

**ACTIVACIÓ DE LA FOSFOLIPASA C PER
RECEPTORS ACOBLATS A PROTEÏNES G
EN CULTIUS DE NEURONES GRANULARS DE
CEREBEL. PAPER MODULADOR DEL CALCI**

ROSER MASGRAU JUANOLA

FERNANDO PICATOSTE RAMÓN, Doctor en Química i Catedràtic del Departament de Bioquímica i Biologia Molecular de la Universitat Autònoma de Barcelona,

CERTIFICA: que la tesi “Activació de la fosfolipasa C per receptors acoblats a proteïnes G en cultius de neurones granulars de cerebel. Paper modulador del Calci” que presenta Roser Masgrau Juanola per a optar el grau de Doctora en Ciències, ha estat realitzada sota la seva direcció al Departament de Bioquímica i Biologia Molecular de la Universitat Autònoma de Barcelona, i es troba en condicions de ser llegida.

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'F. Picatoste', written in a cursive style.

Dr. Fernando Picatoste Ramón
Bellaterra, 21 de febrer de 2000

A la meva família i en especial al meu avi,

Agraïments

Primerament, vull agrair a en Pica (Dr. Fernando Picatoste) per haver confiat amb mi i donar-me la oportunitat de gaudir de la neuroquímica durant aquests anys, sense oblidar-me de la seva ajuda professional i humana, ni del seu recolçament en tot moment.

I com no, vull donar les gràcies a en Joan Marc. Jo també m'alegro de tenir-te com a gran amic. Sense cap dubte aquesta tesi no hagués estat possible sense el teu recolçament, les teves opinions, els teus innombrables favors, les teves ruixades amb “el flasco lavador”, els emails i milions de coses més. Espero poder seguir agraint-te tantes coses en el futur. I bona sort per a tu també!!

No em puc deixar de donar les gràcies a la Bet, tan com a predecessora d'aquest projecte com pel dia a dia del laboratori. I també estic agraïda a en Raül per haver aportat un toc diferent al grup.

També vull donar les gràcies al Melchor, al Manel i a la Dolors per tota la seva ajuda i, com no a tota la resta de la gent que ha estat i/o encara està a la Unitat. Sense vosaltres la bioquímica i la vida a la Unitat hagués estat molt monòtona, avorrida i complicada. Espero que ens anem retrovant i anem a ballar moltes més vegades!

I ara toca la secció anglesa. Estic molt agraïda al Prof. Steve Nahorski per haver confiat en mi en tot moment i haver-me brindat la oportunitat d'aprendre tanta ciència. També vull donar les gràcies a en Ken, per haver-me ensenyat la tècnica de ‘Ca²⁺ imaging’ i pels cops de mà que m’ha i m’està donant. Els meus agraïments els faré extensius a en Lee, per les seves cantarelles i estones divertides al laboratori i per ensenyar-me tota una sèrie de tècniques. I a la Pam W., sense la qual els meus cultius primaris no haguessin sobreviscut en un món de línies cel·lulars, i a la resta del departament de ‘Cell Pysiology and Pharmacology’ de la Universitat de Leicester.

I com no vull donar les gràcies als meus pares i a la Mariona per haver-me donat tant de suport i per haver-se après a dir fosfolipasa C, tot i no haver entès mai com i perquè he estat quatre anys “remanant l’olla”. Mariona, la comunitat científica crec que t’hauria d’estar agraïda per les correccions ortogràfiques i jo per tenir-te com a millor amiga. Pares, sé que em quedo curta, però a tots us agraeixo milions de coses així com als avis, a l’Anna i a la resta de la família.

I finalment, però no per ser menys importants, em recordo dels meus amics i companys de pis, gràcies als quals no tinc la sensació que la meva vida es limiti a una ‘poyata’. Us estic molt agraïda a tots per les hores boges i no tan boges, però igualment divertides, que hem passat junts, i sobretot per estar sempre al meu costat.

Ah, i com no, vull donar les gràcies a la salsa i a tota la música en general. Que n’és de divertit ballar!! i com ajuda!.

ÍNDEX

INTRODUCCIÓ	1
1. Transducció de senyals	1
1.1. Receptors	1
1.2. Proteïnes G	3
1.3. Sistemes efectors i segons missatgers	6
2. La fosfolipasa C de fosfoinosítids	7
2.1. Cicle dels fosfoinosítids i metabolisme dels inositol fosfats	9
2.2. Estructura i isoenzims de la PLC	12
2.3. Localització subcel·lular dels diferents isoenzims de la PLC	14
2.4. Mecanismes d'activació i modulació de la PLC	14
2.4.1. Activació de la PLC via proteïnes G	16
2.4.2. Activació de la PLC per tirosino proteïno quinases	19
2.4.3. Activació de la PLC per Ca^{2+}	19
2.4.4. Modulació de la PLC per altres factors	21
2.4.5. Desensibilització de la PLC	24
2.4.6. Regulació de l'activitat PLC nuclear	25
2.5. Accions dels segons missatgers generats per activació de la PLC	25
2.5.1. $\text{Ins}1,4,5\text{P}_3$ i alliberació de Ca^{2+} intracel·lular	26
2.5.2. DAG i activació de la PKC	27
2.5.3. Altres segons missatgers derivats de l'activació de la PLC	29
2.6. Possibles funcions fisiològiques de la PLC	31
2.7. Estimulació de la PLC per neurotransmissors en teixit cerebral	32
2.7.1. Expressió de la PLC al teixit nerviós	33
2.7.2. Possibles funcions fisiològiques de la PLC al sistema nerviós	33
3. Homeostasi del Ca^{2+}	35
3.1. Entrada de Ca^{2+} extracel·lular	35
3.1.1. VOCs: canals de Ca^{2+} dependent de voltatge	37
3.1.2. ROC: receptors-canals de Ca^{2+}	38
3.1.3. SMOC: canals de Ca^{2+} activats per receptors i a través de diferents mecanismes intracel·lulars	38
3.1.4. SOC: canals de Ca^{2+} activats per buidament del ER	39
3.1.5. Mecanismes per a l'exclusió de Ca^{2+} de la cèl·lula	40
3.2. Mobilització de Ca^{2+} intracel·lular	41

3.2.1. El reticle endoplasmàtic. SERCAs, InsP ₃ R i RyR	41
3.2.2. Altres compartiments subcel·lulars	44
3.3. Característiques espaials i temporals del senyal de Ca ²⁺	47
3.4. Mecanismes del senyal de Ca ²⁺ neuronal: una resposta integrativa	48
3.5. Funcions fisiològiques del senyal de Ca ²⁺	50
4. Receptors muscarínics de l'acetilcolina	52
4.1. Classificació, localització i estructura	52
4.2. Transducció de senyals. Activació de la PLC	53
4.3. Funcions fisiològiques que impliquen els receptors muscarínics	54
4.4. Expressió i transducció del senyal mitjaçada per receptors muscarínics en cultius de neurones granulars de cerebel	55
5. Receptors metabotròpics del glutamat	56
5.1. Classificació dels mGluRs	56
5.2. Estructura i farmacologia desl mGluRs	57
5.3. mGluRs del grup I i la transducció de senyals	60
5.4. Localització i funcions fisiològiques dels mGluRs al SNC	61
5.5. Els mGluRs a cultius primaris de neurones granulars de cerebel: expressió i transducció del senyal.	62
6. Cultius primaris de neurones granulars de cerebel	64
OBJECTIUS	67
METODOLOGIA	71
1. Preparacions de teixit neuronal	71
1.1 Cultius primaris de neurones granulars de cerebel	71
1.2. Membranes de neurones granulars de cerebel	72
1.3. Homogenats de neurones granulars de cerebel	72
2. Determinació de l'activitat PLC	74
2.1. Determinació de l'acumulació d' ³ H-InsPs	74
2.1.1. En cultius primaris de neurones granulars de cerebel	74
2.2.2. En membranes de neurones granulars de cerebel	76
2.2.3. En homogenats de neurones granulars de cerebel	76
2.2. Determinació de la generació d' ³ H-InsP ₃	77
2.3. Determinació de l'acumulació de [³ H]CDP-DAG en neurones granulars de cerebel	78
3. Separació i determinació dels ³ H-InsPs individuals per HPLC en	79

cultius primaris de neurones granulars de cerebel	
4. Determinació de la concentració de Ca^{2+} en neurones granulars de cerebel individuals	80
4.1. Determinació de la $[\text{Ca}^{2+}]$ citoplasmàtica	80
4.2. Determinació de la quantitat de Ca^{2+} enmagatzamat als reservoris intracel·lulars de Ca^{2+}	81
5. Determinació de l'expressió de les diferents isoformes de la PLC a cultius primaris de neurones granulars de cerebel.	83
5.1. Assaig d'immunodetecció	83
5.2. Assaig d'immunoprecipitació	85
6. Assajos de translocació de diferents isoformes de la PLC a cultius primaris de neurones granulars de cerebel	86
7. Determinació de l'expressió dels diferents mGuRs del grup I a cultius primaris de neurones granulars de cerebel.	87
8. Determinació de la concentració de proteïna en les diferents preparacions de teixit neuronal	88
9. Tractament de les dades	89

RESULTATS 91

1. Caracterització de l'activació de la PLC per diferents receptors acoblats a proteïnes G en cultius primaris de neurones granulars de cerebel de rata. Comparació amb l'estimulació de la PLC a miniprismes d'escorça cerebral.	91
1.1. Introducció	91
1.2. Curs temporal de l'activació de la PLC	93
1.3. Estimulació de la PLC en astròcits	96
1.4. Acumulació de $[\text{}^3\text{H}]\text{CDP-DAG}$ com a índex de l'activitat	96
PLC	
1.5. Característiques de l'activació de la PLC en cultius de CGC	99
1.5.1. Relació entre l'acumulació de $[\text{}^3\text{H}]\text{CDP-DAG}$ i ${}^3\text{H-InsPs}$	99
1.5.2. Acumulació dels diferents isòmers dels ${}^3\text{H-InsPs}$	102
1.5.3. Modulació de l'activació de la PLC per inhibidors de l'entrada de Ca^{2+}	105
1.6. Activació de la PLC per agonistes en membranes de neurones granulars de cerebel	107
1.7. Activació de la PLC per agonistes en homogenats de neurones granulars de cerebel	110

1.8. Influència del glutamat en l'estimulació de la PLC per Cch	114
1.9. Resum i conclusions del capítol	115
2. Activació de la PLC i mobilització de Ca^{2+} pels receptors muscarínics de l'acetilcolina. Paper modulador dels magatzems intracel·lulars de Ca^{2+}	117
2.1. Introducció	117
2.2. Determinació de l'activació inicial de la PLC	118
2.3. Efectes de canvis en la concentració extracel·lular de Ca^{2+} en l'estimulació de la PLC per Cch	120
2.4. Efectes de canvis en la concentració extracel·lular de Ca^{2+} en l'estimulació de la PLC per KCl	121
2.5. Senyals de Ca^{2+} induïts per Cch i KCl	124
2.6. Efectes de canvis en els reservoris intracel·lulars de Ca^{2+} sobre l'estimulació de la PLC per Cch	126
2.7. Efectes del BAPTA/AM en les respostes del Cch i KCl	129
2.8. Estimació de l'estat d'ompliment dels reservoris intracel·lulars de Ca^{2+}	132
2.9. Resum i conclusions del capítol	136
3. Expressió i caracterització farmacològica dels mGluRs responsables de l'estimulació de la PLC i dels senyals de Ca^{2+}	137
3.1. Introducció	137
3.2. Anàlisi de l'expressió dels mGluR1 α i mGluR5 en CGC per Western blot	138
3.3. Caracterització dels subtipus de mGluRs implicats en l'activació de la PLC	140
3.4. Caracterització dels subtipus de receptors implicats en el senyal de Ca^{2+} induït per agonistes dels mGluRs	144
3.5. Resum i conclusions del capítol	146
4. Modulació pel Ca^{2+} intra- i extracel·lular de l'activació de la PLC pels mGluRs	149
4.1. Introducció	149
4.2. Efectes de canvis en la concentració extracel·lular de Ca^{2+} en l'estimulació de la PLC per Glu	150
4.3. Estimulació de la PLC per Glu en cèl·lules predespolaritzades	151
4.4. Efectes del BAPTA/AM en les respostes del Glu	152
4.5. Participació dels receptors de rianodina en l'estimulació de la PLC per Glu	156
4.6. Resum i conclusions del capítol	156
5. Expressió dels isoenzims de la PLC en cultius primaris de neurones granulars. Translocació de la PLC- β 1 induïda per activació dels receptors muscarínics de l'acetilcolina.	159

5.1. Introducció	159
5.2. Expressió dels diferents isoenzims de la PLC en CGC	160
5.3. Estudis de la translocació de la PLC-β1 induïda pels receptors muscarínics	163
5.3. Resum i conclusions del capítol	164
DISCUSSIÓ	167
1. Característiques de l'activació de la PLC per agonistes en cultius primaris de neurones granulars. Estudi comparatiu amb la resposta de miniprismes d'escorça cerebral	167
2. Els receptors muscarínics i mGluRs responsables de l'activació de la PLC i els senyals de Ca ²⁺ en cultius primaris de neurones granulars	175
3. Mecanismes d'activació i regulació de la PLC estimulada per receptors m3 i mGluR1	178
3.1. Paper del Ca ²⁺ extracel·lular i del Ca ²⁺ citosòlic	178
3.2. Els reservoris intracel·lulars de Ca ²⁺ i l'activació de la PLC	180
CONCLUSIONS	187
BIBLIOGRAFIA	189

ABREVIATURES

CGC	Neurones granulars de cerebel
DIV	Dies <i>in vitro</i>
Tampó KH	Tampó Krebs-Henseleit/Hepes
PLC	Fosfolipasa C
PKC	Proteïno quinasa C
RE	Reticle endoplasmàtic
InsP ₃ R	Receptor d'Ins1,4,5 trifosfat
RyR	Receptor de rianodina
DAG	Diacilglicerol
CDP-DAG	CDP-diacilglicerol
Ins	Inositol
InsPs	Inositol fosfats
Ins1,4,5 P ₃	Inositol 1,4,5 trifosfat
PtdIns	Fosfatidilinositol
PtdIns1,2 P ₂	Fosfatidilinositol 4,5 bifosfat
Ca ²⁺	Ió calci
[Ca ²⁺] _c	Concentració de calci citoplasmàtic
[Ca ²⁺] _o	Concentració de calci extracel·lular
BAPTA/AM	1,2-bis(<i>o</i> -amino-phenoxi)età-N,N,N',N'-tetraacètic àcid acethoximetil éster
Cch	Carbacol
ET-1	Endotelina 1
HA	Histamanina
NA	Noradrenalina
5-HT	Serotonina
GTP γ S	guanosina 5'-[γ tió]-trifosfat
Glu	Glutamat
Quis	Quisqualat
1S,3R-ACPD	Àcid trans-(1S,3R)-1-aminociclopentil-1,3-dicarboxílic
DHPG	(S)-3,5-dihidroxifenilglicina
CHPG	(RS)-2-cloro-5-hidroxifenilglicina
AIDA	Àcid 1-aminoindan-1,5-dicarboxílic
MCPG	(S)- α -methyl-4-carboxifenilglicina
CPCCOEt	ciclopropan[b]cromen-1a-carboxílic àcid etilèster;
SIB-1893	(<i>E</i>)-2-metil-6-(2-feniletetil)piridina
MPEP	2-Metil-6-(feniletetil)-piridina
CNQX	6-ciano-7-nitroquinoxalin-2,3-diona
D-AP5	D(-)-2-amino-5-fosfonopentanoic

INTRODUCCIÓ

1. Transducció de senyals

Quan una cèl·lula rep un estímul, bioquímic o elèctric, s'origina una successió específica i controlada d'esdeveniments precursora d'una resposta cel·lular i que s'ha etiquetat com a mecanisme de transducció del senyal. En aquest procés cel·lular, de gran importància en l'evolució i funcionament dels organismes pluricel·lulars, intervenen una gran diversitat de molècules que abarca receptors, sistemes efectors i segons missatgers.

Les interconnexions entre tots ells i la participació d'altres elements reguladors fan que el sistema de transducció dels senyals cel·lulars siguin enormement complicats. És precisament aquesta complexitat la responsable de què s'en coneixin molt bé alguns aspectes però s'en desconexin totalment d'altres.

En aquest capítol de la introducció es donen quatre pincellades sobre els diferents elements més importants de la transducció del senyal, donant èmfasi en els que tenen lloc al sistema nerviós.

1.1. Receptors

Malgrat que existeixin varies definicions de receptor depenent de diferents punts de vista, com ara fisiològics o farmacològics, i que sigui un concepte que ha anat evolucionant o ampliant-se al llarg del temps, es podria considerar, de manera simplificada, que un receptor és una macromolècula cel·lular de natura proteica a la qual se li uneixen mediadors podent desencadenar-se una resposta funcional.

Els receptors de membrana són proteïnes integrals de membrana que presenten un domini extracel·lular de reconeixement, un domini transmembrana i un domini intracel·lular efector. Poden classificar-se segons la seva estructura molecular i els

mecanismes intracel·lulars de transducció del senyal que utilitzen en tres grans famílies: receptors canals, receptors amb activitat enzimàtica i receptors acoblats a proteïnes G. Els primers són proteïnes oligomèriques que formen un canal iònic modulats per agonistes. Exemples en són els receptors nicotínics de l'acetilcolina (nAChR), els ionotòpics del glutamat (iGluR) o el receptor GABA_A. Per contra, els receptors amb activitat enzimàtica poden ser proteïnes monomèriques o oligomèriques i es caracteritzen, tal i com indica el seu nom, per tenir un domini intracel·lular amb activitat enzimàtica. Aquesta pot ser guanilil ciclase, tirosina quinasa o fosfoproteïna fosfatasa i és iniciada després de la unió del receptor amb agonistes. Pertanyen a aquest grup els receptors dels pèptids natriurètics, de la insulina i de factors de creixement. Finalment, els receptors acoblats a proteïnes G (GPCRs, *G-protein-coupled receptors*) són macromolècules monomèriques que activen diferents sistemes efectors mitjançant unes proteïnes reguladores que fixen nucleòtids de guanina, les proteïnes G. Aquest grup comprèn un bon nombre de receptors de senyals tan diferents com la llum, el Ca²⁺, odorants, molècules petites com aminoàcids, nucleòtids o pèptids, i neurotransmissors. Aquests últims han estat precisament objectiu d'estudi en aquesta tesi doctoral.

Els GPCRs pertanyen a una gran superfamília de més de 1000 membres, la majoria dels quals corresponen a receptors d'odorants i feromones (Bockaert i Pin, 1999). Les anàlisis de la seqüència revelen una disposició topogràfica molt característica de la cadena peptídica basada en set seqüències hidrofòbiques de 20-27 aminoàcids que adopten una estructura tridimensional de set hèlixs α transmembranals. L'extrem C-terminal es localitza al citoplasma cel·lular mentre que l'N-terminal es situa a l'espai extracel·lular i ambdós poden tenir una llargada molt variable. Així l'extrem N-terminal té 7 aminoàcids en els receptors α_{A2} -adrenèrgics però 300 en els metabotòpics del glutamat i 600 en el receptor de Ca²⁺ (Ji et al., 1998). En aquest extrem N-terminal hi ha seqüències consens de N-glicosilació no necessàries per a la unió a l'agonista però sí probablement responsables de la localització cel·lular del receptor. Per altra banda, l'extrem carboxílic, presenta una cisteïna palmitoilada, conservada en la gran majoria de receptors, i responsable de l'ancorament de la cua citoplasmàtica a la membrana. Les set hèlixs α presenten la major similitud de seqüència entre els diferents receptors acoblats a proteïnes G i estan units entre sí per tres llaços extra- i tres intracel·lulars. Dels segons cal destacar-ne el llaç situat entre la cinquena i sisena hèlix α , ja que té una llargada superior que la resta i una baixa homologia entre els diferents receptors; i dels primers l'existència d'un pont disulfur entre

dues cisteïnes del segon i tercer llaç important pel manteniment de l'estructura i possiblement responsable de les diferents propietats de la fixació de l'agonista.

En general la majoria de regions del receptor que estan al citoplasma, com ara els aminoàcids dels extrems citoplasmàtics de les hèlixs transmembranals i les parts dels llaços citoplasmàtics més properes a la membrana, estan implicades en la interacció amb la proteïna G i altres proteïnes implicades en la senyalització cel.lular com les proteïnes PDZ, les proteïnes amb dominis semblants a l'EVH (Torres et al., 1998; Boackaert i Pin, 1999), les quinases de GPCRs, l'arrestina (Ji et al., 1995), la calmodulina i la proteïno quinasa C (PKC) (Minakami et al., 1997). Per altra banda, recentment estan apareixent evidències per les quals alguns GPCRs són capaços d'enviar senyals per una via alternativa a les proteïnes G, com ara a través de la Jak2 quinasa, la fosfolipasa C γ o la PKC.

En els últims anys, s'ha demostrat que els GPCRs poden formar dímers a través de diferents mecanismes que podrien ser específics de cada receptor o subtipus de receptor. La idea predominant és que aquesta dimerització dels GPCRs no és essencial per l'activació de la proteïna G però sí que podria tenir un paper important en altres funcions del receptor com la regulació específica dels diferents subtipus d'un mateix receptor (Gether i Kobilka, 1998).

Hi ha diferents classificacions dels GPCRs. Segons la longitud de la cadena aminoacídica, es divideixen en tres famílies: la de tipus A relacionada amb el receptor de rhodopsina i dividida en tres subgrups (1a, 1b i 1c), la de tipus B formada per receptors relacionats amb el receptor de calcitonina i la de tipus C formada per receptors relacionats amb els receptors metabotòpics del glutamat (Gether i Kobilka, 1998). Per contra la classificació segons la unió del lligand i funcionalitat dels dominis principals donaria lloc a 5 famílies: receptors d'amines, nucleòsids i eicosanoids; receptors d'hormones peptídiques; receptors activats per proteases (trombina); receptors d'hormones glicoproteïques com ara la LH, FSH i TSH; i receptors de neurotransmissors (Ca²⁺, Glu i GABA) (Ji et al., 1998).

1.2. Proteïnes G

Es coneixen dos tipus diferents de proteïnes G implicades en la transducció de senyals: les proteïnes G heterotrimèriques i les monomèriques. Les primeres són heterotrímers peptídics capaços d'unir nucleòtids de guanina, i que participen en

mecanismes de transducció de senyals constituint un vincle entre els GPCRs i els sistemes efectors. La subunitat α ha estat la més estudiada ja que és la responsable de la interacció física amb els receptors, uneix nucleòtids de guanina, presenta activitat GTPasa i confereix especificitat d'interacció amb canals iònics i diferents sistemes efectors. Les subunitats $\beta\gamma$ formen un dímer molt estable, dissociable només sota condicions desnaturalitzants. Inicialment es creia que la seva funció era únicament reguladora, i només se li atribuïen les capacitats de desactivar les subunitats α i d'inhibir el sistema efector adenilat ciclasa. Més recentment, però, s'ha suggerit que determinats dímers $\beta\gamma$ són responsables de la unió selectiva de la subunitat α amb determinats receptors (Kleuss et al., 1992) i s'ha demostrat que poden interaccionar directament amb varis sistemes efectors, com ara determinats isoenzims de l'adenilil ciclasa (Sunahara et al., 1996) o de la fosfolipasa C (Camps et al., 1992; Morris i Scarlata, 1996), de manera independent i amb diferent afinitat que les subunitats α (Park et al., 1993).

La classificació de les proteïnes G heterotrimèriques basa en la diversitat gènica de la seva subunitat α . Així les 20 subunitats α , de pes molecular entre 39 i 52 kDa, permeten classificar les proteïnes G en quatre grans famílies: G_s , que activen l'adenilat ciclasa, $G_{i/o}$, que inhibeixen l'adenilat ciclasa, $G_{q/11}$, que activen la fosfolipasa C i $G_{12/13}$, de funció desconeguda. La diversitat gènica, però, també està present a les altres dues subunitats, ja que existeixen 5 isoformes de la subunitat β d'aproximadament 36 kDa de pes molecular i 7 subunitats γ , de 6-9 kDa.

El cicle funcional de les proteïnes G heterotrimèriques és un model que explica els diferents estats de la interacció receptor-proteïna G-sistema efector (Birnhaumer et al., 1990) (figura 1.1.): l'agonista indueix un canvi conformacional del receptor que li permet interaccionar amb la proteïna G trimèrica unida a GDP. Seguidament el GDP és desplaçat per GTP provocant la dissociació de la proteïna G en dues unitats, el dímer $\beta\gamma$ i la subunitat α , unida al GTP. Alhora, com que el receptor té una afinitat baixa per la subunitat α sola, el complexe agonista-receptor-proteïna G (forma d'alta afinitat del receptor) es dissocia en el complexe agonista-receptor (forma de baixa afinitat del receptor). Les unitats dissociades de la proteïna G, la subunitat α i el dímer $\beta\gamma$, activaran els sistemes efectors fins que s'iniciï l'activitat GTPasa de la subunitat α . Aquesta subunitat unida a GDP, altra vegada, té més afinitat per $\beta\gamma$ i s'afavoreix la formació del trímer tornant-se d'aquesta manera a l'estat basal inicial.

Aquest cicle d'activació de les proteïnes G heterotrimèriques pot ser regulat negativament per una família de proteïnes conegudes com a proteïnes RGS (*regulators of G protein signalling*). Malgrat que s'haig demostrat que les proteïnes RGS intervenen en el cicle de les proteïnes G quan aquestes estan dissociades i sobre la subunitat α , però no sobre el dímer $\beta\gamma$, i que activen l'activitat GTPasa, es coneix poc sobre els mecanismes pels quals actuen (Berman i Gilman, 1998).

Les proteïnes G monomèriques (SmG, *small G proteins*) són una superfamília de GTPases amb pes molecular entre 20 i 25 kDa i agrupades en cinc subfamílies: Ras, Rho, ARFs, Rab i Ran. A l'igual que les subunitats α de les proteïnes G heterotrimèriques, les proteïnes G monomèriques s'activen per l'intercanvi de GDP per GTP, en aquest cas, però, induït per factors intercanviadors de nucleòtids de guanina (GEFs, *guanine nucleotide exchange factors*). La seva desactivació es produeix per estimulació de l'activitat GTPasa per part de les proteïnes activadores de GTPases (GAPs, *GTPase-activating proteins*).

Malgrat el gran nombre d'estudis sobre les proteïnes G petites i el seu paper en la transducció del senyal, es desconeixen els mecanismes pels quals els diferents receptors activen aquestes proteïnes. Recentment s'ha proposat una interacció directe entre els GPCRs i les proteïnes G petites, de manera semblant a la que té lloc entre aquests receptors i les subunitats α de les proteïnes G heterotrimèriques (Michell et al., 1998).

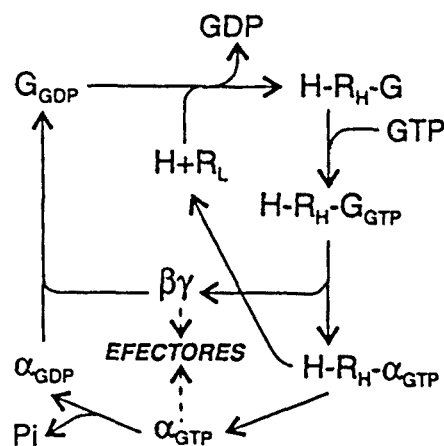


Figura 1.1. Cicle de les proteïnes G heterotrimèriques. R: receptor; G: proteïna G; H; agonista.

1.3. Sistemes efectors i segons missatgers

Els sistemes efectors són macromolècules que poden ser canals iònics o enzims que participen en la transducció del senyal promovent canvis ràpids en les concentracions intracel·lulars de ions o dels seus productes de reacció, anomenats segons missatgers. L'estimulació dels sistemes efectors és desencadenada per l'activació de receptors de membrana, ja sigui directament o a través de proteïnes G. Exemples de sistemes efectors són les fosfolipases C, les adenilil ciclases, la fosfodiesterasa de GMP cíclic, l'esfingomielinasa i la fosfoinositid 3-quinasa.

Tal i com s'ha esmentat, l'activació de sistemes efectors dóna lloc a segons missatgers que regulen activitats cel·lulars a través de la modulació d'algunes proteïnes quinases o donant lloc a altres segons missatgers. Les interconnexions entre ells juntament amb la participació d'altres elements reguladors i la diversitat molecular de receptors, proteïnes G i sistemes efectors, fan que els sistemes de transducció del senyal siguin enormement complexos, fet que permet l'especificitat dels diferents estímuls extracel·lulars en desencadenar respostes cel·lulars determinades.

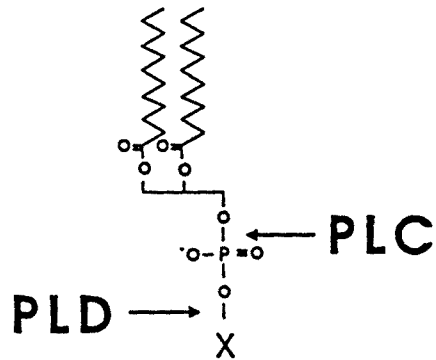
Entre els segons missatgers més estudiats trobem l'inositol 1,4,5 trifosfat (Ins1,4,5P₃), el diacilglicerol (DAG), el Ca²⁺, l'AMP cíclic, el GMP cíclic, el NO, el fosfatidat, l'àcid araquidònic, els lisofosfolípids, la ceramida i l'esfingosina 1-fosfat. De totes maneres, malgrat la rellevància d'aquestes molècules, està adquirint importància la idea de que altres molècules conegudes puguin participar també en la transmissió de senyals intracel·lulars. Així, existeixen evidències creixents que atribueixen funcions de segons missatgers a inositols fosfats diferents a l'Ins1,4,5P₃, suggerint que de fet els inositols fosfats formen una família versàtil de segons missatgers (Shears, 1998).

2. La Fosfolipasa C de fosfoinosítids

Les fosfolipases participen en la transducció de senyals intracel·lulars hidrolitzant fosfolípids de membrana. S'han classificat en tres grups segons els enllaços sobre els quals actuen, així les de tipus A (PLA₂) separen els àcids grassos insaturats de l'esquelet de glicerol del fosfolípid, mentre que les de tipus C (PLC) i D (PLD) tenen activitat fosfodiesterasa i per tant alliberen el cap polar, que queda soluble al citoplasma, de la resta del fosfolípid, que roman a la capa lipídica. La PLC hidrolitza l'enllaç fosfodièster proximal alliberant-se el *sn*-1,2-Diacilglicerol (DAG) per una banda i el cap polar unit al grup fosfat per l'altra. La PLD catalitza la hidròlisi dels fosfolípids per l'enllaç fosfodièster terminal, de manera que el grup fosfat queda unit a l'esquelet lipídic formant l'àcid fosfatídic (PtdOH). La PLD actua preferentment sobre la fosfatidilcolina originant PtdOH i colina (Exton, 1997). Per contra, la PLC més important com a sistema efector és la que hidrolitza els fosfoinosítids generant DAG i Ins1,4,5P₃. S'anomena PLC de fosfoinosítids (PI-PLC) o simplement PLC. En aquest treball el terme PLC farà referència sempre a aquesta activitat d'hidròlisi dels fosfoinosítids.

Possiblement la PLC ha estat el sistema de senyalització cel·lular més àmpliament estudiat al sistema nerviós, tot i així encara es desconeixen molts aspectes d'aquest sistema. En aquesta tesi s'ha estudiat les característiques de l'activitat PLC i s'han determinat mecanismes de regulació de la PLC activada per determinants receptors acoblats a proteïnes G en un model neuronal.

A



B

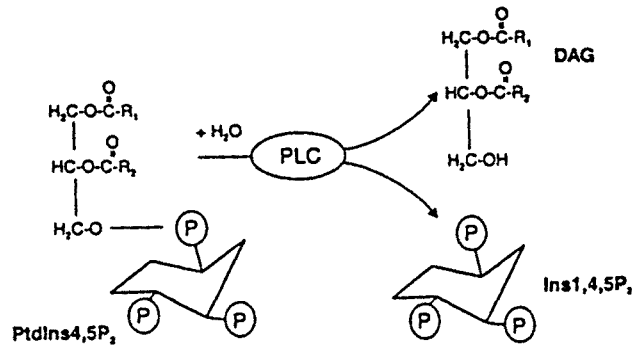


Figura 1.2. Les fosfolipases. A) Punts d'hidròlisi de la PLC i PLD. B) Reacció catalitzada per la PLC.

2.1. Cicle dels fosfoinosítids i metabolisme dels inositol fosfats

Els fosfoinosítids són fosfolípids de la membrana plasmàtica amb un cap polar format per inositol unit a un o més grups fosforil. Els fosfoinosítids majoritaris són el fosfatidilinositol (PtdIns), el fosfatidilinositol 4-fosfat (PtdIns4P) i el fosfatidilinositol 4,5-bifosfat (PtdIns4,5P₂), essent el primer el més abundant.

La síntesi *de novo* del PtdIns es produeix al reticle endoplasmàtic i segueix a la membrana plasmàtica on té lloc un procés seqüencial de fosforilació per les diferents isoformes de la PtdIns 4-quinasa i la PtdIns4P 5 quinasa (figura 2.1.A.). A la membrana també hi ha fosfatases que hidrolitzen els enllaços fosfodiester introduïts per aquestes quinases, sense conèixer-se'n la seva utilitat funcional. La PLC hidrolitza el PtdIns4,5P₂ en DAG i Ins1,4,5P₃ (figura 2.1.A.), i possiblement, en algunes preparacions i sota determinades condicions cel·lulars, el PtdIns4P (Claro et al., 1989a). El DAG pot ser fosforilat per la DAG quinasa -un enzim amb diferents isoformes, algunes de citoplasmàtiques i altres associades a membrana- i convertit en PtdOH que alhora per acció de la CTP-fosfatidat citidiltransferasa passa a CDP-DAG. Aquest últim s'uneix a l'inositol provinent del metabolisme de l'Ins1,4,5P₃ i es forma PtdIns per acció de la PtdIns sintasa, un enzim inhibit pel calci (Claro et al., 1992).

La vida mitja de l'Ins1,4,5P₃ és molt curta i presenta un metabolisme finament regulat del qual en depèn el cicle dels fosfoinosítids, ja que podria limitar-se la resíntesi del PtdIns, si no es metabolitzés l'Ins1,4,5P₃ a inositol. El metabolisme de l'Ins1,4,5P₃ pot seguir dues vies alternatives (Majerus, 1992). Una d'elles s'inicia per fosforilació a Ins1,3,4,5P₄ per part de la Ins1,4,5P₃ 3-quinasa, una quinasa citoplasmàtica sensible a Ca²⁺/calmodulina i possiblement regulada per la proteïno quinasa C (PKC), la proteïno quinasa A (PKA), la relació cel·lular d'ADP/ATP i per proteolisi limitada per calpaïna (en un procés d'activació a llarg termini). S'ha proposat que, en el mecanisme de transmissió del senyal per activació de la PLC per part d'un receptor, aquesta quinasa seria inicialment activada per l'increment del calci intracel·lular i més tard seria inhibida per la PKC (). De totes maneres, no sempre s'ha observat augment dels nivells d'Ins1,3,4,5P₄ elevant el calci intracel·lular. L'Ins1,3,4,5P₄, per acció de la inositol polifosfat 5-fosfatasa, es desfosforila a Ins1,3,4P₃, el qual posteriorment donarà lloc a l'Ins1,3P₂ o a l'Ins3,4P₂ i aquests als monofosfats corresponents: Ins1P i Ins3P (figura 2.1.B.).

L'altra via de metabolisme de l'Ins1,4,5P₃ consisteix en una desfosforilació seqüencial per la inositol polifosfat 5-fosfatasa i inositol polifosfat 1-fosfatasa a Ins1,4P₂ i Ins4P, respectivament. Es coneixen dues isoformes de la inositol polifosfat 5-fosfatasa, ambdues insensibles al Ca²⁺. Les de tipus I tenen més afinitat per l'Ins1,4,5P₃ i les de tipus II per l'Ins1,3,4,5P₄ però cap de les dues no actua sobre altres substrats ja que la seva especificitat és molt elevada, a l'igual que la resta dels enzims d'aquest metabolisme (Shears, 1989). Tots els inositol monofosfats esmentats són substrat de la inositol monofosfatasa que els converteix a inositol, el qual és incorporat a la membrana plasmàtica per acció de la PtdIns sintasa que l'uneix al CDP-DAG formant-se PtdIns.

El Li⁺ és un inhibidor acompetitiu dels enzims inositol monofosfatasa i inositol polifosfat 1-fosfatasa. Per tant, a l'estimular la PLC en presència d'aquest ió s'acumulen els inositol monofosfats i el CDP-DAG degut a la conseqüent manca d'inositol citoplasmàtic lliure. Aquest trencament del cicle dels fosfoinosítids induït per la presència de Li⁺ s'ha aprofitat per determinar experimentalment l'activitat PLC estimulada per diferents estímuls extracel·lulars (veure apartat 2.1 dels mètodes). Cal tenir present, però, que en cèl·lules amb una elevada concentració d'inositol lliure al citoplasma en condicions basals, l'acumulació de CDP-DAG no és un índex acurat de l'activitat PLC ja que només grans estimulacions de l'enzim provoquen la depletació de l'inositol (Nahorski et al., 1992).

Per altra banda, la diferent distribució subcel·lular de la Ins1,4,5P₃ 3-quinasa i la inositol polifosfat 5-fosfatasa fa que, en cèl·lules senceres, cèl·lules permeabilitzades i homogenats, es puguin presentar les dues rutes metabòliques de l'Ins1,4,5P₃ mentre en preparacions membranals el perfil d'inositol fosfats és més senzill degut a l'absència de la quinasa (Claro et al., 1989a).

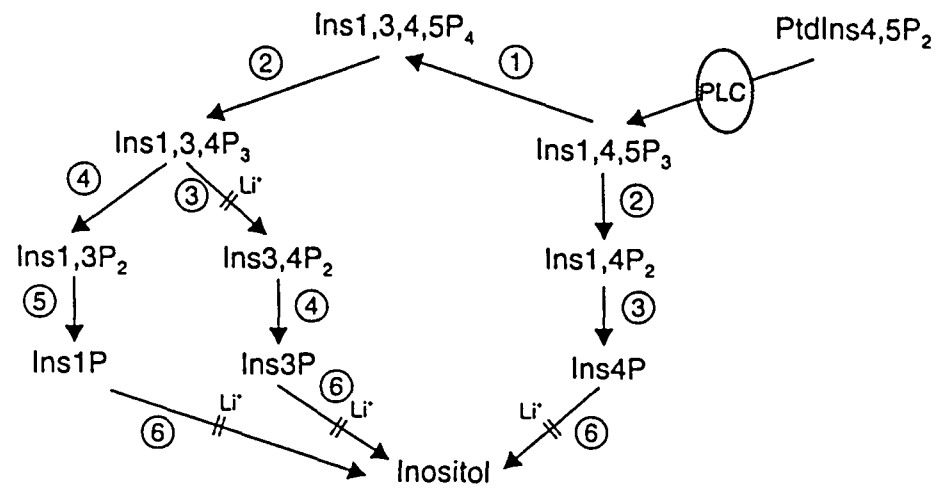
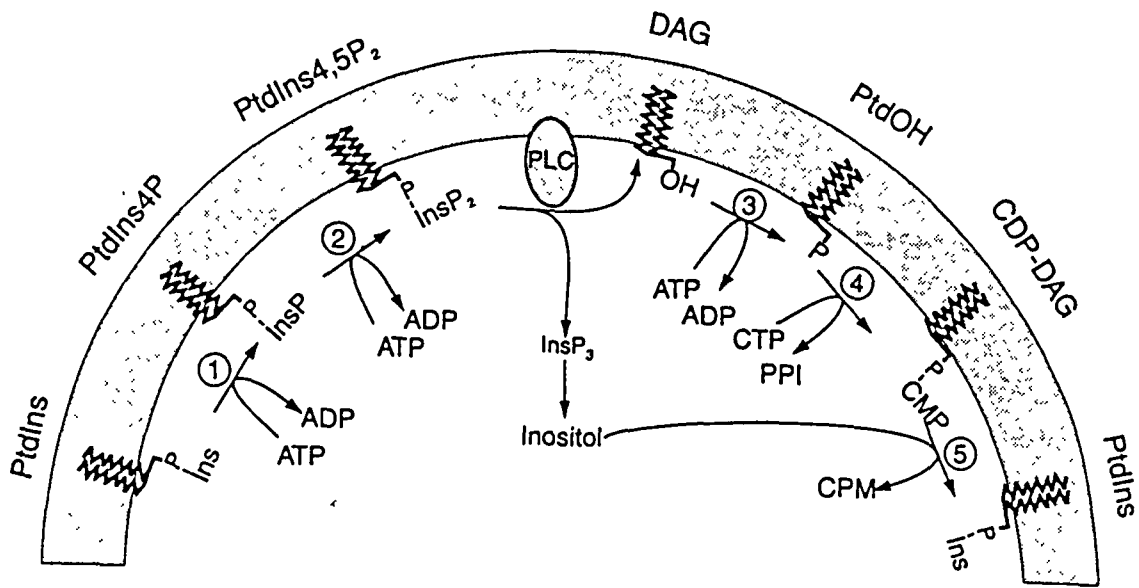


Figura 2.1. A: Cicle dels fosfoinosítids. 1:PtdInsP 4-quinasa; 2:PtdIns4P 5-quinasa; 3:DAG quinasa; 4:CTP-fosfatidat citidiltransferasa; 5:PtdIns sintasa. **B: Metabolisme dels inositol fosfats.** 1:Ins1,4,5P₃ 3-quinasa; 2:Inositol polifosfat 5-fosfatasa (Ins_x5-Pasa); 3:InsP_x1-Pasa; 4:InsP_x4-Pasa; 5:InsP_x3-Pasa; 6:Inositol monofosfatasa. S'indiquen els passos inhibits per Li⁺.

2.2. Isoenzims i estructura de la PLC

Tal i com s'ha mencionat abans, la hidròlisi del PtdIns4,5P₂ per la PLC donant lloc a dos segons missatgers, el DAG i l'Ins1,4,5P₃, és un dels passos inicials activats per un gran nombre de senyals extracel·lulars. S'han identificat diferents molècules de PLC a un ample espectre d'organismes incluint bacteris, eucariotes simples, plantes i animals. En eucariotes, la comparació de la seqüència aminoacídica i estudis estructurals han permès agrupar els diferents isoenzims de la PLC en tres famílies: β , γ , i δ . Anteriorment s'havien descrit dos isoenzims més, la PLC- α i la PLC- ϵ però el cDNA de l'isoenzim ϵ no va donar lloc a una proteïna amb activitat fosfodiesterasa del tipus C i l'isoenzim α es va demostrar, posteriorment, que era un producte proteolític de la PLC- δ (Exton, 1997). Dintre aquestes tres superfamílies s'han descrit quatre subtipus de la PLC- β (β_1 - β_4), dos de la PLC- γ (γ_1 - γ_2) i quatre de la PLC- δ (δ_1 - δ_4) (Lee and Rhee, 1995). No tots aquests subtipus de la PLC s'activen de la mateixa manera. Així, la PLC- β és activada per receptors acoblats a proteïnes G i la PLC- γ interacciona amb receptors amb activitat tirosino quinasa, però es sap molt poc sobre els mecanismes estimuladors de la PLC- δ . Malgrat que totes les formes de la PLC poden ser activades per Ca²⁺ *in vitro*, la PLC- δ és l'isoenzim més sensible a Ca²⁺ i s'ha proposat que increments de la [Ca²⁺]_i podrien induir la unió d'aquest isoenzim a membranes riques amb PtdIns4,5P₂ induint la seva activació, fet que significaria que l'activació de la PLC- δ seria secundària a l'activació d'altres isoenzims de la PLC o de canals de Ca²⁺ (Allen et al., 1997).

En la seqüència dels diferents isoenzims de la PLC es distingeixen dues regions d'alta homologia (40-60 % d'identitat), són el domini X (d'aproximadament 170 aminoàcids) i el domini Y (d'uns 260 aminoàcids). En ells resideix l'activitat catalítica i estan separats per 50-70 aminoàcids en les PLC- β i les PLC- δ però per aproximadament 400 aminoàcids en les PLC- γ que contenen dos mòduls estructurals petits de tipus SH (SH2 i SH3), i homòlegs als de les proteïnes de la família de tirosino quinases Src. Ambdós faciliten el reconeixement i la interacció amb determinades proteïnes: el primer amb proteïnes amb tirosines fosforilades, com els receptors amb activitat tirosino quinasa, i el segon amb proteïnes enriquides amb prolina, com les del citoesquelet. A l'extrem aminic, d'uns 300 residus, i precedint el domini X s'hi troba el domini PH (homòleg a la plecstrina), present també entre X i Y i separat pels dominis SH a la PLC- γ . Aquest domini

interacciona amb el PtdIns4,5P₂, tot i que no participa en la catàlisi. Entre PH i el domini X hi ha quatre motius 'EF-hand', requerits per l'activitat catalítica. Per altra banda, l'extrem carboxílic és d'aproximadament 400 aminoàcids a la PLC-β i pràcticament inexistent en la PLC-δ. A prop d'aquest extrem C-terminal hi ha un domini C2, en els tres tipus de PLC i present també a molts isoenzims de la PKC. Es creu que aquest domini pot participar en la unió a membrana, a més del domini PH, ja que uneix fosfolípids de manera dependent de calci. A més a més, estudis del domini C2 de la isoforma PLC-δ1 han revelat punts d'unió a diferents metalls i Ca²⁺ (Exton, 1997; Rhee i Bae, 1997).

Recentment s'ha cristalitzat l'isoforma PLC-δ1, fet que ha proporcionat molta informació sobre l'associació de la PLC a membrana i l'activitat catalítica. Els autors proposen un mecanisme en el qual la regió PH s'uniria al PtdIns1,4,5P₂ lligant així la PLC a la membrana, i el domini C2 col·locaria el domini catalític en una orientació adequada. Els motius 'EF-hand' servirien com a unió flexible entre el domini PH i la resta de l'enzim (Essen et al., 1996; Katan, 1998).

S'accepta de manera generalitzada que els pesos moleculars de les isoformes PLC-β i PLC-γ oscil·len entre les 130-155 kDa i que les isoformes PLC-δ són d'aproximadament 85 kDa. De totes maneres, les purificacions de les diferents isoformes en varis teixits de mamífers han mostrat pesos moleculars diferents per una mateixa isoforma depenent del teixit on s'expressi i, en alguns casos, el pes molecular determinat per alguna de les isoformes ha estat lleugerament superior o inferior a l'esperat. Així, per exemple, Le Mellay et al. (1997) han descrit que les isoformes PLC-β₃, PLC-β₄ i PLC-γ₁ s'expressen com a proteïnes de pes molecular de 163, 160 i 156 kDa respectivament en osteoblasts i cerebel, i en cèl·lules HL60 s'ha clonat un cADN que donaria lloc a una PLC-β₃ de 134 kDa (Kritz et al., 1990). A més a més s'ha proposat que les isoformes PLC-β₁ i PLC-β₄ presenten variants d'*splicing*. Aquestes variants, en molts teixits i entre ells el cervell, s'expressen com a proteïnes de 150 (PLC-β1a), 140 (PLC-β1b), 130 (PLC-β4a) i 97 kDa (PLC-β4b) (Lee et al., 1988; Bahk et al., 1994; Kim et al., 1998).

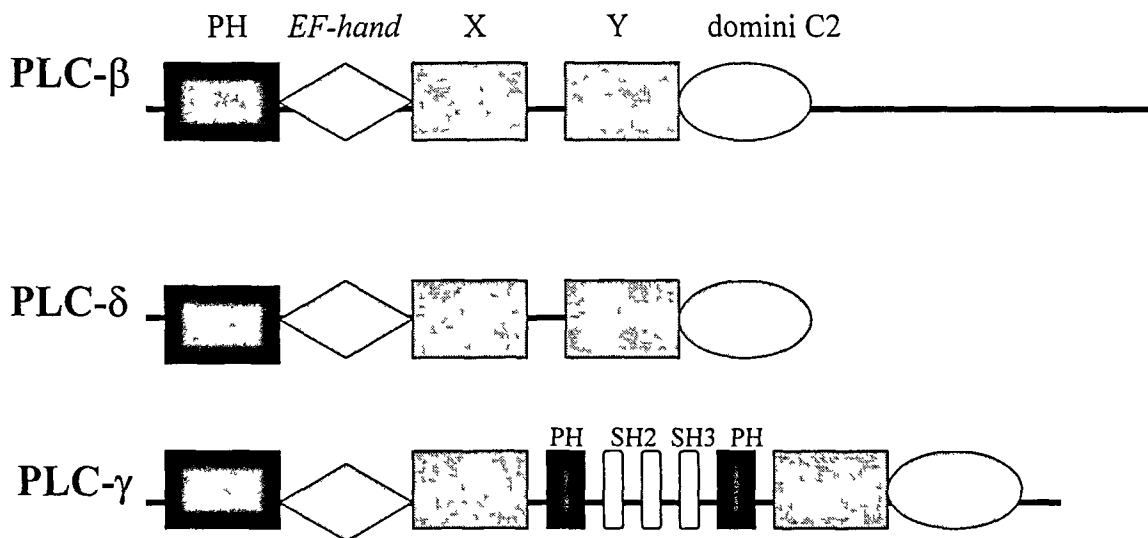


Fig. 2.2. Representació lineal dels diferents isoenzims de la PLC.

2.3. Localització subcel·lular dels diferents isoenzims de la PLC

La localització subcel·lular de la PLC ha estat tema de controvèrsia durant molts anys (Cockcroft i Thomas, 1992). Els primers estudis d'aquest sistema de transducció del senyal varen establir que la PLC residia predominantment al citosol (Irvine i Dawson, 1978), però posteriorment la hipòtesi d'una localització a la membrana plasmàtica va anar adquirint importància. Diferents aproximacions experimentals han aportat evidències per les dues possibilitats. Així, si bé la majoria de les fosfolipases C han estat purificades a partir de la fracció citosòlica, s'ha descrit activitat PLC en nombroses preparacions membranoses (Lee et al., 1987; Banno i Nozawa 1987; Claro et al., 1989a,b) i experiments amb cèl·lules permeabilitzades mostren una difusió de la PLC a l'exterior cel·lular més lenta que proteïnes citosòliques del mateix pes molecular (Thomas et al., 1991).

Per altra banda, considerant que la seqüència aminoacídica dels diferents isoenzims de la PLC no presenta cap domini transmembrana però sí un domini PH d'interacció amb el PtdIns4,5P₂ i que l'activitat PLC associada a membrana pot ser anul·lada amb una concentració salina alta (Lee et al., 1987), es creu que la interacció de la PLC amb la membrana és dèbil i no permanent.

Per tant, actualment es creu, de manera generalitzada, que la PLC està en equilibri dinàmic entre el citosol i la membrana plasmàtica, existint variabilitat entre els diferents isoenzims i el tipus cel·lular. Observacions molt recents per diferents grups, mostren com l'activació dels diferents isoenzims de la PLC per agonistes alteren la seva distribució subcel·lular (Wheldon et al., resultats sense publicar). Així, la comparació de la distribució subcel·lular de determinats isoenzims de la PLC en condicions basals i estimulades per receptors o agonistes concrets podria utilitzar-se com a índex indicatiu dels isoenzims que han estat activats.

Existeix, també, activitat PLC al nucli cel·lular. De totes maneres, malgrat que hi ha una gran quantitat de dades que suggereixen la presència de la PLC al nucli cel·lular, també hi ha gran confusió en la determinació de quins isoenzims de la PLC resideixen al nucli. A més a més, pels diferents estudis realitzats fins el moment sembla que hi ha molta heterogeneïtat entre línies cel·lulars, tipus de teixit i estats metabòlics diferents.

La PLC- β_1 ha acapatat molta atenció i varies metodologies diferents han demostrat la seva localització nuclear. La coincidència dels resultats, però, ha estat baixa. Així, per exemple, Martelli et al., 1992 i posteriorment molts altres autors, han suggerit una localització de la PLC- β_1 exclusivament al nucli, però Divecha et al., 1993 han mostrat com només un 2% de la PLC- β_1 és nuclear. Hi ha altres autors que troben dades intermitges. Tal i com s'ha comentat anteriorment, Bahk et al., 1994 van demostrar que la PLC- β_1 existeix com a dues isoformes generades per '*splicing*' alternatiu d'un mateix gen, per tant, els mateixos autors van explorar la possibilitat de que una d'aquestes isoformes fos nuclear i l'altra citosòlica. Els seus resultats en cèl·lules C6Bu-1 de rata permeten concloure que ambdues isoformes estan presents a la fracció citosòlica i nuclear de la cèl·lula, però mentre que la PLC- β_{1a} es localitza preferentment al citosol la PLC- β_{1b} té una distribució majoritària al nucli (Bahk et al., 1998). Per altra banda, la tècnica de 'marcatge amb immunoor' (*immunogold labelling*) ha permès determinar que la PLC- β_1 nuclear està concentrada en regions específiques, concretament als dominis d'intercromatina i a la matriu interna de nuclis isolats (Maraldi et al., 1994). Recentment, Cocco et al. (1999) han

trobat que en cèl·lules NIH 3T3 els isoenzims PLC- β_2 , PLC- β_3 i PLC- β_4 també tenen una localització nuclear, tot i que són menys abundants que la PLC- β_1 .

Tanmateix, els isoenzims PLC- β no són els únics que han estat localitzats al nucli ja que també hi ha evidències experimentals per la PLC- γ_1 . A l'igual que per la PLC- β_1 , existeixen dades conflictives i oposades sobre la distribució de la PLC- γ_1 al nucli i la variabilitat entre teixits sembla ser també present (D'Santos et al., 1998). Per altra banda, s'ha suggerit que la PLC- δ també pot ser activa al nucli cel·lular. Així en cèl·lules 3T3 suïsses estimulades amb sèrum, s'ha reconegut una proteïna de 85 kDa amb l'anticòs anti la PLC- δ_4 localitzada majoritàriament al nucli cel·lular (Liu et al., 1996) mentre que en cervell, tiroïdes i múscle esquelètic s'han reconegut dues variants d' *'splicing'* nuclears de la PLC- δ_4 de 90 i 93 kDa (Lee i Rhee, 1996).

2.4. Mecanismes de l'activació i regulació de la PLC

2.4.1. Activació de la PLC via proteïnes G

L'acoblament entre receptors, proteïnes G trimèriques i la PLC ha estat àmpliament demostrat per diferents aproximacions experimentals. Per una banda, s'han utilitzat anàlegs de GTP no hidrolitzables com ara guanosina 5'-[gamatio]trifosfat (GTP γ S) o guanosina 5'-[$\beta\gamma$]-imido trifosfat en preparacions membranals per induir una activació sostinguda de la proteïna G. Així s'ha observat que, en preparacions membranals de teixit nerviós (Chiu et al., 1988; Claro et al., 1989b; Wojcikiewicz et al., 1990), el GTP γ S produïa una estimulació de la PLC que podia ser potenciada per un agonista dels receptors muscarínics de l'acetilcolina. També s'han fet estudis purificant els diferents elements implicats i reconstituïnt de nou el sistema. En aquesta línia, s'ha aconseguit estimular amb agonistes una PLC- β_1 purificada de cervell boví i reconstituïda conjuntament amb una proteïna G_q hepàtica o cerebral i un receptor muscarínic M₁ recombinant (Berstein et al, 1992). Posteriorment s'han utilitzat tècniques de biologia molecular que han permès la clonació de cDNAs de diferents subtipus de receptors, proteïnes G (i subunitats d'aquestes) i fosfolipases C i, per tant, sobreexpressar diferents combinacions d'aquests cDNAs.

Un altre punt important és l'estudi de la identitat de les subunitats de les proteïnes G responsables d'activar la PLC. Les subunitats α dels quatre membres de la suprefamília de proteïnes heterotrimèriques G_q (α_q , α_{11} , α_{14} i α_{16}) estimulen els isoenzims PLC- β però no els PLC- γ ni PLC- δ . Experiments amb GTP γ S han demostrat que les subunitats α_q i α_{11} estimulen les isoformes de la PLC- β amb el següent rang de potència: PLC- $\beta_1 \geq$ PLC- $\beta_3 >$ PLC- β_2 . La PLC- β_4 també podria ser activada per les subunitats α_q (Kim et al., 1998). Altres treballs han utilitzat tècniques de biologia molecular per estudiar les relacions entre les diferents subunitats de les proteïnes G i de la PLC- β i han demostrat que en cèl·lules COS-7 les subunitats α_q i α_{11} però no les α_z , α_{0A} o α_{0B} poden estimular la PLC- β_1 (Wu et al., 1992) (figura 2.3.).

El dímer $\beta\gamma$ també pot activar els isoenzims PLC- β , però amb una sensibilitat diferent a la subunitat α essent PLC- $\beta_3 >$ PLC- $\beta_2 >$ PLC- β_1 (Park et al., 1993; Smrcka i Sternweis, 1993). La magnitud de l'activació és similar a la de les subunitats α però es requereixen concentracions més elevades en estudis in vitro. Molts receptors que activen la PLC ho poden fer tan a través de la subunitat α com a través del dímer $\beta\gamma$, però per exemple en oòcits de *Xenopus* la PLC és majoritàriament activada pel dímer $\beta\gamma$ (Stehno-Bittel et al., 1995) i estudis fets amb la toxina pertussis -capaç d'ADP-ribosilar les proteïnes G_i i G_o inhibint la seva activitat però no les G_q - demostren que les proteïnes G_q poden activar la PLC- β a través de la seva subunitat α , i suggereixen que les proteïnes G_i i G_o podrien activar totes les PLC- β , excepte la PLC- β_4 , per mitjà del dímer $\beta\gamma$ (Camps et al., 1992; Blank et al., 1992; Fisher 1995).

La regió de la PLC- β que interacciona amb les subunitats α_q difereix de la responsable de l'interacció amb els dímers $\beta\gamma$ (Blank et al., 1992). Així, mentre l'extrem C-terminal és essencial per l'activació de la PLC- β_1 i PLC- β_2 per la subunitat α_q , el lloc d'interacció del dímer $\beta\gamma$ amb la PLC- β_2 està localitzat entre el Glu⁴³⁵ i la Val⁶⁴¹ (Kuang et al., 1996) (figura 2.3.).

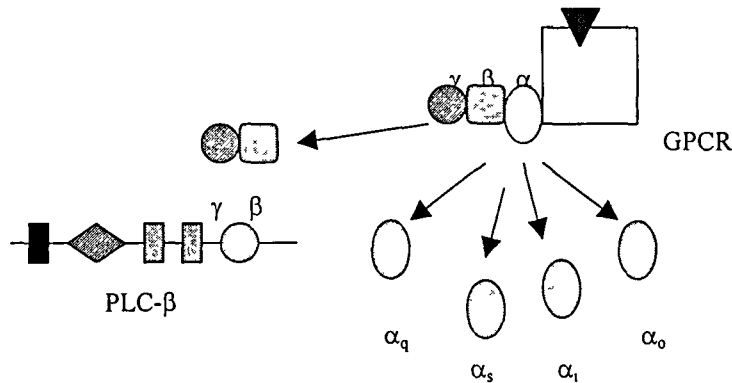


Figura 2.3. Activació dels isoenzims PLC-β mitjançada per proteïnes G heterotrimèriques.

Per altra banda, s'ha demostrat que una nova classe de proteïnes que uneixen GTP anomenades G_h , formades per una subunitat α de 75-80 kDa i una subunitat β d'aproximadament 50 kDa, poden activar molècules purificades de PLC- δ i formar un complex amb la PLC- δ en cèl·lules estimulades a través de receptors α -adrenèrgics o receptors d'oxitocina (Hwang et al., 1995). També s'ha suggerit que la PLC- δ pot ser activada per la proteïna G monomèrica RhoA i que diferents mecanismes poden estar implicats en la regulació de la PLC- δ_4 (Rhee i Bae, 1997).

Finalment, cal comentar que recentment s'ha demostrat que els isoenzims PLC- γ també poden ser activats per receptors acoblats a proteïnes G. El mecanisme encara no està clar, però s'ha suggerit que en cèl·lules neuronals diferents receptors acoblats a proteïnes G_i o G_q activarien la PLC- γ induïnt una tirosino-fosforil·lació al residu SH2 (Dikic et al., 1996; Rhee and Bae, 1997) (figura 2.4.).

2.4.2. Activació de la PLC per activitats tirosino quinases

Els factors de creixement i algunes hormones estimulen la PLC- γ a través de receptors que són proteïnes de membrana monomèriques amb un domini extracel·lular responsable de l'interacció amb l'agonista, un sol domini transmembranaral i un domini citoplasmàtic que té activitat enzimàtica. Quan el factor de creixement s'uneix al receptor es produeix una dimerització d'aquest que facilita una autofosforilació de tirosines del seu domini citoplasmàtic. La PLC- γ reconeix aquestes tirosines fosforilades, gràcies a les regions SH2 de la seva seqüència, i interacciona amb el receptor activant-se la hidròlisi del PtdIns4,5P₂ (Rhee i Bae, 1997; Katan 1998). Per tant, en aquest mecanisme, es produeix una interacció directa entre el receptor i el sistema efector (figura 2.4.).

Existeixen receptors sense activitat tirosino quinasa que també poden activar la PLC- γ . Aquests receptors, la majoria dels quals estan formats per múltiples cadenes polipeptídiques, activen una àmplia gama d'enzims amb activitat tirosino quinasa com les proteïnes de les famílies Src, Syk i Jak/Tyk, que alhora fosforil·len una de les cadenes del receptor. Posteriorment, la PLC- γ s'uneix a través del seu domini SH2 a aquesta cadena del receptor fosforil·lada, fet que propicia que també sigui fosforil·lada per l'activitat tirosino-quinasa, i per tant activada (Rhee and Bae, 1997) (figura 2.4.).

2.4.3. Activació de la PLC per Ca²⁺

Existeix una interrelació entre el Ca²⁺ i l'activitat PLC. Així la hidròlisi del PtdIns4,5P₂ per la PLC genera Ins1,4,5P₃ que pot augmentar la [Ca²⁺]_c i alhora el Ca²⁺ pot activar directament la PLC o modular l'estimulació d'aquesta activitat per agonistes. El mecanisme d'aquesta activació i regulació de la PLC per part del calci és molt complexe, fet que fa que no es coneixi del tot i que hagi estat un punt d'estudi d'aquest treball, seguint així una línia d'investigació iniciada anteriorment pel nostre grup i en la que s'observava estimulació de la hidròlisi de fosfoinosítids per Ca²⁺ en membranes d'escorça cerebral de rata (Claro et al., 1989a; Claro et al., 1989b) i activació de la PLC per diferents receptors acoblats a proteïnes secundària a un influx de Ca²⁺ en miniprismes d'escorça cerebral de rata (Claro et al., 1993a; Sarri et al., 1995).

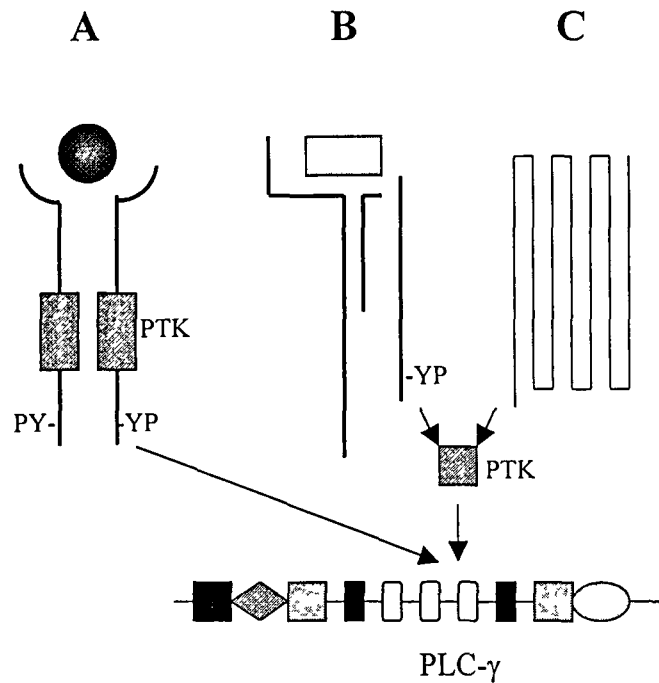


Figura 2.4. Activació dels isoenzims PLC- γ per diferents receptors. L'activació es pot fer a través d'un receptor amb activitat proteïno quinasa (A), un receptor de múltiples cadenes peptídiques (B) i un receptor de set dominis transmembrana (C).

La sensibilitat de la PLC al Ca^{2+} ha estat molt estudiada en els últims anys, sobretot al teixit nerviós. S'han publicat diferents treballs en els que s'aconsegueix incrementar la hidròlisi de fosfoinosítids augmentant el Ca^{2+} citosòlic per diferents procediments: per eliminació del Na^+ extracel·lular -que augmenta el Ca^{2+} citosòlic quan no funciona l'antitransportador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (Chandler and Crews, 1990); amb concentracions despolaritzants de potassi que, en cèl·lules excitable, poden obrir canals de Ca^{2+} sensibles a voltatge (Connor et al., 1987; Irving et al., 1992a; del Río et al., 1994) o bé amb l'ús de ionòfors (Baird and Nahorski, 1990). Altres aproximacions experimentals han utilitzat quelants intracel·lulars de Ca^{2+} , com ara el BAPTA, per eliminar increments de la concentració de Ca^{2+} , observant-se disminució de l'activitat PLC estimulada per agonistes. A més a més s'ha detectat l'estimulació de la PLC per agonistes de receptors canal com el nicotínic de l'acetilcolina o l'NMDA del glutamat, que produeixen un influx de calci extracel·lular (Eberhard i Holz, 1988; Myles and Fain, 1994). La idea generalitzada de que

el Ca^{2+} pot estimular la PLC en algunes situacions ha estat també recolzada per estudis d'aquesta resposta en cèl·lules permeabilitzades, homogenats cel·lulars o preparacions membranals a diferents concentracions de Ca^{2+} (Claro et al., 1989a,b; Yaud et al., 1993).

El possible significat fisiològic que s'ha proposat per la regulació del Ca^{2+} de l'activitat PLC seria permetre una amplificació del senyal, ja que l'activació de la PLC produïria $\text{Ins}1,4,5\text{P}_3$ que mobilitzaria calci intracel·lular, i això estimularia encara més aquesta activitat d'hidròlisi de fosfoinosítids reforçant-se el senyal. No cal despreciar, però, la possibilitat de que la regulació per Ca^{2+} constitueixi un factor diferenciador entre les diferents estimulacions de la PLC.

Les qüestions que queden per aclarir, per tant, són quin/s mecanismes són els utilitzats per regular l'activitat PLC induïda pels diferents estímuls extracel·lulars, la generalitat o especificitat d'aquests i quins isoenzims de la PLC hi estan implicats.

2.4.4. Modulació de la PLC per altres factors

A part de les activacions de la PLC esmentades existeixen nombrosos factors que poden modular aquesta activitat enzimàtica.

Així, els isoenzims de la PLC- γ poden ser activats directament per segons missatgers lipídics en absència de la tirosino fosforil·lació. Un exemple n'és l'àcid araquidònic que en presència de la proteïna neuronal associada als microtúbuls, tau, o proteïnes homòlogues com ara la recentment caracteritzada proteïna AHNAK, pot estimular específicament els isoenzims de la PLC- γ , a través d'un procés que és inhibït per la fosfatidilcolina (Hwang et al., 1996; Sekiya et al., 1999). Com que l'activació de la PLA₂ incrementa els nivells d'àcid araquidònic i disminueix la concentració de la fosfatidilcolina a la cèl·lula, s'ha proposat que l'activació de la PLC- γ podria donar-se lloc de manera secundària a l'activació de la PLA₂ (Rhee i Bae, 1997). Per altra banda, l'àcid fosfatídic s'origina per activació de la PLD i és un altre missatger secundari lipídic que pot activar els isoenzims de la PLC- γ de manera al·lostèrica (Jones i Carpenter, 1993). També s'ha demostrat que el $\text{PtdIns}3,4,5\text{P}_3$, resultat de la fosforilació en posició 3 del $\text{PtdIns}4,5\text{P}_2$ per part de la fosfatidilinositol 3-quinasa, pot activar isoenzims purificats de la PLC- γ interaccionant específicament amb el domini SH2 (Bae et al., 1998). De totes maneres, no es pot descartar que tots aquests segons missatgers lipídics activin la PLC- γ de manera indirecta incrementant la concentració de Ca^{2+} citoplasmàtica (figura 2.5.).

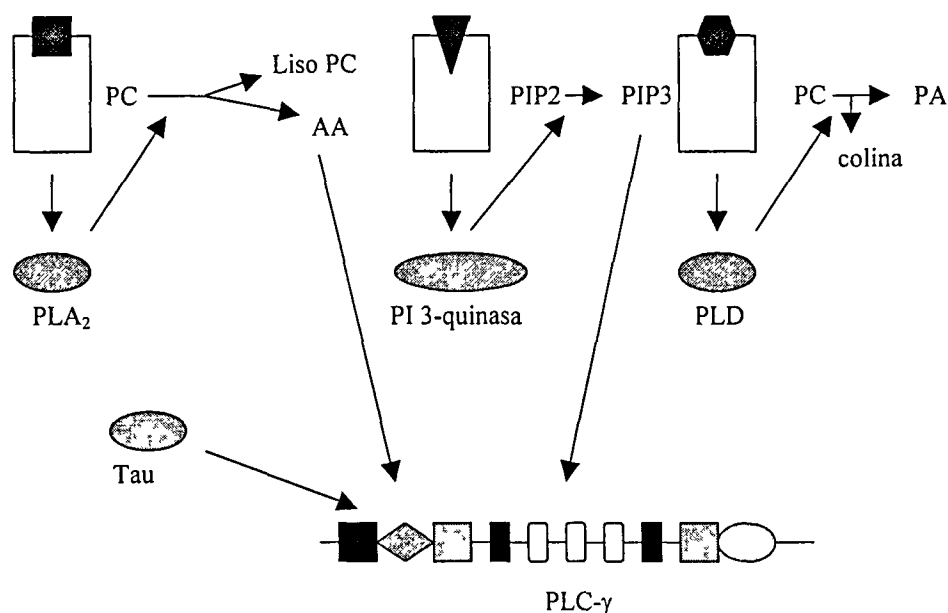


Figura 2.5. Activació i modulació dels isoenzims PLC- γ . PC: fosfatidilcolina; lisoPC: lisofosfatidilcolina; AA: àcid araquidònic; PIP₂: fosfatidilinositol 4,5 fosfat; PIP₃: Inositol 1,4,5 trifosfat; PA: àcid fosfatídic; cPLA₂: fosfolipasa A₂; PI-3-quinasa: fosfatidilinositol 3-quinasa; PLD: fosfolipasa D.

A més a més d'aquests reguladors, cal esmentar que s'ha suggerit que diferents ribonucleòtids tri-, di- i monofosfats a baixes concentracions poden inhibir específicament l'isoenzim PLC- β 4. Aquesta inhibició també s'ha observat sobre la PLC- γ 1 però a concentracions molt més altes (Lee et al., 1994).

El PtdIns4,5P₂ constitueix menys del 5% dels lípids d'inositol de la membrana cel·lular i no tot és accessible i conseqüentment hidrolitzable per la PLC. Per tant, la disponibilitat del PtdIns4,5P₂, substrat de la PLC, podria ser un factor limitant per a l'activitat d'aquest efector. De totes maneres, malgrat que canvis en les concentracions de substrat/producte, i especialment les dramàtiques reduccions que tenen lloc a les proximitats de la PLC activada, poden tenir un paper important en la regulació del subministrament del PtdIns4,5P₂, és més probable que aquesta via de senyalització poseixi mecanismes més sofisticats per regular i garantir que el subministrament de

substrat s'adecui a la seva demanda en condicions d'estimulació de la PLC. En aquest context, s'han proposat mecanismes de regulació de les PtdIns 4-quinasa i/o PtdIns4P 5-quinasa (Fisher, 1995) i la proteïna de transferència de PtdIns (Lee i Rhee, 1995). Recentment, un estudi en cèl·lules SH-SY5Y, línia de neuroblastoma amb característiques de neurones ganglionals simpàtiques, ha mostrat com la resíntesi del PtdIns4,5P₂ és necessària per una plena activació de la PLC per receptors muscarínics de l'acetilcolina, tan per la seva etapa inicial com per una fase més sostinguda, però no troba evidències de que la velocitat o proporció de resíntesi d'aquest fosfoinosítid sigui un factor limitant per la resposta mitjançada per agonistes (Willars et al., 1998). Així, en aquest treball, es proposa un mecanisme regulatori pel qual els nivells de PtdIns4,5P₂ es mantindrien a expenses dels nivells de PtdIns4P. Els autors suggereixen que aquest mecanisme podria ser generalitzat a molts sistemes d'activació de la PLC ja que el patró d'activació d'aquest sistema efector i la depleció dels nivells de PtdIns4,5P₂ induïts pels receptors muscarínics en el seu estudi, coincideixen amb els mitjançats per altres tipus de receptors en una gran varietat de sistemes cel·lulars.

En el mateix context de la disponibilitat de substrat com a factor regulador de l'activitat PLC cal fer esment que si bé el PtdIns4,5P₂ és el substrat principal de la PLC, podria ser que no fos l'únic. Així, si bé està clarament demostrat que en preparacions membranals o com a enzim parcialment purificat, la PLC també pot hidrolitzar el PtdIns i el PtdIns4P, sempre i quan aquests siguin presentats exògenament (Rittenhouse, 1983; Claro et al., 1989a), la determinació de l'especificitat de substrat de la PLC estimulada per receptors és difícil d'establir en cèl·lules senceres. Sembla ser que en la majoria de sistemes el PtdIns4,5P₂ és l'únic substrat de la PLC (Berridge 1983; Huges i Putney Jr., 1989; Fisher et al., 1990; Willars et al., 1998), tot i que no es pot despreciar que en determinades condicions i sistemes es pugui produir la hidrolisi d'altres fosfoinosítids.

Finalment s'ha demostrat que la sobreexpressió de la PLC- γ en fibroblasts NIH 3T3 potencia la formació d'Ins1,4,5P₃ estimulada pel PDGF (*platelet-derived growth factor*), fet que indica que la disponibilitat de la PLC pot ser un factor limitant en cèl·lules no transfectades (Margolis et al., 1990; Cuadrado i Molloy 1990; Renard et al., 1992). En aquest sentit, s'ha observat que la concentració cel·lular de la PLC- γ és superior en línies cel·lulars tumorals (Cockroft i Thomas, 1992).

2.4.5. Desensibilització de la PLC

En moltes preparacions biològiques, l'exposició prolongada de receptors acoblats a proteïnes G a agonistes inicia un procés regulatori que atenua el senyal del receptor, i que es coneix com a desensibilització. La desensibilització homòloga és específica d'agonista, però també existeix l'associada a factors implicats en el procés i per tant no agonista dependent, que s'anomena heteròloga.

La regulació homòloga a nivell del receptor sembla ser el procés predominant per la desensibilització de les respostes activades per receptors acoblats a proteïnes G. Actualment es disposa de moltes dades sobre la desensibilització de la PLC a nivell del receptor, fet que ha permès arribar a tres conclusions principals. Primerament, es tracta d'un procés ràpid però sovint parcial, tal i com s'ha demostrat pels receptors muscarínics de l'acetilcolina en les cèl·lules de neuroblastoma humà SH-SY5Y i en cèl·lules CHO transfectades (Tobin et al., 1992; Fisher et al., 1994; Wojcikiewicz et al., 1994b). En segon lloc, cal tenir present que el mecanisme i la magnitud d'atenuació pot ser específica de cada receptor per una mateixa cèl·lula. Així, els receptors muscarínics de l'acetilcolina es desensibilitzen menys ràpidament que altres receptors en cèl·lules de pancreatoma AR4-2J (Menniti et al., 1991) i en neurones granulars de cerebel (Dillon-Carter i Chuang., 1989). Finalment, el receptor pot ser desensibilitzat de manera diferencial depenent del tipus cel·lular. Exemples en són els receptors d'angiotensina a cèl·lules cromafines i a cèl·lules de glomerulosa adrenal (Balla et al., 1988; Stauderman i Pruss, 1990). Els mecanismes que participen en aquesta desensibilització de la resposta són diversos, i impliquen la fosforil·lació del receptor per activitats proteïno quinases, la pèrdua de l'eficiència del receptor a unir-se a proteïnes G i la disminució del nombre de receptors a la superfície cel·lular (procés conegut com a '*down-regulation*') (Wojcikiewicz et al., 1993; Fisher, 1995).

Tanmateix, cada vegada més estan sortint evidències a favor d'una desensibilització heteròloga de l'activació de la PLC per receptors acoblats a proteïnes G a nivell de les proteïnes G (Milligan G., 1993; Jasper, 1998). Així s'ha observat que la hidròlisi dels fosfinosítids induïda pels receptors muscarínics de l'acetilcolina és deguda en part a la desensibilització del receptor però també de la subunitat α de les proteïnes Gq tan en cèl·lules CHO (Mullaney et al., 1993) com en miometri de rata (Lajat et al., 1998).

Per altra banda, existeixen considerables evidències que suggereixen que la PKC pot modular negativament la PLC, de manera que s'ha proposat que l'activació de la PKC podria ser un mecanisme de regulació 'feedback' de la PLC. Així, en molts teixits, s'ha observat com una '*down-regulation*' de la PKC dóna lloc a un increment de la hidròlisi dels fosfoinosítids induïda per agonistes (Fisher, 1995). De totes maneres i malgrat les nombroses aproximacions experimentals en diferents teixits, es coneix molt poc el mecanisme d'aquesta regulació i tampoc es sap si es tracta d'un mecanisme generalitzat o bé si depèn de les diferents isoformes de la PKC i/o de la PLC. Així, s'ha proposat que la PKC inhibeix l'estimulació de la PLC mitjançada pels receptors muscarínics a les línies de neuroblastoma SH-SY5Y via la supressió de la hidròlisi del PtdIns4,5P₂ (Wilalrs et al., 1996) i recentment, s'ha descrit *in vivo* i *in vitro* una fosforil·lació directe de la PKC sobre la PLC- β acompanyada per una pèrdua de l'activitat d'aquest últim sistema efector (Filtz et al., 1999). Els autors, però, no exclouen la possibilitat de que també es produeixi una fosforil·lació de les proteïnes G o proteïnes relacionades amb les proteïnes G com ara les proteïnes RGS. Per tant, no es pot descartar que la regulació negativa de la PLC- β per la PKC sigui un procés de modificació múltiple amb fosforil·lació de la PLC i de reguladors de les proteïnes G a membrana.

Finalment cal dir que en diferents teixits s'ha observat que increments en la concentració de AMP cíclic, els quals presumptament activen la proteïna quinasa A (PKA), estan associats a la inhibició de la hidròlisi dels fosfatidilinosítids estimulada per receptors, i per tant, s'ha proposat que la proteïna quinasa A també podria regular la PLC. De totes maneres, en l'actualitat, hi ha molt poques evidències de que la PKA pugui fosforil·lar i per tant, modificar, proteïnes G o isoenzims de la PLC (Cockcroft i Thomas, 1992; Fisher, 1995).

2.4.6. Regulació de l'activitat PLC nuclear

L'activació de les PLC nuclears es produeix de manera independent a l'activació de les PLC citosòliques o unides a membrana plasmàtica i a través d'un mecanisme desconegut. La presència de les PLC- β al nucli, suggeriria l'existència de proteïnes G heterotrimèriques al nucli, o de proteïnes G citosòliques capaces de ser translocades al nucli. Actualment, però no hi ha evidències experimentals per les proteïnes G_q, però sí que s'ha demostrat una translocació de les proteïnes G_i del citoplasma al nucli induïda per

factors de creixement (Crouch i Simson, 1997), fet que podria donar lloc a la hipòtesi d'una localització nuclear de subunitats $\beta\gamma$. Pel que fa a l'activació de la PLC- γ 1 al nucli, existeix un model hipotètic pel qual una activitat quinasa, receptor o proteïna no receptora, seria activada a la membrana plasmàtica i translocada al nucli on activaria la PLC- γ 1 nuclear. També hi ha una altra hipòtesi que contemplaria una internalització del lligand que d'aquesta manera activaria un hipotètic receptor amb activitat tirosino quinasa nuclear (D'Santos et al., 1998).

2.5. Accions dels segons missatgers generats per activació de la PLC

Com s'ha esmentat anteriorment, la hidròlisi del PtdIns4,5P₂ per part de la PLC genera dos segons missatgers, l'Ins1,4,5P₃ i el DAG. Ambdós donen lloc a respostes cel·lulars diferents però alhora interconnectades entre sí, les quals s'analitzen a continuació.

2.5.1. Ins1,4,5P₃ i alliberació del Ca²⁺ intracel·lular

La formació d'Ins1,4,5P₃ induïda per agonistes presenta un perfil bifàsic que consisteix en un pic inicial, reflexe de l'activació de la PLC, però que degut al ràpid metabolisme de l'Ins1,4,5P₃ és transitori i el precedeix una fase sostinguda de menors quantitats d'Ins1,4,5P₃ i determinada per l'equilibri entre la formació i el metabolisme d'aquest inositol fosfat. Aquest Ins1,4,5P₃ generat per activació de la PLC és el responsable de la mobilització de Ca²⁺ intracel·lular (Streb et al., 1983), ja que és el principal lligand del receptor d'Ins1,4,5P₃ (InsP₃R), un receptor canal de Ca²⁺ extensament distribuït en reservoris de Ca²⁺ intracel·lulars (veure apartat 3.2.1. de la introducció).

De manera generalitzada es pot dir que l'activació de la PLC per diferents estímuls produeix una elevació transitòria de la $[Ca^{2+}]_c$ que es caracteritza per tenir dues etapes, similars a les de la formació de l'Ins1,4,5P₃: un pic transitori inicial seguit d'un període prolongat (fase sostinguda) d'inferior concentració de Ca²⁺ però amb nivells encara superiors als basals. La primera fase seria deguda a l'alliberació de Ca²⁺ dels reservoris intracel·lulars per activació dels InsP₃R per part de l'Ins1,4,5P₃ generat. La segona fase, però, depèn del calci extracel·lular, i per tant s'ha establert que és deguda a una entrada de Ca²⁺ extracel·lular induïda pel buidatge dels reservoris intracel·lulars a través d'un

mecanisme bastant desconegut encara i que ha rebut el nom d'entrada capacitativa de Ca^{2+} . En aquesta resposta bifàsica també són importants els receptors de rianodina (RyR, *ryanodine receptors*), uns altres canals de Ca^{2+} situats a la membrana de diferents reservoris intracel·lulars de Ca^{2+} i activats per increments de la $[\text{Ca}^{2+}]_c$, i altres macromolècules cel·lulars que actuen com reguladors de la concentració intracel·lular de Ca^{2+} .

A part de tots aquests elements, els receptors de membrana que activen la PLC poden també activar l'entrada de Ca^{2+} extracel·lular a través d'alguns dels múltiples canals de Ca^{2+} presents a la membrana plasmàtica per mecanismes independents de l'activació de la PLC. Considerant, a més a més, que el Ca^{2+} és un activador de la hidròlisi dels fosfoinosítids (apartat 2.4.3 de la introducció), es dedueix que es tracta d'una resposta complexa i finament regulada en la que intervenen nombrosos elements cel·lulars que permeten una amplificació de la resposta per una banda, i una alta especificitat de la mateixa per l'altra.

Tanmateix, aquests són mecanismes molt generals que presenten molts matissos en els diferents teixits on es produeixen i que alhora no són vàlids en altres sistemes, fet no sorprenent davant l'enorme complexitat de l'homeostasi del Ca^{2+} (regulació de la concentració intracel·lular de Ca^{2+}) evidenciada recentment. És aquesta heterogeneïtat i complexitat la responsable de que actualment hi hagin molts punts desconeguts tan en els mecanismes d'interrelació entre l'activitat PLC i la resposta de Ca^{2+} , com en la inducció, regulació i propagació d'aquesta senyalització a través del Ca^{2+} .

2.5.2. DAG i activació de la proteïna quinasa C

La hidròlisi dels $\text{PtdIns}4,5\text{P}_2$ per part de la PLC dóna lloc a DAG poliinsaturats, mentre que l'activació de la PLD dóna lloc a DAG monoinsaturats o saturats. Ambdós tipus de DAG actuen com a missatgers secundaris, tinguent un paper important en la biosíntesi de lípids, sobretot en la dels fosfolípids i triglicèrids. Però la principal funció dels DAG, i en particular dels poliinsaturats, és l'activació de la PKC, enzim responsable de fosforilar residus de serina i treonina de moltes proteïnes citosòliques com la MAPK, la MARCKS, la miogenina, la laminina B i la glicoproteïna P (Nisizuka, 1995; Wakeman, 1998).

El procés d'activació de la PKC implica, en primer lloc, una translocació d'aquesta quinasa a la membrana plasmàtica en un procés afavorit per l'increment de la concentració de Ca^{2+} citosòlic i, en segon lloc, una interacció amb el DAG mitjançada possiblement per una unió de la PKC a la membrana i a altres molècules de naturalesa proteica o/i lipídica, com ara la fosfatidilserina.

Es coneixen onze isoenzims de la PKC dividits en tres famílies i que tenen el punt comú de requerir fosfolípids per a la seva activació. La primera família està formada per les PKC clàssiques, *c*: α , β_1 , β_2 i γ , la segona per les noves, *n*: δ , ϵ , σ i μ , i la tercera per les atípiques, *a*: ζ i λ (Tanaka and Nishizuka, 1994; Hodgkin et al., 1998). Tots són proteïnes monomèriques de 68-84 kDa amb dos dominis, un catalític, situat a l'extrem C-terminal, i l'altre regulador, a l'extrem amínic. Analitzant la seqüència dels subtipus clàssics s'han trobat quatre regions conservades (C_1 - C_4) i cinc de variables (V_1 - V_5). De les primeres, C_1 i C_2 estan situades al domini regulador i C_3 i C_4 al catalític. Aquests últims dominis són presents a totes les famílies de PKC, mentre que C_1 només a *c* i *n*, i C_2 és exclusiu de *c*. La regió C_1 és rica en Cys i té llocs d'unió al DAG i als ésters de forbol (anàlegs del DAG i amb capacitat d'activar la PKC). La resolució de l'estructura del cristall del domini C_1 de la PKC γ unit a un éster de forbol ha revelat que aquest lloc d'unió està format per làmines plegades β d'aquesta regió (Zang et al., 1995). La inserció de l'éster de forbol dins d'aquest lloc d'unió resulta en una superfície hidrofòbica que podria facilitar l'associació de la PKC a la membrana. Les isoformes de PKC noves no tenen un residu de Pro conservat al domini C_1 i això semblaria explicar el fet que aquestes no puguin unir ésters de forbol. Molt aprop de l'extrem N-terminal de la regió C_1 també hi ha una seqüència pseudosubstrat que bloqueja el centre actiu fins a l'activació de la PKC. Per altra banda, la regió C_2 és un 'sandwich' β que permet la interacció amb els fosfolípids de manera dependent de Ca^{2+} . Així, s'ha proposat que quan C_2 uneix Ca^{2+} queden exposades tres Lys que podrien formar el lloc d'unió a PtdSer. La regió C_3 és el domini d'unió de l'ATP i C_4 el de la proteïna substrat.

S'han proposat diferents factors que poden modular l'activitat dels diferents isoenzims de la PKC, fet que dona gran variabilitat en el procés d'activació de la PKC i la seva regulació. Així el DAG i els seus anàlegs, els ésters de forbol, poden activar les PKC*c* i molts subtipus de les PKC*n* però no les PKC*a*. L'activació de les PKC*c* per DAG pot ser augmentada per lisofosfolípids i àcids grassos lliures, inactius ells sols. Els àcids grassos també poden activar les PKC*n* i PKC*a* (Spiegel et al., 1996). Per altra banda, el Ca^{2+} actua

com a cofactor totalment necessari per les isoformes PKC ϵ , augmentant la seva afinitat pels fosfolípids àcids.

Amb totes aquestes característiques es dedueix que l'estimulació de la PLC, que genera DAG i alhora pot augmentar la concentració de Ca²⁺ citoplasmàtic, podrà activar la PKC ϵ i la PKC δ però no la PKC α . Cal tenir en compte, però, que les dues primeres isoformes de la PKC poden estar activades per DAG resultant de l'activitat d'altres fosfolipases, com ara la PLD i la PLA₂, fent possible la interacció de diferents sistemes de transmissió del senyal cel·lular (Exton, 1997).

2.5.3. Altres segons missatgers derivats de l'activació de la PLC

És cada vegada més clar que el metabolisme de l'Ins1,4,5P₃ no és només un mecanisme per finalitzar les respostes induïdes per l'Ins1,4,5P₃ i de síntesi del PtdIns4,5P₂, sinó també un procediment per generar nous missatgers. La idea de que els inositols fosfats formen una família versàtil de segons missatgers s'ha originat a partir de les evidències experimentals de que, a part de l'Ins1,4,5P₃, altres inositols fosfats estan implicats en la transducció de senyals (Shears, 1998).

Així, s'ha proposat que l'Ins1,3,4,5P₄, format per fosforilació en posició 3 de l'Ins1,4,5P₃, té un paper important en l'homeostasi del Ca²⁺, induïnt entrada de Ca²⁺ extracel·lular i mobilització de Ca²⁺ intracel·lular. S'han descrit varies proteïnes que poden unir Ins1,3,4,5P₄ amb diferent afinitat *in vitro*, com ara una proteïna de 97 kDa purificada a partir de fetge de rata i dues proteïnes de 84 i 182 kDa de cervell de rata, però només una s'ha considerat com a possible candidat a ser un receptor d'Ins1,3,4,5P₄, es tracta de GAP1^{IP4BP}. Aquesta proteïna presenta una gran afinitat i especificitat per l'Ins1,3,4,5P₄, té un domini PH/Btk que li permet interaccionar amb la membrana plasmàtica i alhora desunir-se d'ella una vegada activada, i mostra activitat GAP, fet pel qual se l'ha classificat com a membre de la família GAP1. Originàriament va ser purificada a partir de membranes de plaquetes de porc solubilitzades (Cullen et al., 1995), però posteriorment s'ha observat que la seva expressió màxima és al cervell, sobretot a neurones (Baba et al., 1995). Després d'algunes evidències experimentals directes i indirectes de l'entrada i mobilització de Ca²⁺ per part de l'Ins1,3,4,5P₄ a través de la proteïna GAP1^{IP4BP} en diferents teixits, actualment es creu que la GAP1^{IP4BP} és una proteïna de la membrana plasmàtica que es comunica amb els InsP₃R i que en regula el seu

comportament a través d'un mecanisme modulats per una activitat Ras.GTP, però no per la 'tradicional' substitució Ras.GTP per Ras.GDP. S'han proposat dos mecanismes alternatius per la participació dels receptors $\text{GAP1}^{\text{IP4BP}}$ en l'entrada capacitativa de Ca^{2+} i el subseqüent reompliment dels reservoris intracel·lulars de Ca^{2+} . En un primer model l'entrada de Ca^{2+} extracel·lular s'induiria per formació d'un complex entre el InsP_3R activat, una proteïna G petita unida a GTP (SmG.GTP) i $\text{GAP1}^{\text{IP4BP}}$, mentre que el segon model constituiria un mecanisme homeostàtic d'ompliment dels reservoris, en el qual el seu buidatge degut a l'activació dels InsP_3R induiria un influx de Ca^{2+} a través del receptor-canal de calci $\text{GAP1}^{\text{IP4BP}}$ (Cullen, 1998). Per altra banda, s'ha isolat també una altra proteïna, la GAP1^{m} , que es localitza a la membrana del reticle endoplasmàtic i que podria estar implicada en la mobilització de Ca^{2+} intracel·lular per part de l' Ins1,3,4,5P_4 (Soriano i Banting, 1997).

L'inositol polifosfat 5-fosfatasa desfosforila l' Ins1,3,4,5P_4 a Ins1,3,4P_3 que pot ser desfosforilat a Ins1,3P_2 o Ins3,4P_2 o bé fosforilat a Ins3,4,5,6P_4 . Aquest últim inositol també ha estat proposat com a missatger secundari ja que anàlegs seus no hidrolitzables són capaços d'interrompre la secreció d'anions Cl^- activada per Ca^{2+} a cèl·lules epitelials de colon T84 (Vajanaphanich et al., 1994). Però, a més a més, la fosforilació seqüencial de l' Ins3,4,5,6P_4 dona lloc a l' InsP_6 , que també podria participar en la transducció de senyals intracel·lulars ja que es pot unir amb alta afinitat a moltes proteïnes, com ara la vinculina, component del citoesquelet de les plaquetes; la mielina, que participa en la formació de la mielina; la sinaptotagmina, component del complex de les vesícules sinàptiques que sembla que promou l'exocitosi; les proteïnes AP-2 i AP-3, que promouen la polimerització de la clatrina i per tant participen en el procés d'endocitosi; i el coatomer, que regula el tràfic de vesícules entre el reticle endoplasmàtic i l'aparell de Golgi, entre d'altres (Shears, 1998). Tanmateix, cal fer esment de s'ha suggerit que tan l' Ins3,4,5,6P_4 , com l' Ins1,3,4,5,6P_5 i l' InsP_6 pertanyen a un reservori metabòlic diferent al de l' Ins1,4,5P_3 i els seus derivats més immediats (Menniti et al., 1993).

Finalment dir que a part dels inositol fosfats, la senyalització cel·lular també pot tenir lloc a través de segons missatgers lipídics derivats dels fosfatidilinositols, com ara el PtdIns4,5P_2 i el seu derivat PtdIns3,4,5P_3 . Aquestes macromolècules sembla que transmetrien el senyal a través d'una gran família de proteïnes que contenen dominis PH, pels quals s'unirien específicament al fosfolípid (Bottomley et al., 1998; Erneux et al., 1998; Toker A., 1998).

2.6. Possibles funcions fisiològiques de la PLC

Es creu que l'activació de la PLC i la consegüent regulació de la concentració del Ca^{2+} intracel·lular i activació de la PKC regulen un gran nombre de processos cel·lulars. Aquest sistema de senyalització està present al llarg de tota la vida d'una cèl·lula típica des de la gametogènesi, fertilització, proliferació cel·lular i desenvolupament en les primeres etapes, fins a la diferenciació cel·lular, per tal de realitzar tota una sèrie de funcions precises i ben controlades en una gran varietat de cèl·lules especialitzades, tan vegetals com animals (Berridge, 1993).

A les cèl·lules diferenciades, el sistema $\text{Ins}1,4,5\text{P}_3\text{-Ca}^{2+}$ s'ha adaptat per controlar moltes respostes tals com la contracció en el múscle llis, el metabolisme al fetge i l'acoblament estímul-resposta a moltes cèl·lules secretòries (Berridge, 1993). Per altra banda, sembla que en moltes cèl·lules diferenciades l'activació de la PLC i les seves posteriors respostes cel·lulars de mobilització de Ca^{2+} i activació de la PKC, podrien contribuir a una seqüència d'esdeveniments que culminaria en la síntesi de ADN, especialment en cèl·lules com els limfòcits, cèl·lules del fetge i cèl·lules gials. Adicionalment, hi ha algunes evidències que podrien suggerir que aquest sistema de transducció del senyal podria estar implicat en la inducció de les cèl·lules a esdevenir tumorals. Així l'expressió d'una subunitat de les proteïnes $\text{G}\alpha_q$ mutada, augmenta l'activitat PLC i transforma les cèl·lules NIH 3T3 (De Vito et al., 1992) i s'ha pogut induir tumorigènesi en moltes cèl·lules després de transfectar determinats receptors acoplats a la PLC (Julius et al., 1989; Gutkind et al., 1991). A més a més, en un alt percentatge de carcinomes primaris de mama humans presenten nivells alts de receptors del factor de creixement EGF i de PLC- γ , fet que aporta evidències clares per una amplificació d'aquesta via de senyalització intracel·lular (Arteaga et al., 1991).

La vinculina i l' α -actina són dos components del citoesquelet que poden unir-se al $\text{PtdIns}4,5\text{P}_2$. En cèl·lules Balb/c 3T3 s'ha observat que aquestes unions disminueixen en resposta a l'activació de la PLC- γ pel factor de creixement PDGF i que alhora hi ha una bona correlació amb la desunió d'aquestes cèl·lules de la placa de cultiu i amb desorganització dels filaments d'actina (Fukami et al., 1994), i per tant, s'ha suggerit que l'activació de la PLC- γ_1 mitjançada per proteïno quinases provoca una reorganització del citoesquelet (Lee i Rhee, 1995).

Per altra banda, estudis amb rates espontàniament hipertensives suggereixen una activació anormal de la PLC- $\delta 1$ com a una de les causes per a la hipertensió. Es creu que hi ha una mutació puntual entre les regions X i Y del gen de la PLC- $\delta 1$ (Yagisawa et al., 1991; Kato et al., 1992).

L'importància funcional dels diferents isoenzims de la PLC també ha estat mostrada al cervell. D'aquests aspectes s'en parla a l'apartat 2.7.2 de la introducció.

2.7. Estimulació de la PLC per neurotransmissors a teixit cerebral.

La transducció de senyals intracel·lulars per hidròlisi dels fosfoinosítids ha estat intensament estudiada durant les últimes dècades, posant un gran èmfasi en el sistema nerviós central (SNC). A l'actualitat es coneixen un gran nombre de neurotransmissors, pèptids i factors de creixement que activen la PLC al cervell, tan en neurones com en cèl·lules no neuronals. En aquest sentit, la quantificació de l'activitat fosfolipasa C ha permès classificar els receptors acoblats a proteïnes G del teixit nerviós en dos grans grups. Un primer grup generaria una magnitud de resposta elevada mentre que l'altre grup estaria format per aquells receptors que induirien una petita estimulació d'aquest sistema efector i només en algunes preparacions (Fisher et al., 1992). Entre els primers cal destacar els receptors muscarínics m_1 i m_3 de l'acetilcolina, els metabotròpics del glutamat $mGluR_1$ i $mGluR_5$, els de l'endotelina ET_A i ET_B , els adrenèrgics α_{1A} i α_{1B} , els histaminèrgics H_1 i els serotoninèrgics $5-HT_{2A}$, $5-HT_{2B}$ i $5-HT_{2C}$. Al segon grup, hi pertanyen els receptors purinèrgics P_2 , els dels prostanoids i receptors de molts pèptids (angiotensina, bradiquinina, vasoprenina, etc.).

Tanmateix, encara queden molts aspectes per aclarir. Així, si bé recentment s'ha establert l'expressió dels diferents isoenzims de la PLC al cervell i s'està avançant ràpidament en l'estudi de les implicacions fisiològiques de la PLC en aquest teixit, el coneixement dels complexos i heterogenis mecanismes de regulació de la PLC està encara en els seus passos inicials. En aquesta tesi s'aporten dades que mostren com dos receptors acoblats a proteïnes G, els muscarínics de l'acetilcolina i els metabotròpics del glutamat, activen a la PLC per dos mecanismes amb característiques diferenciades. Per tant, deixo per a la discussió, el parlar de l'activació i mecanismes de regulació de la PLC al SNC i em centro en donar els trets més importants sobre l'expressió dels diferents isoenzims de la

PLC i el paper fisiològic d'aquesta via de senyalització al SNC.

2.7.1. Expressió la PLC al teixit nerviós

El patró d'expressió dels diferents isoenzims de la PLC a mamífers només ha estat ben caracteritzat al cervell. En aquest teixit, les formes predominants, PLC- β_1 , - β_3 i - β_4 , tenen un patró específic de distribució. Així la PLC- β_1 té una expressió elevada a l'escorça cerebral, a l'hipocamp, a l'amígdala, al septum lateral i al bulb olfatori, però s'expressa poc al cerebel. Per contra es troben nivells alts de la PLC- β_4 al cerebel, al tàlam i al septum medial i nivells negligibles a l'escorça cerebral i a l'hipocamp. L'expressió de la PLC- β_3 és baixa a tot el cervell amb l'excepció de les cèl·lules de Purkinje de cerebel.

Per altra banda, els ARNm de la PLC- β_2 han estat detectats per hibridació *in situ* a la matèria blanca del cervell i altres estudis han trobat expressió dels dos subtipus de la PLC- γ a la majoria de cèl·lules de tipus neuronal del cervell i PLC- δ_1 i PLC- δ_2 a cèl·lules glials (Majerus et al., 1990; Rhee et al., 1991; Kim et al., 1997; Watanabe et al., 1998).

2.7.2. Possibles funcions fisiològiques de la PLC al sistema nerviós

El sistema nerviós és ric en els components dels mecanismes de senyalització intacel·lular per activació de la PLC, però les funcions fisiològiques dels segons missatgers Ins1,4,5P₃ i DAG han estat i són difícils d'establir.

Hi ha evidències experimentals que impliquen la hidròlisi dels fosfoinosítids en la percepció sensorial, tan en el tast en cèl·lules de mamífer (Hwang et al., 1990), l'olfacte en insectes, crustacis i peixos (Breer et al., 1990; Fadool i Ache, 1992; Restrepo et al., 1990) com en la fotorecepció en invertabrats (Minke i Selinger, 1992), però també es creu que l'activació de la PLC està implicada en la neuromodulació i en la plasticitat sinàptica. Així s'ha proposat que els receptors metabotrópics del glutamat (mGluRs) utilitzen els senyals derivats dels fosfoinosítids per a modular l'activitat neuronal i la plasticitat neuronal responsable de la memòria (Henzi i MacDermott, 1991) i també com a mecanisme de regulació 'feedback' positiu per augmentar l'alliberació de glutamat (Herrero et al., 1992). A més a més, s'ha suggerit l'activació de la PLC com a mecanisme a través del qual el sistema colinèrgic augmenta l'activitat sinàptica (Berridge et al., 1989; Berridge, 1993) i s'ha apuntat que la pèrdua de memòria amb l'edat podria estar relacionada amb una

disminució de l'activitat PLC estimulada per receptors muscarínics de l'acetilcolina (Berridge 1993). En aquest sentit també s'ha implicat la PLC com a mediador de la neurotoxicitat induïda pel pèptid β -amiloid en la malaltia de l'Alzheimer. Així, s'ha vist que no només en el teixit cerebral postmortem de malalts d'Alzheimer el contingut dels fosfolípids a la membrana plasmàtica està reduït i el dels productes del seu metabolisme incrementat (Wallace, 1994; McClure et al., 1995), sino que a més el pèptid β -amiloid pot activar la PLC en cèl·lules LA-N-2 en cultiu (Singh et al., 1997), en cèl·lules diferenciades de cervell de ratolí (Hartmann et al., 1996) i en plaquetes humanes (Ishikawa et al., 1998). La hipòtesi seria que el pèptid β -amiloid induïria una activació substinguda de la PLC, PLD i PLA₂ que contribuïria a la neurodegeneració característica de la malaltia d'Alzheimer i que els efectes benéficos dels compostos NSAIDs, la nicotina i potser altres molècules es podria explicar per la seva habilitat a reduir l'activació de les fosfolipases per l'esmentat pèptid (Kanfer et al., 1998). Per altra banda, recentment, s'ha suggerit que els receptors metabotròpics del glutamat del grup I redueixen l'apoptosi que el pèptid β -amiloid induïx a les neurones corticals i granulars de cerebel en cultiu, a través d'un mecanisme que implicaria l'activació de la PLC i la modulació de la concentració de Ca²⁺ citoplasmàtic (Allen et al., 1999).

També s'ha descrit que en miniprismes d'hipocamp, l'activació de la PLC és un pas necessari per la inducció de la depressió a llarg termini (LTD, *long-lasting depression*), fenomen pel qual hi ha una disminució de la transmissió sinàptica (Reyes-Harde i Stanton, 1998).

Recentment, s'han utilitzat ratolins transgènics per estudiar la impotència funcional de diferents isoenzims de la PLC. Així, ratolins amb una mutació nul·la de la PLC- β 1 o PLC- β 4 presenten epilèpsia i ataxia respectivament (Kim et al., 1997). Ambdós fenotips es troben també en ratolins deficients amb el tipus I del InsP₃R (Matsumoto et al., 1996).

Finalment, dir que també s'han implicat enzims del metabolisme de l'Ins1,4,5P₃ en determinades patologies del sistema nerviós. Així, els pacients amb el síndrome oculocerebrorenal de Lowe (OCRL) que es caracteritza per catarates congènites, retard mental i síndrome renal Fanconi, tenen l'activitat PtdIns4,5P₂ 5-fosfatasa disminuïda en els fibroblasts, fet que suggereix que en condicions normals els nivells de PtdIns4,5P₂ estan molt regulats i que aquest control té conseqüències importants en el funcionament normal de les cèl·lules (Zhang et al., 1998; Erneux et al., 1998).

3. Homoestasi del Ca^{2+}

La concentració de calci al citosol de les cèl·lules ($[\text{Ca}^{2+}]_c$) està finament regulada, essent en condicions no estimulades de l'ordre de 50-150 nM. Aquesta concentració es manté constant gràcies a mecanismes de tamponació i difusió en els quals hi participen proteïnes quelants de calci, canals de calci de diferent naturalesa a la membrana plasmàtica i a la membrana de diferents compartiments intracel·lulars, l'intercanviador Na^+ - Ca^{2+} també a la membrana plasmàtica, diferents Ca^{2+} -ATPases que bombegen el calci des del citosol a l'exterior cel·lular (ATPases plasmàtiques) i a dins de reservoris intracel·lulars de Ca^{2+} , etc.

L'activació de la cèl·lula per part d'un estímul extern provoca sovint un augment de la concentració de Ca^{2+} citosòlic ($[\text{Ca}^{2+}]_c$) amb característiques espaials i temporals determinades i que s'anomena senyal de Ca^{2+} . Existeixen dos mecanismes principals que indueixen aquest augment de la $[\text{Ca}^{2+}]_c$: una entrada de Ca^{2+} extracel·lular o una mobilització de Ca^{2+} intracel·lular (alliberació i recaptació de Ca^{2+} per part de reservoris intracel·lulars de Ca^{2+}). Aquests dos fenòmens es poden donar alhora, seqüencialment o per separat, depenent de l'estímul que arriba a la cèl·lula i del tipus cel·lular on es produeix. Anem a analitzar ambdós processos, posant atenció en els elements participants.

3.1. Entrada de Ca^{2+} extracel·lular

Existeixen una gran varietat de mecanismes per a l'entrada de Ca^{2+} extracel·lular a través de la membrana plasmàtica que difereixen entre tipus cel·lulars i, en una mateixa cèl·lula, entre els diferents estímuls que indueixen aquests influxos. Malgrat que alguns d'aquests mecanismes es coneixen força bé, falta encara aclarir molts aspectes, fet que ha portat a una gran diversitat entre diferents autors a l'hora de classificar i anomenar els diferents canals de Ca^{2+} de la membrana plasmàtica.

Així les entrades de Ca^{2+} més ben caracteritzades són les que tenen lloc en cèl·lules excitable a través de canals que s'obren com a conseqüència d'una

despolarització cel·lular, els VOCs (*voltatge-operated channels*). L'entrada de Ca^{2+} , però, es pot realitzar a través d'altres canals, com ara els receptors-canals, proteïnes integrals de membrana amb característiques de receptor i canal en una sola entitat. Aquestes, recentment han anomenat per molts autors ROCs (*Receptor-operated channels*) tot i que també reben el nom d' IRCC (*ionotropic receptor Ca^{2+} channels*). Una altra via d'entrada de Ca^{2+} extracel·lular es produeix a través de canals de Ca^{2+} que són oberts per activació de receptors i a través de diferents factors intracel·lulars. Aquests canals són poc coneguts encara, però sempre s'ha considerat de que constitueixen un important grup de canals de Ca^{2+} amb diferent especificitat, característiques i mecanismes d'activació i regulació. Així, mentre alguns autors es refereixen a ells de forma generalitzada utilitzant la nomenclatura SMOC (*second messenger-operated channels*) (Taylor, 1995; Bolsover et al., 1999), altres autors en distingeixen subgrups, fent distincions entre els canals que s'activen per acció de segons missatgers, com ara $\text{Ins}1,4,5\text{P}_3$ o $\text{Ins}1,3,4,5\text{P}_4$, i que anomen SMOCs i altres canals activats per proteïnes G, que anomen GOCs (*G protein-operated channels*) (Fasolato et al., 1994). També existeixen canals de Ca^{2+} a la membrana plasmàtica que són regulats per l'estat d'ompliment dels reservoris intracel·lulars de Ca^{2+} , de manera que s'activen quan aquests últims es buiden o tenen nivells de Ca^{2+} molt baixos. Aquests canals reben el nom de SOC (*store-operated channels*) tot i que fins fa poc alguns autors també es referien a ells com a CRACs (*Ca^{2+} -release activated channels*), nom dels primers canals d'aquest tipus que van ser caracteritzats en limfocits i mastòcits (Fasolato et al., 1994; Meldonesi i Pozzan, 1998). Els canals SOC són activats i regulats per diferents mecanismes, molt poc coneguts encara, però que contempnen diferents factors intracel·lulars. És per això que recentment alguns treballs han agrupat els canals SOC i els SMOC en un únic grup que han anomenat RACCs (*receptor-activated Ca^{2+} channels*) (Barritt, 1999). Finalment, cal dir que el Ca^{2+} extracel·lular pot entrar a les cèl·lules a través de canals catiónics no selectius regulats per una àmplia gama de missatgers intracel·lulars, com la PKC, el DAG, l' $\text{Ins}1,3,4,5\text{P}_4$, l' $\text{Ins}1,4,5\text{P}_3$ i el mateix Ca^{2+} (Loirand et al., 1991; Lückhoff i Clapham, 1992; Oike et al., 1993; Helliwell i Large, 1997).

Tot seguit s'analitzen les característiques i els mecanismes d'activació dels canals específics de Ca^{2+} , utilitzant la següent nomenclatura:

- VOCs: canals de Ca^{2+} dependents de voltatge, és a dir que s'obren per despolarització de la membrana plasmàtica.
- ROCs: receptors-canals de Ca^{2+} , activats per un estímul extern que s'uneix a ells.
- SMOCs: canals de Ca^{2+} que s'obren per activació d'un receptor i a través de diferents mecanismes que exclouen la despolarització.
- SOCs: canals de Ca^{2+} que s'obren per diferents mecanismes induïts pel buidament dels reservoris intracel·lulars de Ca^{2+} , en especial el reticle endoplasmàtic (ER, *endoplasmatic reticulum*).

3.1.1. VOCs: canals de Ca^{2+} dependents de voltatge

Els canals de calci dependents de voltatge són entitats moleculars presents a la membrana plasmàtica de molts teixits excitable, i en especial el SNC. Les característiques electrofisiològiques i farmacològiques permeten classificar-los en diferents tipus dividits en dues famílies, tot i que les tècniques de clonació han dotat de complexitat la seva classificació (Zhang et al., 1993). Els canals activats per alt voltatge són els de tipus L, N, P, O, Q i R, mentre que el de tipus T és estimulat per baix voltatge (Tareilus i Breer, 1995). Els primers en ser caracteritzats varen ser els canals L, sensibles a dihidropiridines i els N i T insensibles a aquests compostos orgànics però sí a diferents toxines (Nowycky et al., 198). Així, el de tipus N és sensible a les toxines w-conotoxina CVIA (w-CTx-GVIA) i w-CTx-MVVIC. Aquesta última, a més, bloqueja, amb diferent afinitat, els canals de tipus P, Q i O, també modulats negativament per w-agarotoxina-IVA (w-Aga-IVA) (Mijanich i Ramachandran, 1995). Aquests dos últims canals no estan molt ben caracteritzats així com el canal R, identificat com el current que resta quan es coapliquen alhora les dihidropiridines i les toxines esmentades (Graham and Burgoyne, 1995). De totes maneres alguns autors troben altres solapaments en l'acció d'aquestes toxines sobre els VOCs (Pearson et al., 1995).

Per altra banda, aquests tipus de canals difereixen considerablement en la seva resposta a neuromoduladors, en la seva distribució en les diferents poblacions neuronals i la seva localització en una mateixa cèl·lula (Randall and Tsien, 1995). Alguns autors

creuen que els mateixos estímuls que estimulen la PLC poden modular els VOCs. Així, recentment s'ha descrit, a neurones granulars de cerebel, l'activació dels receptors metabotrópics del glutamat del grup I acoblada a una proteïna G insensible a la toxina pertussis i capaç de promoure, de manera no determinada, una interacció directe entre un canal de calci dependent de voltatge, del tipus L, i el receptor intracel·lular de rianodina (Chavis et al., 1996). Sense cap dubte, aprofundir en l'estudi d'aquesta interacció i la seva relació amb l'activació de la PLC és de gran importància, ja que fins ara la interacció entre receptors de rianodina i canals de calci dependents de voltatge només es coneixia en l'acoblament excitació-contracció del teixit muscular i en sistemes neuronals només es coneixia una modulació negativa dels VOCs per part receptors de neurotransmissors mitjançada per proteïnes $G_{i/o}$ (Scott et al., 1992; Tareilus et al., 1995).

3.1.2. ROCs: receptors-canals de Ca^{2+}

Hi ha diferents proteïnes amb funció de canals de Ca^{2+} i receptor alhora. Així, la unió d'un lligand específic a aquesta proteïna integral de membrana produeix un canvi conformacional que permet l'obertura del canal i, per tant, l'entrada de Ca^{2+} a la cèl·lula. Al SNC, els ROCs més importants són els receptors nicotíncs de l'acetilcolina, els ionotrópics del glutamat, els receptors d'ATP P_{2x} , i els receptors de serotonina 5-HT₃ (Taylor, 1995).

3.1.3. SMOCs: canals de Ca^{2+} activats per receptors i a través diferents mecanismes intracel·lulars

Es desconeix la identitat dels canals SMOC responsables de l'entrada de Ca^{2+} en molts tipus cel·lulars, com tampoc es coneix molt bé els mecanismes concrets de la seva activació. Hi ha evidències de que en cèl·lules no excitablels aquests canals poden ser oberts per l'acció de cGMP (Finn et al., 1996), cAMP (Finn et al., 1996; Lenz i Kleineke, 1997), Ins1,4,5P₃ (Kuno i Gardiner, 1987; Khan et al., 1996), àcid araquidònic o un dels seus metabolits (Peppelenbosch et al., 1992; Shuttleworth, 1996; Munaron et al., 1997; Broad et al., 1999) i potser Ins1,3,4,5P₄ (Irvine i Moor, 1986).

El problema més gran en l'estudi d'aquests receptors és el fet de que no sempre és fàcil distingir influxes de Ca^{2+} originats SMOCs o pels canals de Ca^{2+} SOC, comentats en

l'apartat següent (Clementi i Meldonesi, 1996; Barritt, 1999). L'ús de diferents concentracions del ió Gd^{3+} permet observar l'obertura d'ambdós tipus de canals de manera independent (Board et al., 1999), tot i que, en algunes cèl·lules, aquests dos processos són indistingibles (Takemura et al., 1989; Demaurex et al., 1994; Madge et al., 1997).

3.1.4. SOC: canals de Ca^{2+} activats per buidament del ER

L'entrada de Ca^{2+} induïda pel buidament dels reservoris intracel·lulars, anomenada entrada capacitativa de Ca^{2+} , va ser descrita per primera vegada per Putney a finals dels anys 80 i principis dels 90 (Putney, 1986, 1990). Posteriorment, experiments de patch-clamp van mostrar, en limfòcits i mastocits, corrents de Ca^{2+} induïdes per buidament dels reservoris intracel·lulars que anomenaren I_{crac} i conseqüentment es batejaren els canals responsables com a CRACs (Hoth i Penner). La mateixa tècnica va permetre, més tard, detectar en altres tipus cel·lulars canals de Ca^{2+} responsables també de l'entrada capacitativa de Ca^{2+} amb característiques similars, però no idèntiques, a les dels CRACs (Fasolato et al., 1994; Barritt, 1999). Més recentment, s'ha clonat un primer gen que codificava un canal de Ca^{2+} capaç d'induir corrents de Ca^{2+} activats per depleció dels reservoris intracel·lulars, el gen *trp* de *Drosophila* (Hardie R.C. i Minke B, 1993). Gens homòlegs a aquest, s'han pogut identificar en *Xenopus* (Petersen et al., 1995), ratolí (Petersen et al., 1995; Zhu et al., 1996) i humà (Wes et al., 1995; Zitt et al., 1996; Zhu et al., 1996). Es creu que aquest gens codifiquen per proteïnes hetero- o homooligomèriques que han estat postulades com a possibles SOCs (Montell, 1997; Zhu i Birnbaumer, 1998).

Nombrosos segons missatgers han estat proposats com a activadors dels canals SOCs, incluint proteïnes G petites de la família Rab, proteïnes G heterotrimèriques sensibles a la toxina pertussis, cGMP, un producte del citocrom P450, $Ins1,4,5P_3$, $Ins1,3,4,5P_4$ (veure apartat 2.5.3 de la introducció), diferents lípids i fosforilacions per tirosino quinases (Fasolato et al., 1994; Clapham, 1995). Tanmateix a l'actualitat encara no existeixen evidències definitives per cap d'aquests mecanismes d'activació dels SOC. La hipòtesi més acceptada contempla la formació d'un factor citoplasmàtic capaç d'induir entrada de Ca^{2+} i que s'ha nomenat CIF (*Ca²⁺ influx factor*) (Randriamampita and Tsien, 1993). El CIF és un factor de baix pes molecular (< 500 Da), parcialment lipofílic i fosforilat que s'alliberaria del RE quan aquest es buida i que difon a la membrana plasmàtica activant els SOCs. (Parekh et al., 1993; Clapham, 1994; Davies i Hallett, 1995).

Finalment, existeix la possibilitat que els canals SOC s'obrin per interacció directa amb el domini citoplasmàtic del InsP_3R (Irvine, 1990). Aquest model conformacional és anàleg al que s'ha proposat per descriure l'alliberament de Ca^{2+} induït per despolarització en el múscle esquelètic. Així, com a resultes d'un buidament del ER, el receptor InsP_3R , més probablement el de tipus 3 (Berridge, 1995), experimenta un canvi conformacional que és transmès als SOCs de la membrana plasmàtica induint l'entrada de Ca^{2+} extracel·lular (Berridge, 1997). Perquè aquest model d'acoblament per canvi conformacional tingui lloc és necessari que almenys part del RE es localitzi a no més de 10 nm de la membrana plasmàtica, fet que ja s'ha demostrat per algunes cèl·lules com en oòcits de *Xenopus* (Gardner i Grey, 1983) i *Drosophila* (Walz, 1982).

Cal fer esment que es creu que poden existir més d'un subtipus de SOC en un mateix tipus cel·lular i que els diferents mecanismes d'activació proposats no han de ser exclusius, és a dir, podrien donar-se alhora o per separat, depenent de l'estímul, en una mateixa cèl·lula (Fasolato et al., 1994; Clapham 1995; Barritt, 1999).

3.1.5. Mecanismes per l'exclusió de Ca^{2+} de la cèl·lula

Per tal de regular finament la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ les cèl·lules també poseeixen elements moleculars amb funcions contràries a les descrites fins ara, és a dir, per enviar Ca^{2+} citoplasmàtic a l'espai extracel·lular i que s'activarien sobretot davant influxos de Ca^{2+} sustinguts. Es tracta de l'intercanviador $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$, responsable d'un antitransport actiu secundari, i les Ca^{2+} -ATPases de la membrana plasmàtica (PMCA, *plasmatic membrane Ca^{2+} ATPase*). Existeixen quatre gens que codifiquen per aquestes últimes: PMCA1,2,3 i 4, que alhora presenten variants d' 'splicing', i que codifiquen per proteïnes amb deu dominis transmembranals i amb els extrems N- i C-terminal situats al citoplasma cel·lular. Existeixen dos llaços citosòlics entre els dominis transmembranals molt llargs i que juntament amb l'extrem C-terminal, també de grans dimensions, presenten llocs de regulació per diferents factors com ara la calmodulina, proteïno quinasses, proteases, fosfolípids àcids i possiblement proteïnes G (Montheith i Roufogalis, 1995). L'expressió de les diferents PMCA és ubiqüa i molt generalitzada. En neurones s'ha trobat expressió de tots els isoenzims, essent els majoritaris el PMCA2 i PMCA3. L'expressió d'aquests isoenzims és depenent del desenvolupament (Guerini et al., 1999).

3.2. Mobilització de Ca^{2+} intracel·lular

3.2.1. El reticle endoplasmàtic. SERCAs, InsP_3Rs i RyRs .

El reticle endoplasmàtic (RE) és considerat com el reservori intracel·lular de Ca^{2+} més important i ben caracteritzat, especialment en neurones (Berridge, 1998). Es tracta d'un compartiment intracel·lular amb aspecte de xarxa membranosa que s'extén al llarg de tota la cèl·lula, tal i com han demostrat estudis de microscopia convencional (Droz et al., 1975; Martone et al., 1993) i estudis per difusió de colorant lipofílic fluorescent (Terasaki et al., 1994).

La concentració de Ca^{2+} que conté (Ca^{2+} luminal) és difícil de quantificar, essent els valors de la literatura molt depenents de la tècnica utilitzada (Meldonesi i Pozzan, 1998). Tot i així, es creu que el RE conté una concentracions de Ca^{2+} de 1-10 μM en la majoria de cèl·lules i que aquest es pot intercanviar molt ràpidament amb el Ca^{2+} del citosol. Gran part d'aquest Ca^{2+} luminal està unit a proteïnes amb baixa afinitat pel Ca^{2+} , com ara la calreticulina i algunes xaperones. En condicions de repòs d'una cèl·lula, la concentració de Ca^{2+} luminal es manté més o menys constant, però no es tracta d'una situació estàtica, sinó d'un equilibri entre un continu vessament (procés pel qual el Ca^{2+} passa de dins el RE al citosol cel·lular) i un continu ompliment (procés contrari a l'anterior) (Alvarez et al., 1999).

Els elements del RE responsables de l'ompliment de Ca^{2+} , són les SERCAs (*sarcoplasmic-endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPases*), unes proteïnes transmembrana que actuen com a bombes de Ca^{2+} , transportant 2 ions de Ca^{2+} citosòlics a dins del REgràcies a la hidròlisi d'una molècula d'ATP. La seva estructura, que es coneix gràcies a estudis de mutagènesi dirigida i a estudis de microscopia electrònica d'alta resolució, consisteix en un llarg domini citoplasmàtic amb activitat ATPasa i deu dominis transmembrana que formen un canal de transport de Ca^{2+} (Toyoshima et al., 1993; Clapham, 1995). Existeixen tres productes gènics, SERCA1, SERCA2 i SERCA3, que alhora presenten variants d'*'splicing'*. Al SNC només s'expressen la SERCA2b i la SERCA 3 (Pozzan et al., 1994; Wu et al., 1997).

L'alliberació de Ca^{2+} del RE té lloc a través de dos receptors-canals de Ca^{2+} , InsP_3R i el receptor de rianodina. Ambdós comparteixen característiques estructurals i funcionals. Així presenten homologies en l'estructura primària i són regulats tan per la

$[Ca^{2+}]_c$ com per la concentració de Ca^{2+} luminal (Berridge, 1997; Alvarez 1999). Aquests receptors, $InsP_3R$ i RyR , coexisteixen en molts tipus cel·lulars, però hi ha molta controvèrsia sobre la seva presència en un mateix o en separats reservoris de Ca^{2+} , ja que es coneixen pocs detalls de la distribució subcel·lular precisa d'aquests receptors.

Els $InsP_3R$ formen homo- o heterotetràmers de 305-313 kDa. Cada subunitat presenta varis segments transmembranals al seu domini carboxílic que constitueixen un canal de calci al centre del receptor i presenta un extrem N-terminal ric en Pro i Arg que forma un cap que es projecte al citosol cel·lular i que integra els diferents senyals que controlen l'obertura i el tencament del canal. Així, en aquest domini es troba el lloc d'unió a l' $Ins1,4,5P_3$, principal lligand d'aquest receptor-canal (Mikoshiya, 1997). El canal de Ca^{2+} i el domini N-terminal es troben units per un domini modulador, on exerceixen la seva funció reguladora diferents factors, com ara la PKC i PKA, la quinassa II dependent de Ca^{2+} /calmodulina i la calpaina, una proteasa activada per calci i semblaria que presenta un possible lloc d'unió a ATP (Michelangeli et al., 1995; Simpson et al., 1995). Es coneixen almenys quatre isoenzims del $InsP_3R$, que alhora presenten variants d' *'splicing'*. A mamífers es presenten els $InsP_3R$ de tipus 1,2,3, essent el primer predominant en el SNC. Tots tres es caracteritzen per elevar el calci citosòlic (fins a una concentració que pot arribar a ser de més d'1 μM) i per tenir una acció ràpida, però es diferencien en la sensibilitat a $Ins1,4,5P_3$.

La modulació de l' $InsP_3R$ per part del Ca^{2+} citosòlic és bifàsica o com a vegades es prefereix dir, en forma de campana, ja que es produeix una potenciació de l'obertura del canal a $[Ca^{2+}]_c$ baixes (per sota d' 1-2 μM) i una inhibició a $[Ca^{2+}]_c$ altes. Cal remarcar, però, que el Ca^{2+} per si sol no pot obrir els $InsP_3R$, sinó que només pot actuar després de la unió d' $Ins1,4,5P_3$. També cal tenir present que tot i que hi ha pocs dubtes sobre aquests efectes del Ca^{2+} citosòlic sobre els receptors d' $Ins1,4,5P_3$ en molts teixits, no es tracta d'un procés ubiqüo, ja que en alguns teixits no s'ha pogut descriure aquest efecte (Taylor, 1998).

Els RyR varen ser inicialment identificats en el múscul cardíac i esquelètic però posteriorment s'han trobat a molts altres teixits. Actualment, es coneixen tres gens que codifiquen per $RyRs$, localitzant-se tots ells al SNC, tot i que fins fa poc es pensava que només el de tipus 3 era present al cervell (Furuichi et al., 1994). Són també tetràmers proteics formats per subunitats de 550-565 kDa, capaços de conduir quantitats de Ca^{2+} de quatre a deu vegades superiors que els receptors d' $Ins1,4,5P_3$. Els RyR s'activen per increments globals en la $[Ca^{2+}]_c$ o per acumulació local de Ca^{2+} , ja sigui degut a l'entrada

de Ca^{2+} extracel·lular o com a conseqüència de l'alliberació de Ca^{2+} a través dels InsP_3R després de la formació d' $\text{Ins}1,4,5\text{P}_3$ per estimulació de la PLC. L'activació dels RyR permet, per tant, l'alliberament de Ca^{2+} luminal induït per Ca^{2+} (CICR, *Ca²⁺-induced Ca²⁺ release*). Tot i així, altes $[\text{Ca}^{2+}]_c$ molt altes (per sobre de 100 μM) produeixen un efecte inhibitori sobre aquest receptor-canal (Alvarez et al., 1999). A més a més, cal dir que hi ha evidències de que l'ADP ribosa cíclica podria actuar com a lligand del RyR, potenciant la sensibilitat d'aquests receptors pel Ca^{2+} (Berridge, 1998) i pot ésser modulats per Mg^{2+} i ATP (Clapham, 1995).

L' InsP_3R i el RyR poden ser regulats per proteïnes citosòliques. En són exemples la calmodulina, les proteïnes FKBP i les proteïno quinases PKA, PKC, PKG (proteïno quinasa dependent de cGMP) i la CaMKII (proteïno quinasa dependent de calmodulina de tipus II). Tot i així es desconeix si aquestes regulacions són universals i es coneixen molt poc els mecanismes pels quals es duen a terme (Mackrill, 1999).

L'efecte moduladori per part del Ca^{2+} luminal sobre els InsP_3R i RyR és encara menys conegut, i conseqüentment ha estat motiu de controvèrsia. Molts treballs donen suport a la idea de que el contingut de Ca^{2+} dels reservoris intracel·lulars de Ca^{2+} , i en especial el ER, regula la sensibilitat del InsP_3R per a l' $\text{Ins}1,4,5\text{P}_3$. Aquesta observació, però, no és universal (Taylor et al., 1998). El problema més gran, tanmateix, és determinar si aquests efectes del Ca^{2+} luminal són mitjançats per una unió directa del Ca^{2+} als InsP_3R i/o als RyR dintre del mateix RE o bé si exerceix el seu efecte a dominis citosòlics després del seu pas a través del receptor-canal obert (Taylor i Traynor, 1995). Altres possibilitats serien que el Ca^{2+} luminal exercís la seva funció a través de proteïnes luminals o integrals de membrana del RE (Mackrill, 1999). Així aquesta regulació podria donar-se per actuació sobre les calsequestrines (Gilchrist et al., 1992) o l'anexina IV (Diaz-Muñoz et al., 1990) unides al RyR, o bé per una interacció dependent de Ca^{2+} entre un domini luminal del InsP_3R i una molècula de calreticulina (Camacho i Lechleiter, 1995; Krause i Michalak, 1997; Berridge 1997) o una molècula de chromogranina A (Yoo, 1994; Yoo i Lewis, 1995). És evident, per tant, que encara es coneix poc sobre aquests mecanismes, tot i que es pot dir, com a corolari general, que concentracions baixes de Ca^{2+} dins del RE limitarien l'alliberació de Ca^{2+} a través d'ambdós receptors, evitant així la depleció total del RE, fet que pot afectar a una gran diversitat de funcions cel·lulars. Entre aquestes es troba la inhibició de la síntesi proteica per fosforilació del factor d'iniciació 2α , la inducció de l'expressió de moltes proteïnes relacionades amb respostes d'estrès, i el bloqueig de

l'activitat de la xaperona BiP que assegura un correcte plegament de les proteïnes sintetitzades de novo destinades a l'aparell de Golgi o a estructures membranoses posteriors. El tràfic membranal entre els diferents compartiments del RE i l'aparell de Golgi es veu també afectat per concentracions de Ca^{2+} luminal baixes, així com el transport nucleo-citoplasmàtic de proteïnes amb massa molecular superior als 500 kDa, ja que es produeix una disminució del diàmetre dels porus nuclears (Meldonesi i Pozzan, 1998; Alvarez et al., 1999). A més a més, no cal oblidar-se de que una depleció dels reservoris intracel·lulars de Ca^{2+} indueix una entrada de Ca^{2+} extracel·lular a la cèl·lula per entrada capacitativa de Ca^{2+} (veure apartat 3.1.4 de la introducció).

Finalment, dir que estudis moleculars han mostrat l'existència d'heterogeneïtat en la distribució de diferents components de la maquinària del RE responsable de la captura, unió i alliberació de Ca^{2+} , tot i que es desconeix si té impotència en la funció d'enmagatzament de Ca^{2+} o en una possible diversitat funcional en diferents regions regional diferencial (Pozzan et al., 1994). A més a més, d'aquesta heterogeneïtat, s'ha proposat que en algunes cèl·lules altres elements, com ara bombes de Ca^{2+} insensibles als inhibidors clàssics de les SERCAs, podrien estar presents en aquest orgànul (Bian et al., 1991, Chen et al., 1993). Per altra banda experiments de fraccionament subcel·lular han mostrat l'existència d'una fracció microsomal, suposadament un subcompartiment del RE, amb un contingut de Ca^{2+} insensible als estímuls que activen els InsP_3R , RyR i les SERCAs (Nori et al., 1993; Hussain et al., 1995; Pizzo et al., 1997).

3.2.2. Altres compartiments subcel·lulars

Diferents estudis han demostrat com en condicions de repòs la concentració de Ca^{2+} dins de les mitocondries és del mateix ordre que la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ (Brini et al., 1997; Rizzuto et al., 1998). Per tant, aquests orgànuls intracel·lulars no són reservoris de Ca^{2+} en condicions de repòs i conseqüentment no poden alliberar Ca^{2+} davant d'un estímulo extracel·lular. De totes maneres, les mitocondries poden recaptar Ca^{2+} quan es produeixen increments en la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ (Alvarez et al., 1999), tot i que degut a la baixa afinitat de la mitocondria per la recaptura de Ca^{2+} citosòlic, aquests increments han de ser superiors a 1 μM . Per tant, es considera que les mitocondries no poden detectar elevacions globals de la $[\text{Ca}^{2+}]_c$, que no són massa grans, però sí que poden respondre a senyals locals que es produeixen aprop de llocs d'alliberació de Ca^{2+} (Rizzuto et al., 1993; Lawrie et al., 1996;

Berridge, 1997). A més a més, cal dir que en algunes cèl·lules les mitocondries són capaces de distingir l'origen dels ions de Ca^{2+} , ja que poden recaptar Ca^{2+} que provingui d'un influx de Ca^{2+} extracel·lular però no Ca^{2+} que s'alliberi del RE (Verkhratsky i Petersen, 1998). Es conclou per tant que les mitocondries participen en l'homeostasi del Ca^{2+} , recaptant Ca^{2+} del citosol cel·lular durant una senyal fisiològica en molts tipus cel·lulars (Duchen, 1999).

De totes maneres no es pot oblidar que les mitocòndries exerceixen un gran nombre de processos bioquímics, i que per tant, és lògic pensar que l'augment en la concentració de Ca^{2+} dins d'aquests orgànuls pot tenir implicacions metabòliques importants. Així, s'ha demostrat que aquest augment indueix disfuncions metabòliques importants que podrien portar a una mort cel·lular programada, apoptosi (Duchen, 1999).

Els processos pels quals les mitocondries capten i alliberen Ca^{2+} són diferents als del ER. Així, en aquest cas, es capta Ca^{2+} per un gradient electroquímic a través d'un unitransportador de Ca^{2+} . Aquest influx de Ca^{2+} és conduit a través de la membrana mitocondrial interna per un gran potencial de membrana negatiu. Per altra banda, a les mitocondries existeixen dos antitransportadors que permeten alliberar Ca^{2+} al citosol cel·lular per entrada de dos molècules de Na^+ o H^+ (Verkhratsky i Petersen, 1998; Alvarez et al., 1999).

Pel que fa als nuclis, s'ha suggerit que la concentració de Ca^{2+} nucleoplasmàtica pot participar en la regulació de nombrosos processos nuclears importants, com ara l'expressió gènica, l'apoptosi o el trencament de l'embolcall nuclear. En condicions de repòs, la concentració de Ca^{2+} nucleoplasmàtica és de 100-200 nM, és a dir, similar a la $[\text{Ca}^{2+}]_c$. Després de l'estimulació cel·lular, aquesta concentració de Ca^{2+} segueix el mateix perfil que la citosòlica, fet que fa suposar que hi ha una difusió ràpida del Ca^{2+} citosòlic a través dels porus nuclears. De totes maneres, en determinades condicions, la concentració de Ca^{2+} nucleoplasmàtica pot comportar-se de manera diferent a la $[\text{Ca}^{2+}]_c$. Així, s'ha proposat que l'embolcall nuclear pot alliberar Ca^{2+} al nucli a través de InsP_3R i RyR presents en la membrana nuclear interior i encarats cap al nucleoplasma (Petersen, 1996). Si es considera a més que la membrana nuclear exterior presenta ATPases SERCA, es pot considerar el fet de que al nucli existeixi una regulació de la $[\text{Ca}^{2+}]$ molt precisa i independent de la citosòlica. Tanmateix aquest és un aspecte molt desconegut encara (Petersen et al., 1998, Alvarez et al., 1999).

Per altra banda, s'ha proposat que els grànuls secretoris podrien actuar com a reservoris intracel·lulars de Ca^{2+} , ja que contenen grans quantitats de Ca^{2+} i experiments amb grànuls secretoris pancreàtics isolats han mostrat com es produeix alliberació de Ca^{2+} a través de receptors InsP_3R i RyR (Petersen, 1996; Gerasimenko et al., 1996). També s'ha suggerit recentment que l'aparell de Golgi és un reservori de Ca^{2+} sensible a l' $\text{Ins}1,4,5\text{P}_3$, però amb propietats funcionals diferents a les del RE (Pinton et al., 1998).

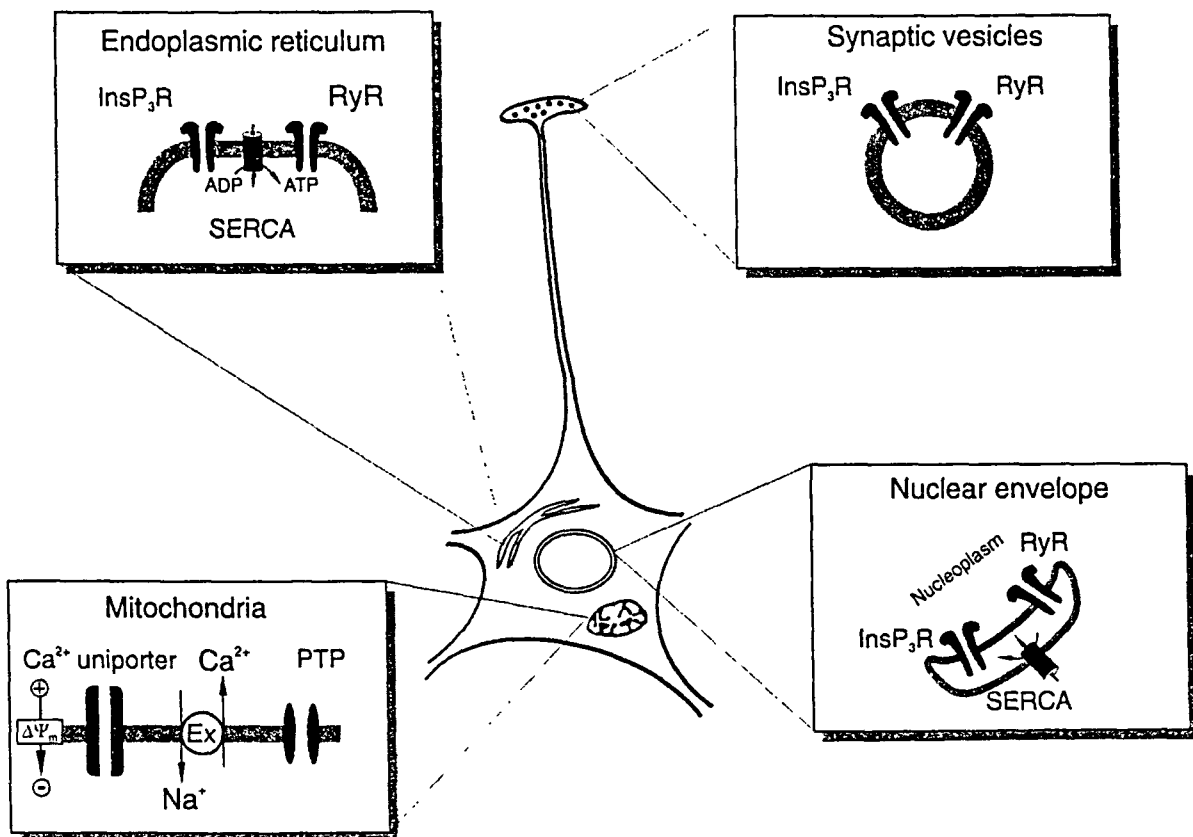


Fig 3.1. Reservoris de Ca^{2+} neuronals. En neurones, el reticle endoplasmàtic és el reservori de Ca^{2+} més important, tot i que recentment les mitocondries han estat, també, implicades en el senyal de Ca^{2+} . L'embolcall nuclear, ben estudiat a cèl·lules no excitable, i altres orgànuls cel·lulars com les vesícules secretores han estat postulades com a possibles reservoris intracel·lulars. InsP_3R : receptor d' $\text{Ins}1,4,5\text{P}_3$; RyR : receptor de rianodina; SERCA : Ca^{2+} -ATPasa del reticle endoplasmàtic; Ex : intercambiador Ca^{2+} - Na^+ .

3.3. Característiques espaials i temporals del senyal de Ca^{2+}

Una vegada exposats tots els elements que participen o poden participar en la homeostasi del Ca^{2+} , es dibuixa el fet de que el senyal de Ca^{2+} (o la senyalització via Ca^{2+}) és un procés particularment complex. En efecte, depenent del tipus cel·lular, de l'agent estimulador i de l'estat d'ompliment dels reservoris intracel·lulars s'activen determinats elements moleculars que alhora es relacionen de manera específica, i per tant, s'esdevindrà un senyal de Ca^{2+} amb paràmetres espaials i temporals característics i que dóna lloc a una resposta concreta (Simpson et al., 1995). És a dir, no existeix un únic senyal de Ca^{2+} que es presenta de forma igual en tots els tipus cel·lulars ni davant de tots els estímuls, sinò tot el contrari, existeix una enorme versatilitat en l'activació de tota la gama d'elements de la senyalització de Ca^{2+} que permet que aquest ió pugui actuar en diferents contextes espaials i temporals (Berridge et al., 1998).

La generació dels senyals de Ca^{2+} s'han pogut observar gràcies a les tècniques de monitorització de la concentració de Ca^{2+} amb marcadors fluorescents. A partir dels resultats obtinguts, s'han classificat els senyals de Ca^{2+} en dos tipus: les respostes elementals i les respostes globals.

Així, quan un canal de Ca^{2+} , tan de la membrana plasmàtica (VOC, ROC, SMOC, SOC, etc) com dels reservoris de Ca^{2+} intracel·lulars (RyR, InsP₃R, etc), s'obre, a la sortida d'aquest canal es concentren un gran nombre de ions Ca^{2+} que ràpidament es dissipen per difusió quan el canal es tanca. Aquest senyal localitzat s'anomena fenomen elemental (o resposta de Ca^{2+} elemental) i les seves propietats espaials i temporals són funció de la naturalesa i localització del canal que les produeix (Bootman i Berridge, 1995; Lipp i Niggli, 1996). Els fenòmens elementals tenen dues funcions, la d'activar grans processos cel·lulars al costat mateix dels canals on es produeixen o la d'activar processos a nivell global, activant-se canals al llarg de la cèl·lula. Així, perquè es donguin fenòmens globals (o respostes de Ca^{2+} globals) els diferents llocs de respostes de Ca^{2+} elementals s'han de comunicar un amb els altres. Les respostes de Ca^{2+} global es poden donar simultàniament a tota la cèl·lula o es poden propagar a través d'ella en forma d'ona de Ca^{2+} .

Una de les paradoxes de la senyalització via Ca^{2+} és que pot desencadenar processos totalment oposats, com ara viabilitat o mort cel·lular. Si elevacions de la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ són necessàries com a senyals intracel·lulars, increments prolongats d'aquestes concentracions de Ca^{2+} poden induir a la mort cel·lular. Per tant, els senyals de Ca^{2+} que

indueixen respostes cel·lulars no letals, són transitòries i, quan la informació necessita ser transmesa durant un període de temps llarg, aquestes senyals transitòries són, a més, repetitives, originant el que s'anomena oscil·lacions de Ca^{2+} (Berridge et al., 1998).

3.4. Mecanismes del senyal de Ca^{2+} neuronal. Una resposta integrativa.

L'activació de la PLC per part d'un estímul, genera $\text{Ins}1,4,5\text{P}_3$ que actua sobre els InsP_3R alliberant-se Ca^{2+} del ER. L'augment de la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ pot induir l'activació dels RyR que alliberen més Ca^{2+} , originant així el procés de CICR. Aquest Ca^{2+} , alhora, pot potenciar més el senyal modulant positivament l'activació d'ambdós receptors intracel·lulars. Els RyR, per tant, participen amplificant el senyal de Ca^{2+} (figura 3.2.). L'estat d'ompliment de Ca^{2+} del RE té un paper importantíssim en determinar el grau de potenciació d'aquest procés d'amplificació del senyal. Així si el RE té nivells baixos de Ca^{2+} , el CICR o no es produirà o només ho farà en punts pròxims als InsP_3R , produint-se únicament senyals de Ca^{2+} elementals, mentre que si el RE té nivells de Ca^{2+} suficientment alts, es produirà un senyal de Ca^{2+} global. A part del CIRC, s'ha postulat que, en neurones, determinats estímuls de GPCRs podrien activar els RyR de manera independent a la producció d' $\text{Ins}1,4,5\text{P}_3$ (Chavis et al., 1996).

Per altra banda, alguns neurotransmissors i altres senyals externs activen receptors-canals ROC, de manera que es produeix una entrada de Ca^{2+} extracel·lular que alhora pot induir l'alliberació de Ca^{2+} del RE a través dels RyR. En alguns tipus cel·lulars també es pot induir alliberació de Ca^{2+} del RE a través dels InsP_3R , si s'expressen isoenzims de la PLC sensibles a la $[\text{Ca}^{2+}]_c$, que a l'activar-se generen $\text{Ins}1,4,5\text{P}_3$. El mateix passaria si enlloc d'activar-se canals ROCs s'activessin canals VOCs (figura 3.2.).

El fet de que els InsP_3R a part de ser estimulats per $\text{Ins}1,4,5\text{P}_3$ puguin ser regulats pel Ca^{2+} citoplasmàtic i pel Ca^{2+} luminal del RE, fa que aquests receptors puguin actuar com a detectors coincidents per integrar la informació provinent de senyals diferents. Per exemple, aquells senyals que promouen l'entrada de Ca^{2+} poden cooperar amb els que activen la PLC i que, per tant, generen $\text{Ins}1,4,5\text{P}_3$, donant lloc a una resposta que, potser, no es donaria si els dos processos es donguessin per separat.

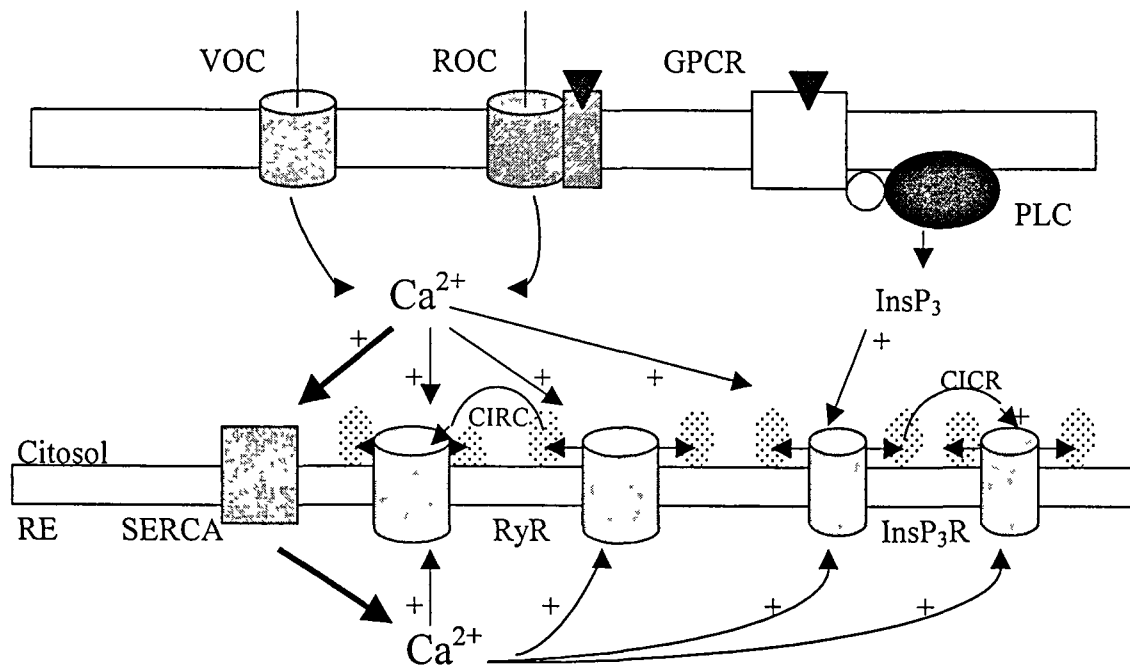


Figura 3.2. Senyalització via Ca^{2+} a neurones.

Però a part de ser el RE una font de Ca^{2+} , també pot actuar com a magatzem (*sink*) (Simpson et al., 1995; Berridge, 1998). Així al produir-se un increment de la $[\text{Ca}^{2+}]_c$, ja sigui per entrada de Ca^{2+} extracel·lular o per alliberació de Ca^{2+} del RE, es produeix una activació de les SERCAs que recapten Ca^{2+} dins del RE molt ràpidament, i en funció moltes vegades, de l'estat d'ompliment d'aquest reservori intracel·lular de Ca^{2+} . Aquesta activació de les SERCAs pot permetre el reompliment gradual del RE i per tan augmentar la sensibilitat dels receptors RyR i InsP₃R, i consegüentment, el Ca^{2+} pot ser de nou alliberat al citosol cel·lular, donant lloc al que seria un altre procés de alliberació de Ca^{2+} induïda per Ca^{2+} .

Una conseqüència d'aquesta funció de magatzem del RE, és el fet de que pot anar atenuant petits increments de Ca^{2+} associats a entrades de Ca^{2+} extracel·lular fins que els els reservoris s'omplen i els receptors InsP_3R i RyR esdevenen suficientment sensibles per alliberar aquest Ca^{2+} altra vegada al citosol. Així, el RE actuaria integrant petits i transitòris senyals de Ca^{2+} per donar lloc a un posterior senyal de Ca^{2+} més gran i generalitzat que podria proveir a la cèl·lula d'informació referida a anteriors nivells d'activitat neuronal. Es tractaria d'una classe de memòria a curt termini proporcionada pel RE. Aquest concepte, juntament amb altres propietats del RE, ha fet que alguns autors considerin el RE com una neurona dins una neurona i no simplement una font de Ca^{2+} per ser alliberat (Berridge, 1998).

En cèl·lules no excitable, la senyalització via Ca^{2+} presenta aproximadament els mateixos mecanismes. En aquests tipus cel·lulars, però, no hi ha expressió de canals VOCs i per tant, no es pot considerar entrada de Ca^{2+} induïda per aquests canals. A més a més els canals SOC tenen molta importància, de manera que després de l'activació dels receptors InsP_3R i RyR hi ha un buidament dels reservoris intracel·lulars de Ca^{2+} que activa un nou influx de Ca^{2+} via aquests canals (Berridge, 1997).

3.5. Funcions fisiològiques del senyal de Ca^{2+}

Els ions Ca^{2+} juguen un paper clau en la regulació de moltes formes d'activitat cel·lular. Per tal de controlar tantes funcions, les característiques espaials i temporals del senyal de Ca^{2+} són fonamentals. Així, les respostes de Ca^{2+} elementals han estat implicades en l'activació del metabolisme mitocondrial, en la secreció de vesícules, en la relaxació muscular i en la mitosi, entre d'altres funcions. Per altra banda, les ones de Ca^{2+} en una cèl·lula tenen un paper clau en la fertilització, el control del desenvolupament i la diferenciació cel·lular, la proliferació cel·lular, la contracció del múscle llis, esquelètic i cardíac, el metabolisme del fetge i la transcripció gènica. En canvi, les ones de Ca^{2+} intercel·lulars s'han relacionat, per exemple, amb les funcions glials, secreció d'insulina, la inducció de la formació d'òxid nítric al múscle llis, la síntesi d'òxid a l'endoteli i el moviment cilial (Berridge et al., 1998).

El Ca^{2+} , però, també ha estat implicat en mort cel·lular. Així, concentracions de Ca^{2+} poden conduir a la desintegració de les cèl·lules (necrosi) per potenciació de l'activitat

d'enzims digestius de proteïnes sensibles a Ca^{2+} . El Ca^{2+} , també, ha estat implicat en apoptosi, un procés de mort cel·lular programada important tan en el desenvolupament normal com en condicions patològiques com ara la SIDA, l'Alzheimer i el càncer. Es creu, que aquest procés apoptòtic podria estar activat per una elevada concentració de Ca^{2+} dins la mitocondria (Berridge et al., 1998).

Finalment dir que les neurones són un exemple excel·lent de com la combinació de senyals de Ca^{2+} elementals i globals poden ser adaptats per regular una àmplia gamma de processos en una sola cèl·lula. Així, l'entrada de Ca^{2+} extracel·lular però sobretot la mobilització de Ca^{2+} del ER, compartiment que interaccionaria amb la membrana plasmàtica per actuar com a un sistema binari, controlen l'excitabilitat neuronal, l'alliberació de neurotransmissors, l'associativitat neuronal, la plasticitat neuronal i la transcripció gènica (Berridge, 1998).

4. Receptors muscarínics de l'acetilcolina

4.1. Classificació, localització i estructura

L'acetilcolina és un neurotransmissor que s'allibera de les vesícules presinàptiques de les terminals nervioses per regular tota una sèrie de funcions fisiològiques bàsiques. Existeixen dos tipus de receptors de l'acetilcolina que difereixen notablement tan en la seva estructura com funció. Els receptors nicotínics reben el nom per la seva afinitat a la nicotina i són proteïnes formades per combinacions de diferents subunitats que actuen com a receptors-canal iònics. Els receptors muscarínics de l'acetilcolina van ser descoberts per la seva habilitat a unir l'alcaloid muscarina, i pertanyen al grup de receptors acoblats a proteïnes G (Feldder, 1995).

Es coneixen cinc subtipus de receptors muscarínics de l'acetilcolina (mAChR): m1-m5, tots ells clonats i d'estructura i localització cel·lular perfectament coneguda. Així, mentre m1, m4 i m5 són predominantment neuronal, m2 té una localització cardíaca i m3 neuronals i glandular alhora (Lambert et al., 1992).

Com a membres de la família de receptors GPCRs, els receptors muscarínics tenen una estructura comuna caracteritzada per set dominis transmembranals. D'aquestes, les hèlixs III, VI i VII són altament conservades en tots els subtipus i són importants per a la unió de l'agonista al receptor. Per altra banda, es sap que el tercer llaç citoplasmàtic i l'extrem carboxílic de la cadena peptídica participen en la interacció amb la subunitat α de les proteïnes G (Wess et al., 1990; Okamoto i Nishimoto, 1992), però es desconeix el domini d'aquests receptors que interacciona amb les subunitats $\beta\gamma$ de les proteïnes G tot i que s'ha demostrat que en alguns sistemes la transducció del senyal mitjançada pels receptors muscarínics es fa predominantment a través d'aquest dímer (Stehno-Bittel et al., 1995). Per altra banda, un estudi amb diferents receptors m3 quimèrics ha posat en relleu com el tercer llaç citoplasmàtic d'aquest receptor no és important per la unió de lligands, l'iniciació de la transducció de senyals ni la internalització del receptor però sí que té un paper actiu en la interacció intermolecular entre receptors, de manera que la dimerització del receptor depèn de la llargada d'aquest tercer llaç citoplasmàtic (Maggio et al., 1996). Cal recordar que existeixen nombroses evidències experimentals per la dimerització dels GPCRs tot i que no es coneix encara el paper fisiològic per aquesta interacció, i que s'ha

demostrat que els receptors muscarínics poden formar dominis d'interacció no només de dos sinó de múltiples unitats (Schöneberg et al., 1995).

4.2. Transducció de senyals acoblats als receptors muscarínics. Activació de la PLC.

L'ocupació per l'agonista dels receptors muscarínics de l'acetilcolina comporta una variada gamma d'esdeveniments intracel·lulars. L'expressió d'aquests receptors en línies cel·lulars ha permès determinar que els receptors m1, m3 i m5 activen la PLC i mobilitzen Ca^{2+} mentre que m2 i m4 indueixen la inhibició de l'adenilat ciclasa. A més a més, actualment s'atribueix al primer grup de receptors muscarínics l'habilitat d'estimular les fosfolipases A_2 i D i de modular l'activitat de canals de calci. m2 i m4 també poden potenciar l'activitat PLA_2 (Felder et al., 1991; Caulfield, 1993; Felder, 1995).

L'activació de la PLC mitjançada pels receptors muscarínics m1, m5 i sobretot m3 ha estat àmpliament estudiada com a model de resposta intracel·lular induïda per receptors GPCRs, intentant, per una banda, caracteritzar els elements que participen en aquesta transducció del senyal i determinar els mecanismes de la seva regulació, per l'altra. Així, s'ha demostrat l'activació de l'isoenzim $PLC-\beta_1$ per part d'un agonista no selectiu dels receptors muscarínics a l'escorça cerebral i a l'hipocamp (Kim et al., 1997), l'existència d'un acoblament entre receptors m3, proteïnes $G_{q/11}$ i $PLC-\beta_1$ en vesícules lipídiques reconstituïdes amb aquests elements purificats (Brestein et al., 1992) i l'habilitat del receptor m5 a activar tan la $PLC-\beta$ com la $PLC-\gamma$ en una mateixa cèl·lula (Gusovsky et al., 1993). També s'ha observat que l'estimulació de la hidròlisi dels fosfoinosítids mitjançada pel receptor m3 pot ser regulada per petits increments en la $[Ca^{2+}]_c$ en cèl·lules SH-SY5Y i CHO transfectades (Wojcikiewicz et al., 1994a; Willars i Nahorski, 1995) i en neurones despolaritzades (del Rio et al. 1994). Tanmateix, però, no es poden despreciar les creixents evidències per una heterogeneïtat entre tipus cel·lulars en els mecanismes de les diferents vies de transducció del senyal, i per tant, no es poden descartar la participació d'altres esoenzims de la PLC i altres mecanismes de regulació d'aquesta activitat.

L'estimulació dels receptors m1, m3 i m5 produeix també els canvis típics de la $[Ca^{2+}]_c$ caracteritzats per un ràpid i transitori pic seguit per una fase sostinguda, en molts tipus cel·lulars. Tot i així, no es tracte d'un mecanisme generalitzat ja s'ha vist que els

receptors m3 poden induir respostes de Ca^{2+} monofàsiques en determinades cèl·lules i no són capaços d'induir cap resposta de calci en miniprismes de neurones granulars de cerebel de ratolí de 6 o 30 dies (Kirischuk et al., 1996; Irving i Collinbridge, 1998).

L'activació de la PLC i la inducció dels senyals de Ca^{2+} per part dels receptors muscarínics poden ser regulades negativament. Així, els receptors muscarínics poden ser desensibilitzats per diferents mecanismes que varien entre tipus cel·lulars i que semblen ser lleugerament diferents als d'altres receptors GPCRs, tal i com s'ha apuntat anteriorment. Així, en cèl·lules CHO transfectades amb receptors m3 i cèl·lules SH-SY5Y, que expressen majoritàriament aquest mateix receptor, les respostes induïdes per l'agonista carbacol són desensibilitzades ràpidament però parcialment, és a dir, es produeix, tan en l'acumulació d'Ins1,4,5P₃ com en els increments de $[\text{Ca}^{2+}]_i$, una reducció del pic transitòri però no de la fase sostinguda (Tobin et al., 1992; Fisher et al., 1994). S'han proposat diferents mecanismes per aquest fenomen, com ara l'activació de la caseïno quinasa 1 α que fosforila el tercer llaç citoplasmàtic del receptor de manera dependent d'agonsites (Tobin et al., 1996; Tobin et al., 1997), l'activació de la PKC que anula de la hidròlisi del PtdIns4,5P₂, en part inhibint l'acoblament entre les proteïnes Gq i la PLC (Willars et al., 1996) o una disminució dels nivells de les subunitats α de les proteïnes Gq/11 (Mullaney et al., 1993; Lajat et al., 1998).

Finalment, cal fer esment de que estudis d'expressió han portat evidències experimentals de que els receptors m2 i m4 poden activar la PLC a través de proteïnes G insensibles a la toxina pertussis, tot i que de manera molt menys eficaç que les receptors m1 i m3 (Ashkenazi et al., 1987). Tanmateix també s'ha descrit que el receptor m2 inhibeix la PLC en cèl·lules FRTL5 (Bizzarri et al., 1990), fet que porta a la conclusió de que depenent del teixit els receptors m2 i m4 poden modular l'activitat PLC de manera diferent.

4.3. Funcions fisiològiques que impliquen els receptors muscarínics

Els receptors muscarínics han estat implicats en el control motor, sensorial, el ritme cardíac, el comportament, la memòria i l'aprenentatge, però es sap poc de com aquests processos són iniciats a nivell de la transducció del senyal. A més s'ha relacionat la pèrdua de receptors muscarínics de l'acetilcolina amb malalties com l'Alzheimer, el Parkinson i la

Síndrome de Down (Felder, 1995).

Per altra banda, s'ha observat que l'exposició contínua de cultius de granulars de cerebel a Cch o muscarina, agonistes dels mAChR, provoca una inhibició -depenent de la concentració i del temps- de l'apoptosi produïda per l'absència de condicions despolaritzants (altes concentracions de K^+ , superiors a les fisiològiques), cosa que suggereix una important funció d'aquests receptors en el SNC dels adults (Yan et al., 1994).

També s'ha proposat que els receptors muscarínics poden regular el creixement i la transformació cel·lular, ja que l'expressió dels receptors m1, m3 i m5 en cèl·lules NIH-3T3 no tumorigèniques induïx a que expressin un fenotip tumorigènic (Gutkind et al., 1991) i al revés, l'expressió dels mateixos receptors en cèl·lules CHO tumorigèniques fa que perdin aquest fenotip (Felder et al., 1993).

4.4. Expressió i transducció del senyal mitjaçada per receptors muscarínics en cultius primaris de neurones granulars de cerebel

En cultius de neurones granulars de cerebel s'ha detectat expressió de m_2 i m_3 (McLeskey i Wojcik, 1990; Longone et al., 1993), en densitats que poden arribar a ser elevades (Whitham et al., 1991). Els nivells de mRNA de m_2 i m_3 augmenten amb el temps de cultiu arribant a un màxim estacionari als 10 dies *in vitro* (DIV) (Fukamauchi et al., 1991). Per altra banda també s'ha descrit activitat PLC estimuladaa per acetilcolina i carbacol, agonistes muscarínics (Xu iand Chuang, 1987b; McLeskey et al., 1990) i atribuïda únicament als receptors m_3 (Whitham et al., 1991). Pel que fa a l'habilitat dels receptors muscarínics en mobilitzar Ca^{2+} dels reservoris intracel·lulars en cultius primaris de neurones granulars, s'han publicat resultats que discrepen entre ells. Així, varis autors han mostrat com en condicions no despolaritzants els receptors m_3 indueixen ràpids i transitoris increments de $[Ca^{2+}]_i$ (Irving et al., 1992a; Courtney and Nicholls, 1992; Simpson et al., 1996). Però, altres treballs només observen aquestes respostes després d'una prèvia despolarització de les cèl·lules amb concentracions altes de K^+ (Fohrman et al., 1993), les quals indueixen una entrada de Ca^{2+} que permet emplenar els magatzems intracelulars de calci (Murphy and Miller, 1989).

5. Receptors metabotròpics del glutamat

El glutamat és el principal neurotransmissor excitatori del SNC. Les seves accions són mitjançades per activació de dos tipus diferents de receptors: els receptors ionotròpics (iGluR), canals de cations oberts per glutamat, i els receptors metabotròpics (mGluR), acoblats a proteïnes G. Entre els primers hi ha del receptor AMPA/Kainat, anomenats així per la seva afinitat a l'àcid α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-oxopropioènic (AMPA) i el kainat, i els receptors NMDA, amb alta afinitat per l'àcid N-metil-D-aspartic (NMDA). Els receptors metabotròpics es caracteritzen per presentar set dominis transmembranals i estar acoblats a proteïnes G. Tanmateix, però, formen una nova família de GPCRs ja que la seva seqüència aminoacídica és més llarga i no té homologia amb els receptors típics d'aquesta superfamília. En aquesta família recentment s'hi han afegit els receptors de Ca^{2+} (CaR) i els receptors de GABA_B ja que sorprenentment entre ells presenten una homologia de seqüència del 30% (Brown et al., 1993; Kaupmann et al., 1997; Bockaert and Pin, 1999).

5.1. Classificació dels mGluRs

En l'actualitat s'han clonat vuit gens corresponents a receptors metabotròpics del glutamat i s'han agrupat en tres grups basant-se amb la seqüència aminoacídica, la sensibilitat a l'agonista i els mecanismes de transducció del senyal als quals estan acoblats (Conn i Pin, 1997; Schoepp et al., 1999). Així, mentre el grup I està format pels mGluR1 i mGluR5 que es caracteritzen per activar la PLC, el grup II, que inclou els receptors mGluR2 i mGluR3, i el grup III, que està format pels receptors mGluR4, 6-8, inhibeixen l'adenilil ciclase. A més a més, s'ha proposat que els mGluR poden interaccionar directa o indirectament amb canals iònics, com canals de calci i regular la hidròlisi dels fosfoinosítids per la PLA₂ i els nivells de nucleòtids com el GMP cíclic (Conn i Pin, 1997). Recentment s'ha demostrat que els receptors metabotròpics del grup I poden activar la PLD (Klein et al., 1997; Servitja et al., 1998).

Per altra banda, cal fer esment de que s'han trobat diferents variants d' *'splicing'* per

tres d'aquests mGluRs. Així existeixen quatre variants pel mGluR1 que poden ser nomenades com mGluR1_{α,β,δ,γ} o bé mGluR1_{a,b,c,d}, dues pel mGluR4_{a,b}, i tres pel mGluR5_{a,b,d}. També existeixen altres mGluRs lleugerament diferents als esmentats. En *Drosophila melanogaster* s'ha clonat un receptor (DmGluRA) amb homologia semblant als del grup II (Parmentier et al., 1996) i del cervell de salmó s'ha aïllat un receptor metabotrópic del glutamat (sBimR) bifuncional, és a dir, que pot ser activat tan per glutamat com per ions de Ca²⁺ extracel·lular (Kubokawa et al., 1996). En aquest sentit s'ha proposat que els receptors mGluR1, mGluR5, mGluR2 i mGluR3 tenen funcions de sensar Ca²⁺ (Kubo et al., 1998).

Finalment, no es pot excloure l'existència de mGluR no identificats per manca de la seva clonació. Així en miniprismes de diferents regions del cervell el perfil farmacològic d'activació de la PLD per agonistes dels mGluRs no correspon a cap dels subtipus de mGluRs fins ara clonats (Boss and Conn, 1992; Pelligrini-Giampietro et al., 1996) i en miniprismes d'escorça cerebral de rata s'ha descrit un receptor mGluR capaç d'activar la PLC però amb característiques farmacològiques diferents a les dels receptors del grup I (Chung et al., 1997).

5.2. Estructura i farmacologia dels mGluRs

Tal i com s'ha mencionat abans, els receptors de la família dels mGluRs es diferencien estructuralment de la resta de GPCRs. Així, si per molts GPCRs s'ha demostrat que el tercer llaç citoplasmàtic està implicat en l'acoblament específic amb proteïnes G, en els mGluRs és el segon llaç citoplasmàtic el que té un paper crític en la interacció amb les proteïnes G i en la determinació de la transducció del senyal per cada subtipus de receptor (Pin et al., 1995; Gomeza et al., 1996a). Per altra banda, aquesta família de GPCRs tenen l'extrem N-terminal més llarg. Concretament, en els mGluRs aquest domini extracel·lular és d'aproximadament 560 aminoàcids i estudis de mutagènesi han mostrat que és responsable de la unió del glutamat, l'activació del receptor per part de l'agonista i la selectivitat dels diferents subtipus a agonistes selectius (O'Hara et al., 1993; Takanashi et al., 1993; Tones et al., 1995), a diferència dels altres receptors GPCRs que fan la interacció amb el lligand a través dels dominis transmembranals. Aquest paper com a determinant inicial per a l'activació de l'agonista per part de l'extrem N-terminal s'ha

suggerit recentment també pel CaR (Hammerland et al., 1999). Els esmentats estudis han permès construir un model pel qual el domini extracel·lular dels mGluRs estaria format per dos dominis globulars units per una frontissa.

Experiments de Western blot amb anticossos contra diferents subtipus dels mGluRs han mostrat que aquests receptors migren com a dímers en condicions no reductores, degut a que es formen ponts disulfur entre els diferents dominis N-terminals (Romano et al., 1996). La dimerització també ha estat descrita per altres GPCRs però no s'en coneix el significat funcional, tal i com s'ha fet esment anteriorment. De totes maneres, recentment s'ha mostrat que els receptors GABA_B formen heterodímers que són importants per la funcionalitat d'aquests receptors (Kuner et al., 1999) i que mutacions en residus de cisteïna altament conservats en el receptor Ca²⁺ humà que porten a la desgregació dels dímers, són essencials per les funcions del receptor en reconèixer el Ca²⁺ (Fan et al., 1998).

La farmacologia dels mGluRs, està encara poc establerta degut a l'escassetat de compostos específics per determinats subtipus, al fet de que en teixit intacte més d'un subtipus de mGluRs pot participar en una determinada resposta (Schoepp et al., 1996b; Mistry et al., 1998) i a la possibilitat de que no es coneixin tot els mGluRs existents. Recentment l'activitat de nous agonistes i antagonistes s'ha caracteritzat en sistemes on s'havia expressat un determinat subtipus de mGluR. Tot i així, encara s'està lluny d'arribar a una situació ben establerta ja que molts agonistes tenen un comportament diferencial depenent del teixit. Així, l'agonista no selectiu pels mGluRs, 1*S*,3*R*-1-amino-1,3-ciclopentanedicarboxilate (1*S*,3*R*-ACPD), i l'agonista selectiu del grup I, 3,5-dihidroxifenilglicina (3,5-DHPG) són agonistes totals en alguns tipus cel·lulars i parcials en altres. Pel que fa als antagonistes, actualment existeixen compostos que es consideren més específics per un determinat subtipus de mGluR que per un altre, tot i que també hi tornen haver dades divergents per diferents teixits i sistemes cel·lulars sobretot perquè presenten un antagonisme depenent de l'agonista al qual inhibeixen l'acció (Schoepp et al., 1999). No es coneix amb exactitud la causa d'aquest efecte diferencial per part de la majoria d'antagonistes dels mGluRs existents, però s'ha proposat que podria ser degut a una diferent localització del lloc d'unió dels lligands (Littman i Robinson, 1994; Brabet et al., 1995). Així els recentment sintetitzats antagonistes no competitiu CPCCOEt i MPEP, altament selectius pel mGluR1 i mGluR5 respectivament (Annoura et al., 1996; Hermans et al., 1998b; Gasparini et al., 1999), interaccionen en amb determinats aminoàcids dels dominis transmembranals VII, i III i VII, respectivament (Litschig et al., 1999; Pagano et

al., 1999), fet que suggereix que no només hi poden haver múltiples llocs d'unió d'agonistes i antagonistes a l'extrem N-terminal sinò que els dominis transmembranals també poden regular l'activació del receptor. A la taula 5.1. es mostren alguns agonistes i antagonistes dels mGluRs.

AGONISTES mGluRs		
	Selectivitat	Referències
1S,3R-ACPD	mGluRs	Schoepp et al., 1999
CHPG	mGluR5	Doherty et al., 1997
DHPG	mGluR grup I	Schoepp et al., 1999
Quisqualat	mGluR grup I	Schoepp et al., 1999
ANTAGONISTES mGluRs		
	Selectivitat	Referències
AIDA	mGluR grup I	Brabet et al., 1995 Moroni et al., 1997
AP3	mGluRs < 300 µM	Mistry et al., 1996
CPCCOEt	mGluR1	Casabona et al., 1997 Hermans et al., 1998b
MPEP	mGluR5 < 100 µM	Gasparini et al., 1999
MCPG	mGluR grup I mGluR grup II	Brabet et al., 1995 Moroni et al., 1997 Conn i Pin, 1997
SIB-1893	mGluR5	Varney et al., 1999

Taula 5.1. Diferents agonistes i antagonistes dels mGluRs

5.3. mGluRs del grup I i transducció de senyals

Tal i com s'ha esmentat anteriorment, una de les característiques dels mGluR del grup I és la seva habilitat d'activar la PLC i induir senyals de Ca^{2+} a través d'un mecanisme que implica l'acoblament a proteïnes G. Malgrat això, però, les proteïnes G responsables d'aquesta transducció del senyal han estat matèria de debat. Diferents estudis mostren com la toxina pertussis, que inactiva per ADP-ribosilació les proteïnes $G_{i/o}$ però no les $G_{q/11}$, inhibeix parcialment la hidròlisi de fosfoinosítids en cèl·lules recombinants que expresen el receptor mGluR1 α com ara les cèl·lules BHK (Pickering et al., 1993; Thomsen et al., 1993), cèl·lules d'ovari de hamster xinès (Aramori i Nakanishi, 1992) i oòcits de *Xenopus laevis* (Kasahara i Sugiyama, 1994), però no afecta a l'activació de la PLC pel receptor mGluR5 i el subtipus mGluR1 β (Abe et al., 1992; Pin i Duvoisin, 1995). Aquest fet ha portat a la idea generalitzada de que els receptors mGluR1 α activen la PLC via proteïnes $G_{q/11}$ i $G_{i/o}$, mentre que els receptors mGluR5 i mGluR1 β mitjancien la mateixa resposta només a través de proteïnes $G_{q/11}$. Tanmateix no cal despreciar altres dades experimentals com ara les presentades en un estudi detallat amb cèl·lules BHK transfectades amb el receptor mGluR1 α , que indicarien com l'activació d'aquest receptor condueix alhora a un efecte modulador positiu de l'estimulació de la PLC mitjançat per $G_{q/11}$ i a un efecte modulador negatiu sobre el mateix sistema efector via proteïnes $G_{i/o}$ (Carruthers et al., 1997).

Per altra banda, recentment s'ha posat de manifest com els mGluRs, i en especial els del grup I, poden induir respostes intracel·lulars de manera independent a les proteïnes G, fet que ha suposat un pas per trencar el paradigma, esmentat anteriorment, de que els GPCRs només indueixen respostes intracel·lulars per acoblament a aquestes proteïnes (Hall et al., 1999). Un exemple és el complexe entre mGluR-Homer-Shark-PSD-95/GKAP capaç de mobilitzar Ca^{2+} intracel·lular via el receptor d'Ins1,4,5P₃ (Tu et al., 1999). També, n'és un exemple el treball amb cèl·lules piramidals CA3 d'hipocamp que descriu que les respostes postsinàptiques excitatòries mitjançades pels mGluRs del grup I, són independents de les proteïnes G, però impliquen tirosino quinases de la família Src (Heuss et al., 1999).

Aquesta diversitat molecular en la transmissió del senyal podria suposar un altre element diferenciador entre els diferents subtipus de mGluRs del grup I, a part de l'esmentat diferent acoplament a proteïnes G, i de la seva possible diferent regulació

suggerida últimament. Així, s'ha mostrat que en sistemes d'expressió heteròloga, el fet de que el mGluR5 mitjanci increments en la $[Ca^{2+}]_i$ oscil·latori i el mGluR1 indueixi només un sol increment en la $[Ca^{2+}]_i$, en forma de pic és degut a que el primer receptor pot ser fosforilat, però no el segon, pot ser fosforilat per la PKC (Kuwabata et al., 1998; Nakanishi et al., 1998)

5.4. Localització cel·lular i funcions fisiològiques dels mGluRs al SNC

El patró de distribució dels diversos subtipus de receptors metabotrópics del glutamat són diferents els uns dels altres. Al sistema nerviós central, tots mGluRs s'expressen a neurones, tot i que de manera heterogènia entre els diferents tipus neuronals, i encara no està clar si tots s'expressen també en astròcits o altres cèl·lules glials. Els estudis d'expressió ja des d'un principi han centrat més atenció als receptors del grup I. El mGluR1 es localitza majoritàriament al cerebel, hipotàlam, hipocamp i bulb olfatori on presenta nivells de proteïna que creixen amb l'edat de rata, tot i que també s'ha trobat expressió constant amb l'edat a al copus estriat i a l'escorça cerebral (Condorelli et al., 1992; Catania et al., 1994; van der Pol et al., 1994; Casabona et al., 1997). Per altra banda, l'expressió del mGluR5 és més alta en rata jove que en rata adulta. S'ha trobat immunoreactivitat per mGluR5 en algunes regions cerebrals com l'hipocamp, l'escorça cerebral, al corpus estriat, i al bulb olfatori, mentre que a l'hipotàlam i al cerebel, el mGluR5 s'expressa només en rates joves (Catania et al., 1994; Copani et al., 1998b; Romano et al., 1995; van de Pol et al., 1995; Casabona et al., 1997).

El glutamat és el neurotransmissor de la majoria de les sinapsis excitatòries ràpides i té un paper important en una gran varietat de funcions al SNC, entre les quals cal destacar la regulació de l'excitabilitat i la transmissió sinàptica (Murphy et al., 1992; Conn i Pin, 1997), la participació en la maduració neuronal, el desenvolupament de la plasticitat sinàptica (Aronica et al., 1993) i processos d'aprenentatge i memòria (Nakanishi, 1992; Conn et al., 1994). S'ha suggerit també que els mGluRs també podrien tenir un paper important en varis circuits motors, incluint els de la corda espinal, gangli basal i cerebel (Conn i Pin, 1997). Per altra banda, els mGluR capaços d'estimular la PLC s'han implicat en processos de potenciació a llarg termini i reorganització neuronal després d'una lesió (Gallagher et al., 1994; Vignes et al., 1996).

En cultius primaris de neurones granulars de cerebel s'ha observat que l'estimulació dels mGluR atenua l'excitotoxicitat deguda als iGluR (Pizzi et al., 1996). De totes maneres, però, el paper dels mGluRs del grup I en la neurodegeneració és encara motiu de controvèrsia ja que si bé hi ha evidències sòlides per accions neuroprotectores i neurotòxiques pels diferents agonistes, alguns antagonistes d'aquests receptors són consistentment neuroprotectors. Les raons per aquestes discrepàncies es desconeixen (Nicoletti et al., 1999). Per altra banda, també s'ha proposat que en neurones granulars de cerebel, els receptors mGluR5 reforcen la supervivència neuronal, i que una disminució de la seva expressió dóna lloc a una mort cel·lular programada, és a dir, indueix a les cèl·lules a l'apoptosi (Copani et al., 1998a).

Davant totes aquestes possibles funcions fisiològiques i la seva àmplia i heterogènia distribució, els mGluRs suposen una nova diana pel desenvolupament d'agents terapèutics que podrien tenir un gran impacte en el tractament d'una extensa gamma de desordres neurològics i psiquiàtrics com ara Alzheimer, Parkinson, Corea de Huntington, esclerosi amiotròfica lateral, atàxia cerebral, dolor agut i crònic, hipertensió, entre d'altres (Conn i Pin, 1997).

5.5. Els mGluRs en cultius primaris de neurones granulars de cerebel: expressió i transducció del senyal

Pocs estudis en cultius primaris de neurones granulars de cerebel s'han centrat en els receptors del grup II i del grup III, tot i que es coneix que expressen els mRNAs del mGluR2, mGluR3 i mGluR4 (Santi et al., 1994). Els receptors del grup I han acaparat més atenció, però els diferents estudis que han determinat l'expressió dels mRNAs (Aronica et al., 1993; Prezeau et al., 1994; Santi et al., 1994) o de la proteïna (Copani et al., 1998a,b) han mostrat resultats divergents en quant a l'expressió d'ambdós subtipus, mGluR1 i mGluR5, durant el desenvolupament del cultiu. De totes maneres, es sap que les diferents condicions del cultiu, com la concentració de K^+ , l'estat de maduració i la presència de glutamat endogen alliberat per les neurones granulars, influeixen directament sobre l'expressió d'aquests receptors (Bessho et al., 1993; Copani et al., 1998a,b).

Per altra banda, la manca de bons agonistes i antagonistes específics per ambdós subtipus de receptors, mGluR1 i mGluR5, ha fet que fins al present treball la

responsabilitat dels diferents subtipus d'aquests receptors en l'activació de la PLC en cultius primaris de neurones granulars de cerebel no hagi estat del tot establerta, tot i que un estudi limitat suggereix que l'mGluR1 pot mitjançar l'estimulació de la hidròlisi dels fosfoinosítids en cultius de 4-6 DIV (Toms et al., 1995).

Resultats divergents també s'han trobat en quan a l'habilitat dels diferents agonistes del mGluRs a mobilitzar Ca^{2+} en cultius de neurones granulars. Així, mentre alguns autors han mostrat com els mGluRs mitjancien un increment en la $[Ca^{2+}]_i$ en cèl·lules en estat de repòs (Courtney et al., 1990; Pizzi et al., 1996; Simpson et al., 1996;), altres troben resposta només després d'emplenar els reservoris intracel·lulars de Ca^{2+} (Irving et al., 1992a) o en condicions despolaritzants (del Río et al., 1999). Aquestes discrepàncies podrien estar relacionades amb el diferent estat de maduració dels cultius, ja que els primeres estudis han estat duts a terme en cultius de 3-6 DIV i els segons en cultius de 7-9 DIV.

6. Cultius primaris de neurones granulars de cerebel

Les tècniques de cultius cel·lulars primaris han estat i estan essent extensament utilitzades per investigar la fisiologia i bioquímica de diferents regions del sistema nerviós central i perifèric ja que són sistemes senzills on les condicions del medi poden ser finament controlades. A més, aquests cultius no presenten moltes limitacions d'altres preparacions de teixit nerviós, com pot ser la complexitat de les respostes obtingudes degut a la heterogeneïtat de la població cel·lular, la dificultat de mesurar canvis en les concentracions citoplasmàtiques de ions paral·lelament amb estudis bioquímics i la curta vida *in vitro* de les preparacions.

Els cultius primaris de neurones granulars de cerebel (CGC, *cerebellar granule cells*) que s'obtenen de cerebels de mamífers en el primer període postnatal, es caracteritzen per ser monocapes cel·lulars altament homogènies i riques en neurones granulars, cèl·lules glutamatergiques molt abundants al cervell. Aquestes cèl·lules són progenitores d'interneurones que *in vivo* estan encara en la primera fase replicativa del seu cicle de vida per més endavant, en l'adult, formar importants sinàpsis excitatòries amb les neurones Purkinje. Malgrat això, en condicions *in vitro* enlloc de reproduir les característiques que posseeixen *in vivo*, comencen a diferenciar-se més o menys depressa i, per tant, es poden considerar cèl·lules natives que expressen per primera vegada propietats neuronals com ara l'extensió de neurites, la formació de contactes amb les altres cèl·lules i l'elaboració de la maquinària de transmissió del senyal. Les neurones d'aquests cultius sobreviuen un temps relativament llarg i la seva fisiologia varia al llarg dels *dies in vitro* (DIV) ja que primerament formen una xarxa de fibres nervioses i llavors migren en petits grups que van incrementant el tamany progressivament amb el temps alhora que les fibres formen unions interconnectadores entre ells (Kingsbury et al., 1985). Es consideren cultius madurs, monocapes de cèl·lules amb fenotip de neurona plenament diferenciada, a partir dels 7-9 DIV (Thangnipon et al., 1993).

Aquests cultius neuronals han estat extensament estudiats, cosa que ha permès la definició de les condicions idònies per a la supervivència d'aquestes cèl·lules *in vitro* i la descripció dels patrons de desenvolupament que expressen (Thangnipon et al., 1983; Kingsbury et al., 1985; Bálazs et al., 1987). Així, cal remarcar que per garantir la supervivència d'aquestes neurones, el medi de cultiu ha de ser despolaritzant, és a dir, la

concentració de KCl ha de ser de 20 a 30 mM, considerant-se com a condició estàndard 25 mM. S'ha descrit l'expressió de nombrosos receptors, com ara els receptors ionotòpics de glutamat (Wroblewski et al., 1985; Drejer et al., 1986; Holopainen et al., 1989; Courtney et al., 1990), receptors nicotínics de l'acetilcolina (Didier et al., 1995) i una gran varietat de receptors acoplats a la PLC a través de proteïnes G, incluint els receptors 5-HT₂, H₁ i α_1 adrenèrgics (Xu i Chuang, 1987a; Dillon-Carter i Chuang, 1989), muscarínics m₃ (Xu i Chuang, 1987b; Whitman et al., 1991), mGluR del grup I (Nicoletti et al., 1986; Wroblewski et al., 1987; Santi et al., 1994; Copani et al., 1998a,b), i l'ET (Lin et al., 1990a). També s'han caracteritzat diferents elements de la via de senyalització a través de la PLC. En són exemples els InsP₃R (Oberdorf et al., 1997), els RyR (Irving et al., 1992b) i les PMCA (Guerini et al., 1999). Alhora s'han identificat cinc subtipus de canals de calci dependents de voltatge presents a les granulars; són els de tipus L, N, P, Q i R (Randall i Tsien, 1995; Pearson et al., 1995) i que podrien participar en aquesta resposta intracel·lular.

El conjunt de totes aquestes característiques han convertit els cultius primaris de granulars de cerebel en sistemes neuronals idonis i àmpliament utilitzats per a l'estudi de diferents fenòmens cel·lulars com la transducció del senyal via PLC, els corrents de calci i els mecanismes de control de la concentració intracel·lular de calci, la relació entre els receptors acoblats a la PLC i els receptors iònics i canals de calci, l'alliberament de glutamat i aminoàcids excitatoris per aquestes neurones, els mecanismes del desenvolupament del sistema nerviós central i de l'apoptosi, etc (Nicoletti et al., 1986; Gallo et al., 1987; Pizzi et al., 1993; Simpson et al., 1996).

OBJECTIUS

Treballs previs del nostre grup han caracteritzat l'activació de la PLC en miniprismes d'escorça cerebral per agonistes de diferents receptors acoblats a proteïnes G. D'acord amb les dades obtingudes, les característiques de la resposta estan condicionades pel mecanisme d'activació de la PLC, i això permet classificar els receptors estudiats en dos grups ben diferenciats, tot i pertànyer a una mateixa família. El primer grup, format pels receptors muscarínics i serotoninèrgics, es caracteritza perquè indueix una equilibrada acumulació d'InsPs i CDP-DAG, presenta la via de fosforilació com a ruta preferent del metabolisme de l'Ins1,4,5P₃ format i no pot activar la PLC en preparacions membranals en presència de nucleòtids de guanina no hidrolitzables. En canvi, els receptors metabotròpics del glutamat, entre d'altres receptors, presenten una menor acumulació de CDP-DAG que de InsPs, exhibeixen una preferència del metabolisme de l'Ins1,4,5P₃ per desfosforilació, tenen la capacitat d'estimular la PLC en preparacions membranals i les característiques d'activació de la PLC en cèl·lules senceres s'accentuen a l'augmentar la concentració de Ca²⁺ extracel·lular. Donat que aquestes conclusions i hipòtesis sorgeixen de treballs fets en preparacions de cervell heterogènies -miniprismes i membranes corticals- no es pot excloure la possibilitat de que els dos grups de receptors es localitzin en diferents tipus cel·lulars, que alhora expressin de manera diferent els elements que implicats en la resposta. És per això que l'objectiu general inicial del treball que presentem és la comparació d'aquestes dades prèvies amb les que s'obtinguin en estimular la PLC en un sistema neuronal homogeni: els cultius primaris de neurones granulars de cerebel.

A més d'aquest estudi comparatiu, ens interessa correlacionar l'activació de la PLC per agonistes amb els senyals de Ca²⁺ derivats de les mateixes estimulacions estudiant les dues respostes en condicions experimentals idèntiques, per tal d'esbrinar els mecanismes de regulació de Ca²⁺ de l'estimulació de la PLC.

Aquests dos propòsits generals es poden concretar en diferents objectius que exposem a continuació.

1. Caracterització de l'activació de la PLC per agonistes en cultius primaris madurs de neurones granulars de cerebel de rata.

Com a primer objectiu del treball estudiarem les característiques de l'activació de la PLC per receptors muscarínics de l'acetilcolina, mGluRs del grup I, de l'endotelina, α_1 adrenèrgics, H_1 histaminèrgics i 5-HT₂ serotoninèrgics en cultius primaris madurs de neurones granulars de cerebel de rata, determinant les acumulacions d' [³H]InsPs i [³H]CDP-DAG. També analitzarem les vies del metabolisme de l' [³H]Ins1,4,5P₃ sota les diferents estimulacions. A més a més, s'estudiarà la influència del Ca²⁺ extracel·lular en les respostes quantitativament més importants.. L'estimulació de la PLC mitjançada per aquests últims receptors també l'extendrem a preparacions membranals i en homogenats de neurones granulars.

2. Estudi de l'estimulació de la PLC i els senyals de Ca²⁺ induïts pels receptors muscarínics de l'acetilcolina en cultius primaris de neurones granulars de cerebel de rata. Regulació pel Ca²⁺ extra i intracel·lular de l'activació de la PLC

Tot i el gran nombre d'estudis sobre l'activació de la PLC i la mobilització de Ca²⁺ mitjançades pels receptors muscarínics, es sap poc sobre la seva regulació i la correlació entre els dos senyals. És per això que portarem a terme un estudi extensiu de l'estimulació de la PLC en el sistema neuronal escollit anteriorment i correlacionarem aquesta resposta amb l'homeostasi del Ca²⁺ en diferents condicions experimentals.

3. Expressió i caracterització farmacològica dels mGluRs del grup I responsables de l'estimulació de la PLC i els senyals de Ca²⁺ en cultius primaris de neurones granulars de cerebel de rata.

Malgrat l'estimulació de la PLC per glutamat en cultius primaris de neurones granulars de cerebel hagi estat descrita per diferents autors, les dades sobre l'expressió dels mGluRs del grup I són molt divergents. És per això que hem considerat important determinar els subtipus de mGluRs del grup I que s'expressen en cultius de neurones granulars crescuts diferents temps *in vitro* a les nostres condicions i caracteritzar farmacològicament el receptor o receptors responsables tan de l'activació de la PLC com dels senyals de Ca²⁺ induïts per agonistes dels mGluRs en cultius madurs. En aquest context, hem volgut treure avantatge de la síntesi i comercialització de nous antagonistes més específics per un determinat subtipus de mGluR.

4. Estudi de l'estimulació de la PLC i els senyals de Ca^{2+} induïts pels receptors metabotròpics del glutamat en cultius primaris de neurones granulars de cerebel de cerebel de rata. Regulació pel Ca^{2+} extra i intracel·lular de l'activació de la PLC

Considerant les recents evidències clares sobre el paper clau del Ca^{2+} en la regulació dels mGluRs, considerem molt interessant estudiar la implicació del Ca^{2+} extracel·lular en l'activació de la PLC pels mGluRs caracteritzats anteriorment i estudiar la correlació d'aquesta resposta amb els increments en la concentració de Ca^{2+} citosòlic induïts pel mateix agonista, en un model homogeni de neurones glutamatèrgiques. A més a més, l'interés d'aquest estudi rau també en la comparació dels mecanismes moleculars implicats en aquestes respostes i en les induïdes per receptors muscarínics de l'acetilcolina, estudiades anteriorment i sota les mateixes condicions.

5. Anàlisi de l'expressió dels diferents isoenzims de la PLC en cultius primaris de neurones granulars de cerebel de rata i determinació dels canvis en la localització subcel·lular de la PLC- β 1 induïts per estimulació dels receptors muscarínics.

L'objectiu és determinar quins isoenzims de la PLC s'expressen en cultius de neurones granulars de cerebel de rata per tal de comprendre millor el grau de complexitat en què s'enmarquen les respostes que pretenem analitzar en els objectius anteriors. Per altra banda, tenint present que s'ha descrit que els receptors muscarínics estan majoritàriament acoblats a la PLC- β 1, creiem interessant analitzar si agonistes muscarínics indueixen canvis en la localització subcel·lular d'aquest isoenzim. La importància d'aquest anàlisi rau en el fet de que fins al moment no existeix cap aproximació experimental que permeti determinar l'activació selectiva d'un determinat isoenzim de la PLC, i la comparació de la translocació d'un isoenzim sota diferents estimulacions en podria ser un índex .

METODOLOGIA

1. Preparacions de teixit cerebral

1.1. Cultius de neurones granulars de cerebel

Els cultius primaris de neurones granulars s'han preparat a partir de rates de 7-8 dies seguint el protocol prèviament descrit per Gallo et al. 1982., amb petites modificacions.

Les rates es decapiten per extreure'n els cerebels, que posteriorment són deslliurats de les meninges i vasos sanguinis en un acurat procés que requereix una lupa. Una vegada els cerebels estan nets es trituren fent talls perpendiculars i els miniprismes de teixit obtinguts es transfereixen a un tub amb tampó Krebs-Ringer (KR) suplementat amb albúmina de sèrum de boví (BSA) (en mM: NaCl 120, KCl 4,8, KH₂PO₄ 1,2, NaHCO₃ 25,5, Glucosa 14, MgSO₄ 1,2 i BSA 0,3%). Després d'una centrifugació de 1500xg es segueix un protocol de disgregació enzimàtica i física. Primerament es fa un tractament de 10 minuts a 37°C amb tripsina (0,25 mgr/ml) que s'atura addicionant KR amb l'inhibidor de tripsina SBTI (0,08 mgr/ml) i DNasa I (30 UI/ml), centrifugant a 1500xg i traient el sobrenadant. Seguidament s'addiciona KR amb SBTI (0,52 mgr/ml) i DNasa (170 UI/ml) i es disgrega el teixit fent-lo passar unes deu vegades per una pipeta Pasteur amb la punta arrodonida a la flama i per una malla de niló de 40 µm de porus. La suspensió cel·lular resultant es recull per centrifugació a 1000xg (5 minuts), i després de comptar les cèl·lules viables utilitzant el colorant blau de tripà i una cambra hemocitòmetre, el sediment es resuspèn amb medi BME ('Basal Eagle Medium') suplementat amb sèrum fetal de boví (FCS) (10% v/v), glucosa (30 mM), L-glutamina (2 mM), els antibiòtics penicilina (50 IU/ml) i streptomicina (50 µgr/ml) i KCl (25mM concentració final). Aquest últim és necessari per a la supervivència de les granulars en cultiu (Gallo et al., 1987). Finalment,

les cèl·lules es sembren en plaques de cultiu pretractades amb poli-L-lisina (500 µgr/ml) un mínim de 4 hores i posteriorment rentades amb PBS, a una densitat cel·lular que oscil·la entre $0,9-2 \times 10^6$ cèl·lules viables/ml depenent de l'assaig que posteriorment es vulgui realitzar. El pretractament amb poli-L-lisina es fa per facilitar la unió de les cèl·lules i per tant per obtenir una monocapa cel·lular homogènia a tot el pou (Thangnipon et al., 1983) Els cultius s'incuben a 37°C en una atmosfera humida de 5% CO₂-95% O₂. A les 20-24 hores de la sembra s'afegeix citosina β-D-arabinofuranòsid (10 µM) per inhibir la proliferació de cèl·lules no neuronals, que poden interferir en la supervivència de les granulars i en els posteriors assajos. Els estudis funcionals es fan amb cultius de 8-9 dies *in vitro* (DIV). En aquestes condicions s'ha demostrat que els cultius contenen un 90%-95% de neurones granulars, contenint un 3-6 % de neurones GABAèrgiques i un 2-4% de cèl·lules glials i endotelials (Kingsbury et al.,1985).

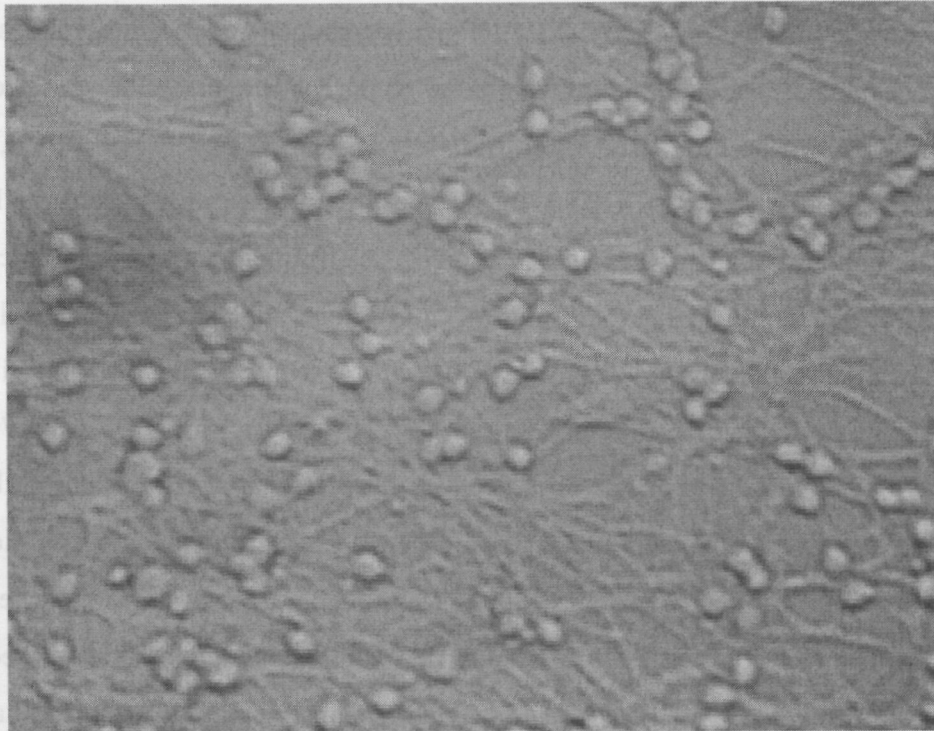


Figura 1.1. Cultiu primari de neurones granulars de cerebel de rata als 9 DIV

1.2. Membranes de neurones granulars de cerebel

Les membranes de neurones granulars s'han obtingut a partir dels cultius primaris mantinguts 8-9 DIV en plaques de 6 pous a densitat de 2×10^6 cèl·lules viables/ml (o el que és el mateix a 4×10^6 cèl·lules viables/pou) i premarcats 24 hores amb [^3H] inositol (2 $\mu\text{Ci/ml}$), seguint un protocol prèviament descrit (Claro et al., 1989a) i optimitzat per aquests cultius.

El cultiu es renta amb tampó Krebs-Henseleit (KH) (en mM: NaCl 113, NaHCO_3 25, KCl 4,7, MgSO_4 1,2, KH_2PO_4 1,2, glucosa 11, HEPES-sodim salt 5 i CaCl_2 1,3 a pH 7,4 i gasejat amb 5% CO_2 -95% O_2) i seguidament es rasquen les plaques amb TRIS-HCl 20 mM i EGTA 1 mM a pH 7,0. El contingut de totes elles s'ajunta en una sola alíquota, d'uns 12 ml/placa rascada, i s'homogeneïtza amb un politron (Kinematica) a la posició num. 5 durant 15 segons tres vegades. Aquest homogenat es centrifuga 20 minuts a 39.000xg i el sediment resultant es resuspèn en el mateix tampó per ser posteriorment rehomogenitzat amb el politron com en el pas anterior. Es torna a centrifugar la suspensió 20 minuts a 39.000xg i el sediment obtingut es guarda fins a la seva utilització a 4°C o -80°C si aquesta preparació membranar és utilitzada en dies posteriors.

1.3. Homogenats de neurones granulars de cerebel

Per la preparació dels homogenats s'ha seguit un protocol molt semblant al descrit per l'obtenció de membranes.

Es parteix de cultius primaris de neurones granulars de cerebel sembrats també en plaques de 6 pous i a la mateixa densitat (2×10^6 cèl·lules viables/ml o 4×10^6 cèl·lules viables/pou) i premarcats igualment amb 2 $\mu\text{Ci/ml}$ d' [^3H] inositol durant 24 hores. Després d'un rentat amb tampó KH, s'afegeixen 0,375 ml/pou de tampó d'homogeneïtzació, es rasquen les plaques del cultiu i les cèl·lules s'ajunten a una mateixa alíquota. El tampó d'homogeneïtzació té una composició semblant a la del medi intracel·lular, alt en K^+ i baix en Na^+ , de manera que en l'homogeneïtzació i en l'assaig les concentracions finals són en mM: KCl 120, MgCl_2 6, KH_2PO_4 2, acetat sòdic 5, HEPES 20 i ATP 5, pH 6,9 i amb el calci tamponat a 0,1 μM (EGTA 3 mM i CaCl_2 0,272 mM). Per calcular les concentracions d'EGTA i CaCl_2 necessàries per tenir aquesta concentració de Ca^{2+} lliure, s'aplica la

fòrmula:

$$[\text{Ca}^{2+}]_{\text{total}} = [\text{Ca}^{2+}]_{\text{lliure}} \times ([\text{EGTA}]K_{\alpha} + K_{\alpha}[\text{Ca}^{2+}]_{\text{lliure}} + 1) / (1 + K_{\alpha}[\text{Ca}^{2+}]_{\text{lliure}})$$

Es considera que la constant d'afinitat (K_{α}) de l'EGTA pel Ca^{2+} a 37°C i a pH 6,9 és de 10^6 M. (Sasaguri et al., 1985)

Finalment, s'homogeneïtza el teixit amb el politron (Kinematica) a la posició num. 5 durant 15 segons 3 vegades i es guarda a 4°C fins a la seva utilització.

2. Determinació de l'activitat PLC

2.1. Determinació de l'acumulació d' ^3H -InsPs

2.1.1 En cultius de neurones granulars de cerebel

Per tenir un reflex de l'activitat de la fosfolipasa C es pot determinar l'acumulació dels ^3H -InsPs induïda en presència de Li^+ (10 mM), inhibidor acompetitiu de diferents passos del metabolisme de l' ^3H -InsP₃.

Amb aquesta finalitat, plaques de 24 pous de cultius de neurones granulars crescudes a una densitat de 1,5-1,8 cèl·lules viables/ml (0,75-0,9 cèl·lules viables/pou) es premarquen durant 24 hores amb ^3H inositol (2 $\mu\text{Ci/ml}$). L' ^3H inositol difon al citoplasma cel·lular i és incorporat a la membrana plasmàtica donant lloc a diferents ^3H -PtdInsPs, entre ells el ^3H PtdIns4,5P₂, substrat de la PLC.

El primer pas en els assajos d'estimulació de la PLC consisteix en treure el medi de cultiu i fer dos rentats de 15 minuts cada un amb tampó KH (en mM: NaCl 113, NaHCO₃ 25, KCl 4,7, MgSO₄ 1,2, KH₂PO₄ 1,2, glucosa 11, HEPES-sodim salt 5, amb o sense CaCl₂ 1,3 afegit, pH 7,4 equilibrat amb 5%CO₂-95%O₂ i a 37°C) per permetre

l'estabilització de les cèl·lules després de passar-les de condicions despolaritzants (el medi de cultiu té una elevada concentració de KCl) a condicions no despolaritzants. Posteriorment les cèl·lules es preincuben amb 0,5 ml/pou de tampó KH, moment en què s'afegeixen els antagonistes i/o altres compostos si aquests són requerits. La reacció d'estimulació de la PLC s'inicia 20 minuts després amb l'addició de 50 µl de tampó que conté l'agonista i el Li^+ i s'atura afegint 0,25 ml de metanol fred (a 4°C), després d'aspirar el tampó de reacció.

Una vegada finalitzada la reacció, el següent pas consisteix en fer una separació de fases de manera que obtinguem una fase aquosa amb els ^3H -InsPs formats i una fase orgànica que conté els ^3H -fosfoinosítids. Per tant, les plaques es rasquen i el contingut s'afegeix en tubs. Els pous es renten amb 0,55 ml addicionals de metanol fred i s'afegeix a cada tub juntament amb 0,9 ml de cloroform. Després de 15 minuts com a mínim, s'addicionen 0,75 ml de HCl 0,17 M i les dues fases generades es separen centrifugant 5-7 minuts a 2000xg. Una mostra de la fase aquosa, 1 ml, es neutralitza amb NH_4OH 1,5 M, es dilueix amb 3 ml d'aigua i es sotmet a una cromatografia d'intercanvi aniònic amb 0,5 ml de resina Dowex (1x8, 100-200 mesh, formate form) per separar-ne els ^3H -InsPs. Després de fer tres rentats amb 3 ml amb aigua, dos amb 3 ml d'una mescla de format sòdic 60 mM i borax 5 mM, per eliminar l' ^3H inositol i els ^3H -glicerofosforilinositols, els ^3H -InsPs s'elueixen amb 6 ml (2x3 ml) de format amònic 1M/àcid fòrmic 0,1 M. Finalment, s'afegeixen 12 ml de líquid d'escintil·lació (Flo-scintTM IV, Packard) a la mostra eluïda de la columna i es determina la radioactivitat (eficiència d'aproximadament el 44 %). La fase orgànica es renta amb 1,55 ml de metanol/aigua (1:1) i es centrifuga durant 5-7 minuts a 2000xg. Es mesuren els ^3H -fosfoinosítids determinant la radioactivitat d'una alíquota d'aquesta fase orgànica a la que se li ha evaporat el cloroform i posteriorment addicionat 3 ml de líquid de centelleig (Emulsifier-safeTM, Packard), tal i com ha estat descrit pel nostre grup anteriorment (Claro et al., 1993a) (eficiència 'aproximadament el 23 %).

L'activitat PLC s'expressa com el percentatge de les dpm dels ^3H -InsPs respecte la suma de les dpm dels ^3H -InsPs i dels ^3H -lípid, per tal de corregir les diversitats originades per la diferent incorporació de l' ^3H inositol a la membrana plasmàtica i la possible diferent densitat cel·lular de cada pou després de mantenir els cultius 8-9 DIV.

2.1.2.- En membranes de neurones granulars de cerebel

A l'igual que en les monocapes, l'activitat PLC es pot determinar mesurant l'acumulació d' ^3H -InsPs formats en presència de Li^+ . En aquest assaig, però, cal controlar la concentració de Ca^{2+} del tampó ja que el Ca^{2+} pot activar la PLC a concentracions superiors a la fisiològica. També cal la presència de $\text{GTP}\gamma\text{S}$, anàleg no hidrolitzable dels nucleòtids de guanina, en substitució del GTP endogen d'una cèl·lula intacte, ATP-Mg^{2+} , per garantir un reciclatge continu dels polifosfoinosítids, i el detergent desoxicolat sòdic (DOC) que proporciona un estat de permeabilització de les vesícules membranoses òptim per a l'assaig.

Els assajos es realitzen seguint el protocol descrit per Claro et al., 1995. Així, a tubs de polipropilè s'addiciona un volum total de 0,25 ml que conté : tampó de reacció (en mM: TRIS-Maleat 10, ATP 2, LiCl 10, Cl_2Mg 6, DOC 1, EGTA 3 , el CaCl_2 necessari per tenir la concentració de Ca^{2+} lliure desitjada -calculada a partir de la fórmula exposada a l'apartat 1.3 dels mètodes i normalment 100 nM-, pH 6,8 a 37°C, i $\text{GTP}\gamma\text{S}$ i agonista ambdós a concentracions variables depenent de l'assaig. La reacció s'inicia quan s'afageixen 100 μl de membranes de neurones granulars de cerebel premarcades amb [^3H]-Inositol (obtingudes tal i com s'explica a l'apartat 1.2) resuspeses amb el tampó de reacció. La reacció d'estimulació de la PLC és de 30 minuts a 37°C mantenint-se els tubs en constant agitació, i s'atura addicionant 1,2 ml de metanol:cloroform 2:1.

Per a la separació de fases s'addicionen 0,5 ml de cloroform i 0,5 ml d' HCl 0,25 M i es segueix el mateix protocol que en les cèl·lules senceres (apartat 2.2).

Els resultats són igualment expressats com el % del quocient de les dpm dels ^3H -InsPs i la suma de les dpm dels ^3H -InsPs i dels ^3H -lípid.

2.1.3.- En homogenats de neurones granulars de cerebel

Per a la mesura dels ^3H -InsPs acumulats per estimulació de la PLC en homogenats, es parteix de mostres de 0,2 ml d'homogenats de neurones granulars (veure apartat 1.3) a les quals se'ls addiciona LiCl i desoxicolat sòdic en una concentració final de 10 i 1 mM respectivament, l'agonista desitjat, i, quan es requereix, $\text{GTP}\gamma\text{S}$ a concentració final de 1 μM . Paral·lelament a l'assaig en membranes, la reacció es fa amb un volum final de 0,25

ml, a 37°C durant 30 minuts i es para amb metanol:cloroform 2:1. Per la separació de fases se segueix el mateix protocol que en membranes i monocapes. Així mateix, els resultats s'expressen de la manera descrita.

2.2. Determinació de la generació d'InsP₃

L'activitat PLC també es pot mesurar determinant l'increment en la massa d'InsP₃ induïda per agonistes. Aquesta aproximació experimental permet una bona caracterització de l'activitat PLC inicial, però, degut al ràpid metabolisme de l'InsP₃, pot ser difícil en determinats sistemes biològics.

S'ha determinat l'InsP₃ generat a partir d'un mètode d'unió competitiva amb un radiolligand i seguint un protocol optimitzat per cèl·lules en cultiu (Willars and Nahorski, 1995a). Per a l'obtenció de les mostres, les neurones granulars de cerebel es sembren en plaques de 24 pous a una densitat de 1,5-1,8 cèl·lules viables/ml (0,75-0,9 cèl·lules viables/pou). Als 8-9 DIV els cultius es renten amb 0,2 ml de KH durant 30 minuts (2 x 15 minuts) a 37°C i s'inicia l'estimulació de la PLC addicionant 0,2 ml de KH amb l'agonista dissolt a la concentració apropiada. La reacció s'atura amb 0,2 ml d'àcid tricloroacètic (TCA) 1M fred (a 4°C) i es deixen les plaques aproximadament 15 minuts amb gel per una completa extracció del teixit. Aquest temps d'incubació no pot ser molt més llarg ja que es podria produir hidròlisi àcida del PtdInsP₂, fet que augmentaria els valors basals de l'assaig. Es recullen 0,16 ml de l'extracte cel·lular i es dipositen a un tub eppendorf on prèviament s'hi han addiconat 40 µl d'EDTA 10 mM. Seguidament es fa una separació de fases afegint un volum igual de la mescla tri-n-octil-amina i 1,1,2-triclorotrifluoro-età 1:1, s'agiten els tubs vigorosament i es centrifuguen a 20.000xg 5 minuts. Es recullen en un tub apart 0,1 ml de la fase aquosa, on hi ha l'InsP₃ format, i es neutralitzen amb 50 µl de NaHCO₃ 25 mM. Les alíquotes es guarden a -20 o -80°C fins a la seva utilització.

La segona part és l'assaig de radioreceptor, pròpiament dit, i té com a finalitat determinar l'InsP₃ de les mostres per competició d'unió al receptor d'InsP₃ (IP₃R) amb [³H]-InsP₃. Per tant, 30 µl de cada mostra obtinguda prèviament s'incuben 30 minuts a 4°C amb 30 µl d'[*³H]-InsP₃ (Amersham), 30 µl de tampó d'assaig (en mM: Tris-base 100 i EDTA 4, a pH 8) i 30 µl de proteïna d'unió (fraccions riques amb IP₃R obtingudes a partir de membranes de gràndules adrenals bovines segons un protocol estàndard). Les mostres,

posteriorment, es dilueixen amb 2 ml de tampó de rentat fred (en mM: Tris-base 25, EDTA 1, NaHCO₃ 5, pH 8) i es filtren a través de filtres de vidre Whatman GF/B, utilitzant un Brandel Cell Harvester. Els filtres, que contindran les fraccions riques amb l'IP₃R ara unit a l' [³H]-InsP₃ i InsP₃, es renten dues vegades amb 5 ml de tampó de rentat i es compta la radioactivitat dipositant-los a dintre vials amb 3 ml de líquid de centelleig (Emulsifier-safeTM, Packard). La radioactivitat de cada mostra es converteix a massa d'InsP₃ a partir d'una corva patró feta amb diferents mostres de concentració coneguda d'InsP₃ i tractades d'igual manera. La unió inespecífica de l' [³H]-InsP₃ als filtres es determina amb una alíquota que conté 60 µl de tampó d'assaig enlloc de 30 µl de mostra i 30 µl de tampó d'assaig.

Els resultats s'expressen com a percentatge de la massa d'InsP₃ de cada mostra respecte la massa de proteïna (en mg) determinada per una mostra representativa de cada placa de cultiu.

2.3. Determinació de l'acumulació de [³H]CDP-DAG en cultius de neurones granulars de cerebel

L'activitat PLC també es pot determinar a partir de l'acumulació d' [³H]-CDP-DAG induïda per la presència de Li⁺ (10 mM) que, tal i com s'ha dit anteriorment, indueix l'acumulació dels diferents InsPs i la conseqüent deprivació d'inositol citoplasmàtic lliure, fet que impedeix el reciclatge del [³H]CDP-DAG a PtdIns.

En aquest cas els cultius es marquen durant 24 hores amb 1 µCi/ pou de [³H]-citidina, precursora del CTP citoplasmàtic que la cèl·lula estimulada utilitza per la síntesi del [³H]CDP-DAG. El procés que comprèn els rentats, l'estimulació, l'aturada de la reacció i la separació de les fases és el mateix que en la mesura dels ³H-InsPs. Ara, però, la fase aquosa és eliminada i la fase orgànica es renta amb 1,55 ml de metanol/aigua (1:1 v/v), s'agita i es centrifuga durant 5-7 minuts a 2000xg. Finalment, es compta la radioactivitat d'una alíquota de la fase orgànica, després d'evaporar-ne el cloroform i addicionar 3 ml de líquid de centelleig (Emulsifier-safeTM, Packard).

Els resultats s'expressen com el total de les dpm de la fase orgànica corresponents al [³H]-CDP-DAG acumulat en presència de liti.

3. Separació i determinació dels ^3H -InsPs individuals per HPLC en cultius primaris de neurones granulars de cerebel

Per determinar els ^3H -InsPs individuals formats en cultius primaris de neurones granulars, s'han utilitzat plaques de 24 pous de cultius de neurones granulars crescudes a una densitat de 1,7-1,8 cèl·lules viables/ml (0,85-0,9 cèl·lules viables/pou) premarcats amb 4 μCi /pou durant 24 hores i s'ha seguit el mateix protocol d'estimulació de la PLC que per la determinació dels ^3H -InsPs globals en monocapes de neurones granulars (apartat 2.1.1).

Tanmateix, en aquest cas s'atura la reacció per un procediment diferent, aspirant el medi de reacció i addicionant 0,5 ml d'àcid tricloroacètic (TCA) 0,5 M fred. Posteriorment es deixen les plaques 30 minuts amb gel, es rasquen, s'afegeix el contingut de cada pou en un tub i es renten els pous de les plaques rascades amb 0,5 ml de tampó KH. Després d'una centrifugació de 20 minuts a 2000xg, el sobrenadant obtingut es renta amb quatre volums (4ml) d'éter per extreure el TCA, procés que es repeteix tres vegades. Finalment, es deixen les mostres tota la nit destapades perquè s'evapori l'éter restant.

L'anàlisi per HPLC requereix que les mostres, abans de ser injectades, es passin per filtres de 0,22 μm de porus. Per separar els ^3H -InsPs individuals s'utilitza una columna d'HPLC Whatman Parsitil 10 SAX amb una precolumna Whatman CSK I. S'elueix a un flux d'1ml/min amb un gradient esglaonat de concentració creixent de fosfat amònic 1,4 M a pH 3,7 (amb àcid fosfòric): a l'inici, i fins als 10 minuts, el % de fosfat amònic és 0; després s'inicia el gradient essent, als 52 minuts, del 7%; als 80, del 29%; als 110 minuts, del 70%; als 111 minuts del 100%, i es manté fins als 121 min a aquesta concentració. Es recullen alíquotes de 0,5 ml d'eluent en vials als quals posteriorment se'ls addiciona 0,5 ml d'aigua i 3 ml de líquid d'escintil·lació (Flo-scintTM IV, Packard), tal i com ha estat descrit prèviament pel nostre grup (Sarri et al., 1995). Per equilibrar el sistema d'HPLC s'han utilitzat mostres d' [^3H]-Ins1P, [^3H]-Ins1,3P₂ i [^3H]-Ins3,4P₂ obtingudes després d'incubar [^3H]-Ins1,3,4P₃ i [^3H]-Ins1,4,5P₃, respectivament, amb membranes d'escorça cerebral (Claro et al., 1989b).

Els resultats s'expressen com a percentatge del quocient de l' ^3H -InsP corresponent, i la suma dels ^3H -lípid i ^3H -InsPs. Per tant, per comptabilitzar els ^3H -lípid, el sediment obtingut en la centrifugació es tracta de manera anàloga al procediment descrit en l'apartat 2.1.1.

4. Determinació de la concentració de Ca^{2+} en neurones granulars de cerebel individuals

4.1. Determinació de la concentració de Ca^{2+} citoplasmàtic

La concentració de Ca^{2+} citoplasmàtic ($[\text{Ca}^{2+}]_c$) es pot mesurar utilitzant fluoròfors amb alta afinitat d'unió al Ca^{2+} . Aquestes molècules s'incorporen a la cèl·lula en forma d'acetoxi-metil-éster (AM) no fluorescent, que es caracteritza per ser permeable a la membrana i distribuir-se uniformement al citoplasma cel·lular, on és hidrolitzada per proteases intracel·lulars a una forma no permeable a les membranes i amb les propietats fluorescentes. El fura-2 és un dels esmentats indicadors fluorescentes més utilitzats per a determinar la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ ja que té la propietat d'emetre fluorescència creixent amb la concentració de Ca^{2+} a longituds superiors a 500 nm si s'excita a 340 nm i fluorescència decreixent, a les mateixes longituds d'ona, si l'excitació es fa a 380 nm. El càlcul de la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ a partir de la relació entre les emissions a les dues longituds d'ona d'excitació (340/380), permet evitar totes les variacions intra i interexperimentals com ara les degudes a la concentració del fluoròfor dins la cèl·lula.

La $[\text{Ca}^{2+}]_c$ de neurones granulars de cerebel individuals sota diferents condicions s'ha determinat a partir de cultius de 8-9 DIV crescuts en cobreobjectes de 22 mm de diàmetre a una densitat de $0,9-1 \times 10^6$ cèl·lules viables/ml, seguint el protocol descrit per Malgaroli et al., 1987, lleugerament modificat. La placa de petri que conté el cobreobjectes amb la monocapa neuronal, es renta amb KH i s'incuba 45-60 minuts a temperatura ambient amb KH suplementat amb BSA 0,01 % i Fura-2/AM 4 μM . Després de rentar les cèl·lules amb KH, per eliminar el Fura-2/AM sobrant, el cobreobjectes es munta a la platina d'un microscopi de epifluorescència invertida (Nikon Diaphot), acoplat a un termostatzador que assegura una temperatura de 37°C, i a un sistema de perfusió que s'utilitza tan per mantenir la monocapa neuronal amb un volum determinat i constant de KH com per addicionar els agonistes o altres compostos. En les condicions en què es pretracten les cèl·lules amb el quelant de Ca^{2+} no fluorescent BAPTA/AM o amb altres compostos com ara antagonistes de receptors, aquests s'afegeixen en aquest moment i es deixen incubant-se amb les cèl·lules el temps que es requereixi. En cas contrari, es deixen

les cèl·lules amb KH durant 10-15 minuts per assegurar que el cobreobjectes s'atemperi a 37°C.

S'escull un camp del cultiu que sigui representatiu, reconeixent les neurones granulars degut a la seva característica morfologia i grandària cel·lular i se les excita a 340 i 380 nm tot grabant imatges de fluorescència a longituds d'ona superiors a 510 nm cada 1,6 segons amb una càmera acoplada a un intensificador de carga (Photonic Science) fent una prèvia substracció del soroll de fons (background). Una vegada acabat l'experiment, es calculen les $[Ca^{2+}]_c$ de diferents cèl·lules a partir de les relacions de 340/380 amb el sistema Applied Imaging Quanticell 700, i a partir d'una corva de calibració feta segons l'equació de Grynkiewicz et al., 1985:

$$[Ca^{2+}] = \{(R-R_{min})/(R_{max}-R)\} \times K_d \times \beta$$

on: R és la relació 340/380 enregistrada; K_d la constant d'afinitat del Fura-2 pel Ca^{2+} ; β és la relació de la senyal sota condicions mínimes i màximes de Ca^{2+} . La constant R_{min} ha estat calculada a partir d'una solució estàndard lliure de Ca^{2+} (EGTA 5mM, KCl 100 mM) que contenia Fura-2 4 μ M i R_{max} ha estat calculada amb la mateixa solució, però ara saturada amb Ca^{2+} ($CaCl_2$ 5mM).

Els resultats d'aquestes determinacions es calculen a partir dels promitjos de la $[Ca^{2+}]_c$ de 20-25 neurones granulars de varis cultius independents. En les gràfiques, però, es presenten els perfil ($[Ca^{2+}]_c$ vers temps) d'una única i cèl·lula representativa.

4.2. Estimació de la quantitat de Ca^{2+} enmagatzamat dintre els reservoris intracel·lulars de Ca^{2+}

La quantitat de Ca^{2+} enmagatzemat dintre els reservoris intracel·lulars es pot estimar indirectament determinant l'increment en la $[Ca^{2+}]_c$ que es produeix al permeabilitzar les membranes cel·lulars en absència de Ca^{2+} extracel·lular (Montero et al., 1990). Es tracte d'una aproximació esperimental que permet la comparació dels nivells de Ca^{2+} dels reservoris sota diferents condicions, però que podria estar lluny de la determinació exacte dels valors absoluts de Ca^{2+} als reservoris intracel·lulars.

Al tractar-se d'una determinació de la $[Ca^{2+}]_c$ el protocol a seguir és el descrit anteriorment a l'apartat 4.1. Ara, però, després de sotmetre les cèl·lules a la condició desitjada, es fa un rentat d'un minut amb KH sense Ca^{2+} i s'addiciona ionomicina $2 \mu M$ (diluida en KH sense Ca^{2+}) que permeabilitza més selectivament les membranes intracel·lulars. El resultat és un increment de la $[Ca^{2+}]_c$ degut a l'alliberament de Ca^{2+} dels reservoris intracel·lulars en forma de pic transitori seguit d'un plató que va disminuint a l'anar perfusionant nou KH sense Ca^{2+} . Com a control de la permeabilització de les cèl·lules per part de la ionomicina, al final de cada experiment s'addiciona KH amb Ca^{2+} $1,3 \text{ mM}$, observant-se un gran increment en la $[Ca^{2+}]_c$ en les cèl·lules efectivament permeabilitzades.

Els resultats s'expressen com al promig de l'increment net de la $[Ca^{2+}]_c$ de 20-25 cèl·lules de diferents cultius.

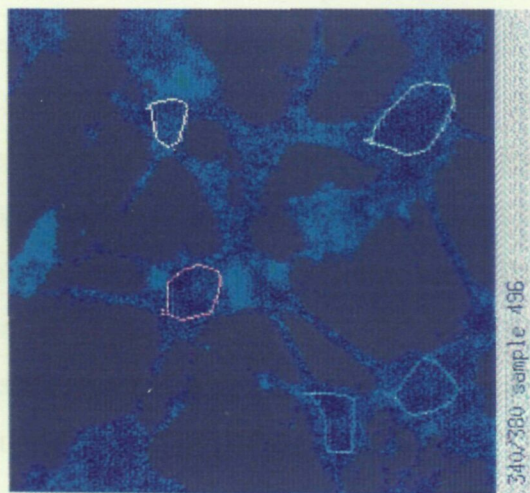
5. Determinació de l'expressió de les diferents isoformes de la PLC a cultius primaris de neurones granulars de cerebel.

5.1 Assaig d'immunodetecció

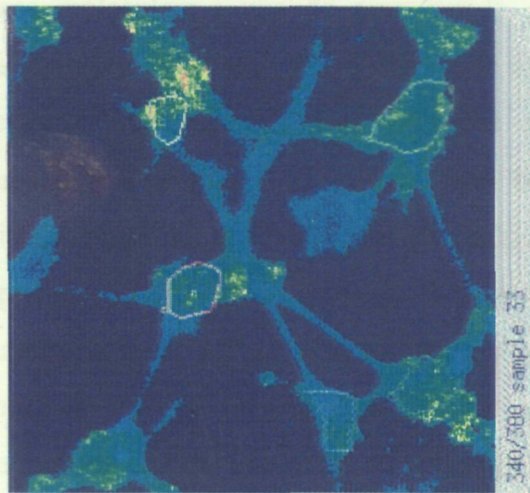
S'ha determinat quines isoformes de la PLC s'expressen a neurones granulars de cerebel seguint d'un protocol desenvolupat al laboratori del Prof. S.R: Nahorski, en el qual s'obtenen extractes cel·lulars de neurones granulars de cerebel i es sotmeten a la tècnica de 'Western Blot'.

Els cultius primaris de neurones granulars es creixen en plaques de 6 pous a una densitat de $1,8-2 \times 10^6$ cèl·lules viables/pou ($3,6-4 \times 10^6$ cèl·lules viables/pou). Als 8-9 DIV, s'aspira el medi de cultiu i es fan dos rentats, de 15 minuts cada un, amb tampó KH a $37^\circ C$. Seguidament es posen les plaques de cultiu en gel i es substitueix el KH per $200 \mu l$ de tampó de solubilització (Tris $9,2 \text{ mM}$ /EGTA $0,92 \text{ mM}$ (TE), NaCl 150 mM , SDS 0.1%

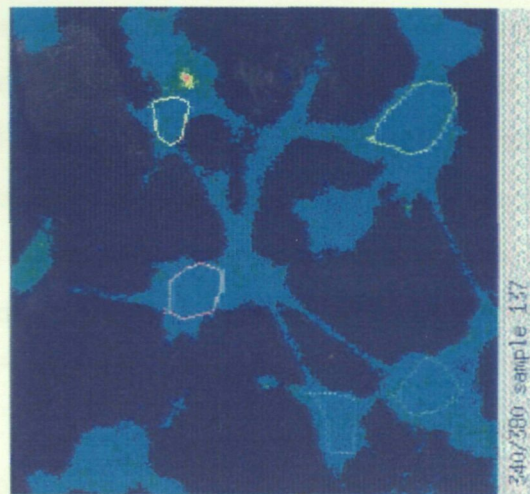
20/11/97d Rat CGCs (9 div)



basal

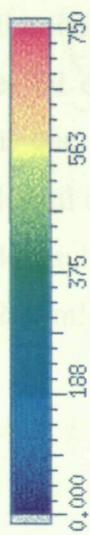
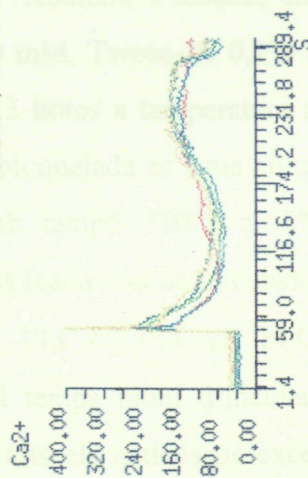


40mM KCl



Krebs

Probe1 : 340 / 380



(v/v), etilfenilpolietilen glicol (Nonidet P40) 1% (v/v), desoxicolat 0.5% (w/v), fenilmetilsulfonil fluorur (PMSF) 0.5 mM, benzamidina 10 μ M i iodoacetamida 5 μ M). Passats 30 minuts, els lisats cel·lulars es recullen i es dipositen en tubs epperdonfs que es centrifuguen a 20.800xg durant 5 minuts i a 4°C, per tal d'excloure, al sediment, les cèl·lules no lisades i fragments membranals molt grans que posteriorment poden causar problemes metodològics. Finalment, a una al·lquota de 150 μ l del sobrenadant se li afegeix un volum igual de tampó d'aplicació (Tris 100mM, dodecilsulfat sòdic (SDS) 2%, blau de bromofenol 0,1%, glicerol 10% i ditiotreitòl (DTT) 200 mM) i es guarda la mostra a -80°C fins a la seva utilització.

S'ajunten dues al·lquotes per obtenir una mostra d'aproximadament 30 μ g de proteïna que es desnatura (5 minuts a 75-100°C), es carrega en un minigel desnatura (8% SDS-PAGE amb dues butxaques, una petita pels marcadors de pesos moleculars i una de gran per la mostra a analitzar, i es connecta a una font d'alimentació elèctrica a 200 V durant 45 minuts. Posteriorment el gel es transfereix a una membrana de nitrocel·lulosa utilitzant un aparell de transferència semi-seca. La transferència es fa a 0,65 mA/cm² una hora. El 'blot' resultant s'incuba, en constant agitació, amb tampó TBST (Tris-HCl 20mM, NaCl 150 mM, Tween-20 0,1% a pH 7,5) suplementat amb llet descremada en pols al 5% durant 3 hores a temperatura ambient o durant tota la nit a 4°C. Una vegada la membrana està bloquejada es situa en una cubeta "multi-canal" de manera que s'omple cada pou amb tampó TBST al 5% de llet descremada en pols que conté un dels següents anticossos (cada pou de la cubeta conté un anticòs diferent): anti PLC- β 2, PLC- β 3, PLC- β 4, PLC- δ 1, PLC- δ 2, PLC- γ 1, PLC- γ 2 a una dilució 1:500 i anti PLC- β 1 a una dilució 1:2000. El temps idoni d'incubació de la membrana amb l'esmentada solució és de 3 hores per tots els anticossos excepte l'anti PLC- β 1 que només requereix 1 hora d'incubació. Els anticossos anti les diferents isoformes de la PLC reconeixen determinats aminoàcids de l'extrem C-terminal d'aquestes isoformes i han estat comprats a Santa Cruz Biotechnology i a Upstate Biotechnology. Després de rentar la nitrocel·lulosa amb TBST durant 25 minuts (2 x 1 min, 1 x 15 min, 2 x 5 min), s'incuba una hora amb una dilució 1:1000 (en tampó TBST al 5 % de llet descremada en pols) d'un anticòs secundari de cabra anti-conill (o anti-ratolí, si es vol detectar la PLC- δ 1) conjugat amb peroxidasa (Sigma Chemicals). Seguidament es renta la

membrana amb tampó TBST (2 x 1 min, 1 x 15 min, 2 x 5 min), i les bandes immunoreactives es detecten utilitzant el kit de reactius de quimioluminiscència incrementada ECL (Amersham), i exposant la membrana a un film autoradiogràfic (Hyperfilms, d'Amersham) durant 5-30 minuts.

5.2. Assaig d'immunoprecipitació

Aquest assaig és un assaig alternatiu al d'immunodetecció per determinar l'expressió de les diferents isoformes de la PLC que s'expressen en neurones granulars. Es tracta d'un protocol similar però més llarg ja que les mostres es pretracten abans de ser carregades al gel, i que requereix més teixit de partida degut a que es necessita una mostra diferent per cada isoforma de la PLC a detectar. De totes maneres, s'ha utilitzat per obtenir una detecció més selectiva de les isoformes de la PLC ja que les mostres que es sotmeten a Western Blot estan enriquides en la isoforma de la PLC a determinar.

A l'igual que en l'assaig d'immunodetecció (apartat 5.1.) es parteix de cultius primaris de neurones granulars crescuts 8-9 DIV en plaques de 6 pous a una densitat de $1,8-2 \times 10^6$ cèl·lules viables/pou ($3,6-4 \times 10^6$ cèl·lules viables/pou). Aquestes monocapes són rentades 30 minuts (2 x 15 minuts) amb tampó KH a 37°C, que és substituït per 0,5 ml de tampó de solubilització i deixades 30 minuts en gel. Posteriorment les mostres provinents de dos pous s'ajunten en un mateix tub eppendorf que es centrifuga a 20,800g durant 5 min i a 4 °C, per eliminar cèl·lules no solubilitzades. S'agafa una al·lquota de 0,8 ml del sobrenadant i es diposita en un tub eppendorf al que posteriorment se li afegeixen 2,5 µl del l'anticòs anti PLC-β1, PLC-β2, PLC-β3, PLC-β4, PLC-δ2, PLC-γ1 o PLC-γ2 i es deixa en gel durant una hora. Els immunocomplexes són capturats afegint 100 µl de proteïna A-sepharosa i deixant les mostres en constant agitació rotacional durant almenys 30 minuts a 4°C. Seguidament els complexos es centrifuguen a 20,000 xg durant 2minuts a 4°C, es descarta el sobrenadant i s'addicionen 1 ml de tampó TTBS fred (a 4°C) (Tris base 100 mM, NaCl 1.5 M, Tween-20 0,05% a pH 7,4). Els tubs s'agiten vigorosament i es tornen a centrifugar a 20,000 xg durant 2minuts a 4°C. El rentat amb TTBS es repeteix una altra vegada i llavors es fan dos rentats iguals amb 1 ml de tampó TE (en M: Tris-HCl 1 i EDTA 0,5, a pH 7,4) també fred. A les mostres resultants se-lis addiciona un volum igual de tampó de mostra i es guarden a -80°C fins a la seva utilització.

A partir d'aquest punt es fa un anàlisi d'immunodetecció igual al descrit a l'anterior subapartat (5.1.), ara però el gel de 8% SDS-PAGE té 10 butxaques, en una de les quals s'hi carregaran els marcadors dels pesos moleculars i en la resta una alíquota de les diferents mostres obtingudes anteriorment corresponent a uns 20 µg of proteïna. Per altra banda, la primera incubació després de bloquejar la membrana de nitrocel·lulosa es fa en una cubeta que conté tampó TBST al 5% de llet descremada en pols i una dilució de tots els anticossos anti-PLC α a una dilució 1:500 excepte l'anticos anti PLC- β 1 que es dilueix a 1:2000.

6. Assajos de translocació de diferents isoformes de la PLC a cultius primaris de neurones granulars de cerebel

Les varies isoformes de la PLC tenen diferents localitzacions cel·lulars. En aquest estudi s'ha volgut determinar el moviment des del citoplasma a la membrana plasmàtica (conegut com a translocació) de les diferents isoformes de la PLC després de ser activades per un estímul en concret.

El protocol seguit parteix de cultius de neurones granulars de cerebel crescuts 8-9 DIV en plaques de 6 pous a una densitat de $1,8-2 \times 10^6$ cèl·lules viables/pou ($3,6-4 \times 10^6$ cèl·lules viables/pou). El primer pas de l'assaig consisteix en substituir el medi de cultiu per KH, fent primerament dos rentats de 15 minuts a 37°C i posteriorment estimular les monocapes amb 0,4 ml de KH amb l'agonista durant diferent temps. La reacció s'atura addicionant 0,2 ml de tampó de lisis fred (a 4°C) (en mM: Tris/HCl 20, EGTA 5, EDTA 2, DTT 1, PMSF 0,5, benzamidina 0,010, iodoacetamida 0,005 a pH 7,4) i deixant les plaques en gel. Després de 30 minuts, les plaques es rasquen i les mostres es recullen en tubs que es centrifuguen a 20,800xg durant 15 min a 4°C per obtenir les fraccions membranoses al sediment i la fracció citosòlica al sobrenadant. Aquestes últimes es en tubs diferents i es resuspenen els sediments amb 0,2 ml de tampó de solubilització. S'afegeix a ambdues fraccions de cada mostra un volum igual de tampó de mostra i es guarden a -80°C fins a la seva utilització.

Seguidament es fa una immunodetecció seguint el mateix protocol que en els

subapartats anteriors (5.1. i 5.2.). En aquest cas, però, al·lotes de 30 µg de proteïna de les diferents mostres de la fracció citoplasmàtica, prèviament desnaturalitzades per ebullició durant 5 minuts, es carreguen a un minigel de 8% SDS-PAGE i al·lotes de 30 µg de proteïna de les diferents mostres de la fracció membranosa, també desnaturalitzades, en un altre minigel. Les dues membranes de nitrocel·losa obtingudes són immunoanalitzades alhora per evitar diferències derivades de diferent exposició de les membranes als anticossos o als reactius de quimioluminiscència.

Els films obtinguts són analitzats per densiometria i els resultats s'expressen com el percentatge de la isoforma de la PLC present a la fracció membranosa respecte el total de la isoforma de PLC expressada (suma de la fracció citoplasmàtica i a la fracció membranosa).

7. Determinació de l'expressió dels diferents mGuRs del grup I a cultius primaris de neurones granulars de cerebel

L'expressió dels receptors metabotrópics del glutamat del grup I s'ha analitzat en extractes cel·lulars de neurones granulars de cerebel també seguint un protocol d'immunodetecció descrit prèviament per Hermans et al., 1998a.

Les neurones granulars de cerebel es cultiven en plaques de 6 pous a una densitat de $1,8-2 \times 10^6$ cèl·lules viables/pou ($3,6-4 \times 10^6$ cèl·lules viables/pou). Després de 3, 6, 9 o 12 DIV els cultius es renten amb tampó KH durant 30 minuts (2 x 15 minuts) i es deixen en gel per ser solubilitzats 0,5 ml d'un tampó d'aplicació modificat per tal d'obtenir condicions altament reductores que impedeixin la dimerització dels receptors (en mM: Tris-HCl 125, DTT 50, SDS 4%, glicerol 20% i blau de bromofenol 0,01% a pH 6,8). Les mostres es recullen en tubs i es renten els pous amb 0,5 ml d'aigua/pou que posteriorment s'afegeix als tubs.

Els Western blots es fan amb minigels de 5% SDS-PAGE, carregant 10 µg de proteïna a cada línia. Després de 2 hores a 80 V els gels es transferèixen a membranes de nitrocel·lulosa també amb un aparell de transferència semi-seca a $0,65 \text{ mA/cm}^2$ però durant 2 hores. Les membranes es bloquegen tal i com s'ha descrit a l'apartat 5.1. i posteriorment s'incuben amb tampó TBST al 5% de llet descremada en pols amb un anticòs anti l'extrem C-terminal del receptor mGluR1α (Chemicon) diluït 1:3000 o amb un anticòs anti l'extrem C-terminal del receptor mGluR5 (Upstate biotechnology) diluït 1:2000. Després de rentar

les membranes de nitrocel·lulosa amb tampó TBST durant 32 minuts (4 x 8 minuts) es tornen a incubar amb una solució de TBST al 5% de llet descremada en pols, ara però que contingui una dilució 1:1000 de l'anticòs secundari de cabra anti-conill i conjugat amb peroxidasa (Sigma Chemical). Després de 2 hores es tornen a fer 32 minuts (4 x 8 minuts) de rentat amb TBST i es detecten les proteïnes immunoreactives tal i com s'ha descrit anteriorment.

En aquest assaig s'han utilitzat com a controls negatius i positius de la immunodetecció dels receptors metabotrópics del grup I, cèl·lules CHO transfectades amb el receptor mGluR1 α humà (CHO-hmGluR1 α) i cèl·lules CHO transfectades amb el receptor mGluR5 humà (CHO-hmGluR5a). Es tracten de línies cel·lulars transfectades establement amb un vector que a part de contenir el gen del receptor metabotrópic d'interés té un promotor activable per IPTG. Així, constitutivament les cèl·lules no expressen o expressen nivells molt baixos del receptor transfectat, però preincubant les cèl·lules durant aproximadament 20 hores amb determinades concentracions d'IPTG adicionades al medi es poden induir diferents nivells d'expressió del receptor. Els extractes cel·lulars d'aquestes cèl·lules, CHO-hmGluR1 α i CHO-hmGluR5a, s'obtenen seguint el protocol descrit anteriorment per neurones granulars, però partint de plaques de 24 pous de cultius confluents. La immunodetecció es fa conjuntament amb les mostres obtingudes de cultius primaris de les neurones granulars però carregant, generalment, a cada minigel 10 μ g de proteïna de mostres de cèl·lules CHO-hmGluR1 α i 2.5 μ g de mostres de cèl·lules CHO-hmGluR5a.

8. Determinació de la proteïna de les diferents preparacions de teixit cerebral

La determinació de la concentració de proteïna present en les diferents preparacions de neurones granulars (lisats cel·lulars, membranes, homogenats, etc) s'ha fet pel mètode de Lowry i utilitzant el BSA com a estàndard (Lowry et al., 1951). Aquest mètode s'ha preferit al de Bradford i al de Lowry utilitzant com a estàndard immunoglobulines G, ja que després d'analitzar diferents mostres pels tres mètodes i varies vegades, s'ha vist que

és el més idoni per determinar quantitats de proteïna de 1-50 µg.

9. Tractament de les dades

Els resultats s'expressen amb la mitjana i un error estàndard de la mitjana (SEM). L'anàlisi estadístic s'ha fet amb el programa GRAPHPAD PRISM, comparant dades entre dos grups amb el test de *t* d'Student, generalment per dades aparellades. Les comparacions múltiples respecte un grup control s'han analitzat segons la prova ANOVA seguida de test de Dunnett. Per ambdós anàlisis estadístics, el nivell de significació considerat per determinar dades significatives ha estat de $p < 0,05$, si no s'indica el contrari.

Les corbes concentració-efecte i d'inhibició s'han ajustat per regressió no lineal, amb el mateix programa informàtic GRAPHPAD PRISM, utilitzant per les primeres l'equació de Hill:

$$E = E_{\text{màx}} [L]^n / ([L]^n + EC_{50}^n)$$

on: E és l'efecte; $E_{\text{màx}}$ l'efecte màxim; EC_{50} la concentració d'agonista que produeix la meitat de l'efecte màxim; n el coeficient de Hill; i [L] la concentració d'agonista. En els assajos amb preparacions membranals, el terme agonista es refereix a GTP γ S+agonista.

Les corbes d'inhibició han estat analitzades amb la següent equació:

$$100 - \%E = 100 [I] / (IC_{50} + [I])$$

on: 100-%E és el percentatge de l'efecte inhibít respecte l'efecte màxim (en absència d'antagonista); [I] la concentració d'antagonista; i IC_{50} la concentració d'antagonista que indueix la meitat de l'inhibició màxima.

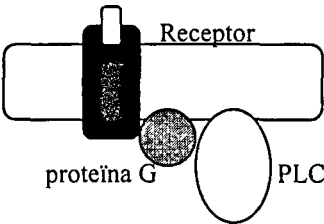
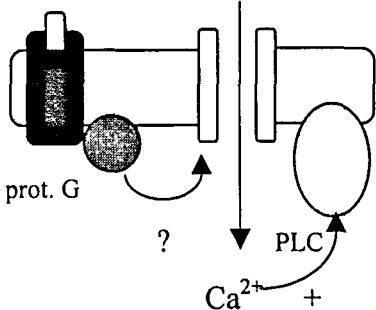
RESULTATS

1. Caracterització de l'activació de la PLC per diferents receptors acoblats a proteïnes G en cultius primaris de neurones granulars de cerebel de rata. Comparació amb l'estimulació de la PLC a miniprismes d'escorça cerebral.

1.1. Introducció

Tal i com s'ha comentat en la introducció, al SNC, la PLC pot ser estimulada per una gran varietat de neurotransmissors i estímuls externs (). Treballs previs del nostre grup van caracteritzar l'activació de la PLC per varis receptors acoblats a proteïnes G en membranes i miniprismes d'escorça cerebral de rata (Claro et al., 1993a; Sarri et al., 1995). Els resultats mostren com, malgrat pertànyer a una mateixa família, els receptors estudiats presenten característiques i possiblement mecanismes d'activació d'aquest sistema efector diferents. Així, els receptors α_1 adrenèrgics, H_1 histaminèrgics, $5-HT_2$ serotoninèrgics, $mGluR_{1,5}$ metabotròpics del glutamat, m_1 i m_3 muscarínics de l'acetilcolina, i receptors de l'ET es poden classificar en dos grups. El primer, format pels receptors muscarínics i els serotoninèrgics $5-HT_2$, es caracteritza perquè la seva activació produeix, en presència de Li^+ , una equilibrada acumulació dels InsPs i CDP-DAG i una preferència, en el metabolisme de l'Ins1,4,5P₃, per la via de fosforilació a Ins1,3,4,5P₄. Per altra banda, aquests receptors poden activar la PLC en preparacions membranals en presència de nucleòtids de guanina no hidrolitzables, fet que indica que l'activació de la PLC té lloc via proteïna G. El segon grup, format per la resta de receptors, es caracteritza per presentar una menor acumulació de CDP-DAG que la esperada en funció de la formació dels InsPs i una preferència del metabolisme de l'Ins1,4,5P₃ per la via de la desfosforilació. A més a més, els membres

d'aquest grup no tenen la capacitat d'estimular la PLC en preparacions membranals, i les seves característiques d'activació de la PLC en cèl·lules senceres s'accentuen a l'augmentar la concentració de Ca^{2+} extracel·lular. Per tant, es va proposar que aquests receptors activen la PLC de forma secundària a una entrada de Ca^{2+} (taula 1.1). D'acord amb les dades obtingudes en aquests estudis, també es va suggerir que les característiques de l'activació de la PLC (acumulació d'InsPs i CDP-DAG i preferència per una determinada via en el metabolisme de l'Ins1,4,5P₃) estan condicionades pel mecanisme d'activació de la PLC (via proteïna G o via Ca^{2+}).

	Grup a m1/3, 5-HT ₂	Grup b α_1 -AR, H ₁ , mGluR _{1/5} , ET
[³ H]CDP-DAG / InsPs	[³ H]CDP-DAG \cong InsPs	[³ H]CDP-DAG < InsPs
Ins4P+Ins1,4P ₂ / Ins1P	Ins4P+Ins1,4P ₂ < Ins1P	Ins4P+Ins1,4P ₂ > Ins1P
Estimulació de la PLC en membranes en presència de GTP γ S	Sí	No
Mecanisme d'activació	 <p>Directe</p>	 <p>Indirecte</p>

Taula 1.1. Resum de l'estudi sobre l'activació de la PLC a escorça cerebral.

De totes maneres, aquestes conclusions i hipòtesis sorgeixen de treballs fets en preparacions heterogènies -miniprismes i membranes corticals- i per tant, no es pot excloure l'heterogeneïtat cel·lular com a responsable d'aquestes diferències en els mecanismes i característiques de l'activació de la PLC per part de receptors acoblats a proteïnes G. Així, hi ha la possibilitat de que els dos grups de receptors esmentats anteriorment s'expressin en dos tipus cel·lulars diferents, i per tant cal considerar per una banda, la possibilitat de que els mecanismes d'activació d'aquest sistema efector vinguin condicionats pel tipus cel·lular on té lloc la resposta, i no pel receptor que l'inicia; i per una altra banda, que les característiques diferencials de l'activació de la PLC no vinguin donades pel mecanisme d'activació d'aquesta sinò per una expressió dels enzims del metabolisme de l'InsP₃ i del DAG condicionada al tipus cel·lular.

És per això que l'objectiu inicial del treball que presentem era la caracterització de l'activitat PLC en un sistema neuronal homogeni: els cultius primaris de neurones granulars de cerebel.

1.2 Curs temporal de l'activació de la PLC

Per a l'estudi de l'estimulació de la PLC per diferents receptors en cultius primaris de neurones granulars de cerebel de rata, primerament, hem determinat l'acumulació d'InsPs al llarg del temps, induïda pels següents receptors: receptors α_1 -adrenèrgics estimulats amb noradrenalina (NA) 30 μ M; H₁ histaminèrgics amb histamina (HA) 1 mM, 5-HT₂ amb serotonina (5-HT) 100 μ M; receptors de l'endotelina, amb endotelina 1 (ET-1) 0,1 μ M; receptors metabotròpics del glutamat (mGluR) amb l'agonista 1S,3R-ACPD 1 mM, específic pels receptors metabotròpics, i amb el glutamat (Glu) 1 mM en presència de CNQX 30 μ M (per eliminar la participació dels receptors ionotròpics AMPA) i D-AP5 50 μ M, (per descartar contribucions degudes als receptors ionotròpics NMDA, malgrat que les condicions d'assaig per elles mateixes no afavoreixen la seva activació degut a la presència de Mg²⁺ al tampó); i receptors muscarínics de l'acetilcolina, activats amb l'agonista carbacol (CCh) 1 mM. En aquesta estimulació no hi ha participació dels receptors nicotínics de l'acetilcolina, d'acord amb Whitman et al. (1991) i amb les nostres dades d'experiments que mostren com l'addició d'atropina 1 μ M -un antagonista dels

receptors muscarínics- inhibeix totalment la resposta (dada no mostrada).

Tal i com es veu a al figura 1.1. a tots els temps estudiats, i en especial a temps llargs, el Cch és l'agonista que indueix una major estimulació de la PLC, seguit pels agonistes dels receptors mGluRs, i posteriorment per l'endotelina. La NA, HA i 5-HT indueixen estimulacions quantitativament molt més inferiors i, conseqüentment, difícils de mesurar.

El perfil d'acumulació d'³H-InsPs al llarg del temps també revela diferències en l'activació de la PLC pels diferents agonistes. Així, mentre el Cch provoca una acumulació d'³H-InsPs caracteritzada per una fase inicial lineal i de gran pendent seguida per un menor increment que es torna pràcticament nul als 60 minuts, l'estimulació de la PLC induïda pels agonistes dels receptors mGluRs arriba a un màxim als 30 minuts. Per altra banda, l'ET-1 als 15 minuts d'estimulació encara no és capaç d'induir una acumulació d'³H-InsPs significativament diferent de la basal, tot i que als 30 minuts la resposta ja és aproximadament del doble del basal. La resta d'agonistes estudiats, indueixen una estimulació de la PLC quantitativament molt més inferior i més o menys lineal al llarg del temps. Per altra banda, l'acumulació d'³H-InsPs a nivell basal es manté pràcticament constant en les condicions assajades.

El conjunt d'aquestes dades ens permeten, per tant, afirmar que als 30 minuts d'estimulació tots els receptors estudiats indueixen una resposta representativa de la seva eficàcia, i per tant els posteriors assajos de les característiques de l'activitat PLC els hem realitzat estimulants els cultius durant aquest temps.

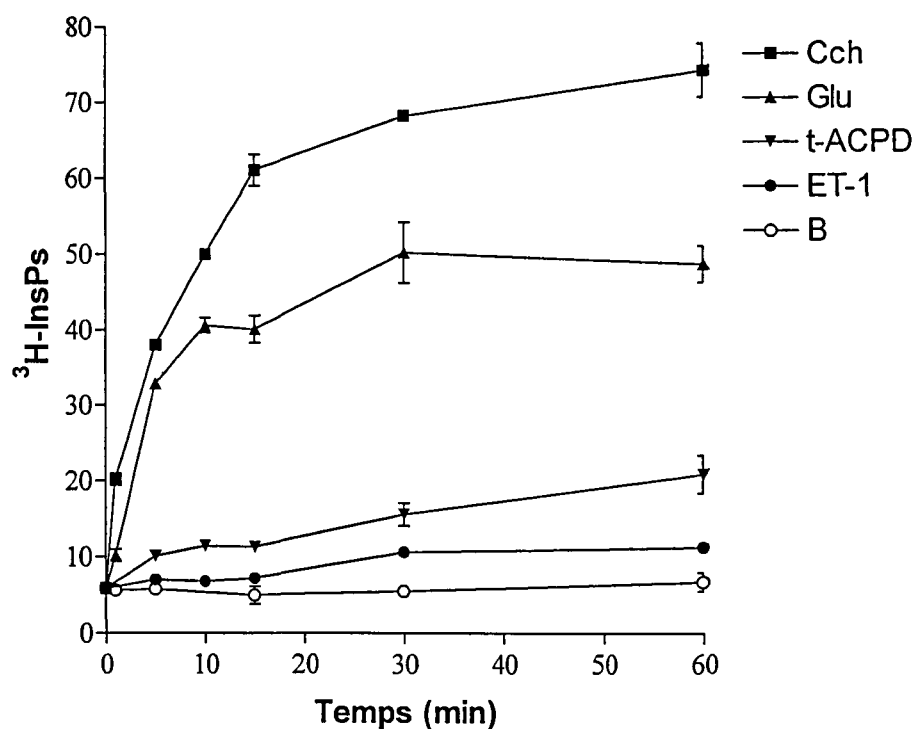


Figura 1.1. Acumulació d'³H-InsPs al llarg del temps. Els cultius primaris de neurones granulars han estat marcats amb ³H-inositol durant 24 hores, després de les quals s'ha substituït el medi de cultiu per un tampó Krebs-Henseleit. Les cèl·lules s'han estimulat en presència de 10 mM de LiCl amb Cch (1mM), Glu (1mM), t-ACPD (1mM) o ET-1 (0,1 μM). Els ³H-InsPs s'han calculat com $\frac{{}^3\text{H-InsPs} \times 100}{{}^3\text{H-InsPs} + {}^3\text{H-lípids}}$ i els resultats s'expressen com mitges \pm S.E.M. de 3 diferents experiments fets per triplicat.