 2003). El hecho de que el bloqueo de los receptores de NMDA se traduzca en un incremento de la población de botones con reciclamiento más lento, similar al que se había observado con la inhibición de la GCs (Lopez-Jimenez y cols., 2009), y de que el efecto no se observe al añadir un análogo permeable del GMPc, confirma la importancia de esta vía de señalización en la regulación fisiológica de este proceso presináptico. Estos resultados evidencian que la activación de los receptores NMDA se traduce, presumiblemente, en una síntesis de NO que, actuando como mensajero retrógrado, activa la GCs en la presinapsis y el aumento de GMPc facilita el reciclamiento vesicular. En este sentido, en la literatura existen numerosas evidencias de que el NO, actuando como mensajero retrógrado, regula diferentes

procesos presinápticos (Hardingham y cols., 2013). Los primeros trabajos sobre la implicación del NO en plasticidad sináptica, evidenciaron su papel a nivel presináptico y, por lo tanto, sugerían su acción como mensajero retrógrado (O'Dell y cols., 1991). A lo largo de las últimas décadas se han acumulado numerosas evidencias de la síntesis de este mensajero gaseoso en la postsinapsis acoplada a la entrada de calcio a través de los receptores NMDA, su difusión a la presinapsis, así como la activación de su principal diana fisiológica, la GCs, y la cascada de señalización activada por el GMPc (Feil y Kleppisch, 2008; Micheva y cols., 2001). Diversos autores han demostrado que el NO regula la excitabilidad neuronal (Prast y Philippu, 2001), incrementando la liberación de neurotransmisores (Arancio y cols., 1995), de la misma manera que la activación de la ruta NO/GMPc en la presinapsis actúa regulando el reciclamiento vesicular (Micheva y cols., 2003) y la distribución de vesículas en los diferentes *pooles* que subyace a la potenciación presináptica dependiente de NMDA en neuronas hipocámpales (Ratnayaka y cols., 2012).

2. Quinasas dependientes de GMPc como sistemas efectores

A pesar de la existencia de diversos sistemas efectores que pueden mediar las respuestas fisiológicas al incremento de GMPc, en la mayoría de los casos están mediadas por la activación de las cGKs (Hofmann y cols., 2006). En el cerebelo de rata se expresan tanto cGKI como cGKII (Jurado y cols., 2005), por tanto, cualquiera de ellas podría participar en el mecanismo por el que el GMPc regula el reciclamiento vesicular. Las neuronas granulares también expresan CNGC, que se activan por GMPc y que, por tanto, también pueden mediar alguna de las respuestas al incremento de GMPc (Lopez-Jimenez y cols., 2012). Sin embargo, ya se había observado que el bloqueo de estos canales no se traducían en el mismo efecto sobre el reciclamiento vesicular que la inhibición de la GCs, aunque sí se modificaban las cinéticas de descarga de la sonda FM1-43 (Lopez-Jimenez y cols., 2012). Por el contrario, los resultados obtenidos en experimentos realizados con la sonda FM1-43, en células incubadas con un inhibidor farmacológico específico de las quinasas dependientes de GMPc (a la concentración utilizada), KT5823, sí reproducían el efecto de la inhibición de GCs o el bloqueo de los receptores NMDA, sugiriendo la participación de las cGKs en el mecanismo activado por el

Discusión

incremento de GMPc. El hecho de que se hayan encontrado resultados similares tanto con una inhibición prolongada (24-96 horas) como con una inhibición aguda (30 min) sugiere, en primer lugar, que no se necesitan inhibiciones muy prolongadas para observar el efecto y, por otro lado, que la escala temporal en la que ocurren el/los proceso/s regulados por estas cGKs es, probablemente, mucho más corta que los tiempos utilizados en este trabajo. Sin embargo, para garantizar que se alcanza la concentración efectiva del inhibidor siempre se han utilizado tiempos mínimos de 30 minutos de incubación con el mismo. Las neuronas granulares de cerebelo de rata expresan las dos isoformas de cGKs (I y II) aunque el perfil de su expresión con el desarrollo de estas células *in vitro* es diferente para ambas (Jurado y cols., 2004). La expresión de cGKII aumenta con el desarrollo, de manera similar a como se incrementan los niveles de NOS1 y de las subunidades α_2 y β_1 de GCs, mientras que la expresión de cGKI disminuye (Jurado y cols., 2005). Este hecho, junto a la localización de cGKII en las neuritas (axones y dendritas), sugería que podía ser la cGKII la que mediara la respuesta al incremento de GMPc.

El silenciamiento de la expresión de la cGKII con un siRNA específico, que reduce el nivel de su RNAm en un 80% y no afecta a los niveles de cGKI, permitió identificarla como el sistema efector del GMPc para regular el reciclamiento vesicular. Por una parte, en células con la cGKII silenciada, la proporción de botones pertenecientes al grupo de descarga débil aumenta significativamente, y en ambos grupos, el porcentaje de descarga de la sonda es menor, resultados similares a lo observado al inhibir a la GCs (Lopez-Jimenez y cols., 2012). Por otra parte, estos resultados no se modifican cuando se adiciona el inhibidor de cGKs, KT5823, a las células con la cGKII silenciada. El hecho de que el silenciamiento de cGKII ocluya el efecto del KT5823, confirma que los resultados observados con este compuesto se deben a la inhibición de esta quinasa, y apoya la participación de la misma en la regulación del reciclamiento vesicular. Por tanto, la activación de cGKII es necesaria para el reciclamiento eficaz de las vesículas exocitadas tras un estímulo intenso y prolongado. Por otra parte, la activación de cGKII estabiliza la presencia de la subunidad GluA1 de receptores AMPA en membrana en estas mismas células (Incontro y cols., 2013), sugiriendo que, tal y como se ha descrito en otras sinapsis (Wang y cols 2005), puede regular procesos pre- y postsinápticos para sincronizar la función sináptica a la actividad.

Discusión

En general, la reducción en la eficacia del reciclamiento observada al silenciar la cGKII es mayor que la que produce la incubación prolongada (24 o 96 horas) con el inhibidor, hecho que podría reflejar diferencias en el grado de inhibición, o la reversibilidad en el tiempo de la inhibición de cGKII. KT5823 es un inhibidor competitivo y reversible que se une al sitio de ATP de las cGKs, de tal manera que el grado de inhibición depende, en gran medida de su concentración y de la concentración de ATP.

Variaciones en el protocolo experimental utilizado con la sonda FM1-43 nos han permitido identificar la etapa del ciclo vesicular afectada por la ausencia de actividad cGKs. La incubación con el inhibidor antes de la carga de la sonda se traduce en una fuerte reducción de la descarga, efecto que no se observa cuando la incubación con el mismo se realiza con posterioridad a la carga, momento en el que ya ha tenido lugar el proceso endocitótico, apoyando la tesis de la implicación de las cGKs en la regulación de la etapa endocitótica del ciclo vesicular, tal y como se ha demostrado en neuronas hipocampales (Micheva y cols., 2003) y en sinapsis del Calyx de Held (Eguchi y cols., 2012; Taoufiq y cols., 2013), en las que se observa un enlentecimiento significativo de la velocidad de endocitosis con la inhibición de cGKs. De cualquier forma, estos experimentos con FM1-43 aportan información sobre el reciclamiento vesicular en general, pero es difícil saber si la endocitosis está alterada. Modificando el protocolo de carga con la sonda, siguiendo el descrito por Ryan y colaboradores (Ryan y cols., 1993), en el que la incubación con la sonda se retrasa con relación al tiempo de estimulación, de tal manera que aquellos fragmentos de membrana que permanezcan más tiempo expuestos al exterior se marcarán más que los que se reciclen más rápidamente, verificamos un enlentecimiento de la endocitosis en las células con cGKs inhibidas.

Multitud de estudios farmacológicos han demostrado la implicación de las cGKs en diversos procesos fisiológicos como: agregación plaquetaria, relajación del músculo liso, secreción intestinal de agua, reabsorción de agua y sales en el túbulo distal de las nefronas, e integración de señales nerviosas (Hofmann y cols., 1992). Sin embargo, que ambas isoformas compartan sustratos, sumado al hecho de que no existan inhibidores farmacológicos específicos para cada una de ellas, ha dificultado la identificación de la isoforma implicada en cada uno de estos procesos. Esta identificación ha comenzado a dilucidarse con el silenciamiento específico de una de las dos isoformas, y, fundamentalmente, con el diseño de los ratones

Discusión

carentes, bien de una de las dos isoformas, o bien de ambas (Hofmann y cols., 2006). En este trabajo se ha utilizado un segundo modelo experimental, las neuronas granulares de cerebelo de ratón, tanto de una cepa salvaje como de un ratón KO para cGKII, para verificar la participación de la cGKII en el mantenimiento de la eficacia de reciclamiento vesicular y si existe una compensación funcional con cGKI.

Los experimentos de reciclamiento con la sonda FM1-43, realizados con estas células de ratón nos han permitido realizar diferentes observaciones. En primer lugar, encontramos que la distribución de botones en los dos grupos de descarga era sustancialmente diferente a la encontrada en neuronas de rata. Si en las neuronas granulares de rata mantenidas 7-9 DIV, los botones se distribuyen de manera que, aproximadamente, el 60% de los mismos presentan alta eficacia de reciclamiento, y el 40% baja eficacia de reciclamiento, en las neuronas granulares de ratón, el porcentaje de botones con alta eficacia de reciclamiento aumenta hasta un 80% del total analizado. Una explicación plausible a este fenómeno podría ser un diferente grado de maduración sináptica en los dos tipos celulares, dado que existe una correlación positiva entre el grado de eficacia de reciclamiento y el estadio de maduración (Bartolome-Martin y cols., 2012). Este hecho, junto al conocimiento de que el desarrollo del cerebelo en ratones es ligeramente más rápido que en rata (Lee y cols., 2009), y que los experimentos funcionales están hechos a los mismos días *in vitro* (7-9 DIV) en rata y ratón, puede explicar ese aumento en el porcentaje de botones de alta eficacia de reciclamiento encontrado sistemáticamente en células de ratón.

En segundo lugar, observamos que, sorprendentemente, la eliminación de la cGKII no parece afectar al reciclamiento vesicular, ya que los resultados obtenidos con las células del ratón KO para cGKII muestran una distribución de botones de alta y baja eficacia de reciclamiento similar a la encontrada en las células de ratón WT. Estos resultados podían indicar que la ausencia de cGKII está funcionalmente compensada y, en parte, sería lógico pensar que esa compensación podría ejercerla la cGKI.

Analizando la bibliografía, encontramos que los estudios realizados en estos animales no siempre han reproducido los resultados obtenidos previamente con tratamientos farmacológicos (Kleppisch y cols., 1999). Existen animales KO convencionales tanto de cGKI como de cGKII, que carecen de la proteína en todas

Discusión

las células, y KO condicionales de cGKI, que sólo en determinadas subpoblaciones neuronales carecen de la proteína (Kleppisch y cols., 2003). Diferentes trabajos realizados con los KOs convencionales de cGKI y cGKII han puesto de manifiesto las limitaciones que el empleo de este tipo de animales tiene, a la hora de interpretar los resultados obtenidos, debido a la multitud de fenotipos encontrados y alteraciones descritas, aspecto que mejora con el empleo de KOs condicionales. Un ejemplo claro de esta problemática sucede con la LTP hipocampal. Numerosas evidencias en la literatura muestran la implicación de cGKs en este proceso (Arancio y cols., 2001; Arancio y cols., 1995; Boulton y cols., 1995; Zhuo y cols., 1994), sin embargo, los estudios realizados con KOs convencionales para cGKI, cGKII o con el doble KO, no reprodujeron la alteración en LTP que se consigue con la inhibición farmacológica de cGKs (Kleppisch y cols., 1999), mientras que el KO condicional para cGKI, en el que el animal tan sólo carece de cGKI en el hipocampo, y, por lo tanto, carece de alteraciones a nivel renal, cardiovascular o gastrointestinal, mostraba alteraciones en la LTP (Kleppisch y cols., 2003).

Resultados similares se han obtenido en el caso del ratón KO para cGKII, en el que, si bien varios trabajos han mostrado que su inhibición se traduce en una reducción de LTP hipocampal (Zhuo y cols., 1994), los ratones KO convencionales no reprodujeron dichas alteraciones y mostraban una LTP normal (Kleppisch y cols., 1999), lo cual sugería la existencia de mecanismos de compensación funcional.

Dado que los animales utilizados en este trabajo son KO convencionales para cGKII, la presencia de la cGKI, en principio, se mantiene intacta. Si bien, es cierto que la isoforma cGKI es soluble y, por lo tanto, su participación en fenómenos que tengan lugar en un entorno de membrana puede verse reducida en comparación con la actividad de la cGKII, que se encuentra anclada a la membrana gracias a la miristoilación de su extremo N-terminal (Hofmann y cols., 2000). A pesar de estas evidencias, la cGKI es muy abundante en cerebelo (El-Husseini y cols., 1999), con lo cual se puede hipotetizar que su actividad podría estar compensando la ausencia de cGKII. Sin embargo, la adición del inhibidor farmacológico de cGKs, KT5823, aunque en neuronas de ratones WT produce efectos similares a los obtenidos en las neuronas de rata, donde la inhibición de cGK se traduce en un aumento del porcentaje de botones con reciclamiento ineficaz, en el caso de las células procedentes de ratones KO para cGKII, aunque

Discusión

produce un ligero incremento del porcentaje de reciclamiento ineficaz, dicho incremento no es significativo. La ausencia de un efecto significativo del KT5823 en neuronas cGKII KO rebate la hipótesis de que la cGKI compense completamente la ausencia de cGKII y, por tanto, deben existir otros mecanismos de compensación. Estos resultados están en sintonía con lo descrito por otros autores, cuyos estudios en LTP hipocampal, describen, además de la ausencia de alteraciones en el ratón cGKII KO, que la actividad de cGKI no está implicada en la compensación de este fenómeno (Kim y cols., 2015), tal como se observó en los trabajos realizados con el doble KO (Kleppisch y cols., 1999).

Este conjunto de evidencias indican la existencia de un mecanismo de compensación que actúa en el ratón KO para cGKII, el cual no implica la actividad de cGKI y que es necesario tener en cuenta en la interpretación de los resultados. Ziff y colaboradores han descrito, en un trabajo reciente, al ratón cGKII KO como un ejemplo típico de la paradoja que supone que, en ocasiones, la eliminación de un gen no resulte en los cambios fenotípicos esperados (Kim y cols., 2015). En sus trabajos muestran que efectos de la actividad de la cGKII, como es la fosforilación en la serina 845 de la subunidad GluA1 de los receptores AMPA, sigue presente en el hipocampo de neuronas del ratón KO convencional para cGKII (Wincott y cols., 2013). Más recientemente han puesto de manifiesto la existencia de un mecanismo de compensación, notablemente más complejo del que inicialmente plantearon, que se basaba en el incremento de la actividad de otra quinasa que compensara la ausencia de cGKII. Este mecanismo de compensación describe que, en neuronas WT, la inducción de LTP activa tanto PKA como cGKII, que fosforilan, entre otros sustratos, a GluA1, lo cual lleva a un incremento de receptores AMPA en membrana. cGKII también fosforila a IP3Rs, que conlleva un incremento de la salida de calcio desde el retículo endoplásmico y, por tanto, un incremento del calcio citosólico. A su vez, este aumento en la concentración de calcio activa a la proteína fosfatasa calcineurina, que defosforila a GluA1 e IP3Rs, estableciéndose así un ciclo auto-regulador de esta cascada. Sin embargo, en neuronas cGKII KO se reduce el grado de fosforilación de IP3Rs, lo cual se traduce en una inhibición de la salida del calcio del retículo y, por lo tanto, en un descenso en la actividad de calcineurina. Como consecuencia de la actividad reducida de calcineurina se estabiliza el estado fosforilado de GluA1, traduciéndose en un incremento de la expresión de CPARS en membrana (Kim y cols., 2015).

3. El análisis ultraestructural de los terminales sinápticos revelan la presencia de endosomas en las sinapsis de células estimuladas y el aumento de estas estructuras cuando la actividad cGKII está ausente.

Los estudios realizados en neuronas hipocampales y sinapsis del Calyx de Held analizando el papel del NO y cGKII en el reciclamiento vesicular, muestran que la activación de cGKs incrementa los niveles de PI(4,5)P₂ (Eguchi y cols., 2012; Micheva y cols., 2003), hecho que favorece el reclutamiento de AP-2 a la membrana, promoviendo así, que la endocitosis mediada por clatrina (CME) tenga lugar (Slepnev y De Camilli, 2000). Por otro lado, está aceptado que, aunque la endocitosis mediada por clatrina es el modo de endocitosis que predomina durante estimulaciones moderadas, la endocitosis masiva (ADBE) es el mecanismo de endocitosis principal ante estimulaciones intensas y prolongadas (Clayton y cols., 2008; Cheung y Cousin, 2012). Ambos mecanismos de endocitosis pueden coexistir en el mismo terminal sináptico, incluso teniendo diferentes contribuciones entre terminales sinápticos (Bartolome-Martin y cols., 2012; Voglmaier y cols., 2006), de manera que el equilibrio de ambos mecanismos, desplazado en favor de uno u otro, es lo que regula la tasa y velocidad del reciclaje vesicular en un determinado terminal (Voglmaier y cols., 2006).

La activación de la endocitosis masiva, que implica la formación de endosomas, es un mecanismo de recuperación de membrana activado por estímulos de alta intensidad, estímulos donde se produce una exocitosis masiva y la endocitosis mediada por clatrina, que recicla vesículas independientes, está saturada (Lopez-Murcia y cols., 2014; Sankaranarayanan y Ryan, 2000). En el protocolo utilizado en este trabajo, para cargar la sonda FM1-43 se ha utilizado un estímulo intenso (despolarización con 50 mM KCl) y prolongado (3 minutos), que produce una exocitosis masiva ya que moviliza todo el *pool* de reciclamiento (Alabi y Tsien, 2012) y que, por tanto, activa mecanismos de ADBE (Clayton y cols., 2008). Este mismo protocolo se utilizó para estimular las células antes de realizar la preparación para su análisis ultraestructural mediante MET que, en trabajos anteriores, había demostrado la presencia de endosomas en subpoblaciones de botones (Bartolome-Martin y cols., 2012). En este caso también se observa un notable incremento de estructuras endosomales en la mayoría de los botones de las células sometidas a estimulación. Sin embargo, cuando las células se mantienen en

Discusión

condiciones de reposo apenas se observan endosomas y los terminales aparecen ocupados, fundamentalmente, por vesículas sinápticas, algo también observado por otros autores en este mismo modelo neuronal (Clayton y cols., 2008). La aparición de estas estructuras endosomales, por tanto, se relaciona con una exocitosis masiva (Cheung y Cousin, 2012), pero también con la inmadurez de la maquinaria endocitótica presináptica (Shetty y cols., 2013). Estas dos situaciones podrían explicar la existencia de estas estructuras endosomales en las células estimuladas, dado que las células utilizadas en este estudio (7 -9 DIV) no están completamente maduras y la estimulación de 3 minutos con 50 mM KCl produce una exocitosis a gran escala.

En otros modelos neuronales se ha demostrado que la inhibición de cGKs conlleva una menor síntesis de PI(4,5)P₂ y, por tanto una disminución de este fosfolípido en la membrana (Eguchi y cols., 2012; Micheva y cols., 2003). La disminución de PI(4,5)P₂ se ha relacionado con una inhibición de la CME (Krauss y cols., 2003; Varnai y cols., 2006; Zoncu y cols., 2007) que se compensa con una potenciación de los mecanismos de endocitosis tipo ADBE, para garantizar la retirada de membrana y prevenir, así, la desestructuración de la sinapsis (Kononenko y Haucke, 2015). En estas circunstancias se debe observar un incremento en los endosomas acumulados en el interior del terminal. El análisis ultraestructural de los botones de células sujetas a una inhibición de las cGKs, o en las que se silencia la expresión cGKII, muestra, efectivamente, un significativo aumento de los endosomas por terminal sináptico, apoyando la idea de que se produce una sobreactivación de la endocitosis tipo ADBE, probablemente porque la CME está inhibida. Estos análisis también justifican la heterogeneidad de respuestas observadas en los experimentos de FM1-43, a pesar de que la población de botones analizada es mucho más pequeña. Tanto los datos de MET como los de FM1-43 sugieren que la actividad de cGKII es necesaria para mantener la eficiencia de reciclamiento en una determinada población de botones, pero no en todos, ya que en ambos estudios siempre se observan botones que no están afectados por la inhibición o por el silenciamiento de cGKII.

Las preparaciones de MET también revelan que, tanto la inhibición prolongada de cGKs como el silenciamiento de cGKII, se traducen en un incremento, aunque no estadísticamente significativo, del número de vesículas por zona activa en condiciones basales y que el incremento de endosomas se acompaña

de una reducción de vesículas sinápticas en condiciones de estimulación, sugiriendo que estos endosomas se están formando como consecuencia de la exocitosis de múltiples vesículas. Es importante señalar que esto no ocurre cuando se realiza una incubación de 30 minutos con el inhibidor de cGKs.

Cuando se realizaron análisis ultraestructurales en neuronas granulares de ratón, WT o cGKII KO, encontramos que, de forma acorde a lo observado durante los experimentos funcionales con la sonda FM1-43, el estímulo con 50mM KCl, tanto en neuronas WT como cGKII KO produce un aumento significativo del número de endosomas con respecto a sus respectivas preparaciones mantenidas en reposo. Sin embargo, no se encontraron diferencias entre los botones de las células WT y los de las neuronas carentes de cGKII. La inhibición de cGKs en neuronas WT con KT5823, induce un aumento notable de estructuras endosomales en los terminales sinápticos en condiciones de estimulación, que justifica el incremento en el porcentaje de botones pertenecientes al grupo de baja eficacia de reciclamiento o grupo 2 en los experimentos con FM1-43, mientras que no afecta a la relación endosoma/vesícula en los botones de las células cGKII KO. Estos datos, en primer lugar confirman los resultados de los experimentos funcionales y, en un segundo lugar, ponen, otra vez, de manifiesto la existencia de un mecanismo que compensa la ausencia de cGKII (Kim y cols., 2015).

4. La actividad cGK es necesaria para que la endocitosis sea rápida tras un estímulo intenso y prolongado.

El conjunto de datos obtenidos, tanto a nivel funcional como en estudios ultraestructurales, junto a las evidencias mostradas por otros autores (Eguchi y cols., 2012; Micheva y cols., 2003; Taoufiq y cols., 2013), sugieren que los defectos en la eficacia del reciclamiento vesicular encontrados en ausencia de cGKs, se deben a la acción de ésta regulando la etapa endocitótica del proceso.

Dado que la principal limitación metodológica de los experimentos con FM1-43 es la estimulación necesaria para la incorporación de la sonda en el interior de las vesículas sinápticas, resulta complicado analizar la fase endocitótica del ciclo vesicular. Con objeto de eludir esta limitación, se diseñaron experimentos valiéndonos del reportero genético de exo/endocitosis vGlut1-pH. El cDNA de esta

Discusión

pHluorina, compuesta por una copia del transportador de glutamato vesicular fusionada a GFP mediante técnicas de biología molecular, se introduce por electroporación a 0 DIV en las células de interés, de forma que las células expresan la proteína que se inserta en las membranas de las vesículas sinápticas y permite monitorizar el ciclo vesicular sin necesidad de ninguna incubación ni estimulación previa. Además, trabajos previos han demostrado que la expresión de vGlut1-pH no se traduce en niveles elevados de fluorescencia en membrana (Balaji y Ryan, 2007) y, tras la fusión de la vesícula, su difusión lateral es limitada, siendo, por tanto, una excelente herramienta para estudiar el ciclo vesicular (Balaji y Ryan, 2007). Además, permite diseccionar con elevada fidelidad las etapas de exocitosis y endocitosis del ciclo vesicular (Voglmaier y cols., 2006). El análisis de la recuperación de la fluorescencia tras el estímulo, hasta niveles basales, se corresponde con la endocitosis y reacidificación de las vesículas sinápticas. Como la reacidificación es un proceso tan rápido ($\tau=4$ s), el decaimiento de la señal de vGlut1-pH refleja la endocitosis en tiempo real (Atluri y Ryan, 2006; Granseth y cols., 2007).

Al analizar las respuestas sinápticas de botones individuales a un estímulo intenso de 50 segundos, aunque se observó una gran heterogeneidad, las diferentes respuestas se pudieron agrupar en cuatro perfiles de recuperación de la fluorescencia basal, con una determinada distribución porcentual. La inhibición de cGKs con KT5823 se traduce en una notable alteración de esa distribución porcentual, aumentando aquellas respuestas en las que no se recupera completamente la fluorescencia basal o que tienen una constante de decaimiento más lenta, dando cuenta de un enlentecimiento en la endocitosis. Estas observaciones apoyan los resultados previos y las evidencias descritas en la literatura que muestran que la ausencia de cGKs enlentece la endocitosis y altera el reciclamiento vesicular (Eguchi y cols., 2012; Micheva y cols., 2003; Micheva y cols., 2001; Taoufiq y cols., 2013). Además, estos resultados confirman que, en las células control, en la mayoría de los botones (perfil 1) durante el estímulo se están produciendo tanto eventos exocitóticos como endocitóticos de manera coordinada. El enlentecimiento de la endocitosis se traduce en una disminución de los botones con este tipo de respuesta.

Además de la posibilidad de analizar las respuestas exo/endocitóticas sin la necesidad de un estímulo previo, otra de las ventajas de la vGlut1-pH es la

Discusión

posibilidad de realizar protocolos con varias estimulaciones sobre el mismo campo celular. Esta característica permite analizar la respuesta de un mismo botón antes y después de la incubación con un determinado compuesto, obteniendo así un control interno para cada una de las respuestas analizadas. Tras un estímulo intenso y prolongado (50 segundos), la perfusión con el inhibidor KT5823 durante 30 minutos resultó en una notable reducción en la velocidad de endocitosis en la respuesta a un segundo estímulo de las mismas características. En una población de botones no se recuperan los niveles basales de fluorescencia, al menos, en la misma escala temporal en la que se recuperan tras el primer estímulo (anterior a la perfusión con este compuesto), sugiriendo defectos en la endocitosis tal como demuestran los estudios realizados con medidas de capacitancia en otros modelos celulares, en los que la inhibición de cGKs producía resultados similares (Eguchi y cols., 2012). Cuando las respuestas individuales a los dos estímulos se clasifican en los cuatro perfiles descritos previamente. La distribución porcentual de las respuestas al primer estímulo es similar a la encontrada en los experimentos anteriores de un único estímulo, pero esa distribución se altera en las respuestas al segundo estímulo si las células se perfunden con KT5823, tratamiento que, como esperábamos, induce un aumento significativo del porcentaje de botones con una constante de endocitosis más lenta, dando cuenta del enlentecimiento de la endocitosis que se observa al analizar la respuesta promedio de todos los botones.

Para descartar que este defecto endocitótico fuera debido a la propia estimulación repetida, se realizó el mismo protocolo, perfundiendo, esta vez, entre los dos estímulos medio HBM sin el inhibidor. En esta situación, las respuestas a los dos estímulos son prácticamente idénticas, no observándose alteraciones en la magnitud de la exocitosis ni de la endocitosis, hecho que nos permite descartar que los defectos endocitóticos encontrados, cuando se perfunde el inhibidor de las cGKs, sean causados por estimulaciones repetidas.

Como ya se ha mencionado anteriormente, la endocitosis masiva se activa por estimulaciones de alta intensidad (Clayton y cols., 2008; Cheung y Cousin, 2013), mientras que la CME predomina cuando los estímulos son moderados. Para determinar si los defectos endocitóticos observados tras la inhibición de cGKs dependen de la intensidad del estímulo, se realizaron los mismos experimentos con el reportero del ciclo vesicular vGlut1-pH, de estimulación simple y de doble estimulación, reduciendo el tiempo de estimulación con 50mM KCl a 15 segundos.

Discusión

Tanto los resultados obtenidos con un solo estímulo (en neuronas control y preincubadas con KT5823), como los obtenidos con doble estimulación, en los que se perfunde el inhibidor KT5823 entre ambos estímulos, no mostraron ningún enlentecimiento de la endocitosis cuando está presente el inhibidor, como ocurre con estímulos más intensos. Con estos estímulos, también se encuentran respuestas individuales heterogéneas, que se agrupan en cinco perfiles distintos. La incubación con KT5823, bien sea prolongada (24 horas) o de 30 minutos, cuando se realiza entre los dos estímulos, reduce la magnitud de la respuesta exocitótica en algunas subpoblaciones de botones que van acompañadas de una recuperación de la fluorescencia basal más rápida y, por tanto, con constantes de endocitosis más bajas.

Estos resultados, en su conjunto, ponen de manifiesto la importancia de la actividad de las quinasas dependientes de GMPc para sincronizar la velocidad de la endocitosis a la exocitosis y, por tanto, que el reciclamiento vesicular sea eficiente en condiciones de estimulación intensa y sostenida, y demuestran que su ausencia se traduce en un enlentecimiento de la endocitosis, al activarse y predominar procesos de endocitosis masiva (Clayton y cols., 2008; Cheung y Cousin, 2013). Sin embargo, en condiciones de estimulación más moderada, cuando no se produce una exocitosis masiva, la actividad de estas quinasas no parece necesaria para mantener una endocitosis eficiente. Más bien al contrario, la inhibición de estas quinasas se traduce en una menor respuesta exocitótica, aspecto que no hemos estudiado en profundidad, y al liberarse menor número de vesículas, la recuperación de membrana es más rápida ya que no se activa la endocitosis en masa. Resultados previos han demostrado que la formación de endosomas, característicos de la endocitosis masiva, dependen de la concentración de calcio, ya que disminuyen de forma notable cuando este disminuye, aún manteniendo el tiempo y la intensidad del estímulo (Bartolome-Martin y cols., 2012).

5. Estudio del reciclamiento vesicular en ratones WT y cGKII KO.

Como ya se ha discutido anteriormente, los estudios de reciclamiento vesicular, utilizando la sonda FM1-43, así como los análisis ultraestructurales realizados en células procedentes de animales KO convencionales para cGKII, no reprodujeron los resultados obtenidos en las células de rata mediante el

Discusión

silenciamiento de la expresión de cGKII o la inhibición farmacológica de las dos isoformas de cGKs. A pesar de las observaciones existentes en la bibliografía, en las que se pone de manifiesto esta ausencia de reproducibilidad de los resultados obtenidos con inhibidores farmacológicos (Kleppisch y cols., 1999; Wincott y cols., 2013), y de que también se hayan descrito mecanismos de compensación en neuronas de hipocampo del ratón KO para cGKII (Kim y cols., 2015), decidimos analizar el ciclo vesicular en células que expresen vGlut1-pH utilizando estímulos de diferente duración, siguiendo los mismos protocolos que los que se habían utilizado con las células de rata.

Aunque el reciclamiento vesicular, analizado con la sonda FM1-43, no parece alterado en los botones de las células de ratones KO para cGKII, los resultados obtenidos al utilizar vGlut1-pH ponen de manifiesto la existencia de diferentes alteraciones que pueden atribuirse a deficiencias en el mecanismo de reciclamiento vesicular. A pesar de que la expresión de vGlut1-pH no se traduce en niveles elevados de fluorescencia en membrana en diferentes tipos celulares (Balaji y Ryan, 2007), en las células procedentes de ratones cGKII KO, el nivel de fluorescencia en membrana (tanto valores absolutos como porcentaje de la Fmax) es significativamente más elevado que en las células de ratones WT, pudiendo deberse a una mayor exocitosis espontánea y/o a una menor velocidad de endocitosis.

Cuando las neuronas de ratón, bien sean WT o cGKII KO, se someten a estimulaciones de 50 segundos, y se analizan las respuestas de los botones individuales también se observa la heterogeneidad encontrada en las células de rata, aunque en este caso las respuestas pueden agruparse en sólo tres tipos, ya que el perfil 3 encontrado en las células de rata, aquí no se observa. Por tanto el perfil A se corresponde con el 1 de rata, que agrupa las respuestas de los botones en los que están coexistiendo eventos exocitóticos y endocitóticos durante el estímulo y finalizado el estímulo se recuperan los niveles basales de fluorescencia; el perfil B se corresponde con el 2 de la rata y el C con el 4 de rata, siendo estos dos últimos los que presentan una constante de endocitosis más elevada, al igual que sucede en las células de rata.

Cuando se someten las células a una doble estimulación, separada por un intervalo de 30 minutos en el que se perfunden con medio HBM o con HBM con KT5823, y analizamos la distribución de las respuestas individuales a los dos

Discusión

estímulos en los tres perfiles (A, B y C), sí se mantiene la magnitud de la respuesta en ambos estímulos y sí se recupera la fluorescencia basal. Encontramos diferencias importantes entre las células de ratón WT y las células del ratón cGKII KO y de ambas con respecto a las células de rata, indicando que muchos de los resultados obtenidos con las células de rata no son extrapolables a las células de ratón y viceversa, como ya se ha demostrado en numerosas ocasiones (Jelnes y cols., 2007).

En las células de ratón WT, cuando se perfunden con HBM entre los dos estímulos, las respuestas promedio de todos los botones analizados son muy similares en las dos estimuciones y, aunque en la segunda estimulación aumenta la proporción de respuestas tipo B, el nivel de fluorescencia basal se recupera completamente. En el caso de las células del ratón cGKII KO las respuestas a ambos estímulos son menores (un 30% de la F_{max}) que en las células del ratón WT (40% de la F_{max}) y, cuando están normalizadas a sus respectivas F_{max} , son similares. La mayoría de las respuestas tanto al primer como al segundo estímulo son del perfil A, y después del segundo estímulo la fluorescencia basal se recupera completamente, disminuyendo, incluso, en relación a la fluorescencia inicial. Sin embargo, cuando se analizan las respuestas, sin normalizar a la F_{max} , obtenida con la perfusión de NH_4Cl , que produce la alcalinización de todos los orgánulos subcelulares, incluidas vesículas, endosomas y lisosomas (Stewart y cols., 2012), encontramos que las respuestas al segundo estímulo son menores que las del primero, y que las fluorescencias máximas después del segundo estímulo también son menores (en torno a un 20%) que las determinadas después del primer estímulo. Por tanto, la menor respuesta podría atribuirse a la reducción del *pool* de vesículas disponibles y, el hecho de que se exociten menos vesículas, explicaría la mayor velocidad de la retirada de la fluorescencia de vGlut1-pH de la membrana, al no activarse mecanismos de endocitosis en masa (Clayton y cols., 2008). Si bien es cierto que es necesario realizar un análisis de mayor profundidad, en concreto, estudios del tamaño y distribución de los *pools* sinápticos en estas neuronas, para poder establecer conclusiones definitivas, basándonos en la literatura podemos especular sobre la causa de este fenómeno. Está descrito un mecanismo de regulación de la probabilidad de liberación mediado por el balance entre calcineurina y CdK5, y dicha regulación cursa con una significativa reducción del RRP debida a la inhibición farmacológica de calcineurina (Kim y Ryan, 2013), y

Discusión

las neuronas de hipocampo de los ratones cGKII KO, tal como se ha discutido anteriormente, muestran una actividad de calcineurina disminuida, debido a la reducción de la liberación de calcio por retículo endoplasmático (Kim y cols., 2015). Un mecanismo similar, basado en la reducción de la actividad de calcineurina y, por tanto, del *pool* de reciclamiento, podría justificar la reducción en la magnitud de las respuestas excitóticas observada en estas células.

Por otro lado, la disminución de los niveles de fluorescencia máxima, alcanzados tras la perfusión de NH_4Cl , es un fenómeno que solamente se observa en neuronas de ratones cGKII KO, y exclusivamente cuando los estímulos son de 50 segundos. Dado que la perfusión con NH_4Cl produce la alcalinización y, por tanto, la consecuente emisión de fluorescencia por parte de la GFP, de todos los orgánulos que contengan vGlut1-pH almacenados en el interior del terminal, incluidos lisosomas (Stewart y cols., 2012), el descenso en los niveles de fluorescencia máximos no puede atribuirse a la formación de endosomas tardíos debidos a la fusión de los endosomas primarios con lisosomas para su degradación, aunque no podemos descartar que haya una mayor degradación de las proteínas vesiculares, que estaría siempre activada por una entrada masiva de calcio.

Otra posible explicación a esta disminución de la F_{max} , observada después del segundo estímulo en las células del ratón cGKII KO, es que se dispersen las vesículas y/o endosomas tras el estímulo. Este hecho provocaría que vesículas que, después de un primer estímulo, se localizan dentro de la región a analizar, después del segundo estímulo se encuentren deslocalizadas y, por lo tanto, excluidas de la región de interés que se estudia, dando cuenta del descenso en la fluorescencia detectada al perfundir con NH_4Cl .

En este sentido, resultados recientes del grupo, en los que se combina el marcaje, con una sonda FM1-43 fijable, y la fotoconversión de la diaminobenzidina para detectar las estructuras recicladas mediante microscopía electrónica, apoyan esta hipótesis, ya que se observan tanto vesículas sinápticas como endosomas fotoconvertidos independientes, y separados del *pool* de vesículas que se concentra en la zona activa, y, en algunos casos localizados a lo largo de los axones, sugiriendo el tráfico de los mismos (Rodal y cols., 2011).

Se han descrito procesos de dispersión vesicular en otros modelos, en los que se muestran evidencias de la implicación de la sinapsina en el mantenimiento de los

Discusión

poovesvesiculares (Bykhovskaia, 2011), proceso regulado por ciclos de fosforilación y defosforilación de la sinapsina tras el estímulo. La sinapsina, en su estado defosforilado forma anclajes entre las vesículas y la citomatriz celular (Greengard y cols., 1993), manteniendo las vesículas en su posición correcta y conformando el *pool* correspondiente. Por el contrario, su estado fosforilado, como resultado de la activación de múltiples quinasas como la CaMKII, MAPK y PKA, provoca un cambio conformacional en la proteína, que disminuye su afinidad, tanto por las vesículas sinápticas como por los filamentos de actina a los que están ancladas (Bykhovskaia, 2011). El estímulo, y el incremento en la concentración de calcio que este conlleva, activa calcineurina, que defosforila a la sinapsina (Yamagata y cols., 2002). Por tanto, teniendo en cuenta las evidencias discutidas anteriormente, que describen el descenso en la actividad de calcineurina en los ratones cGKII KO, se podría especular que la reducción en la actividad calcineurina, pueda traducirse en una estabilización del estado fosforilado de sinapsina, hecho que llevaría a la pérdida de los anclajes entre las vesículas y el citoesqueleto (Greengard y cols., 1993) y a su dispersión y deslocalización, dando cuenta del descenso en la fluorescencia máxima alcanzada con la perfusión del NH₄Cl, al desaparecer vesículas de la región analizada. Evidentemente, la verificación de esta hipótesis requeriría la realización de experimentos de fotoconversión en estas células.

La perfusión de KT5823, durante los 30 minutos que separan los dos estímulos, se traduce en efectos muy diferentes en las células procedentes de ratones WT y en las células procedentes de los ratones cGKII KO. En neuronas de ratones WT, al igual que sucede en las células de rata, se observa un notable enlentecimiento de la endocitosis, no recuperándose los niveles basales cuando se analiza la respuesta promedio de todos los botones estudiados. El análisis de las respuestas individuales mostró que ese enlentecimiento de la endocitosis se debe a un incremento en la proporción de respuestas de perfil B y C, en detrimento del A, en relación a la distribución de respuestas al primer estímulo. En estas células (WT), la perfusión de KT5823, después del primer estímulo de 50 segundos, se traduce en un importante incremento de la fluorescencia basal, no habiéndose observado este fenómeno ni en neuronas de rata ni en las neuronas de ratón cGKII KO y, para el que, de momento, no tenemos una explicación satisfactoria. Podría explicarse por un incremento en la exocitosis espontánea en estas células, probablemente acompañada de una endocitosis defectuosa, por la inhibición de

Discusión

cGKs, sin embargo, este mecanismo en células de rata sólo se observa en condiciones de estimulación intensa (Eguchi y cols., 2012; Micheva y cols., 2003). El hecho de que este fenómeno no se observe ni en células de rata, ni de ratón cGKII KO, o en estas mismas células sometidas a estimulaciones más cortas, excluye la posibilidad de que se trate de un artefacto experimental y apunta a otra diferencia entre células de rata y ratón, que depende de la presencia de cGKII (Jelnes y cols., 2007).

En el caso de las neuronas de ratones cGKII KO, la inclusión de KT5823 en el medio de perfusión, no introduce ninguna modificación a lo ya observado cuando no se incluye este compuesto, salvo que la disminución de la F_{max} después del segundo estímulo es todavía mayor, sugiriendo que la inhibición de cGKI potencia el efecto de la ausencia de cGKII en la dispersión vesicular tras una estimulación prolongada y repetida.

Cuando la duración del estímulo se redujo a 15 segundos, en las células procedentes de ratones WT perfundidas con HBM, las respuestas a los dos estímulos fueron iguales, en cuanto a magnitud y distribución de perfiles, resultados similares a los encontrados en las células de rata. Sin embargo, la inclusión de KT5823 en el medio de perfusión se traduce en un enlentecimiento de la endocitosis, aumentando la proporción de respuestas de perfil B y C, en detrimento del A. En el caso de las células procedentes del ratón cGKII KO, muestran alteraciones en la recuperación del segundo estímulo, tanto si se perfunden en ausencia de KT5823 como en presencia del mismo, observándose un mayor porcentaje de respuestas B y D, que tienen constantes de endocitosis mayores. Estos resultados sugieren que las células de ratón presentan una mayor susceptibilidad a la inhibición de cGKs para garantizar una endocitosis eficiente y rápida, incluso con estímulos de menor duración.

Todo este conjunto de evidencias demuestran la implicación de las cGKs, y más específicamente de la cGKII, en la regulación de los procesos de recaptación de membrana, ajustando su función de forma acorde a los niveles de actividad que presente el terminal sináptico. Si bien, inicialmente, estas evidencias no resultaron reproducibles en el ratón KO para cGKII, la monitorización y análisis en más profundidad del ciclo vesicular de este tipo neuronal, ha mostrado diferentes alteraciones en el reciclamiento vesicular, y la presencia de fenómenos que tan sólo aparecen en las neuronas procedentes del ratón cGKII KO. Todos estos resultados

Discusión

demuestran, de nuevo, la importancia de estas quinasas en el correcto funcionamiento del ciclo vesicular y, por tanto, en la regulación de la actividad sináptica.

VI - CONCLUSIONES

“Quién no haya experimentado la irresistible atracción
de la ciencia, jamás podrá comprender su tiranía”

Mary Shelley

VI – CONCLUSIONES

1. En neuronas granulares de cerebelo de rata, el bloqueo prolongado de los receptores NMDA disminuye la eficacia de reciclamiento vesicular, debido a la disminución de GMPc en la presinapsis, ya que la adición de un análogo permeable de este nucleótido previene la acción de los antagonistas de estos receptores.
2. El sistema efector de GMPc para la regulación del reciclamiento vesicular es la quinasa dependiente de GMPc de tipo II (cGKII), ya que tanto su inhibición farmacológica como el silenciamiento de su expresión con un siRNA específico, provoca un aumento en la proporción de botones que presentan baja eficacia de reciclamiento.
3. La inhibición de cGKs, se traduce en un notable enlentecimiento de la etapa endocitótica del ciclo vesicular cuando el estímulo es intenso y prolongado.
4. Tanto la inhibición como el silenciamiento de cGKII producen un incremento significativo de estructuras endosomales en subpoblaciones de botones tras un estímulo intenso y prolongado. Hecho que explica el enlentecimiento del ciclo vesicular observado en estas condiciones.
5. Las neuronas procedentes de ratones KO para la cGKII muestran diferentes alteraciones en el reciclamiento vesicular, aunque no reproducen completamente los resultados obtenidos al silenciar esta proteína en las neuronas de rata. Hecho que, aunque podría explicarse por la existencia de mecanismos de compensación, requiere un estudio más profundo.

VII - BIBLIOGRAFÍA

“Los libros son abejas que transportan el polen
de la sabiduría de una mente a otra”

J.R.Lowell

VII – BIBLIOGRAFÍA

Alabi, A. A. y Tsien, R. W. (2012) Synaptic vesicle pools and dynamics. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, **4**, a013680

Alabi, A. A. y Tsien, R. W. (2013) Perspectives on kiss-and-run: role in exocytosis, endocytosis, and neurotransmission. *Annu Rev Physiol*, **75**, 393-422

Alderton, W. K., Cooper, C. E. y Knowles, R. G. (2001) Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J*, **357**, 593-615

Andreeva, S. G., Dikkes, P., Epstein, P. M. y Rosenberg, P. A. (2001) Expression of cGMP-specific phosphodiesterase 9A mRNA in the rat brain. *J Neurosci*, **21**, 9068-9076

Arancio, O., Antonova, I., Gambaryan, S., Lohmann, S. M., Wood, J. S., Lawrence, D. S. y Hawkins, R. D. (2001) Presynaptic role of cGMP-dependent protein kinase during long-lasting potentiation. *J Neurosci*, **21**, 143-149

Arancio, O., Kandel, E. R. y Hawkins, R. D. (1995) Activity-dependent long-term enhancement of transmitter release by presynaptic 3',5'-cyclic GMP in cultured hippocampal neurons. *Nature*, **376**, 74-80

Atluri, P. P. y Ryan, T. A. (2006) The kinetics of synaptic vesicle reacidification at hippocampal nerve terminals. *J Neurosci*, **26**, 2313-2320

Balaji, J. y Ryan, T. A. (2007) Single-vesicle imaging reveals that synaptic vesicle exocytosis and endocytosis are coupled by a single stochastic mode. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 20576-20581

Bartolome-Martin, D., Ramirez-Franco, J., Castro, E., Sanchez-Prieto, J. y Torres, M. (2012) Efficient synaptic vesicle recycling after intense exocytosis concomitant with the accumulation of non-releasable endosomes at early developmental stages. *J Cell Sci*, **125**, 422-434

Bergsman, J. B., Krueger, S. R. y Fitzsimonds, R. M. (2006) Automated criteria-based selection and analysis of fluorescent synaptic puncta. *J Neurosci Methods*, **152**, 32-39

Bito, H., Furuyashiki, T., Ishihara, H., Shibasaki, Y., Ohashi, K., Mizuno, K., Maekawa, M., Ishizaki, T. y Narumiya, S. (2000) A critical role for a Rho-associated kinase, p160ROCK, in determining axon outgrowth in mammalian CNS neurons. *Neuron*, **26**, 431-441

Bonnet, C., Andrieux, J., Beri-Dexheimer, M., Leheup, B., Boute, O., Manouvrier, S., Delobel, B., Copin, H., Receveur, A., Mathieu, M., Thiriez, G., Le Caignec, C., David, A., de Blois, M. C., Malan, V., Philippe, A., Cormier-Daire, V., Colleaux, L., Flori, E., Dollfus, H., Pelletier, V., Thauvin-Robinet, C., Masurel-Paulet, A., Faivre, L., Tardieu, M., Bahi-Buisson, N., Callier, P., Mugneret, F., Edery, P., Jonveaux, P. y Sanlaville, D.

Bibliografía

(2010) Microdeletion at chromosome 4q21 defines a new emerging syndrome with marked growth restriction, mental retardation and absent or severely delayed speech. *J Med Genet*, **47**, 377-384

Boulton, C. L., Southam, E. y Garthwaite, J. (1995) Nitric oxide-dependent long-term potentiation is blocked by a specific inhibitor of soluble guanylyl cyclase. *Neuroscience*, **69**, 699-703

Brenman, J. E., Chao, D. S., Gee, S. H., McGee, A. W., Craven, S. E., Santillano, D. R., Wu, Z., Huang, F., Xia, H., Peters, M. F., Froehner, S. C. y Brecht, D. S. (1996) Interaction of nitric oxide synthase with the postsynaptic density protein PSD-95 and alpha1-syntrophin mediated by PDZ domains. *Cell*, **84**, 757-767

Briz, V., Zhu, G., Wang, Y., Liu, Y., Avetisyan, M., Bi, X. y Baudry, M. (2015) Activity-dependent rapid local RhoA synthesis is required for hippocampal synaptic plasticity. *J Neurosci*, **35**, 2269-2282

Budworth, J., Meillerais, S., Charles, I. y Powell, K. (1999) Tissue distribution of the human soluble guanylate cyclases. *Biochem Biophys Res Commun*, **263**, 696-701

Burette, A., Zabel, U., Weinberg, R. J., Schmidt, H. H. y Valtschanoff, J. G. (2002) Synaptic localization of nitric oxide synthase and soluble guanylyl cyclase in the hippocampus. *J Neurosci*, **22**, 8961-8970

Bykhovskaia, M. (2011) Synapsin regulation of vesicle organization and functional pools. *Semin Cell Dev Biol*, **22**, 387-392

Campese, V. M., Sindhu, R. K., Ye, S., Bai, Y., Vaziri, N. D. y Jabbari, B. (2007) Regional expression of NO synthase, NAD(P)H oxidase and superoxide dismutase in the rat brain. *Brain Res*, **1134**, 27-32

Ciani, E., Calvanese, V., Crochemore, C., Bartesaghi, R. y Contestabile, A. (2006) Proliferation of cerebellar precursor cells is negatively regulated by nitric oxide in newborn rat. *J Cell Sci*, **119**, 3161-3170

Ciani, E., Guidi, S., Bartesaghi, R. y 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

Ciani, E., Severi, S., Contestabile, A., Bartesaghi, R. y Contestabile, A. (2004) Nitric oxide negatively regulates proliferation and promotes neuronal differentiation through N-Myc downregulation. *J Cell Sci*, **117**, 4727-4737

Clayton, E. L., Anggono, V., Smillie, K. J., Chau, N., Robinson, P. J. y Cousin, M. A. (2009) The phospho-dependent dynamin-syndapin interaction triggers activity-dependent bulk endocytosis of synaptic vesicles. *J Neurosci*, **29**, 7706-7717

Bibliografía

- Clayton, E. L. y Cousin, M. A. (2009) The molecular physiology of activity-dependent bulk endocytosis of synaptic vesicles. *J Neurochem*, **111**, 901-914
- Clayton, E. L., Evans, G. J. y Cousin, M. A. (2008) Bulk synaptic vesicle endocytosis is rapidly triggered during strong stimulation. *J Neurosci*, **28**, 6627-6632
- Clayton, E. L., Sue, N., Smillie, K. J., O'Leary, T., Bache, N., Cheung, G., Cole, A. R., Wyllie, D. J., Sutherland, C., Robinson, P. J. y Cousin, M. A. (2010) Dynamin I phosphorylation by GSK3 controls activity-dependent bulk endocytosis of synaptic vesicles. *Nat Neurosci*, **13**, 845-851
- Collado-Alsina, A., Ramirez-Franco, J., Sanchez-Prieto, J. y Torres, M. (2014) The regulation of synaptic vesicle recycling by cGMP-dependent protein kinase type II in cerebellar granule cells under strong and sustained stimulation. *J Neurosci*, **34**, 8788-8799
- Contestabile, A. (2000) Roles of NMDA receptor activity and nitric oxide production in brain development. *Brain Res 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
- Cremona, O. y De Camilli, P. (2001) Phosphoinositides in membrane traffic at the synapse. *J Cell Sci*, **114**, 1041-1052
- Cremona, O., Di Paolo, G., Wenk, M. R., Luthi, A., Kim, W. T., Takei, K., Daniell, L., Nemoto, Y., Shears, S. B., Flavell, R. A., McCormick, D. A. y De Camilli, P. (1999) Essential role of phosphoinositide metabolism in synaptic vesicle recycling. *Cell*, **99**, 179-188
- Cudeiro, J., Rivadulla, C. y Grieve, K. L. (2000) A possible role for nitric oxide at the sleep/wake interface. *Sleep*, **23**, 829-835
- Chappie, J. S., Acharya, S., Leonard, M., Schmid, S. L. y Dyda, F. (2010) G domain dimerization controls dynamin's assembly-stimulated GTPase activity. *Nature*, **465**, 435-440
- Chappie, J. S., Mears, J. A., Fang, S., Leonard, M., Schmid, S. L., Milligan, R. A., Hinshaw, J. E. y Dyda, F. (2011) A pseudoatomic model of the dynamin polymer identifies a hydrolysis-dependent powerstroke. *Cell*, **147**, 209-222
- Charbonneau, H., Beier, N., Walsh, K. A. y Beavo, J. A. (1986) Identification of a conserved domain among cyclic nucleotide phosphodiesterases from diverse species. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **83**, 9308-9312

Bibliografía

- Cheung, G. y Cousin, M. A. (2012) Adaptor protein complexes 1 and 3 are essential for generation of synaptic vesicles from activity-dependent bulk endosomes. *J Neurosci*, **32**, 6014-6023
- Cheung, G. y Cousin, M. A. (2013) Synaptic vesicle generation from activity-dependent bulk endosomes requires calcium and calcineurin. *J Neurosci*, **33**, 3370-3379
- Cho, K. O., Hunt, C. A. y Kennedy, M. B. (1992) The rat brain postsynaptic density fraction contains a homolog of the Drosophila discs-large tumor suppressor protein. *Neuron*, **9**, 929-942
- Dani, A., Huang, B., Bergan, J., Dulac, C. y Zhuang, X. (2010) Superresolution imaging of chemical synapses in the brain. *Neuron*, **68**, 843-856
- Darcy, K. J., Staras, K., Collinson, L. M. y Goda, Y. (2006) Constitutive sharing of recycling synaptic vesicles between presynaptic boutons. *Nat Neurosci*, **9**, 315-321
- Denker, A., Krohnert, K., Buckers, J., Neher, E. y Rizzoli, S. O. (2011) The reserve pool of synaptic vesicles acts as a buffer for proteins involved in synaptic vesicle recycling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **108**, 17183-17188
- Derbyshire, E. R. y Marletta, M. A. (2012) Structure and regulation of soluble guanylate cyclase. *Annu Rev Biochem*, **81**, 533-559
- Ding, J. D. y Weinberg, R. J. (2006) Localization of soluble guanylyl cyclase in the superficial dorsal horn. *J Comp Neurol*, **495**, 668-678
- Dominska, M. y Dykxhoorn, D. M. (2010) Breaking down the barriers: siRNA delivery and endosome escape. *J Cell Sci*, **123**, 1183-1189
- Dreosti, E. y Lagnado, L. (2011) Optical reporters of synaptic activity in neural circuits. *Exp Physiol*, **96**, 4-12
- Eguchi, K., Nakanishi, S., Takagi, H., Taoufiq, Z. y Takahashi, T. (2012) Maturation of a PKG-dependent retrograde mechanism for exoendocytic coupling of synaptic vesicles. *Neuron*, **74**, 517-529
- El-Husseini, A. E., Williams, J., Reiner, P. B., Pelech, S. y Vincent, S. R. (1999) Localization of the cGMP-dependent protein kinases in relation to nitric oxide synthase in the brain. *J Chem Neuroanat*, **17**, 45-55
- Eliasson, M. J., Blackshaw, S., Schell, M. J. y Snyder, S. H. (1997) Neuronal nitric oxide synthase alternatively spliced forms: prominent functional localizations in the brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 3396-3401
- Fasshauer, D., Sutton, R. B., Brunger, A. T. y Jahn, R. (1998) Conserved structural features of the synaptic fusion complex: SNARE proteins reclassified as Q- and R-SNAREs. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 15781-15786

Bibliografía

- Fei, H., Grygoruk, A., Brooks, E. S., Chen, A. y Krantz, D. E. (2008) Trafficking of vesicular neurotransmitter transporters. *Traffic*, **9**, 1425-1436
- Feil, R. y Kleppisch, T. (2008) NO/cGMP-dependent modulation of synaptic transmission. *Handb Exp Pharmacol*, 529-560
- Ferguson, S. M., Brasnjo, G., Hayashi, M., Wolfel, M., Collesi, C., Giovedi, S., Raimondi, A., Gong, L. W., Ariel, P., Paradise, S., O'Toole, E., Flavell, R., Cremona, O., Miesenbock, G., Ryan, T. A. y De Camilli, P. (2007) A selective activity-dependent requirement for dynamin 1 in synaptic vesicle endocytosis. *Science*, **316**, 570-574
- Ferguson, S. M. y De Camilli, P. (2012) Dynamin, a membrane-remodelling GTPase. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **13**, 75-88
- Ford, M. G., Jenni, S. y Nunnari, J. (2011) The crystal structure of dynamin. *Nature*, **477**, 561-566
- Ford, M. G., Mills, I. G., Peter, B. J., Vallis, Y., Praefcke, G. J., Evans, P. R. y McMahon, H. T. (2002) Curvature of clathrin-coated pits driven by epsin. *Nature*, **419**, 361-366
- Frings, S., Seifert, R., Godde, M. y Kaupp, U. B. (1995) Profoundly different calcium permeation and blockage determine the specific function of distinct cyclic nucleotide-gated channels. *Neuron*, **15**, 169-179
- Frost, A., Perera, R., Roux, A., Spasov, K., Destaing, O., Egelman, E. H., De Camilli, P. y Unger, V. M. (2008) Structural basis of membrane invagination by F-BAR domains. *Cell*, **132**, 807-817
- Gallo, V., Kingsbury, A., Balazs, R. y Jorgensen, O. S. (1987) The role of depolarization in the survival and differentiation of cerebellar granule cells in culture. *J Neurosci*, **7**, 2203-2213
- Gamm, D. M., Francis, S. H., Angelotti, T. P., Corbin, J. D. y Uhler, M. D. (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. y Boulton, C. L. (1995) Nitric oxide signaling in the central nervous system. *Annu Rev Physiol*, **57**, 683-706
- Gasper, R., Meyer, S., Gotthardt, K., Sirajuddin, M. y Wittinghofer, A. (2009) It takes two to tango: regulation of G proteins by dimerization. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **10**, 423-429
- Gibb, B. J. y Garthwaite, J. (2001) Subunits of the nitric oxide receptor, soluble guanylyl cyclase, expressed in rat brain. *Eur J Neurosci*, **13**, 539-544

Bibliografía

- Gonzalez-Forero, D., Montero, F., Garcia-Morales, V., Dominguez, G., Gomez-Perez, L., Garcia-Verdugo, J. M. y Moreno-Lopez, B. (2012) Endogenous Rho-kinase signaling maintains synaptic strength by stabilizing the size of the readily releasable pool of synaptic vesicles. *J Neurosci*, **32**, 68-84
- Granseth, B., Odermatt, B., Royle, S. J. y Lagnado, L. (2007) Clathrin-mediated endocytosis: the physiological mechanism of vesicle retrieval at hippocampal synapses. *J Physiol*, **585**, 681-686
- Greengard, P., Valtorta, F., Czernik, A. J. y Benfenati, F. (1993) Synaptic vesicle phosphoproteins and regulation of synaptic function. *Science*, **259**, 780-785
- Guan, R., Dai, H., Harrison, S. C. y Kirchhausen, T. (2010) Structure of the PTEN-like region of auxilin, a detector of clathrin-coated vesicle budding. *Structure*, **18**, 1191-1198
- Hackos, D. H. y Korenbrot, J. I. (1999) Divalent cation selectivity is a function of gating in native and recombinant cyclic nucleotide-gated ion channels from retinal photoreceptors. *J Gen Physiol*, **113**, 799-818
- Hardingham, N., Dachtler, J. y Fox, K. (2013) The role of nitric oxide in pre-synaptic plasticity and homeostasis. *Front Cell Neurosci*, **7**, 190
- Harteneck, C., Wedel, B., Koesling, D., Malkewitz, J., Bohme, E. y Schultz, G. (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
- Haucke, V. y De Camilli, P. (1999) AP-2 recruitment to synaptotagmin stimulated by tyrosine-based endocytic motifs. *Science*, **285**, 1268-1271
- Hayashi, M., Raimondi, A., O'Toole, E., Paradise, S., Collesi, C., Cremona, O., Ferguson, S. M. y De Camilli, P. (2008) Cell- and stimulus-dependent heterogeneity of synaptic vesicle endocytic recycling mechanisms revealed by studies of dynamin 1-null neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**, 2175-2180
- Heindorff, K. y Baumann, O. (2014) Calcineurin is part of a negative feedback loop in the InsP3/Ca(2)(+) signalling pathway in blowfly salivary glands. *Cell Calcium*, **56**, 215-224
- Heuser, J. E. y Reese, T. S. (1973) Evidence for recycling of synaptic vesicle membrane during transmitter release at the frog neuromuscular junction. *J Cell Biol*, **57**, 315-344
- Hofmann, F., Ammendola, A. y Schlossmann, J. (2000) Rising behind NO: cGMP-dependent protein kinases. *J Cell Sci*, **113 (Pt 10)**, 1671-1676
- Hofmann, F., Dostmann, W., Keilbach, A., Landgraf, W. y Ruth, P. (1992) Structure and physiological role of cGMP-dependent protein kinase. *Biochim Biophys Acta*, **1135**, 51-60
- Hofmann, F., Feil, R., Kleppisch, T. y Schlossmann, J. (2006) Function of cGMP-dependent protein kinases as revealed by gene deletion. *Physiol Rev*, **86**, 1-23

Bibliografía

- Holderith, N., Lorincz, A., Katona, G., Rozsa, B., Kulik, A., Watanabe, M. y Nusser, Z. (2012) Release probability of hippocampal glutamatergic terminals scales with the size of the active zone. *Nat Neurosci*, **15**, 988-997
- Hua, Z., Leal-Ortiz, S., Foss, S. M., Waites, C. L., Garner, C. C., Voglmaier, S. M. y Edwards, R. H. (2011) v-SNARE composition distinguishes synaptic vesicle pools. *Neuron*, **71**, 474-487
- Ihara, H., Kuwamura, M., Atsuta, M., Nihonmatsu, I., Okada, T., Mukamoto, M. y Kozaki, S. (2006) Expression of neuronal nitric oxide synthase variant, nNOS-mu, in rat brain. *Nitric Oxide*, **15**, 13-19
- Incontro, S., Ciruela, F., Ziff, E., Hofmann, F., Sanchez-Prieto, J. y Torres, M. (2013) The type II cGMP dependent protein kinase regulates GluA1 levels at the plasma membrane of developing cerebellar granule cells. *Biochim Biophys Acta*, **1833**, 1820-1831
- Incontro, S., Ramirez-Franco, J., Sanchez-Prieto, J. y Torres, M. (2011) Membrane depolarization regulates AMPA receptor subunit expression in cerebellar granule cells in culture. *Biochim Biophys Acta*, **1813**, 14-26
- Ito, M. (1984) *The cerebellum and neural control*. Raven Press
- Ito, M. (2008) Control of mental activities by internal models in the cerebellum. *Nat Rev Neurosci*, **9**, 304-313
- Itoh, T. y De Camilli, P. (2006) BAR, F-BAR (EFC) and ENTH/ANTH domains in the regulation of membrane-cytosol interfaces and membrane curvature. *Biochim Biophys Acta*, **1761**, 897-912
- Jahn, R. y Fasshauer, D. (2012) Molecular machines governing exocytosis of synaptic vesicles. *Nature*, **490**, 201-207
- Jarnaess, E. y Tasken, K. (2007) Spatiotemporal control of cAMP signalling processes by anchored signalling complexes. *Biochem Soc Trans*, **35**, 931-937
- Jelnes, P., Santoni-Rugiu, E., Rasmussen, M., Friis, S. L., Nielsen, J. H., Tygstrup, N. y Bisgaard, H. C. (2007) Remarkable heterogeneity displayed by oval cells in rat and mouse models of stem cell-mediated liver regeneration. *Hepatology*, **45**, 1462-1470
- Johansson, F. K., Brodd, J., Eklof, C., Ferletta, M., Hesselager, G., Tiger, C. F., Uhrbom, L. y Westermarck, B. (2004) Identification of candidate cancer-causing genes in mouse brain tumors by retroviral tagging. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 11334-11337
- Jones, J. D., Carney, S. T., Vrana, K. E., Norford, D. C. y Howlett, A. C. (2008) Cannabinoid receptor-mediated translocation of NO-sensitive guanylyl cyclase and production of cyclic GMP in neuronal cells. *Neuropharmacology*, **54**, 23-30

Bibliografía

- Jurado, S., Rodriguez-Pascual, F., Sanchez-Prieto, J., Reimunde, F. M., Lamas, S. y Torres, M. (2006) NMDA induces post-transcriptional regulation of alpha2-guanylyl-cyclase-subunit expression in cerebellar granule cells. *J Cell Sci*, **119**, 1622-1631
- Jurado, S., Sanchez-Prieto, J. y Torres, M. (2003) Differential expression of NO-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., Sanchez-Prieto, J. y 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., Sanchez-Prieto, J. y 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
- Kaesler, P. S., Deng, L., Wang, Y., Dulubova, I., Liu, X., Rizo, J. y Sudhof, T. C. (2011) RIM proteins tether Ca²⁺ channels to presynaptic active zones via a direct PDZ-domain interaction. *Cell*, **144**, 282-295
- Kandel, E. R., Schwartz, J.H. y Jessell, T.M. (2000) Principles of neural science. McGraw-Hill
- Kato, M., Blanton, R., Wang, G. R., Judson, T. J., Abe, Y., Myoishi, M., Karas, R. H. y Mendelsohn, M. E. (2012) Direct binding and regulation of RhoA protein by cyclic GMP-dependent protein kinase Ialpha. *J Biol Chem*, **287**, 41342-41351
- Kaupp, U. B. y Seifert, R. (2002) Cyclic nucleotide-gated ion channels. *Physiol Rev*, **82**, 769-824
- Kim, S., Titcombe, R. F., Zhang, H., Khatri, L., Girma, H. K., Hofmann, F., Arancio, O. y Ziff, E. B. (2015) Network compensation of cyclic GMP-dependent protein kinase II knockout in the hippocampus by Ca²⁺-permeable AMPA receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **112**, 3122-3127
- Kim, S. H. y Ryan, T. A. (2010) CDK5 serves as a major control point in neurotransmitter release. *Neuron*, **67**, 797-809
- Kim, S. H. y Ryan, T. A. (2013) Balance of calcineurin Aalpha and CDK5 activities sets release probability at nerve terminals. *J Neurosci*, **33**, 8937-8950
- Kingston, P. A., Zufall, F. y Barnstable, C. J. (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, P. A., Zufall, F. y Barnstable, C. J. (1999) Widespread expression of olfactory cyclic nucleotide-gated channel genes in rat brain: implications for neuronal signalling. *Synapse*, **32**, 1-12

Bibliografía

Kleppisch, T., Pfeifer, A., Klatt, P., Ruth, P., Montkowski, A., Fassler, R. y 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

Kleppisch, T., Wolfsgruber, W., Feil, S., Allmann, R., Wotjak, C. T., Goebbels, S., Nave, K. A., Hofmann, F. y Feil, R. (2003) Hippocampal cGMP-dependent protein kinase I supports an age- and protein synthesis-dependent component of long-term potentiation but is not essential for spatial reference and contextual memory. *J Neurosci*, **23**, 6005-6012

Kononenko, N. L., Diril, M. K., Puchkov, D., Kintscher, M., Koo, S. J., Pfuhl, G., Winter, Y., Wienisch, M., Klingauf, J., Breustedt, J., Schmitz, D., Maritzen, T. y Haucke, V. (2013) Compromised fidelity of endocytic synaptic vesicle protein sorting in the absence of stonin 2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **110**, E526-535

Kononenko, N. L. y Haucke, V. (2015) Molecular mechanisms of presynaptic membrane retrieval and synaptic vesicle reformation. *Neuron*, **85**, 484-496

Kononenko, N. L., Puchkov, D., Classen, G. A., Walter, A. M., Pechstein, A., Sawade, L., Kaempf, N., Trimbuch, T., Lorenz, D., Rosenmund, C., Maritzen, T. y Haucke, V. (2014) Clathrin/AP-2 mediate synaptic vesicle reformation from endosome-like vacuoles but are not essential for membrane retrieval at central synapses. *Neuron*, **82**, 981-988

Krauss, M., Kinuta, M., Wenk, M. R., De Camilli, P., Takei, K. y Haucke, V. (2003) ARF6 stimulates clathrin/AP-2 recruitment to synaptic membranes by activating phosphatidylinositol phosphate kinase type Igamma. *J Cell Biol*, **162**, 113-124

Lange, M. D., Doengi, M., Lesting, J., Pape, H. C. y Jungling, K. (2012) Heterosynaptic long-term potentiation at interneuron-principal neuron synapses in the amygdala requires nitric oxide signalling. *J Physiol*, **590**, 131-143

Lee, H. K. (2006) Synaptic plasticity and phosphorylation. *Pharmacol Ther*, **112**, 810-832

Lee, H. Y., Greene, L. A., Mason, C. A. y Manzini, M. C. (2009) Isolation and culture of post-natal mouse cerebellar granule neuron progenitor cells and neurons. *J Vis Exp*,

Limbach, C., Laue, M. M., Wang, X., Hu, B., Thiede, N., Hultqvist, G. y Kilimann, M. W. (2011) Molecular in situ topology of Aczonin/Piccolo and associated proteins at the mammalian neurotransmitter release site. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **108**, E392-401

Lindskog, M., Li, L., Groth, R. D., Poburko, D., Thiagarajan, T. C., Han, X. y Tsien, R. W. (2010) Postsynaptic GluA1 enables acute retrograde enhancement of presynaptic function to coordinate adaptation to synaptic inactivity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **107**, 21806-21811

Lopez-Jimenez, M. E., Bartolome-Martin, D., Sanchez-Prieto, J. y Torres, M. (2009) Suppression of guanylyl cyclase (beta1 subunit) expression impairs neurite outgrowth and synapse maturation in cultured cerebellar granule cells. *Cell Death Differ*, **16**, 1266-1278

Bibliografía

- Lopez-Jimenez, M. E., Gonzalez, J. C., Lizasoain, I., Sanchez-Prieto, J., Hernandez-Guijo, J. M. y Torres, M. (2012) Functional cGMP-gated channels in cerebellar granule cells. *J Cell Physiol*, **227**, 2252-2263
- Lopez-Murcia, F. J., Royle, S. J. y Llobet, A. (2014) Presynaptic clathrin levels are a limiting factor for synaptic transmission. *J Neurosci*, **34**, 8618-8629
- Lu, J., Machius, M., Dulubova, I., Dai, H., Sudhof, T. C., Tomchick, D. R. y Rizo, J. (2006) Structural basis for a Munc13-1 homodimer to Munc13-1/RIM heterodimer switch. *PLoS Biol*, **4**, e192
- Lu, Y. F., Kandel, E. R. y Hawkins, R. D. (1999) Nitric oxide signaling contributes to late-phase LTP and CREB phosphorylation in the hippocampus. *J Neurosci*, **19**, 10250-10261
- Ma, C., Li, W., Xu, Y. y Rizo, J. (2011) Munc13 mediates the transition from the closed syntaxin-Munc18 complex to the SNARE complex. *Nat Struct Mol Biol*, **18**, 542-549
- Malenka, R. C. y Bear, M. F. (2004) LTP and LTD: an embarrassment of riches. *Neuron*, **44**, 5-21
- McAllister-Lucas, L. M., Haik, T. L., Colbran, J. L., Sonnenburg, W. K., Seger, D., Turko, I. V., Beavo, J. A., Francis, S. H. y Corbin, J. D. (1995) An essential aspartic acid at each of two allosteric cGMP-binding sites of a cGMP-specific phosphodiesterase. *J Biol Chem*, **270**, 30671-30679
- McMahon, H. T., Missler, M., Li, C. y Sudhof, T. C. (1995) Complexins: cytosolic proteins that regulate SNAP receptor function. *Cell*, **83**, 111-119
- McMillan, K. y Masters, B. S. (1995) Prokaryotic expression of the heme- and flavin-binding domains of rat neuronal nitric oxide synthase as distinct polypeptides: identification of the heme-binding proximal thiolate ligand as cysteine-415. *Biochemistry*, **34**, 3686-3693
- Mergia, E., Russwurm, M., Zoidl, G. y Koesling, D. (2003) Major occurrence of the new alpha2beta1 isoform of NO-sensitive guanylyl cyclase in brain. *Cell Signal*, **15**, 189-195
- Michel, K., Muller, J. A., Oprisoreanu, A. M. y Schoch, S. (2015) The presynaptic active zone: A dynamic scaffold that regulates synaptic efficacy. *Exp Cell Res*, **335**, 157-164
- Micheva, K. D., Buchanan, J., Holz, R. W. y Smith, S. J. (2003) Retrograde regulation of synaptic vesicle endocytosis and recycling. *Nat Neurosci*, **6**, 925-932
- Micheva, K. D., Holz, R. W. y Smith, S. J. (2001) Regulation of presynaptic phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate by neuronal activity. *J Cell Biol*, **154**, 355-368
- Miller, S. E., Sahlender, D. A., Graham, S. C., Honing, S., Robinson, M. S., Peden, A. A. y Owen, D. J. (2011) The molecular basis for the endocytosis of small R-SNAREs by the clathrin adaptor CALM. *Cell*, **147**, 1118-1131

Bibliografía

- Morlot, S., Galli, V., Klein, M., Chiaruttini, N., Manzi, J., Humbert, F., Dinis, L., Lenz, M., Cappello, G. y Roux, A. (2012) Membrane shape at the edge of the dynamin helix sets location and duration of the fission reaction. *Cell*, **151**, 619-629
- Muller, D., Hida, B., Guidone, G., Speth, R. C., Michurina, T. V., Enikolopov, G. y 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
- Muller, D., Hildebrand, M., Lubberstedt, J., Kuhn, M. y 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
- O'Dell, T. J., Hawkins, R. D., Kandel, E. R. y Arancio, O. (1991) Tests of the roles of two diffusible substances in long-term potentiation: evidence for nitric oxide as a possible early retrograde messenger. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 11285-11289
- Omote, H., Miyaji, T., Juge, N. y Moriyama, Y. (2011) Vesicular neurotransmitter transporter: bioenergetics and regulation of glutamate transport. *Biochemistry*, **50**, 5558-5565
- Oude Weernink, P. A., Schulte, P., Guo, Y., Wetzels, J., Amano, M., Kaibuchi, K., Haverland, S., Voss, M., Schmidt, M., Mayr, G. W. y Jakobs, K. H. (2000) Stimulation of phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase by Rho-kinase. *J Biol Chem*, **275**, 10168-10174
- Owen, D. J., Collins, B. M. y Evans, P. R. (2004) Adaptors for clathrin coats: structure and function. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **20**, 153-191
- Park, H., Li, Y. y Tsien, R. W. (2012) Influence of synaptic vesicle position on release probability and exocytotic fusion mode. *Science*, **335**, 1362-1366
- Pena-Altamira, E., Petazzi, P. y Contestabile, A. (2010) Nitric oxide control of proliferation in nerve cells and in tumor cells of nervous origin. *Curr Pharm Des*, **16**, 440-450
- Pereda, A. E. (2014) Electrical synapses and their functional interactions with chemical synapses. *Nat Rev Neurosci*, **15**, 250-263
- Perez Bay, A. E., Ibanez, L. I. y Marengo, F. D. (2007) Rapid recovery of releasable vesicles and formation of nonreleasable endosomes follow intense exocytosis in chromaffin cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, **293**, C1509-1522
- Perin, M. S., Fried, V. A., Mignery, G. A., Jahn, R. y Sudhof, T. C. (1990) Phospholipid binding by a synaptic vesicle protein homologous to the regulatory region of protein kinase C. *Nature*, **345**, 260-263
- Peunova, N. y Enikolopov, G. (1995) Nitric oxide triggers a switch to growth arrest during differentiation of neuronal cells. *Nature*, **375**, 68-73
- Potter, L. R. (2011) Guanylyl cyclase structure, function and regulation. *Cell Signal*, **23**, 1921-1926

Bibliografía

- Prast, H. y Philippu, A. (2001) Nitric oxide as modulator of neuronal function. *Prog Neurobiol*, **64**, 51-68
- Qiu, D. L. y Knopfel, T. (2007) An NMDA receptor/nitric oxide cascade in presynaptic parallel fiber-Purkinje neuron long-term potentiation. *J Neurosci*, **27**, 3408-3415
- Ramirez, D. M. y Kavalali, E. T. (2012) The role of non-canonical SNAREs in synaptic vesicle recycling. *Cell Logist*, **2**, 20-27
- Ramon y Cajal, S. (1899) Textura del sistema nervioso del hombre y de los vertebrados: estudios sobre el plan estructural y composición histológica de los centros nerviosos adicionados de consideraciones fisiológicas fundadas en los nuevos descubrimientos. C. Moya
- Ratnayaka, A., Marra, V., Bush, D., Burden, J. J., Branco, T. y Staras, K. (2012) Recruitment of resting vesicles into recycling pools supports NMDA receptor-dependent synaptic potentiation in cultured hippocampal neurons. *J Physiol*, **590**, 1585-1597
- Reiersen, G. W., Guo, S., Mastronardi, C., Licinio, J. y Wong, M. L. (2011) cGMP Signaling, Phosphodiesterases and Major Depressive Disorder. *Curr Neuropharmacol*, **9**, 715-727
- Richards, D. A., Guatimosim, C., Rizzoli, S. O. y Betz, W. J. (2003) Synaptic vesicle pools at the frog neuromuscular junction. *Neuron*, **39**, 529-541
- Ringstad, N., Nemoto, Y. y De Camilli, P. (2001) Differential expression of endophilin 1 and 2 dimers at central nervous system synapses. *J Biol Chem*, **276**, 40424-40430
- Rizzoli, S. O. y Betz, W. J. (2005) Synaptic vesicle pools. *Nat Rev Neurosci*, **6**, 57-69
- Rodal, A. A., Blunk, A. D., Akbergenova, Y., Jorquera, R. A., Buhl, L. K. y Littleton, J. T. (2011) A presynaptic endosomal trafficking pathway controls synaptic growth signaling. *J Cell Biol*, **193**, 201-217
- Rodrigo, J., Alonso, D., Fernandez, A. P., Serrano, J., Richart, A., Lopez, J. C., Santacana, M., Martinez-Murillo, R., Bentura, M. L., Ghiglione, M. y Uttenthal, L. O. (2001) Neuronal and inducible nitric oxide synthase expression and protein nitration in rat cerebellum after oxygen and glucose deprivation. *Brain Res*, **909**, 20-45
- Rose, T., Schoenenberger, P., Jezek, K. y Oertner, T. G. (2013) Developmental refinement of vesicle cycling at Schaffer collateral synapses. *Neuron*, **77**, 1109-1121
- Rosenmund, C. y Stevens, C. F. (1996) Definition of the readily releasable pool of vesicles at hippocampal synapses. *Neuron*, **16**, 1197-1207
- Roy, B., Mo, E., Vernon, J. y Garthwaite, J. (2008) Probing the presence of the ligand-binding haem in cellular nitric oxide receptors. *Br J Pharmacol*, **153**, 1495-1504

Bibliografía

- Russwurm, M. y Koesling, D. (2004) NO activation of guanylyl cyclase. *EMBO J*, **23**, 4443-4450
- Russwurm, M., Wittau, N. y 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
- Ryan, T. A. (1996) Endocytosis at nerve terminals: timing is everything. *Neuron*, **17**, 1035-1037
- Ryan, T. A., Reuter, H., Wendland, B., Schweizer, F. E., Tsien, R. W. y Smith, S. J. (1993) The kinetics of synaptic vesicle recycling measured at single presynaptic boutons. *Neuron*, **11**, 713-724
- Ryder, E. F. y Cepko, C. L. (1994) Migration patterns of clonally related granule cells and their progenitors in the developing chick cerebellum. *Neuron*, **12**, 1011-1028
- Sabatini, B. L. y Regehr, W. G. (1996) Timing of neurotransmission at fast synapses in the mammalian brain. *Nature*, **384**, 170-172
- Saheki, Y. y De Camilli, P. (2012) Synaptic vesicle endocytosis. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, **4**, a005645
- Sankaranarayanan, S. y Ryan, T. A. (2000) Real-time measurements of vesicle-SNARE recycling in synapses of the central nervous system. *Nat Cell Biol*, **2**, 197-204
- Sauzeau, V., Rolli-Derkinderen, M., Marionneau, C., Loirand, G. y Pacaud, P. (2003) RhoA expression is controlled by nitric oxide through cGMP-dependent protein kinase activation. *J Biol Chem*, **278**, 9472-9480
- Schmidt, H. H., Lohmann, S. M. y Walter, U. (1993) The nitric oxide and cGMP signal transduction system: regulation and mechanism of action. *Biochim Biophys Acta*, **1178**, 153-175
- Shetty, A., Sytnyk, V., Leshchyn'ska, I., Puchkov, D., Haucke, V. y Schachner, M. (2013) The neural cell adhesion molecule promotes maturation of the presynaptic endocytotic machinery by switching synaptic vesicle recycling from adaptor protein 3 (AP-3)- to AP-2-dependent mechanisms. *J Neurosci*, **33**, 16828-16845
- Slepnev, V. I. y De Camilli, P. (2000) Accessory factors in clathrin-dependent synaptic vesicle endocytosis. *Nat Rev Neurosci*, **1**, 161-172
- Stewart, R. S., Teng, H. y Wilkinson, R. S. (2012) "Late" macroendosomes and acidic endosomes in vertebrate motor nerve terminals. *J Comp Neurol*, **520**, 4275-4293
- Su, F., Huang, H., Akieda, K., Occhipinti, G., Donadello, K., Piagnerelli, M., De Backer, D. y Vincent, J. L. (2010) Effects of a selective iNOS inhibitor versus norepinephrine in the treatment of septic shock. *Shock*, **34**, 243-249

Bibliografía

- Suarez, I., Bodega, G., Rubio, M., Felipe, V. y Fernandez, B. (2005) Neuronal and inducible nitric oxide synthase expression in the rat cerebellum following portacaval anastomosis. *Brain Res*, **1047**, 205-213
- Sudhof, T. C. (2004) The synaptic vesicle cycle. *Annu Rev Neurosci*, **27**, 509-547
- Sudhof, T. C. (2012a) Calcium control of neurotransmitter release. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, **4**, a011353
- Sudhof, T. C. (2012b) The presynaptic active zone. *Neuron*, **75**, 11-25
- Sudhof, T. C. (2013) Neurotransmitter release: the last millisecond in the life of a synaptic vesicle. *Neuron*, **80**, 675-690
- Sudhof, T. C. y Rizo, J. (2011) Synaptic vesicle exocytosis. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, **3**,
- Swartling, F. J., Ferletta, M., Kastemar, M., Weiss, W. A. y Westermark, B. (2009) Cyclic GMP-dependent protein kinase II inhibits cell proliferation, Sox9 expression and Akt phosphorylation in human glioma cell lines. *Oncogene*, **28**, 3121-3131
- Taoufiq, Z., Eguchi, K. y Takahashi, T. (2013) Rho-kinase accelerates synaptic vesicle endocytosis by linking cyclic GMP-dependent protein kinase activity to phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate synthesis. *J Neurosci*, **33**, 12099-12104
- Tegenge, M. A. y Bicker, G. (2009) Nitric oxide and cGMP signal transduction positively regulates the motility of human neuronal precursor (NT2) cells. *J Neurochem*, **110**, 1828-1841
- tom Dieck, S., Sanmarti-Vila, L., Langnaese, K., Richter, K., Kindler, S., Soyke, A., Wex, H., Smalla, K. H., Kampf, U., Franzer, J. T., Stumm, M., Garner, C. C. y Gundelfinger, E. D. (1998) Bassoon, a novel zinc-finger CAG/glutamine-repeat protein selectively localized at the active zone of presynaptic nerve terminals. *J Cell Biol*, **142**, 499-509
- Ungewickell, E. y Branton, D. (1981) Assembly units of clathrin coats. *Nature*, **289**, 420-422
- Vaandrager, A. B., Ehlert, E. M., Jarchau, T., Lohmann, S. M. y de Jonge, H. R. (1996) N-terminal myristoylation is required for membrane localization of cGMP-dependent protein kinase type II. *J Biol Chem*, **271**, 7025-7029
- van Staveren, W. C., Steinbusch, H. W., Markerink-van Ittersum, M., Behrends, S. y de Vente, J. (2004) Species differences in the localization of cGMP-producing and NO-responsive elements in the mouse and rat hippocampus using cGMP immunocytochemistry. *Eur J Neurosci*, **19**, 2155-2168
- Varnai, P., Thyagarajan, B., Rohacs, T. y Balla, T. (2006) Rapidly inducible changes in phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate levels influence multiple regulatory functions of the lipid in intact living cells. *J Cell Biol*, **175**, 377-382

Bibliografía

- 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. y 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. *Neurosci Lett*, **258**, 1-4
- Voglmaier, S. M., Kam, K., Yang, H., Fortin, D. L., Hua, Z., Nicoll, R. A. y Edwards, R. H. (2006) Distinct endocytic pathways control the rate and extent of synaptic vesicle protein recycling. *Neuron*, **51**, 71-84
- Wall, M. E., Francis, S. H., Corbin, J. D., Grimes, K., Richie-Jannetta, R., Kotera, J., Macdonald, B. A., Gibson, R. R. y Trehwella, 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, W., Nakayama, T., Inoue, N. y Kato, T. (1998) Quantitative analysis of nitric oxide synthase expressed in developing and differentiating rat cerebellum. *Brain Res Dev Brain Res*, **111**, 65-75
- Watanabe, S., Liu, Q., Davis, M. W., Hollopeter, G., Thomas, N., Jorgensen, N. B. y Jorgensen, E. M. (2013a) Ultrafast endocytosis at *Caenorhabditis elegans* neuromuscular junctions. *Elife*, **2**, e00723
- Watanabe, S., Rost, B. R., Camacho-Perez, M., Davis, M. W., Sohl-Kielczynski, B., Rosenmund, C. y Jorgensen, E. M. (2013b) Ultrafast endocytosis at mouse hippocampal synapses. *Nature*, **504**, 242-247
- Watanabe, S., Trimbuch, T., Camacho-Perez, M., Rost, B. R., Brokowski, B., Sohl-Kielczynski, B., Felies, A., Davis, M. W., Rosenmund, C. y Jorgensen, E. M. (2014) Clathrin regenerates synaptic vesicles from endosomes. *Nature*, **515**, 228-233
- Weernink, P. A., Meletiadis, K., Hommeltenberg, S., Hinz, M., Ishihara, H., Schmidt, M. y Jakobs, K. H. (2004) Activation of type I phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase isoforms by the Rho GTPases, RhoA, Rac1, and Cdc42. *J Biol Chem*, **279**, 7840-7849
- Werner, C., Raivich, G., Cowen, M., Strekalova, T., Sillaber, I., Buters, J. T., Spanagel, R. y Hofmann, F. (2004) Importance of NO/cGMP signalling via cGMP-dependent protein kinase II for controlling emotionality and neurobehavioural effects of alcohol. *Eur J Neurosci*, **20**, 3498-3506
- Wilson, L. S., Elbatarny, H. S., Crawley, S. W., Bennett, B. M. y Maurice, D. H. (2008) Compartmentation and compartment-specific regulation of PDE5 by protein kinase G allows selective cGMP-mediated regulation of platelet functions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**, 13650-13655
- Wincott, C. M., Abera, S., Vunck, S. A., Tirko, N., Choi, Y., Titcombe, R. F., Antoine, S. O., Tukey, D. S., DeVito, L. M., Hofmann, F., Hoeffler, C. A. y Ziff, E. B. (2014) cGMP-dependent protein kinase type II knockout mice exhibit working memory impairments,

Bibliografía

decreased repetitive behavior, and increased anxiety-like traits. *Neurobiol Learn Mem*, **114**, 32-39

Wincott, C. M., Kim, S., Titcombe, R. F., Tukey, D. S., Girma, H. K., Pick, J. E., Devito, L. M., Hofmann, F., Hoeffler, C. y Ziff, E. B. (2013) Spatial memory deficits and motor coordination facilitation in cGMP-dependent protein kinase type II-deficient mice. *Neurobiol Learn Mem*, **99**, 32-37

Winger, J. A. y Marletta, M. A. (2005) Expression and characterization of the catalytic domains of soluble guanylate cyclase: interaction with the heme domain. *Biochemistry*, **44**, 4083-4090

Wu, Y., O'Toole, E. T., Girard, M., Ritter, B., Messa, M., Liu, X., McPherson, P. S., Ferguson, S. M. y De Camilli, P. (2014) A dynamin 1-, dynamin 3- and clathrin-independent pathway of synaptic vesicle recycling mediated by bulk endocytosis. *Elife*, **3**, e01621

Wykes, V. y Garthwaite, J. (2004) Membrane-association and the sensitivity of guanylyl cyclase-coupled receptors to nitric oxide. *Br J Pharmacol*, **141**, 1087-1090

Xing, Y., Bocking, T., Wolf, M., Grigorieff, N., Kirchhausen, T. y Harrison, S. C. (2010) Structure of clathrin coat with bound Hsc70 and auxilin: mechanism of Hsc70-facilitated disassembly. *EMBO J*, **29**, 655-665

Xu, H., Yang, Y., Tang, X., Zhao, M., Liang, F., Xu, P., Hou, B., Xing, Y., Bao, X. y Fan, X. (2013) Bergmann glia function in granule cell migration during cerebellum development. *Mol Neurobiol*, **47**, 833-844

Yamagata, Y., Jovanovic, J. N., Czernik, A. J., Greengard, P. y Obata, K. (2002) Bidirectional changes in synapsin I phosphorylation at MAP kinase-dependent sites by acute neuronal excitation in vivo. *J Neurochem*, **80**, 835-842

Yang, X., Kaeser-Woo, Y. J., Pang, Z. P., Xu, W. y Sudhof, T. C. (2010) Complexin clamps asynchronous release by blocking a secondary Ca(2+) sensor via its accessory alpha helix. *Neuron*, **68**, 907-920

Zabel, U., Kleinschnitz, C., Oh, P., Nedvetsky, P., Smolenski, A., Muller, H., Kronich, P., Kugler, P., Walter, U., Schnitzer, J. E. y Schmidt, H. H. (2002) Calcium-dependent membrane association sensitizes soluble guanylyl cyclase to nitric oxide. *Nat Cell Biol*, **4**, 307-311

Zhuo, M., Hu, Y., Schultz, C., Kandel, E. R. y Hawkins, R. D. (1994) Role of guanylyl cyclase and cGMP-dependent protein kinase in long-term potentiation. *Nature*, **368**, 635-639

Zoncu, R., Perera, R. M., Sebastian, R., Nakatsu, F., Chen, H., Balla, T., Ayala, G., Toomre, D. y De Camilli, P. V. (2007) Loss of endocytic clathrin-coated pits upon acute depletion of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 3793-3798

