

**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**

### 1.3. Estimulació de la PLC en astròcits

Malgrat que els cultius primaris de neurones granulars es caracteritzin per ésser altament homogenis (aproximadament el 95 % en les nostres condicions), abans de seguir en la caracterització de la transducció del senyal via PLC en aquests cultius, ens hem volgut assegurar que la resposta mesurada correspon realment a les neurones granulars. Així, considerant que els tipus cel·lular contaminant més abundant en els nostres cultius són les cèl·lules glials, en especial els astròcits (2-3 %) (Kingsbury et al., 1985), hem determinat l'activitat PLC de cultius d'astròcits de cerebel. Aquests cultius s'han obtingut seguint el mateix protocol que l'emprat en cultius de CGC però sembrant l'extracte cel·lular en plaques sense estar pretractades amb poli-L-lisina i mantenint els cultius fins a la seva confluència (de 21 a 30 DIV) en el mateix medi de cultiu que els cultius de CGC, en aquest cas, però, a concentracions baixes de  $K^+$ .

Els nivells d'acumulació d' $^3H$ -InsPs obtinguts pels diferents agonistes són molt inferiors als determinats en neurones granulars, tant en condicions basals com estimulades, exceptuant-ne la NA. Així, als 30 minuts l'acumulació basal és de  $2,8 \pm 0,1\%$   $^3H$ -InsPs/( $^3H$ -InsPs +  $^3H$ -lípid), i aquesta pot ser incrementada a  $6,3 \pm 0,8$  pel Cch 1mM;  $7,1 \pm 0,6$  per la 5-HT 100mM;  $11,6 \pm 0,3$  per la NA 30  $\mu$ M;  $5,2 \pm 1,5$  per HA 1mM;  $8,7 \pm 1$  per l'ET-1 0,1  $\mu$ M;  $3,6 \pm 1,6$  pel t-ACPD 1mM i  $8,7 \pm 0,1$  pel Glu 1mM).

Es dedueix, per tant, que en cultius primaris de neurones granulars l'activitat PLC que es mesura correspon a les neurones granulars i es pot excloure la participació d'altres tipus cel·lulars en les nostres determinacions.

### 1.4. Acumulació de [ $^3H$ ]CDP-DAG com a índex de l'activitat PLC

L'activitat PLC es mesura, generalment, determinant la quantitat d'un dels seus productes d'activació, l'Ins1,4,5P<sub>3</sub>, o l'acumulació dels  $^3H$ -InsPs en presència de  $Li^+$  després de marcar el teixit amb [ $^3H$ ]inositol. Però, en cèl·lules amb una concentració baixa d'inositol lliure en l'estat basal, l'acumulació del [ $^3H$ ]CDP-DAG provinent del reciclatge del [ $^3H$ ]DAG, és també un reflexe de l'estimulació de la PLC.

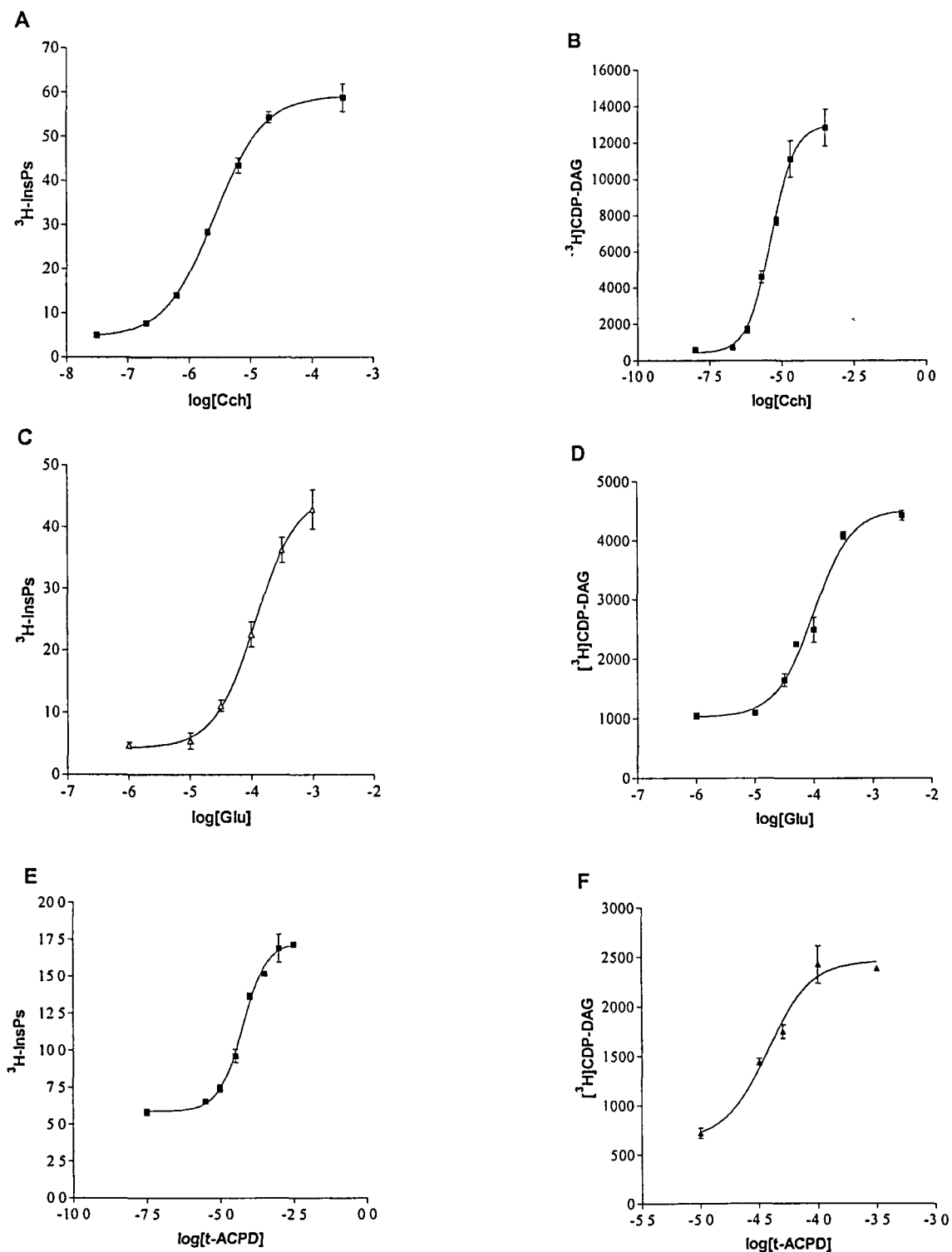
Com que les neurones granular de cerebel en cultius tenen una baixa capacitat d'acumular inositol (Gray et al., 1994; del Rio et al., 1996), en un principi les determinacions del [<sup>3</sup>H]CDP-DAG acumulat haurien de ser un bon índex de l'activitat PLC en aquest sistema. De totes maneres, i abans de passar a anàlisis més avançats, ens hem proposat comprovar aquest fet determinant les eficàcies en acumular <sup>3</sup>H-InsPs i [<sup>3</sup>H]CDP-DAG dels dos receptors que indueixen una més bona estimulació de la PLC, els receptors muscarínics de l'acetilcolina i els metabotrópics del glutamat.

A la gràfica 1.2. i a la taula 1.2. es pot observar com, la potència del Cch, Glu (en presència d'inhibidors dels iGluRs) i 1S,3R-ACPD, és del mateix ordre en l'acumulació dels <sup>3</sup>H-InsPs i del [<sup>3</sup>H]CDP-DAG, fet que corrobora la hipòtesi anteriorment esmentada i que confirma les acumulacions de [<sup>3</sup>H]CDP-DAG com a bon índex de l'activitat PLC.

Per altra banda, cal fer esment que si bé el 1S,3R-ACPD té una major potència per estimular la PLC que el Glu, la seva eficàcia és molt menor, i exhibeix, de fet, un comportament d'agonista parcial, tal i com analitzarem més detalladament al capítol 3 dels resultats.

	Cch		Glu		t-ACPD	
	InsPs	CDP-DAG	InsPs	CDP-DAG	InsPs	CDP-DAG
<b>B</b>	5,3 ± 0,3	391 ± 104	4,2 ± 1,2	1022 ± 208	5,89 ± 0,3	667 ± 288
<b>Emàx</b>	63,3 ± 1,3	13045 ± 656	53,6 ± 2,2	4529 ± 264	17,25 ± 0,4	2464 ± 201
<b>EC<sub>50</sub> (µM)</b>	3,3 ± 0,3	4,6 ± 0,2	116 ± 1,1	100,4 ± 1,2	56,8 ± 1,1	37,5 ± 1,2
<b>n<sub>H</sub></b>	1,0 ± 0,1	0,8 ± 0,2	1,0 ± 0,1	1,35 ± 0,3	1,0 ± 0,1	2,4 ± 1,4

**Taula 1.2. Paràmetres de l'activació de la PLC per agonistes en monocapes de neurones granulars de cerebel.** Els paràmetres: acumulació basal (B), efecte màxim (Emàx), concentració que produeix el 50% de l'Emàx (EC<sub>50</sub>) i coeficient de Hill (n<sub>H</sub>) s'han determinat per ajust a l'equació de Hill per regressió no lineal, a partir de les dades de la fig. 1.2. Els valors d'Emax s'expressen pels <sup>3</sup>H-InsPs com a <sup>3</sup>H-InsPs x 100/(<sup>3</sup>H-InsPs + <sup>3</sup>H-lípids) i per l' [<sup>3</sup>H]CDP-DAG, com a dpm/pou.



**Figura 1.2.** Corbes concentració-efecte per agonistes de l'acumulació d<sup>3</sup>H-InsPs i [<sup>3</sup>H]CDP-DAG. Els cultius primaris de granulars han estat marcats amb [<sup>3</sup>H]inositol o [<sup>3</sup>H]Citidina, tal i com es descriu als mètodes. Les acumulacions dels <sup>3</sup>H-InsPs en presència de LiCl 10 mM es mostren a la banda esquerra de la gràfica, mentre que a la dreta es representen les acumulacions de [<sup>3</sup>H]CDP-DAG per la mateixa concentració de LiCl i **A i B:** induïdes pel Cch, **C i D:** el Glu (**B**) i **E i F:** el 1S,3R-ACPD. Els resultats s'expressen pel <sup>3</sup>H-InsPs com a  $\frac{^3\text{H-InsPs} \times 100}{^3\text{H-InsPs} + ^3\text{H-lípids}}$  i per l'<sup>3</sup>H]CDP-DAG, com a dpm/pou, essent mitges  $\pm$  S.E.M. de 3 experiments fets per triplicat.

## 1.5. Característiques de l'activació de la PLC en cultius de CGC

### 1.5.1. Relació entre l'acumulació de [<sup>3</sup>H]CDP-DAG i <sup>3</sup>H-InsPs

Estudis previs del nostre grup (Sarri et al., 1995) mostren com, en miniprismes d'escorça cerebral de rata, la relació de les eficàcies de sis neurotransmissors en promoure l'acumulació d' <sup>3</sup>H-InsPs de [<sup>3</sup>H]CDP-DAG no és la mateixa per tots els agonistes. Per tal de constatar si aquesta característica es compleix en un altre teixit, i alhora en diferents tipus de preparació, hem realitzat un estudi paral·lel en cultius primaris de neurones granulars de cerebel.

A la taula 1.3. presentem les acumulacions de [<sup>3</sup>H]CDP-DAG i <sup>3</sup>H-InsPs induïdes per diferents agonistes, a la concentració efectiva màxima, i a trenta minuts d'estimulació. S'observa que no tots els agonistes tenen la mateixa capacitat per estimular ambdues acumulacions. De resultes d'això, l'ordre d'eficàcies per ambdós no es manté, essent Cch (1mM) > Glu (1mM) > t-ACPD (1mM) > ET-1 (0,1µM) > HA (1mM) > NA (300µM) > 5-HT (100µM) pels <sup>3</sup>H-InsPs i Cch>Glu>5-HT>t-ACPD> NA>ET-1>HA (tots a la mateixa concentració) pel [<sup>3</sup>H]CDP-DAG.

Si es determina l'habilitat d'aquests agonistes per estimular l'acumulació del [<sup>3</sup>H]CDP-DAG respecte la dels <sup>3</sup>H-InsPs i s'assigna arbitràriament al CCh una resposta equilibrada d'acumulació d'aquests dos intermediaris donant un valor de 1 per cada una de les respostes, s'observa que la resta d'agonistes assajats (excepte la 5-HT) presenten un quocient CDP-DAG/InsPs inferior a 1, que indica una major acumulació d' <sup>3</sup>H-InsPs que de [<sup>3</sup>H]CDP-DAG en relació al Cch. Aquests valors no guarden cap relació amb la magnitud de la resposta, o sigui, amb l'eficàcia de cada agonista a acumular els dos compostos. Malgrat això, però, aquests resultats es correlacionen molt bé amb els obtinguts en miniprismes d'escorça cerebral cerebral (taula 1.3.), pels quals es troben valors molt propers a 1 per la 5-HT i molt inferiors a 1 pels altres agonistes. Sembla, per tant, que aquesta característica pugui dependre més del tipus de receptor que de teixit, preparació o estadi de desenvolupament.

	Miniprismes			
	InsPs	CDP-DAG	Relació	d'escorça cerebral
	(% sobre el basal)	(% sobre el basal)	CDP-DAG /InsPs	Relació CDP-DAG/InsPs
Cch	672 ± 58 (8)	2080 ± 524 (5)	1,00	1,00
5-HT	67 ± 33 (3)	236 ± 114 (2)	1,14	0,83
NA	87 ± 10 (5)	131 ± 141 (2)	0,46	0,26
t-ACPD	164 ± 50 (9)	175 ± 48 (5)	0,29	0,12
Glu	499 ± 64 (7)	610 ± 105 (2)	0,27	ND
ET-1	128 ± 18 (10)	43 ± 26 (5)	0,11	0,10
HA	95 ± 26 (2)	2 ± 2 (2)	0,00	0,04

**Taula 1.3. Acumulació d'  $^3\text{H}$ -InsPs i  $^3\text{H}$ CDP-DAG en neurones granulars de cerebel estimulades.** Marcant els cultius primaris de neurones granulars amb  $^3\text{H}$ Inositol i  $^3\text{H}$ Citidina s'ha pogut mesurar l'acumulació d' $^3\text{H}$ -InsPs i  $^3\text{H}$ CDP-DAG per diferents agonistes.. Els resultat s'expressen en % sobre el basal essent aquest:  $^3\text{H}$  InsPs.-  $7,8 \pm 1,0$   $^3\text{H}$ -InsPs x 100/( $^3\text{H}$ -InsPs +  $^3\text{H}$ -lípid) i  $^3\text{H}$ CDP-DAG.-  $987 \pm 259$  dpm/pou. L'índex de l'eficàcia de l'acumulació dels  $^3\text{H}$ CDP-DAG vers l'acumulació dels  $^3\text{H}$ -InsPs és la relació CDP-DAG/InsPs obtinguda considerant la relació corresponent al Cch igual a 1. Aquests resultats són mitges amb la seva S.E.M. corresponent. Entre parèntesis s'indica el nombre d'experiments realitzats. ND = no determinat.

En els estudis del mecanisme d'activació de la PLC en miniprismes d'escorça cerebral de rata es va observar que, l'eficàcia per acumular [ $^3\text{H}$ ]CDP-DAG respecte als  $^3\text{H}$ -InsPs de determinats agonistes però no per a tots ells, depenia de la concentració de  $\text{Ca}^{2+}$  extracel·lular. De resultes d'això, hem estudiat la participació del  $\text{Ca}^{2+}$  extracel·lular en l'activació de la PLC pels tres receptors que indueixen una major resposta en cultius primaris de neurones granulars, els receptors muscarínics de l'acetilcolina, receptors metabotròpics del glutamat i receptors de l'endotelina.

A la taula 1.4. presentem el percentatge de reducció de l'activació de la PLC quan al tampó de reacció no hi ha  $\text{Ca}^{2+}$  afegit. Es pot observar que la disminució de la concentració de  $\text{Ca}^{2+}$  afecta tant a l'acumulació d' $^3\text{H}$ -InsPs com la de [ $^3\text{H}$ ]CDP-DAG per tots els agonistes assajats. Però mentre que pel Cch l'acumulació d'  $^3\text{H}$ -InsPs és molt més sensible a la concentració de  $\text{Ca}^{2+}$  extracel·lular que l'acumulació de [ $^3\text{H}$ ]CDP-DAG, pel Glu aquest efecte és similar en ambdós casos. Per altra banda, l'ET-1 indueix una acumulació de  $^3\text{H}$ -InsPs menys sensible a la concentració de  $\text{Ca}^{2+}$  extracel·lular que el Cch i Glu, i la molt petita acumulació d' [ $^3\text{H}$ ]CDP-DAG que indueix en un tampó Krebs a 1,3 mM de  $\text{Ca}^{2+}$  es veu reduïda a nivells basals quan aquest  $\text{Ca}^{2+}$  és substituït per un tampó Krebs sense  $\text{Ca}^{2+}$  afegit, fet que afecta per igual les acumulacions de [ $^3\text{H}$ ]CDP-DAG estimulades pels altres dos agonistes. Aquestes dades suggereixen que la dependència del  $\text{Ca}^{2+}$  extracel·lular és similar en el cas de les acumulacions de [ $^3\text{H}$ ]CDP-DAG, però diferent en el cas de les acumulacions d'  $^3\text{H}$ -InsPs, essent l'estimulació muscarínica la més sensible a l'omissió del  $\text{Ca}^{2+}$ .

Aquests resultats es contrasten amb el que passa en l'escorça cerebral on les acumulacions d' $^3\text{H}$ -InsPs i [ $^3\text{H}$ ]CDP-DAG induïdes pel Cch es veuen igualment afectades per la concentració de  $\text{Ca}^{2+}$  extracel·lular mentre que els mGluRs presenten una major sensibilitat al  $\text{Ca}^{2+}$  extracel·lular per les acumulacions d' $^3\text{H}$ -InsPs que per les de [ $^3\text{H}$ ]CDP-DAG.

Per altra banda, es pot anul·lar totalment el  $\text{Ca}^{2+}$  lliure del medi extracel·lular si s'addiciona EGTA 0,5 mM. En aquest cas, en neurones granulars de cerebel, l'acumulació d' $^3\text{H}$ -InsPs es redueix totalment tan en condicions basals com estimulades ( $1,2 \pm 0,1$  pel basal;  $1,3 \pm 0,1$  pel Cch;  $1,6 \pm 0,3$  per l'ET-1;  $1,2$  pel Glu), fet que indica que el  $\text{Ca}^{2+}$  extracel·lular és necessari per l'activació de la PLC per agonistes però també per a l'activitat basal d'aquest enzim.

	InsPs (% reducció)	[ <sup>3</sup> H]CDP-DAG (% reducció)
Cch	81,5 ± 9,5	51,9 ± 2,2
Glu	61,2 ± 8,8	51,0 ± 5,1
ET-1	57,9 ± 0,6	*

**Taula 1.4. Reducció de les acumulacions de <sup>3</sup>H-InsPs i [<sup>3</sup>H]CDP-DAG per omissió del Ca<sup>2+</sup> extracel·lular en neurones granulars de cerebel estimulades.** Les acumulacions de de <sup>3</sup>H-InsPs i [<sup>3</sup>H]CDP-DAG induïdes per Cch, Glu i ET-1 es veuen reduïdes quan la concentració de Ca<sup>2+</sup> extracel·lular disminueix. A la taula es presenten els percentatges d'aquesta reducció calculats a partir de les estimulacions trobades en presència de 1,3 mM de Ca<sup>2+</sup>. Els resultats són mitges ± S.E.M. de 3 experiments realitzats per triplicat. \*Les acumulacions d' [<sup>3</sup>H]CDP-DAG induïdes per l'ET-1 a concentracions baixes de Ca<sup>2+</sup> són nul·les, essent els valors trobats iguals als basals.

### 1.5.2. Acumulació dels diferents isòmers dels <sup>3</sup>H-InsPs

L'Ins1,4,5P<sub>3</sub> pot ser metabolitzat a Ins1,4P<sub>2</sub> i posteriorment a Ins4P o bé fosforilat a Ins1,3,4,5P<sub>4</sub>, el qual donarà lloc finalment als isòmers Ins1P i Ins3P. La relació  $\text{Log}((\text{Ins1,4P}_2 + \text{Ins4P}) / \text{Ins1P})$  permet determinar si l'activació de la PLC per diferents agonistes implica un perfil d'acumulació d'InsPs diferent i saber quina és la via majoritària de metabolisme de l'Ins1,4,5P<sub>3</sub> (fosforilació o desfosforilació), tant en condicions basals com en condicions d'estimulació. Així, un valor del logaritme positiu indica que el metabolisme majoritari és el de desfosforilació de l'Ins1,4,5P<sub>3</sub>, mentre que un valor negatiu indica una preferència per la via de la fosforilació.

Hem determinat per HPLC l'acumulació dels diferents <sup>3</sup>H-InsPs individuals en monocapes de neurones granulars de cerebel després de ser estimulades durant 30 minuts amb diferents agonistes. En aquesta metodologia, l' [<sup>3</sup>H]Ins1P i l' [<sup>3</sup>H]Ins3P apareixen com a un sol pic, al que generalment s'anomena Ins1P, ja que són dos formes enantiomèriques



que només es poden separar amb columnes quirals.

A la taula 1.5. presentem l'acumulació de l' $[^3\text{H}]\text{Ins1P}$  i la de l' $[^3\text{H}]\text{Ins4P}+[^3\text{H}]\text{Ins1,4P}_2$  en condicions basals i en presència de diferents agonistes. Altres isòmers han estat detectats però en quantitats molt petites i per això no els hem tingut en compte. Es pot observar que en aquestes cèl·lules, en condicions basals, els nivells d' $[^3\text{H}]\text{Ins1P}$  són superiors als d' $[^3\text{H}]\text{Ins4P}$  i  $[^3\text{H}]\text{Ins1,4P}_2$ , però després de l'activació de receptors acoblats a la PLC aquestes proporcions varien. Així, en línies generals, a l'estimular-se la PLC, els nivells de  $[^3\text{H}]\text{Ins1P}$  augmenten poc, no arribant a triplicar-se, mentre que els nivells de  $[^3\text{H}]\text{Ins4P}$  i  $[^3\text{H}]\text{Ins1,4P}_2$  augmenten, més o menys de manera proporcional a la magnitud de la resposta global (total dels  $^3\text{H-InsPs}$ ). En aquest sentit, també s'observa que la major acumulació d' $[^3\text{H}]\text{Ins4P}$  i  $[^3\text{H}]\text{Ins1,4P}_2$  que d' $[^3\text{H}]\text{Ins1P}$  depèn del temps d'estimulació, a l'igual que la magnitud de la resposta global. Així si l'estimulació amb Cch és de deu minuts el  $\log((\text{Ins4P}+\text{Ins1,4P}_2)/\text{Ins1P})$  és de +0,25, valor inferior a +0,64 corresponent a trenta minuts.

Variacions en les proporcions dels derivats de l' $[^3\text{H}]\text{Ins1,4,5P}_3$  depenents del tipus d'agonista ja havien estat observades en miniprismes d'escorça cerebral de rata (Sarri et al., 1996), encara que de manera totalment diferent a les obtingudes en cultius primaris de neurones granulars de cerebel (taula 1.5.). Així, en escorça cerebral, l'acumulació d' $[^3\text{H}]\text{Ins1P}$  i  $[^3\text{H}]\text{Ins4P}+[^3\text{H}]\text{Ins1,4P}_2$  en condicions basals és equilibrada, el Cch i la 5-HT dirigeixen el metabolisme principalment vers la formació  $[^3\text{H}]\text{Ins1P}$  i la NA, HA, ET-1 i el t-ACPD vers l'acumulació d' $[^3\text{H}]\text{Ins4P}$  i  $[^3\text{H}]\text{Ins1,4P}_2$ . Per contra, en cultius de neurones granulars, l'activació de la PLC pel Cch i el Glu implica una major acumulació d' $[^3\text{H}]\text{Ins4P}$  i  $[^3\text{H}]\text{Ins1,4P}_2$  que d' $[^3\text{H}]\text{Ins1P}$ , invertint-se les condicions basals, i la resta d'agonistes, els quals no provoquen una robusta activació de la PLC, tenen un índex de la relació dels  $[^3\text{H}]\text{InsPs}$  negatiu ja que no són capaços d'augmentar tan els nivells d' $[^3\text{H}]\text{Ins4P}+[^3\text{H}]\text{Ins1,4P}_2$ . Sembla, per tant, que en neurones granulars el grau de potenciació de la via de desfosforilació de l' $\text{Ins1,4,5P}_3$  vers la de fosforilació està correlacionada amb la magnitud de la resposta originada, fet que no s'ha observat en miniprismes d'escorça cerebral. En altres paraules, la magnitud de la resposta mesurada com a acumulació d' $^3\text{H-InsPs}$  globals, és principalment aportada pels intermediaris de la ruta de desfosforilació de l' $[^3\text{H}]\text{Ins1,4,5P}_3$ .

	Ins1P	Ins4P+Ins1,4P <sub>2</sub>	Ratio**	Miniprismes d'escorça cerebral Ratio**
<b>B</b>	7,1 ± 1,7	4,7 ± 0,4	-0,36 ± 0,04	~0,00
<b>Cch</b>	13,8 ± 2,7	58,0 ± 4,5	+0,64 ± 0,04	-0,21 ± 0,03
<b>5-HT</b>	14,5 ± 0,0	4,6 ± 0,0	-0,46 ± 0,01	-0,13 ± 0,06
<b>NA</b>	7,4 ± 2,0	5,1 ± 0,5	-0,16 ± 0,01	+0,35 ± 0,02
<b>ET-1</b>	12,8 ± 0,0	11,0 ± 0,3	-0,02 ± 0,00	+0,20 ± 0,03
<b>t-ACPD</b>	13,3 ± 0,7	7,4 ± 1,1	-0,36 ± 0,11	+0,36 ± 0,01
<b>Glu</b>	19,1 ± 0,0	24,3 ± 0,0	+0,08 ± 0,02	ND

**Taula 1.5. Perfil dels diferents <sup>3</sup>H-InsPs individuals acumulats en cèl·lules granulars de cerebel estimulades.** Hem determinat l'acumulació dels diferents InsPs separats per HPLC. Els resultats s'expressen com a <sup>3</sup>H-InsPs x 100/(<sup>3</sup>H-InsPs + <sup>3</sup>H-lípids) i són mitges amb la seva S.E.M. de 3 experiments fets per triplicat.\*\*Ratio = log ((Ins4P+Ins1,4P<sub>2</sub>)/Ins1P). ND = no determinat.

En l'apartat anterior hem observat com l'acumulació dels InsPs globals és depenent de la concentració de Ca<sup>2+</sup> extracel·lular, tot i que el grau d'aquest efecte depèn de l'agonista que indueix l'estimulació de la PLC. Si es considera que alguns dels enzims del metabolisme de l'Ins1,4,5P<sub>3</sub> són regultats pel Ca<sup>2+</sup> i que l'acumulació d'InsPs globals és un reflexe de l'acumulació de la suma de les acumulacions de l'Ins4P i Ins1,4P<sub>2</sub>, hem trobat interessant estudiar com el Ca<sup>2+</sup> influeix en aquest metabolisme sota les diferents condicions d'estimulació de la PLC.

Tal i com es pot apreciar a la figura 1.3., en absència de Ca<sup>2+</sup>, la 5-HT és l'únic agonista amb capacitat d'induir una acumulació de l' [<sup>3</sup>H]Ins1P per sobre dels nivells basals. En canvi, el Cch i Glu també presenten acumulacions d'Ins4P+Ins1,4P<sub>2</sub> en aquestes condicions. Amb tot, però, els valors enregistrats són molt menors als que es troben en presència de Ca<sup>2+</sup>, així els receptors de 5-HT presenten una disminució en les acumulacions d' [<sup>3</sup>H]Ins1P i Ins4P+Ins1,4P<sub>2</sub> del 35 i 37 % respectivament, i el Cch i el Glu

veuen disminuïdes les seves acumulacions de d'Ins4P+Ins1,4P<sub>2</sub> el 85 i 73% respectivament. Aquests dos últims valors presenten una gran coincidència amb els percentatges de reducció de les acumulacions d'InsPs globals induïdes pel Cch i Glu en absència de Ca<sup>2+</sup> extracel·lular, respectivament, i presentades anteriorment a la taula 1.4. Per tant, altra vegada, es comprova com la magnitud de l'estimulació de la PLC es correlaciona amb una preponderància de la via de fosforil·lació de l'Ins1,4,5P<sub>3</sub> generat.

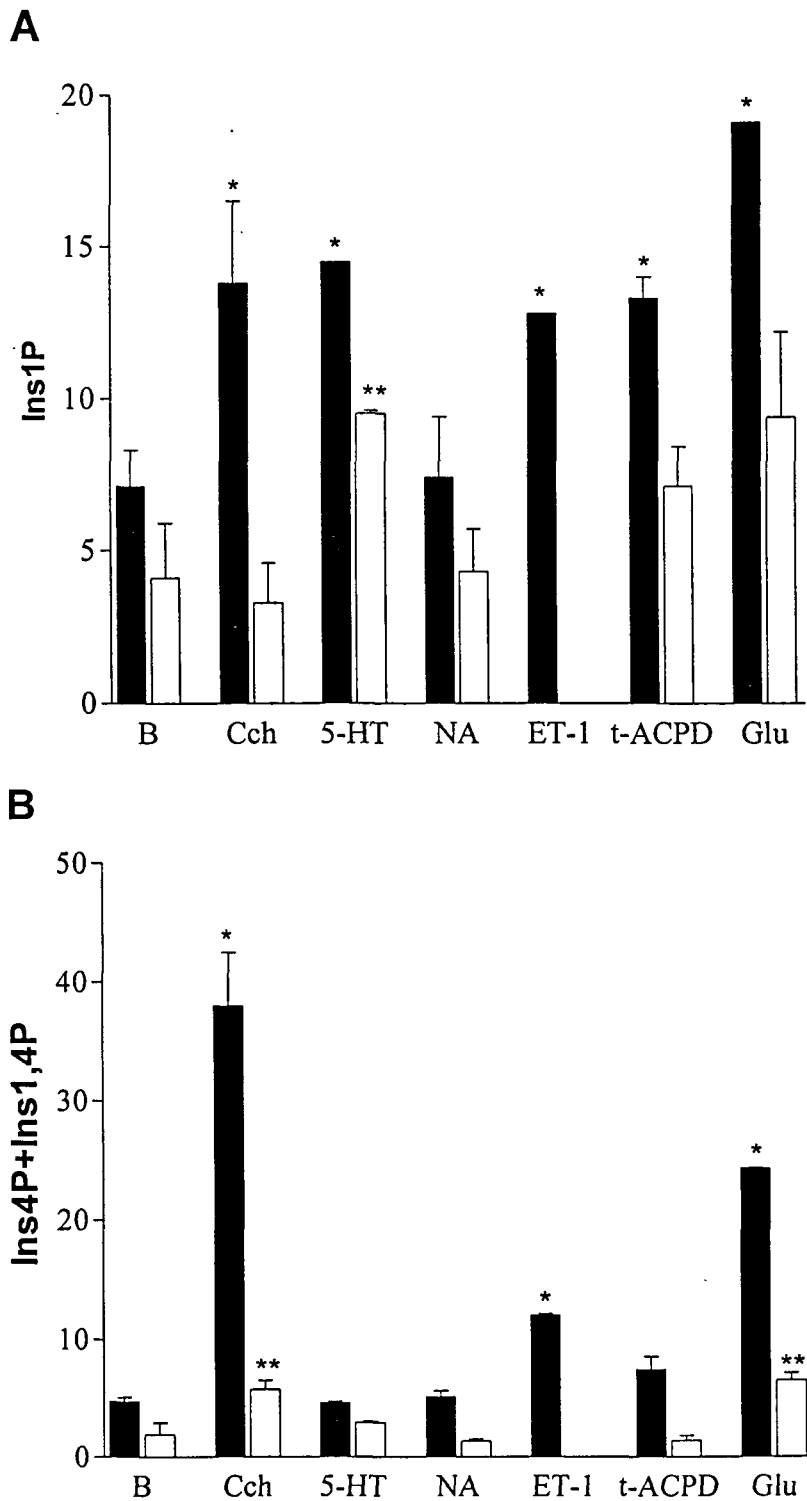
### 1.5.3. Modulació de l'activació de la PLC per inhibidors de l'entrada de Ca<sup>2+</sup>

Els resultats descrits fins ara constaten com el Ca<sup>2+</sup> extracel·lular a més de ser necessari a l'activitat PLC, també modula el funcionament d'aquest sistema de transducció de manera dependent de receptor i teixit.

Considerant que el Ca<sup>2+</sup> extracel·lular pot modular l'activitat PLC induïda per un agonista, directament a través d'un influx de Ca<sup>2+</sup> simultani a aquesta o bé indirectament, influenciant la concentració de Ca<sup>2+</sup> citoplasmàtica i els nivells de Ca<sup>2+</sup> dels reservoris intracel·lulars en estat de repòs, hem continuat l'estudi de la influència del Ca<sup>2+</sup> extracel·lular en l'activitat PLC mesurant l'acumulació d'<sup>3</sup>H-InsPs en presència d'inhibidors de l'entrada de Ca<sup>2+</sup>.

Així, s'ha utilitzat el catió inorgànic Ni<sup>2+</sup> a 1mM per a inhibir inespecíficament l'entrada de Ca<sup>2+</sup> (Tareilus and Breer, 1995; Miljanich and Ramachandran, 1995), les dihidropiridines, nimodipina i nifedipina a una concentració de 1 µM com a inhibidors específics dels canals dependents de voltatge de tipus L (Nowycky et al., 1985) i la toxina ω-Conotoxina GVIA (ω-CTx) a 0,1µM per bloquejar els canals dependents de votatge de tipus N (Olivera et al., 1985).

Els resultats (taula 1.6.) indiquen com cap d'aquests compostos inhibeixen l'activació de la PLC per Cch, Glu o ET-1, en excepció de la nimodipina que produeix una lleugera però significativa disminució de l'acumulació d'<sup>3</sup>H-InsPs per ET-1. Sembla, per tant, que l'efecte del Ca<sup>2+</sup> sobre la PLC en les diferents condicions esta més relacionat en la seva indirecta modulació de l'estat cel·lular anterior a l'activació del receptor que no per un influx de Ca<sup>2+</sup> que aquest pugui induir. Per altra banda, no cal descartar que el Ca<sup>2+</sup> extracel·lular pugui modular directament els receptors mGluRs tal i com s'ha observat en alguns sistemes cel·lulars (Saunders et al., 1998; Kubo et al., 1998).



**Figura 1.3.** Influència del Ca<sup>2+</sup> extracel·lular en l'acumulació de l<sup>[3H]</sup>Ins1P i de la suma de l<sup>[3H]</sup>Ins4P i l<sup>[3H]</sup>Ins1,4P<sub>2</sub>. L'acumulació dels <sup>3</sup>HInsPs individuals ha estat analitzada en presència (barres negres) i absència (barres blanques) de 1,3 mM de Ca<sup>2+</sup> extracel·lular. **A:** Representació de l'acumulació d<sup>[3H]</sup>Ins1P. **B:** Acumulació d<sup>[3H]</sup>Ins4P+l<sup>[3H]</sup>Ins1,4P<sub>2</sub>. Els resultats s'han calculat com la mitja amb una S.E.M. dels (<sup>[3H]</sup>Ins1Px100)/(<sup>3</sup>H-InsPs+<sup>3</sup>H-lípids) o (<sup>[3H]</sup>Ins4P+l<sup>[3H]</sup>Ins1,4P<sub>2</sub>)x100 /(<sup>3</sup>H-InsPs+<sup>3</sup>H-lípids) de 3 experiments fets per triplicat.

	control	Ni <sup>2+</sup>	Nimodipina	Nifedipina	ω-CTx
<b>B</b>	4,5 ± 0,5 (8)	4,5 ± 0,3 (3)	5,4 ± 0,4 (3)	4,6 ± 0,7 (3)	6,1 ± 0,1 (3)
<b>Cch</b>	64,7 ± 2,0 (6)	57,3 ± 1,2 (3)	63,2 ± 3,8 (3)	62,1 ± 4,5 (3)	65,6 ± 2,4 (3)
<b>Glu</b>	36,9 ± 1,0 (5)	47,3 ± 3,7 (4)	35,6 ± 5,1 (3)	34,6 ± 3,3 (3)	36,5 ± 1,2 (3)
<b>ET-1</b>	13,2 ± 1,2 (8)	9,9 ± 1,1 (5)	10,0 ± 0,9* (6)	11,2 ± 1,7 (3)	12,4 ± 0,7 (3)

**Taula 1.6. Efecte dels inhibidors de canals de Ca<sup>2+</sup> sobre l'acumulació d'<sup>3</sup>H-InsPs estimulada per agonistes.** Els cultius primaris de neurones granulars s'han preincubats quinze minuts amb tampó KH 1,3 mM de Ca<sup>2+</sup> en absència (control) o presència de Ni<sup>2+</sup> (1mM), nimodipina (1 μM), nifedipina (1μM) o ω-conotoxina (0,1 μM) i posteriorment trenta minuts amb diferents agonistes: Cch (1mM), ET- (0,1μM), t-ACPD (1mM) o Glu (1 mM). Els resultats són mitges ± S.E.M. de triplicats de diferents experiments (el num. dels quals s'indica entre parèntesis) i expressats com a <sup>3</sup>H-InsPs x 100/(<sup>3</sup>H-InsPs + <sup>3</sup>H-lípids). B = absència d'agonistes. \*Significativament diferent de l'estimulació amb ET-1 sense inhibidor (p<0,05).

### 1.6. Activació de la PLC per agonistes en membranes de neurones granulars de cerebel

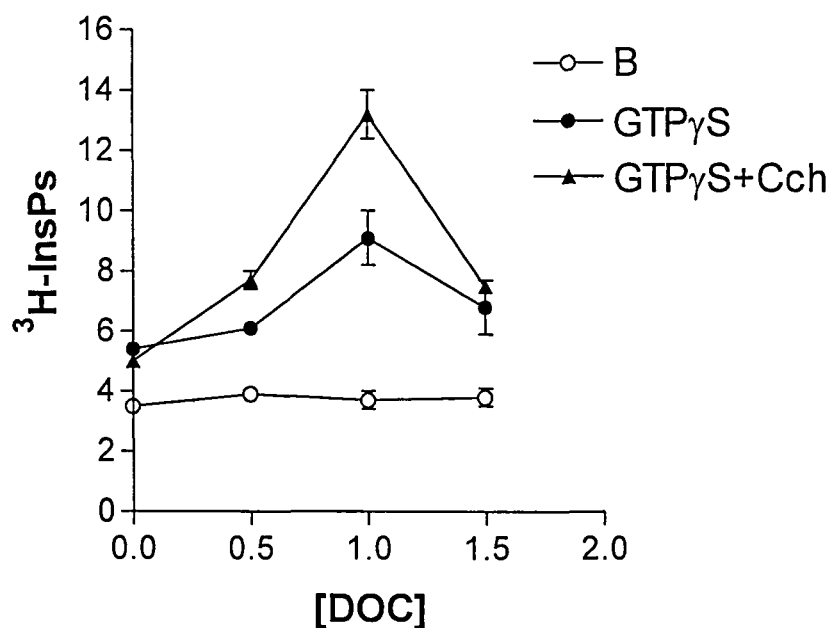
Les preparacions membranals només tenen els components del sistema de transducció del senyal associats a la membrana plasmàtica, i això els converteix en sistemes senzills molt útils per estudiar mecanismes de senyalització cel·lular. En el nostre cas, aquestes preparacions tenen els receptors dels neurotransmissors, les proteïnes G trimèriques i les isoformes de la PLC associades a membrana, per tant, la capacitat d'un agonista d'estimular la PLC en membranes implica que la senyal es genera per acoplament directe entre aquests tres elements sense que sigui necessari cap altre factor. Així, l'absència o gran disminució de l'estimulació en comparació en cèl·lules senceres, significa que manca algun element necessari per la transducció del senyal i que segurament és de naturalesa citoplasmàtica.

Tal i com hem comentat anteriorment, treballs previs del nostre grup havien mostrat com no tots els agonistes que activen la PLC en miniprismes d'escorça cerebral ho fan també en preparacions de membrana i que per tant, en alguns casos, l'activació no depèn de l'acoblament directe receptor-proteïna G-PLC, sinò de mecanismes indirectes, com ara l'entrada de  $\text{Ca}^{2+}$ . Aquests estudis, a més, trobaven una correlació entre les característiques de la PLC analitzades anteriorment (relació CDP-DAG/InsPs i via preferencial del metabolisme de l'Ins1,4,5P<sub>3</sub>) i els seus mecanismes d'activació deduïts a partir d'estudis fets en preparacions membranals.

Per aquest motiu, hem analitzat, en membranes de cultius primaris de neurones granulars de cerebel, l'activació de la PLC per nucleòtids de guanina i agonistes que en cèl·lules senceres presenten diferents eficàcies i característiques d'aquest procés. Així, les preparacions membranals, obtingudes d'aquests cultius premarcats amb [<sup>3</sup>H]-inositol, han estat incubades durant trenta minuts amb un anàleg no hidrolitzable del GTP, el GTP $\gamma$ S, a diferents concentracions i en absència o presència de Cch (1mM), Glu (1mM) o ET-1 (0,1  $\mu$ M). Aquests assatjos s'han fet sempre a una concentració de  $\text{Ca}^{2+}$  de 100 nM, per mimititzar les condicions del citosol cel·lular.

En aquests tipus de preparacions la permeabilització parcial de les vesícules de membrana és un factor important ja que permet que el GTP $\gamma$ S i els agonistes tinguin un millor accés al seu lloc d'unió, els quals estan localitzats en llocs oposats de la membrana. Treballs previs del nostre grup mostren que, en membranes d'escorça cerebral de rata, aquestes condicions òptimes s'aconsegueixen addicionant desoxicolat (DOC) a una concentració de 1mM, la qual és inferior a la concentració miscel·lar crítica (Claro et al., 1989b). Per tant, primerament, hem comprovat si la concentració de DOC idònia per experiments en membranes de neurones granulars és també 1mM. Tal i com es pot veure a la figura 1.4., el DOC 1 mM augmenta de manera màxima l'efecte del GTP $\gamma$ S, sol i amb Cch, però no efecta l'activitat PLC a nivell basal, d'aquí que hagim emprat aquest detergent a aquesta concentració en les nostres assatjos.

El GTP $\gamma$ S estimula la PLC a membranes de manera dependent de concentració i aquesta activació és augmentada per la presència de qualsevol dels agonistes estudiats, tal i com mostrem a la figura 1.5. pel Cch. Aquest efecte es manifesta en un increment, significatiu de l'efecte màxim, mentre que no es modifica l' $\text{EC}_{50}$  ni el coeficient de Hill.



**Figura 1.4. Efecte del desoxicolat en l'estimulació de la PLC per GTP $\gamma$ S i Cch en membranes de neurones granulars de cerebel.** Les membranes s'han obtingut de cultius primaris de granulars premarcats amb  $^3\text{H}$ -inositol, tal i com es descriu en els mètodes. L'assaig s'ha fet amb un tampó Tris/maleat pH 6.8 en absència (○) o presència de 1 M GTP $\gamma$ S sol (●) o amb Cch 1mM (▲). Els resultats són mitja  $\pm$  S.E. de triplicats d'un experiment representatiu. Els  $^3\text{H}$ -InsPs s'expressen com a  $^3\text{H}$ -InsPs  $\times$  100/( $^3\text{H}$ -InsPs +  $^3\text{H}$ -lípid).

Fixant la concentració de GTP $\gamma$ S a 1  $\mu$ M, a la figura 1.6. presentem les diferents estimulacions dels agonistes estudiats en preparacions de membrana i les comparem amb les estimulacions que es deriven d'altres concentracions de Ca<sup>2+</sup> i amb les seves respectives estimulacions a cèl·lules senceres. Les dades són clares, concentracions altes de Ca<sup>2+</sup>, els receptors m3, els mGluRs i els receptors de l'endotelina poden estimular la PLC en membranes de CGC, i ho fan de manera molt similar, mentre que en cèl·lules senceres el Cch presenta una eficàcia d'estimulació molt superior a la del Glu i sobretot l'ET-1. Per tant, es dedueix que si bé tots els esmentats receptors estan acoblats a proteïnes G, en l'acció del Cch, a més hi ha mecanismes addicionals que incrementen la resposta i que no són actius en les preparacions de membranes.

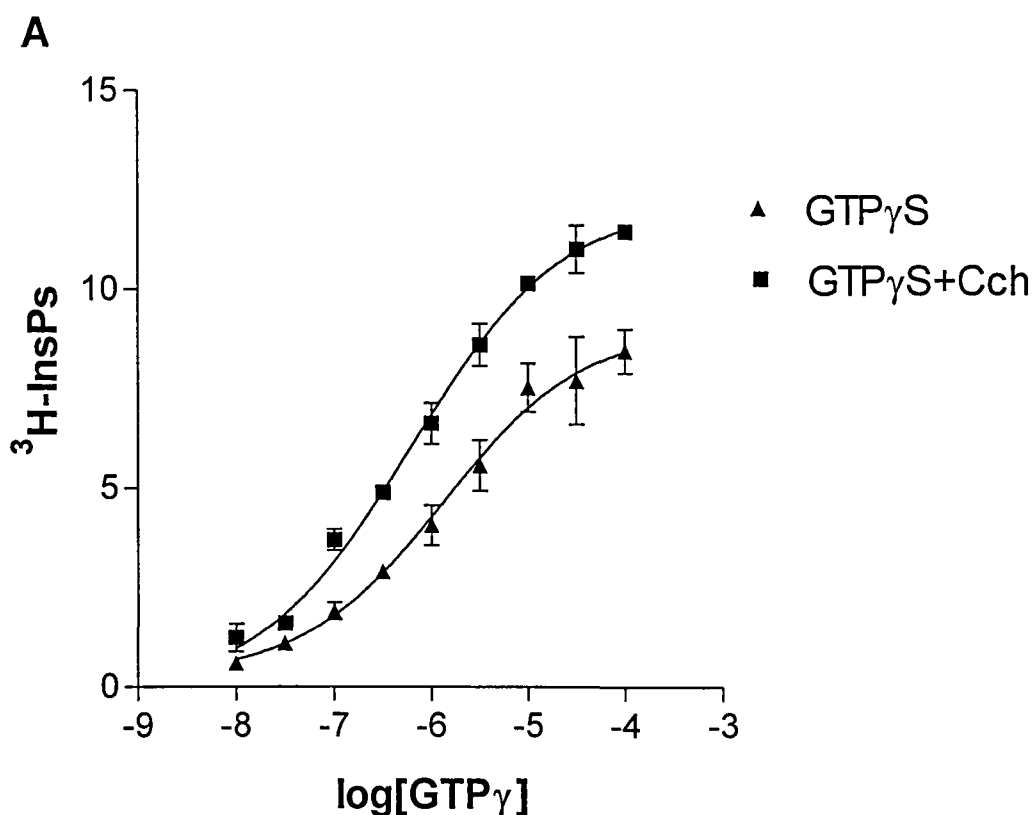
Per altra banda, s'observa que aquests resultats difereixen dels obtinguts en membranes d'escorça cerebral on només el Cch i la 5-HT, però no la NA, HA, ET-1 i t-ACPD, són capaços d'estimular l'enzim d'una manera sinèrgica a l'efecte del GTP $\gamma$ S (Sarri et al., 1996), tot i que en membranes d'escorça cerebral, concentracions de l'ordre de  $\mu$ M de Ca<sup>2+</sup> també estimulen la PLC en absència de nucleòtids de guanina i agonistes (Claro et al., 1989b). Es fa evident, per tant, que entre aquests dos sistemes no només existeixen diferències en les acumulacions de CDP-DAG, InsPs i en el metabolisme de l'Ins1,4,5P<sub>3</sub>, però també en els mecanismes pels quals un mateix receptor activa la PLC, malgrat que tots dos sistemes expressen isoenzims sensibles al Ca<sup>2+</sup>.

### **1.7. Activació de la PLC per agonistes en homogenats de neurones granulars de cerebel**

Finalment, i com a un següent pas en aquests estudis de caracterització de la PLC per diferents receptors acoblats a proteïnes G, hem explorat l'acumulació d'<sup>3</sup>H-InsPs en un sistema biològic de complexitat intermitja entre les preparacions membranals i les monocapes de cèl·lules senceres.

Així, hem analitzat l'activitat PLC en homogenats de neurones granulars de cerebel a les mateixes condicions que les utilitzades per les membranes, fixant també la concentració de Ca<sup>2+</sup> a 100 nM i incubant-los durant trenta minuts en presència d'agonistes dels receptors m3, mGluRs i receptors d'endotelina.

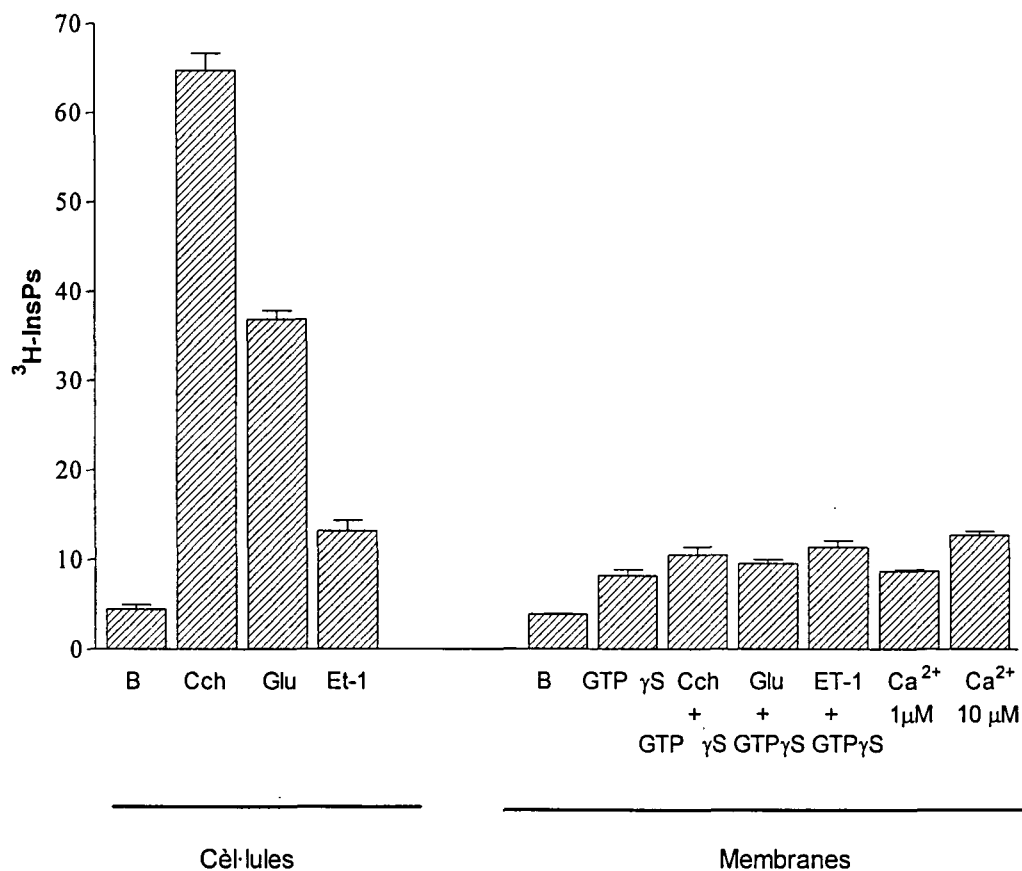




**B**

	Basal	Emàx	EC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	n <sub>H</sub>
GTP $\gamma$ S	3,7 $\pm$ 0,2	14,2 $\pm$ 0,4	1,85 $\pm$ 0,78	0,57 $\pm$ 0,06
GTP $\gamma$ S + 1mM Cch	3,5 $\pm$ 0,2	16,6 $\pm$ 0,8*	0,91 $\pm$ 0,31	0,51 $\pm$ 0,02

**Figura 1.5. Activació de la PLC per GTP $\gamma$ S i Cch en membranes de neurones granulars de cerebel.** A: Els assajos de la PLC en membranes de granulars s'han fet tal i com es descriu als mètodes. Breument, les membranes marcades han estat incubades amb tampó que conté 100 nM Ca<sup>2+</sup> i 10 mM Li<sup>+</sup>, i en presència de: ● GTP $\gamma$ S sol o amb ■ Cch 1mM. Els resultats són mitges de tres experiments realitzats per triplicat. B: Les corbes individuals corresponents a l'apartat A s'han ajustat a una equació de Hill per regressió no lineal i els paràmetres obtinguts es representen com a mitges  $\pm$  S.E.M. Els <sup>3</sup>H-InsPs s'han mesurat com a <sup>3</sup>H-InsPs  $\times$  100/(<sup>3</sup>H-InsPs + <sup>3</sup>H-lípids).



**Figura 1.6. Activació de la PLC per GTPγS, agonistes i Ca<sup>2+</sup> en membranes de neurones granulars de cerebel.** Les preparacions membranals han estat obtingudes a partir de cultius de neurones granulars premarcats amb [<sup>3</sup>H]Inositol, seguint el protocol descrit als mètodes, i posteriorment s'han estimulat alternativament amb GTPγS 1 μM sol o amb Cch 1mM, ET-1 0,1 μM o Glu 1mM o bé amb Ca<sup>2+</sup> 1 μM o 10 μM. \* valors significativament diferents de l'efecte màxim del GTPγS sol amb un nivell de significació de p<0,05.

Els resultats obtinguts, presentats a la taula 1.7., mostren clarament com els agonistes per ells mateixos tenen molt poca habilitat d'activar la PLC, i que en presència de GTPγS 1μM la resposta mesurada és similar a la que es detecta en membranes en les mateixes condicions. Per tant, es dedueix que la sola presència d'algun factor citosòlic no és suficient per a justificar la gran acumulació d'<sup>3</sup>H-InsPs en resposta al Glu i sobretot al Cch a les cèl·lules senceres, i que el mecanisme d'activació d'aquestes respostes és complex.

Per altra banda, es verifica que les neurones granulars expressen isoenzims de la PLC sensibles al  $\text{Ca}^{2+}$  ja que concentracions elevades d'aquest ió poden estimular també la PLC en homogenats (taula 1.7.). Les petites diferències entre aquestes estimulations i les que es presenten en preparacions membranals podrien explicar-se pel fet de que en homogenats poden estimular-se isoenzims de la PLC citoplasmàtics, no presents en les membranes.

	InsPs
<b>B (5)</b>	7,9 ± 0,9
<b>Cch (5)</b>	9,1 ± 1,0*
<b>ET-1 (3)</b>	8,3 ± 1,7
<b>t-ACPD (3)</b>	9,9 ± 1,5
<b>GTP<math>\gamma</math>S 1<math>\mu</math>M (5)</b>	12,7 ± 0,9*
<b>GTP<math>\gamma</math>S 1<math>\mu</math>M + Cch 1mM (5)</b>	14,7 ± 0,9**/**
<b>GTP<math>\gamma</math>S 1<math>\mu</math>M + ET-1 0,1mM (3)</b>	13,0 ± 0,5***
<b>GTP<math>\gamma</math>S 1<math>\mu</math>M + t-ACPD 1mM (3)</b>	14,1 ± 0,7***
<b>Ca<math>^{2+}</math> 1 <math>\mu</math>M (3)</b>	26,5 ± 3,4*
<b>Ca<math>^{2+}</math> 10 <math>\mu</math>M (3)</b>	37,2 ± 0,0*

**Taula 1.7. Acumulació d' $^3\text{H}$ -InsPs per GTP $\gamma$ S i agonistes en homogenats de neurones granulars de cerebel.** Els cultius primaris de neurones granulars premarcats amb  $^3\text{H}$ -inositol s'han homogenitzat i incubat trenta minuts en presència de  $\text{CaCl}_2$  100 nM i en absència o presència de GTP $\gamma$ S 1 $\mu$ M, agonistes: Cch (1mM), ET-1 (0,1  $\mu$ M) i t-ACPD (1 mM) o  $\text{Ca}^{2+}$  (1 o 10  $\mu$ M). L'acumulació d' $^3\text{H}$ -InsPs s'expressa com a  $^3\text{H}$ -InsPs x 100/( $^3\text{H}$ -InsPs +  $^3\text{H}$ -lípid). Els valors exposats són mitges ± S.E.M. de diferents experiments individuals fets per triplicat (el num. dels quals s'indica entre parèntesis). \*Significativament diferent del basal ( $p < 0,05$ ). \*\*Significativament diferent de l'estimulació per GTP $\gamma$ S ( $p < 0,05$ ). \*\*\*Significativament diferent de l'estimulació per l'agonista sol ( $p < 0,05$ ).

## 1.8. Influència del glutamat en l'estimulació de la PLC per Cch

Els cultius primaris de neurones granulars de rata són rics en neurones, la majoria de les quals són glutamatèrgiques (Gallo et al., 1982). L'alliberació de Glu és mínima en cultius primaris de granulars on la concentració de potassi és 25 mM, però sí que augmenta a l'incrementar la concentració de potassi i  $\text{Ca}^{2+}$  del medi de cultiu. Nosaltres, a l'igual que altres grups, hem vist com el Glu indueix una elevada acumulació d'InsPs en monocapes de granulars de cerebel, i per això ens hem plantejat si en l'elevada estimulació de la PLC pel Cch es produeix un alliberament de Glu que pugui activar els receptors ionotròpics o metabotròpics del Glu potenciant la resposta del Cch.

Per estudiar aquesta possible contribució del Glu hem preincubat durant vint minuts les monocapes de neurones granulars amb CNQX (30  $\mu\text{M}$ ), inhibidor dels receptors AMPA del Glu, AP-5 (50  $\mu\text{M}$ ), antagonista dels receptors NMDA, i AP-3 (1mM), antagonista dels receptors metabotròpics del Glu. Posteriorment, hem estimulat els cultius amb Cch (1mM) en presència de liti (10 mM) durant trenta minuts i s'ha mesurat l'acumulació d' $^3\text{H}$ -InsPs.

Els resultats, presentats a la taula 1.8., mostren clarament com la inhibició dels receptors de Glu no modifica l'activitat de la PLC basal ni l'induïda pel Cch, de manera que es pot afirmar, que en aquestes condicions el Glu alliberat és insuficient per activar la PLC, i que per tant, l'acumulació d' $^3\text{H}$ -InsPs mesurada pel Cch correspon exclusivament als receptors muscarínics de l'acetilcolina, i no a un mecanisme d'activació múltiple de receptors.

	condicions normals	preincubant amb AP-3 + AP-5 + CNQX
Basal	5,4 $\pm$ 0,5	5,1 $\pm$ 0,8
Cch	55,0 $\pm$ 7,1	56,8 $\pm$ 7,6

**Taula 1.8. Efecte dels antagonistes dels receptors de Glu en l'acumulació d'InsPs induïda per Cch.** Els cultius de neurones granulars es preincuben, durant 15 minuts, amb tampó Krebs-Henseleit en presència d'antagonistes dels receptors de Glu : CNQX (30 $\mu\text{M}$ ), AP-5 (50 $\mu\text{M}$ ) i AP-3 (1 mM). Posteriorment s'addiciona Cch (1mM) i LiCl (10 mM).. Els resultats s'expressen com a mitges  $\pm$  S.E.M. de 3 experiments realitzats per triplicat. Els  $^3\text{H}$ -InsPs es mesuren com a  $^3\text{H}$ -InsPs  $\times$  100/( $^3\text{H}$ -InsPs +  $^3\text{H}$ -lípid).

### 1.3. Resum i conclusions parcials

Hem determinat les característiques de l'activació per diferents neurotransmissors de la fosfolipasa C de fosfoinosítids (PLC) en cultius primaris de neurones granulars de cerebel de rata i s'han comparat amb les dades obtingudes anteriorment en miniprismes d'escorça cerebral. Els resultats mostren que la relació de les acumulacions de [ $^3\text{H}$ ]CDP-DAG i  $^3\text{H}$ -InsPs, conseqüències de l'activació de la PLC, és una característica més dependent del tipus de receptor que de la preparació biològica, ja que en ambdós preparacions biològiques el Cch i la 5-HT indueixen acumulacions equilibrades dels  $^3\text{H}$ -InsPs i [ $^3\text{H}$ ]CDP-DAG, mentre que la resta d'agonistes presenten acumulacions superiors pels primers. Altrament, el patró de formació dels diferents isòmers dels  $^3\text{H}$ -InsPs - indicatiu de la via majoritària del metabolisme de l' [ $^3\text{H}$ ]Ins1,4,5P<sub>3</sub> - és més funció del teixit on té lloc la resposta, almenys nosaltres no hem pogut trobat cap correlació entre l'estimulació d'un mateix agonista als dos teixits. En CGC, en condicions basals les acumulacions d' [ $^3\text{H}$ ]Ins1P, producte del metabolisme per fosforil·lació inicial de l'Ins1,4,5P<sub>3</sub>, són superiors a la suma de les acumulacions de [ $^3\text{H}$ ]Ins4P i [ $^3\text{H}$ ]Ins1,4P<sub>2</sub>, del metabolisme de l' Ins1,4,5P<sub>3</sub> iniciat per desfosforil·lació, però l'estimulació de la PLC es tradueix en una potenciació d'aquesta última ruta metabòlica. Així existeix una bona correlació entre les acumulacions [ $^3\text{H}$ ]Ins4P+ [ $^3\text{H}$ ]Ins1,4P<sub>2</sub> i l'eficàcia d'estimulació de la PLC associada a cada agonista.

Per altra banda, la modulació de la resposta per part del  $\text{Ca}^{2+}$  és diferent en tots els agonistes i per cada un d'ells varia segons la preparació de teixit emprada. En CGC, la participació del  $\text{Ca}^{2+}$  extracel·lular en l'activació de la PLC per Cch, Glu, i possiblement l'ET-1, sembla produir-se a través d'un mecanisme diferent a la inducció per part del receptor d'un influx de  $\text{Ca}^{2+}$ .

Aquesta diversitat en les característiques d'activació de la PLC suggereix la implicació de més d'un mecanisme d'estimulació. Així, el fet que l'activació de la PLC per proteïnes G en membranes i homogenats, però no en cèl·lules senceres, sigui similar pel Cch, Glu i ET-1 indica que pels dos primers receptors, i en especial pels receptors muscarínics, hi ha d'haver un mecanisme addicional que expliqui la gran magnitud de la seva resposta en cèl·lules senceres. Finalment, dir que el Glu endogen no contribueix en l'activació de la PLC per Cch.



## **2. Activació de la PLC i mobilització de $\text{Ca}^{2+}$ pels receptors muscarínics de l'acetilcolina. Paper modulador dels reservoris intracel·lulars de $\text{Ca}^{2+}$**

### **2.1. Introducció**

En cultius de neurones granulars, l'activació de la PLC i el senyal de  $\text{Ca}^{2+}$  induïts pel Cch o qualsevol agonista dels receptors muscarínics de l'acetilcolina és mitjançada pel receptor  $\text{m}_3$  (Whitham et al., 1991). En l'apartat anterior hem presentat dades que demostren com aquests receptors activen la PLC per acoblament directe a proteïnes G, però que alhora suggereixen la participació d'algun factor addicional responsable de la gran magnitud d'aquesta resposta i possiblement de les seves característiques. Aquest element regulatori sembla característic de l'estat cel·lular intacte, ja que no està present en preparacions membranals ni en homogenats de neurones granulars, i podria estar relacionat amb l'homeostasi del  $\text{Ca}^{2+}$  intracel·lular. Així les nostres dades mostren com l'activació de la PLC pel Cch és regulada indirectament pel  $\text{Ca}^{2+}$  extracel·lular, mostrant les acumulacions d'InsPs gran sensibilitat a incubacions llargues de les cèl·lules en absència de  $\text{Ca}^{2+}$ .

Aquestes interessants dades obtingudes en neurones granulars de cerebel, apunten a un mecanisme d'activació de la PLC pels receptors  $\text{m}_3$  complexe i diferent als fins ara descrits en sistemes neuronals, els quals només contempen regulacions per increments de la concentració de  $\text{Ca}^{2+}$  citosòlic deguts a entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  extracel·lular o/i a mobilitzacions de  $\text{Ca}^{2+}$  intracel·lulars. És per això que en aquest treball ens hem proposat analitzar quin és aquest mecanisme de transducció del senyal induït pels receptors  $\text{m}_3$ . Per tal propòsit, hem estudiat els canvis en la concentració de  $\text{Ca}^{2+}$  citosòlic ( $[\text{Ca}^{2+}]_c$ ) induïda pel Cch, hem estimat la concentració de  $\text{Ca}^{2+}$  dels reservoris intracel·lulars a diferents condicions i hem determinat l'activació de la PLC per Cch després de manipular les

concentracions intracel·lulars de  $\text{Ca}^{2+}$  amb diferents compostos i aproximacions metodològiques. A més a més, hem utilitzat com a sistema comparatiu l'activació de la PLC deguda a influxos de  $\text{Ca}^{2+}$  induïts per despolarització amb altes concentracions de  $\text{K}^+$ .

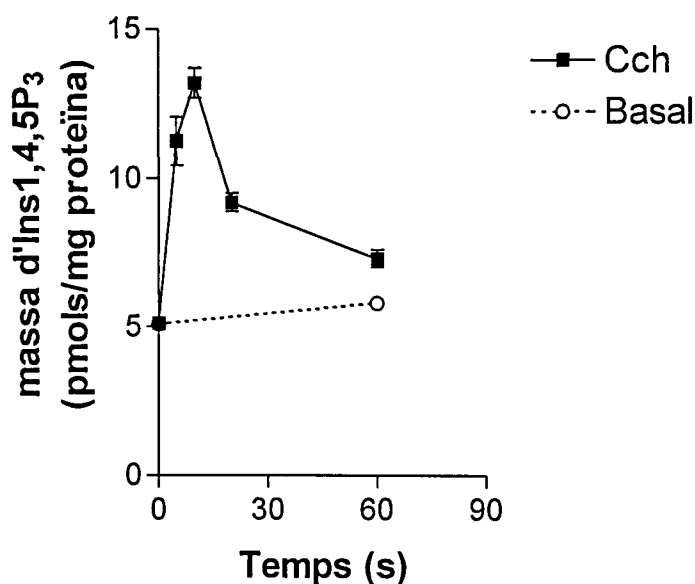
## 2.2. Determinació de l'activació inicial de la PLC

Per un acurat estudi dels mecanismes d'activació de la PLC és imprescindible tenir un reflexe de l'activació inicial d'aquest sistema de transducció de senyals intracel·lulars per així evitar mecanismes de regulació posteriors com ara la desensibilització de la resposta. I en aquest sentit, les mesures d'activitat PLC com a acumulacions d'InsPs o  $[^3\text{H}]\text{CDP-DAG}$  durant llargs períodes de temps no són índexs vàlids.

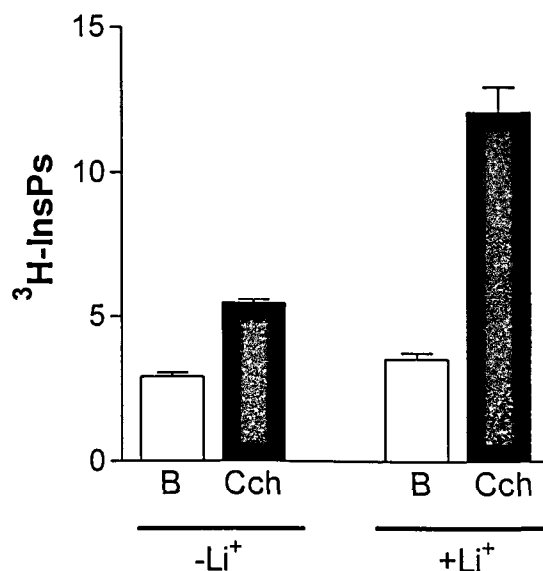
L'alternativa més generalitzada entre aquests tipus d'estudis, és la determinació de la quantitat d'Ins1,4,5P<sub>3</sub> generat pocs segons després de l'estimulació de la PLC. Ara bé, en cultius de neurones granulars, l'estimulació muscarínica de la PLC resulta en un estat transitori d'augmentats nivells d'Ins1,4,5P<sub>3</sub> que presenta un pic, d'aproximadament dues vegades el nivell basal, als 10 s de l'aplicació de l'agonista i que disminueix fins a nivells basals abans de 5 min (300 segons), tal i com es pot veure a la figura 2.1., i ha estat descrit anteriorment per altres autors (Whitham et al., 1991; Simpson et al., 1994; del Ríó et al. 1998). Es dedueix, per tant, que si bé per molts sistemes biològics els nivells d'Ins1,4,5P<sub>3</sub> són fàcilment quantificables i representen una bona mesura de estimulació inicial de la PLC (Wojcikiewicz et al., 1994a), en cultius primaris de neurones granulars els nivells baixos d'Ins1,4,5P<sub>3</sub>, propiciats per un ràpid metabolisme d'aquest, impossibiliten determinar canvis d'activitat PLC sota condicions que la modulen subtilment.

Davant aquestes dificultats metodològiques, vam adoptar una nova aproximació experimental que fos vàlida pel nostre sistema, la mesura de l'acumulació dels  $^3\text{H-InsPs}$  després d'una estimulació amb agonista d' 1 min i en presència de LiCl 10 mM, addicionat al mateix temps que l'agonista. A la figura 2.2. s'observa com la capacitat amplificadora de la senyal per part del LiCl permet estimulacions del Cch d'una magnitud fàcilment quantificables. Exposicions de les neurones granulars a LiCl inferiors a 5 min no alteren els reservoris de PtdInsPs ni els d'inositol, tal i com varen demostrar del Ríó et al. (1998).





**Figura 2.1.** Nivells d'Ins1,4,5P<sub>3</sub> al llarg del temps. Els cultius primaris de neurones granulars han estat estimulats per diferents temps amb Cch 1 mM o tampó Krebs-Henseleit (basal) i l'extracte cel·lular obtingut s'ha sotmès a un assaig d'unió de radiolligand tal i com es descriu als mètodes. Els resultats s'expressen com a pmols d'Ins1,4,5P<sub>3</sub> / mg i són mitges  $\pm$  S.E.M. de 3 experiments fets per triplicat.



**Figura 2.2.** Acumulacions d'<sup>3</sup>H-InsPs induïdes pel Cch en presència i absència de LiCl. Els cultius de neurones granulars han estat marcats amb [<sup>3</sup>H]inositol durant 24 hores, després de les quals s'ha substituït el medi de cultiu per un tampó Krebs-Henseleit i s'han estimulat durant 1 min amb Cch 1mM en absència o presència de LiCl. En aquest últim cas, el LiCl s'ha addicionat al mateix temps que l'agonista. Els resultats s'expressen com a <sup>3</sup>H-InsPs  $\times$  100 / (<sup>3</sup>H-InsPs + <sup>3</sup>H-lípids) i són mitges  $\pm$  S.E.M. de 3 diferents experiments fets per triplicat.

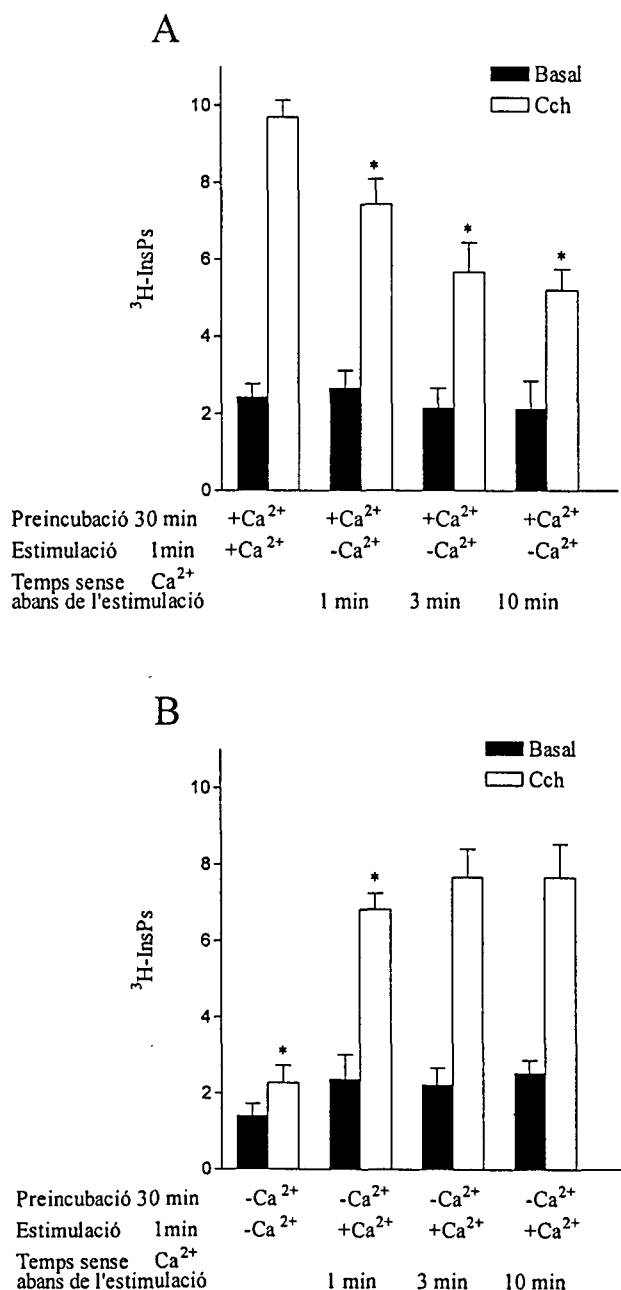
### 2.3. Efectes de canvis en la concentració extracel·lular de $\text{Ca}^{2+}$ en l'estimulació de la PLC per Cch

Per caracteritzar la dependència al  $\text{Ca}^{2+}$  extracel·lular de l'estimulació de la PLC per Cch, hem determinat, com a primer pas, l'efecte de canvis en la concentració del  $\text{Ca}^{2+}$  extracel·lular al llarg a diferents temps previs a aquesta estimulació.

La metodologia que hem utilitzat consisteix en incubar les cèl·lules 30 minuts a  $37^{\circ}\text{C}$  amb tampó Krebs-Henseleit (KH) 1,3 mM de  $\text{Ca}^{2+}$ , substituir-lo per un tampó KH sense  $\text{Ca}^{2+}$  afegit i, després de diferents intervals de temps, estimular les cèl·lules amb Cch 1mM i LiCl 10mM durant 1 min, també en absència de  $\text{Ca}^{2+}$ . Com s'observa a la figura 2.3.A., la magnitud de l'estimulació muscarínica de la PLC disminueix en absència de  $\text{Ca}^{2+}$ . D'acord amb això, si les cèl·lules es mantenen 30 min sense  $\text{Ca}^{2+}$  i l'estimulació també es fa en absència d'aquest ió, la resposta induïda pel Cch es veu marcadament reduïda (reducció del  $88,0 \pm 5,0$  %,  $n = 3$ ). Ara bé, si després de 30 min sense  $\text{Ca}^{2+}$  es substitueix el tampó KH per un tampó igual però 1,3 mM de  $\text{Ca}^{2+}$  i s'estimulen els cultius durant un min després de diferents intervals de temps, es recupera progressivament l'activació de la PLC pel Cch, essent el valor trobat als 3 min no significativament diferent del trobat en cèl·lules control, és a dir, incubades sempre amb tampó KH 1,3 mM de  $\text{Ca}^{2+}$  (figura 2.3.B.).

Cal fer esment que per tal d'evitar efectes deguts al canvi de tampó, hem estimulat les cèl·lules amb Cch com a mínim 1 min després d'aquesta substitució de tampó. Aquest període de 1 min d'equilibració de les cèl·lules l'hem aplicat a tots els experiments que continuen i presenten un canvi de tampó.

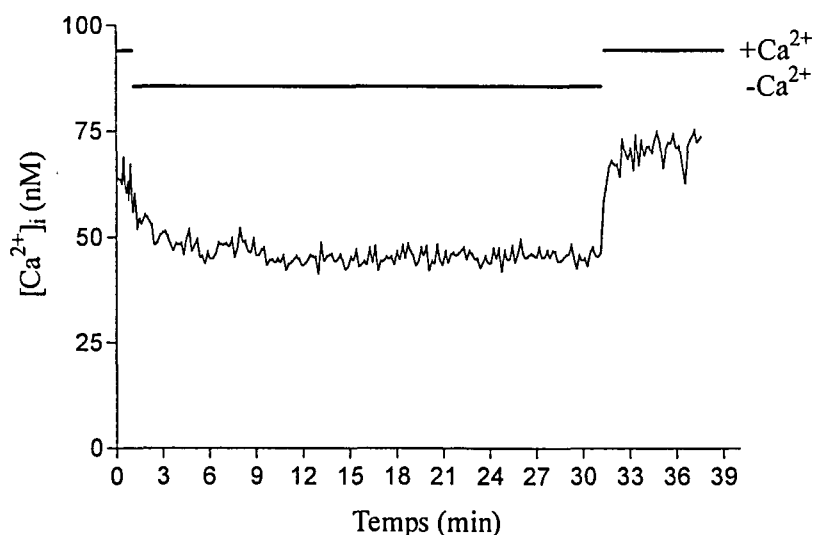
Les manipulacions de la concentració de  $\text{Ca}^{2+}$  extracel·lular acabades d'exposar resulten en petits canvis en la concentració de  $\text{Ca}^{2+}$  citosòlica, tal i com es pot veure a la figura 2.4. per una sola neurona granular de cerebel en cultiu premarcada amb fura-2/AM. Els valors de les concentracions citosòliques de  $\text{Ca}^{2+}$  sota les diferents condicions i obtinguts a partir de 25 cèl·lules/cultiu de 3 cultius diferents són de  $69,7 \pm 2,1$  nM després de 30 minuts amb tampó KH 1,3 mM de  $\text{Ca}^{2+}$  i  $51,9 \pm 3,8$ ,  $47,0 \pm 4,3$  i  $43,9 \pm 4,0$  nM a 1, 3 i 10 min després de substituir aquest tampó per un altre sense  $\text{Ca}^{2+}$  afegit, respectivament. Per altra banda, després de 30 min sense  $\text{Ca}^{2+}$  la concentració citosòlica de  $\text{Ca}^{2+}$  és de  $44,7 \pm 3,0$  nM i la substitució d'aquest per un tampó KH amb  $\text{Ca}^{2+}$  1,3 mM implica un augment a  $75,3 \pm 4,0$  nM en menys d'un min, que es manté estable (figura 2.4.).



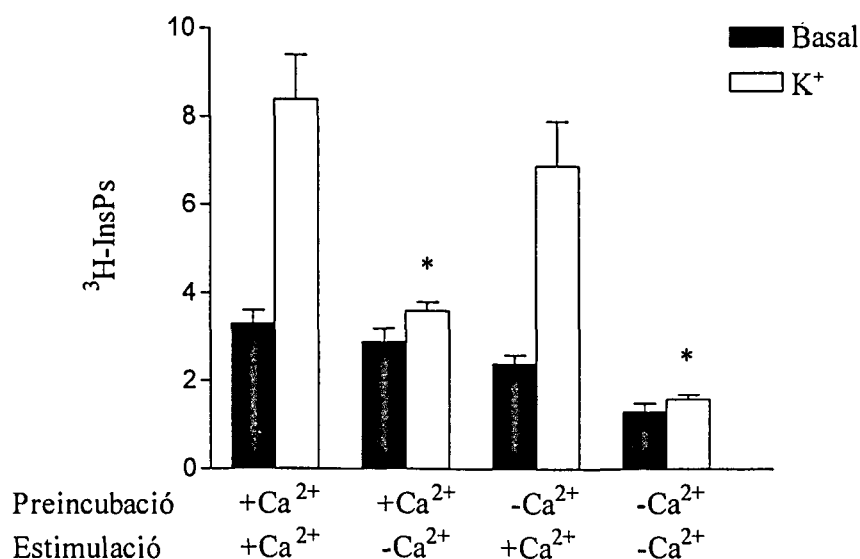
**Figura 2.3. Dependència del  $\text{Ca}^{2+}$  extracel·lular de l'estimulació de la PLC per Cch.**  
**A:** els cultius de neurones granulars han estat marcats amb [ $^3\text{H}$ ]Inositol i posteriorment mantinguts 30 minuts amb tampó KH 1,3 mM de  $\text{Ca}^{2+}$ . Les cèl·lules, posteriorment, han estat estimulades durant 1 min amb Cch 1 mM tan en presència ( $+\text{Ca}^{2+}$ ) com en absència de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $-\text{Ca}^{2+}$ ). En aquest últim cas, les cèl·lules han estat mantingudes durant diferents intervals de temps en absència de  $\text{Ca}^{2+}$  abans de l'addició de l'agonista i el  $\text{Li}^+$ . **B:** Els cultius premarcats amb [ $^3\text{H}$ ]Inositol han estat incubats durant 30 min amb un tampó KH sense  $\text{Ca}^{2+}$  afegit i estimulats durant 1 min en presència ( $+\text{Ca}^{2+}$ ) o absència de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $-\text{Ca}^{2+}$ ). En el primer cas, les cèl·lules han estat tractades amb Cch i  $\text{LiCl}$  després de ser exposades durant diferents temps a un tampó KH amb  $\text{Ca}^{2+}$  1,3 mM. Els resultats s'expressen com a  $^3\text{H-InsPs} \times 100 / (^3\text{H-InsPs} + ^3\text{H-lípids})$  i són mitges  $\pm$  S.E.M de 3 experiments independents fets per triplicat i duts a terme sobre mostres del mateix cultiu per ambdues condicions (A i B). \*Efecte del Cch significativament diferent al que es troba en cèl·lules preincubades i estimulades en presència de  $\text{Ca}^{2+}$  1,3 mM ( $p < 0,05$ ).

## 2.4. Efectes de canvis en la concentració extracel·lular de $\text{Ca}^{2+}$ en l'estimulació de la PLC per KCl

Els resultats anteriors semblen indicar que tot i que les granulars expressin isoenzims de la PLC sensibles al  $\text{Ca}^{2+}$ , existeix una desavinència entre la concentració de  $\text{Ca}^{2+}$  citosòlica i la magnitud de l'estimulació de la PLC per Cch. Per tant, hem analitzat l'acumulació d' $^3\text{H}$ -InsPs induïda per  $\text{K}^+$  40 mM. Tal i com es pot observar a la figura 2.5., a diferència de l'activació de la PLC per Cch, les respostes induïdes per altes concentracions de KCl són totalment dependents de la presència de  $\text{Ca}^{2+}$  extracel·lular durant l'estimulació, però independents de la seva presència abans d'aquesta. Així, l'estimulació de  $2.54 \pm 0,30$  vegades el basal ( $n = 3$ ) induïda pel  $\text{K}^+$  40 mM en cèl·lules preincubades amb un tampó amb  $\text{Ca}^{2+}$ , no es veu significativament reduïda si aquestes han estat preincubades sense  $\text{Ca}^{2+}$ , mentre que l'absència de  $\text{Ca}^{2+}$  durant l'estimulació impedeix al  $\text{K}^+$  estimular la PLC per sobre els nivells basals tan si els cultius han estat preincubats amb o sense  $\text{Ca}^{2+}$ . Aquests resultats, són consistents en la idea de que altes concentracions de  $\text{K}^+$  activen la PLC com a conseqüència d'una elevació de la concentració de  $\text{Ca}^{2+}$  citosòlica resultat d'una entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  induïda per despolarització.



**Figura 2.4. Efecte de canvis en la concentració extracel·lular de  $\text{Ca}^{2+}$  en la concentració citosòlica de  $\text{Ca}^{2+}$ .** Els cultius de neurones granulars han estat marcats amb fura-2/AM durant 1 hora i posteriorment mantinguts amb tampó KH amb  $\text{Ca}^{2+}$  1,3 mM durant 30 minuts a  $37^\circ\text{C}$ . Tot seguit el tampó KH ha estat substituït per un mateix tampó KH però sense  $\text{Ca}^{2+}$  ( $-\text{Ca}^{2+}$ ), el qual després de 30 min ha estat també canviat per un altre tampó KH, ara amb  $\text{Ca}^{2+}$  ( $+\text{Ca}^{2+}$ ). El perfil presentat correspon a una cèl·lula individual representativa de 25 cèl·lules analitzades pel sistema de ' $\text{Ca}^{2+}$  imaging'. Resultats similars s'han obtingut per tres cultius independents.



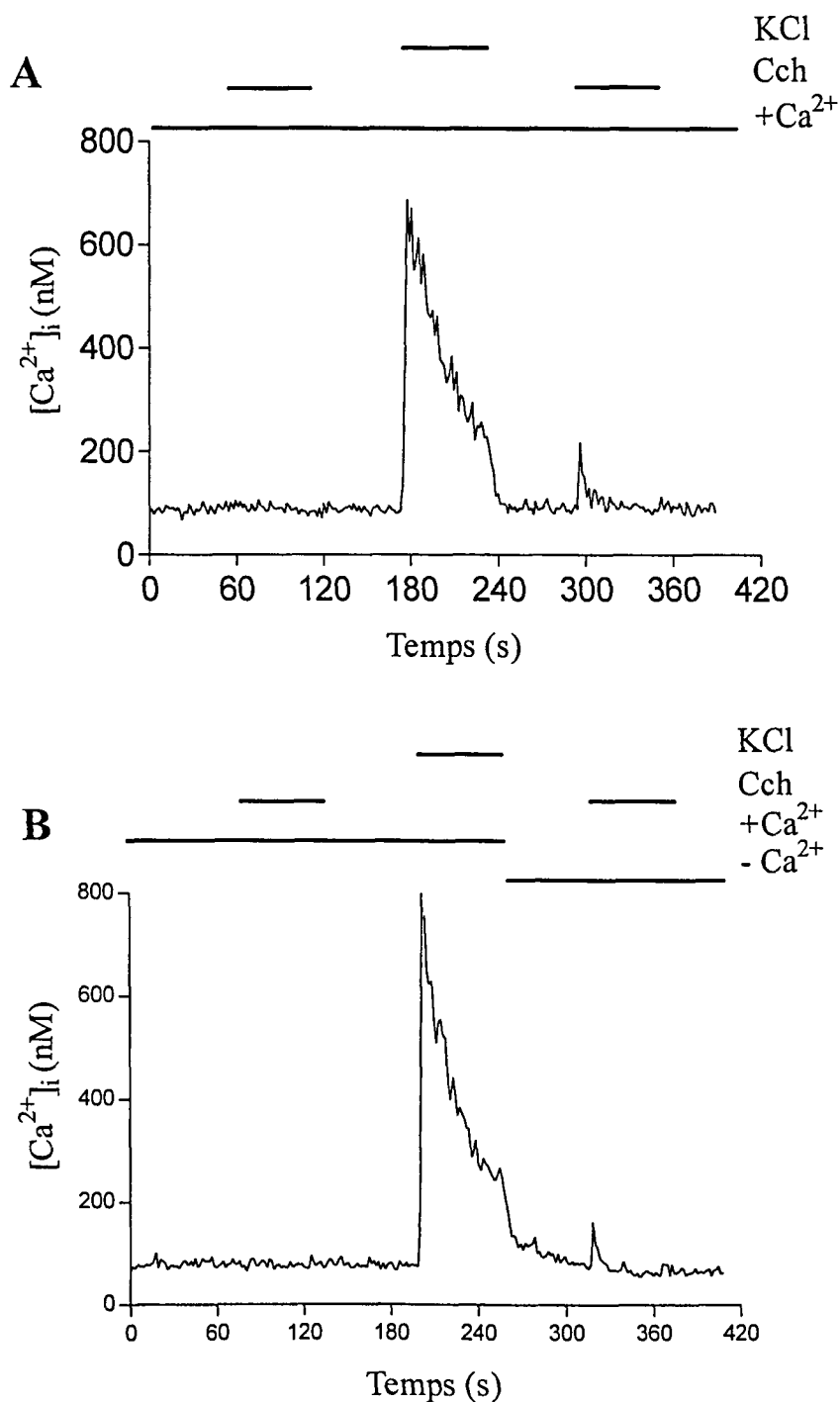
**Figura 2.5. Dependència del  $\text{Ca}^{2+}$  extracel·lular de l'estimulació de la PLC per  $\text{K}^+$ .** Les cèl·lules han estat incubades durant 30 minuts amb un tampó KH amb o sense  $\text{Ca}^{2+}$  1,3 mM i estimulades amb KCl 40 mM per 1 min també en presència ( $+\text{Ca}^{2+}$ ) o absència ( $-\text{Ca}^{2+}$ ) de  $\text{Ca}^{2+}$  1,3 mM. El LiCl ha estat afegit al mateix temps que el KCl i a una concentració final de 10 mM. Els resultats s'expressen com a  $^3\text{H-InsPs} \times 100 / (^3\text{H-InsPs} + ^3\text{H-lípids})$  i són mitges  $\pm$  S.E.M de 3 experiments independents fets per triplicat. \*Efecte del  $\text{K}^+$  significativament diferent al que es troba en cèl·lules preincubades i estimulades en presència de  $\text{Ca}^{2+}$  1,3 mM ( $p < 0,01$ ).

## 2.5. Senyals de $\text{Ca}^{2+}$ induïts per Cch i $\text{K}^+$

Les nostres dades sobre acumulacions d' $^3\text{H}$ -InsPs induïdes per exposició de les cèl·lules a Cch durant 30 min en presència de diferents inhibidors de l'entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  indiquen com l'estimulació de la PLC per receptors muscarínics no indueix entrada de  $\text{Ca}^{2+}$ . Però per tal de demostrar més firmament aquesta hipòtesi hem analitzat els canvis en la concentració de  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmàtica induïts pel Cch.

Els anàlisis per ' $\text{Ca}^{2+}$  imaging' mostren com, en neurones granulars de cerebel, els receptors muscarínics no són capaços d'induir cap senyal de  $\text{Ca}^{2+}$ , ja sigui per entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  o per alliberament de  $\text{Ca}^{2+}$  dels reservoris intracel·lulars (figura 2.6.A.). Cal fer esment, però, que en un 0,1 % dels cultius es poden observar senyals de  $\text{Ca}^{2+}$  en una minoria de cèl·lules.

Per contra, l'exposició de les neurones granulars a  $\text{KCl}$  40 mM indueix una resposta de  $\text{Ca}^{2+}$  bifàsica consistent en un pic transitori i una fase sostinguda, que retorna als nivells de  $\text{Ca}^{2+}$  citosòlic basals quan la concentració de  $\text{KCl}$  és reduïda a 5,9 mM, valor normal del tampó KH, tal i com es pot observar a la figura 2.6.A. i ha estat prèviament descrit per altres autors (Connor et al., 1987; Murphy i Miller, 1989; Irving et al., 1992a; Simpson et al., 1993). Es considera que aquest tractament emplena els reservoris intracel·lulars de  $\text{Ca}^{2+}$  (Murphy i Miller, 1989; Irving et al., 1992a), i en els nostres cultius de neurones granulars això permet que el Cch evoqui un petit i transitori increment de la concentració citosòlica de  $\text{Ca}^{2+}$  (figura 2.6.A.) que és independent de la presència de  $\text{Ca}^{2+}$  extracel·lular (figura 2.6.B.). Aquests resultats confirmen dades publicades anteriorment (Fohrman et al., 1993), i mostren com els receptors muscarínics tenen l'habilitat de mobilitzar  $\text{Ca}^{2+}$  intracel·lular sempre i quan les reservoris intracel·lulars estiguin suficientment plens.



**Figura 2.6. Efecte del Cch en la concentració de  $\text{Ca}^{2+}$  citosòlica abans i després d'una despolarització transitòria amb KCl 40 mM. A:** Els cultius de neurones granulars han estat marcats amb fura-2/AM durant 1 hora i posteriorment estimulats amb Cch 1 mM abans i després d'una despolarització transitòria amb KCl 40 mM. El tampó KH contenia  $\text{Ca}^{2+}$  1,3 mM en tot moment (+ $\text{Ca}^{2+}$ ). **B:** Les cèl·lules han estat tractades igualment que en l'apartat A però després de la despolarització transitòria amb KCl 40 mM el tampó KH afegit no contenia  $\text{Ca}^{2+}$  (- $\text{Ca}^{2+}$ ). Els registres corresponen a una única cèl·lula representativa de sis cultius independents dels quals s'han analitzat 25 cèl·lules/cultiu.

## 2.6. Efectes de canvis en els reservoris intracel·lulars de $\text{Ca}^{2+}$ sobre l'estimulació de la PLC per Cch

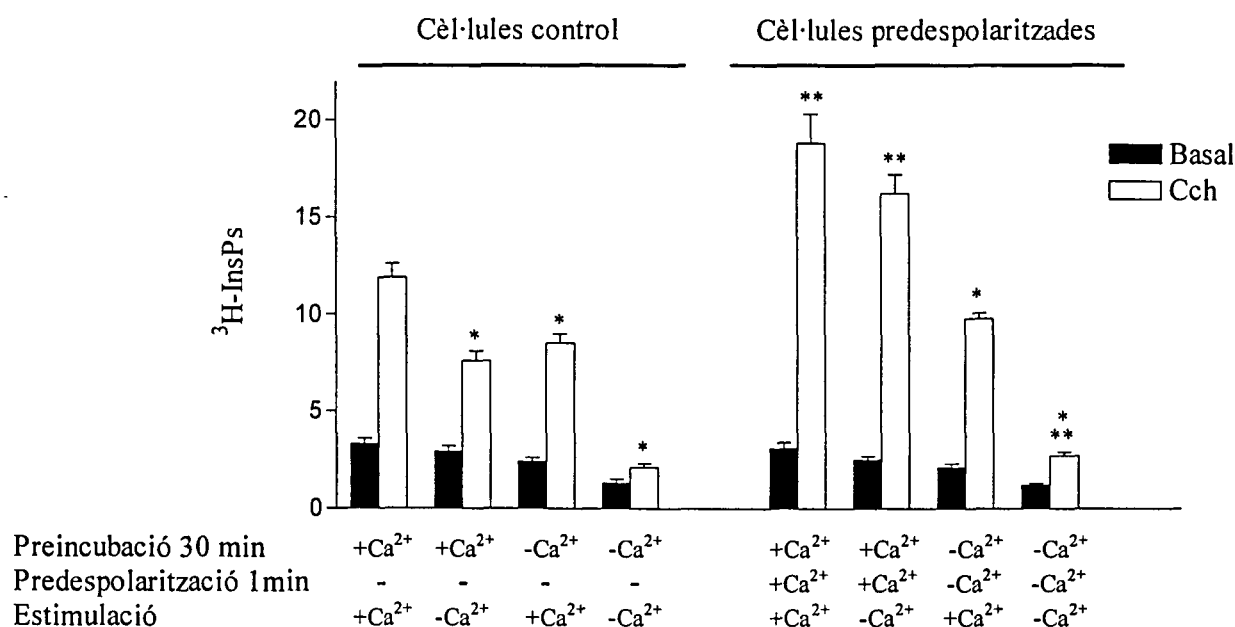
Hem estudiat la relació entre els reservoris intracel·lulars de  $\text{Ca}^{2+}$  i l'estimulació de la PLC per receptors muscarínics, mesurant els efectes deguts a un ompliment d'aquests orgànuls subcel·lulars previ a l'estimulació de la via de transducció de senyals intracel·lulars esmentada.

Per aconseguir l'ompliment dels reservoris intracel·lulars de  $\text{Ca}^{2+}$ , hem despolaritzat les cèl·lules seguint un protocol similar al descrit en l'apartat anterior. Així, hem incubat els cultius de CGC amb tampó KH 30 min, els hem despolaritzat durant 1 min amb KCl 40 mM i, després d'un rentat d'1 minut amb tampó KH, els hem estimulat amb Cch 1 mM en presència de LiCl també durant 1 min. L'absència de LiCl durant el tractament amb KCl 40 mM evita l'acumulació d' $^3\text{H}$ -InsPs en aquesta fase, tal i com mostren les següents mitges  $\pm$  S.E.M de 3 experiments:

Basal	$2,90 \pm 0,3$	$^3\text{H-InsPs} \times 100 / (^3\text{H-InsPs} + ^3\text{H-lípids})$
KCl 40 mM	$3,80 \pm 0,6$	$^3\text{H-InsPs} \times 100 / (^3\text{H-InsPs} + ^3\text{H-lípids})$

A la la figura 2.7. presentem la comparació entre cèl·lules control que han estat només incubades amb tampó KH i cèl·lules amb els reservoris intracel·lulars més plens de  $\text{Ca}^{2+}$ , és a dir, que han estat tractades amb el protocol que acabem de descriure. S'observa com una despolarització de les cèl·lules prèvia a la seva estimulació amb Cch implica un augment de l'estimulació de la PLC per aquest agonista d'aproximadament el 80 %. Aquesta potenciació és totalment independent de la presència de  $\text{Ca}^{2+}$  durant l'estimulació i no té lloc quan realitzem la despolarització en absència de  $\text{Ca}^{2+}$ , condicions en les quals no entra  $\text{Ca}^{2+}$  i per tant no s'omplen els reservoris intracel·lulars. Aquests resultats indiquen, per tant, que nivells més elevats de  $\text{Ca}^{2+}$  en els reservoris intracel·lulars potencien l'estimulació de la PLC per receptors muscarínics, de manera independent de l'entrada de  $\text{Ca}^{2+}$ , i degut exclusivament a l'ompliment dels reservoris intracel·lulars de  $\text{Ca}^{2+}$  però no a altres efectes de la despolarització cel·lular.

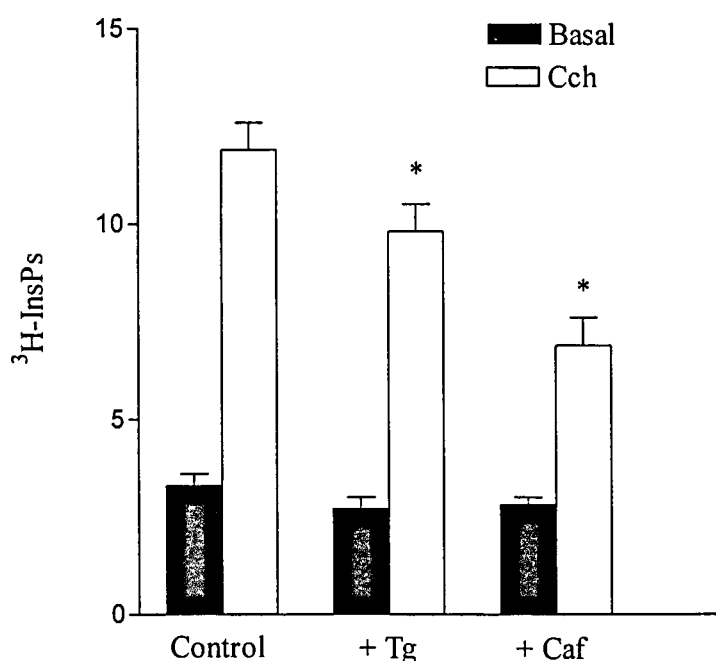




**Figura 2.7. Efecte d'una prèvia despolarització cel·lular en l'estimulació de la PLC per receptors muscarínics.** Els cultius de CGC han estat preincubats amb tampó KH durant 30 min i tractats 1 min amb tampó KH amb KCl 5,9 mM (cèl·lules control) o 40 mM (cèl·lules predepolaritzades). Posteriorment, el tampó ha estat substituït per un tampó KH de KCl 5,9 mM i 1 min més tard, les cèl·lules han estat estimulades amb Cch 1mM i LiCl 10 mM. Tots els passos, preincubació, predepolarització i estimulació han estat realitzats tan en presència (+Ca<sup>2+</sup>) com en absència (-Ca<sup>2+</sup>) de Ca<sup>2+</sup> 1,3 mM, tal com està indicat. Els resultats són mitges  $\pm$  S.E.M de 3 experiments independents realitzats per triplicat i s'expressen com a  $^3\text{H-InsPs} \times 100 / (^3\text{H-InsPs} + ^3\text{H-lípids})$ . \*Respostes significativament diferents de la que es troba en les respectives cèl·lules preincubades i estimulades en presència de Ca<sup>2+</sup> extracel·lular tan en cèl·lules control com en cèl·lules predepolaritzades. \*\*Respostes de cèl·lules predepolaritzades que són significativament diferents de la resposta de les cèl·lules control preincubades i estimulades en presència de Ca<sup>2+</sup> extracel·lular ( $p < 0,05$ ).

Per altra banda, també hem analitzat la participació dels reservoris intracel·lulars de  $\text{Ca}^{2+}$  en l'estimulació muscarínica de la PLC fent una aproximació experimental contrària a l'acabada d'exposar, és a dir, reduint el contingut de  $\text{Ca}^{2+}$  dels reservoris intracel·lulars. Per tal d'aconseguir-ho, hem preincubat les cèl·lules 20 min amb thapsigargina 10  $\mu\text{M}$ , un inhibidor de les SERCAs i que per tant trenca l'equilibri de l'estat de repòs cel·lular d'entrada i sortida de  $\text{Ca}^{2+}$  dels reservoris; i cafeïna 10 mM, un agonista dels receptors RyR capaç d'induir l'alliberament de  $\text{Ca}^{2+}$  dels reservoris que expressen aquest receptor (Inesi i Sagara, 1994; Simpson et al., 1995; Taylor i Broad, 1998).

Els resultats obtinguts, mostren com, la reducció del contingut en  $\text{Ca}^{2+}$  dels reservoris intracel·lulars no implica un canvi en l'activitat PLC basal però sí que redueix significativament l'estimulació d'aquest enzim per Cch, essent la cafeïna més efectiva que la thapsigargina (figura 2.8.). Es confirma, consegüentment, la participació dels reservoris intracel·lulars de  $\text{Ca}^{2+}$  en aquesta resposta.



**Figura 2.8.** Efecte de la modulació del contingut de  $\text{Ca}^{2+}$  dels reservoris intracel·lulars en l'estimulació de la PLC per Cch. Els cultius de CGC, premarcats durant 24 hores amb [ $^3\text{H}$ ]Inositol, han estat incubats 20 min amb thapsigargina 10  $\mu\text{M}$  (Tg) o cafeïna 10 mM (Caf) i posteriorment estimulats durant 1 min amb Cch 1mM en presència de LiCl 10 mM. En tot moment, tan en la preincubació com en l'estimulació, el tampó KH contenia  $\text{Ca}^{2+}$  1,3 mM. Els resultats són mitges  $\pm$  S.E.M de 4 experiments independents realitzats per triplicat i s'expressen com a  $^3\text{H-InsPs} \times 100 / (^3\text{H-InsPs} + ^3\text{H-lípids})$ . \*Respostes induïdes pel Cch significativament diferents a les respostes que aquest agonista indueix sense cap pretractament (cèl·lules control) ( $p < 0,05$ ).

## 2.7. Efectes del BAPTA/AM en les respostes del Cch i $K^+$

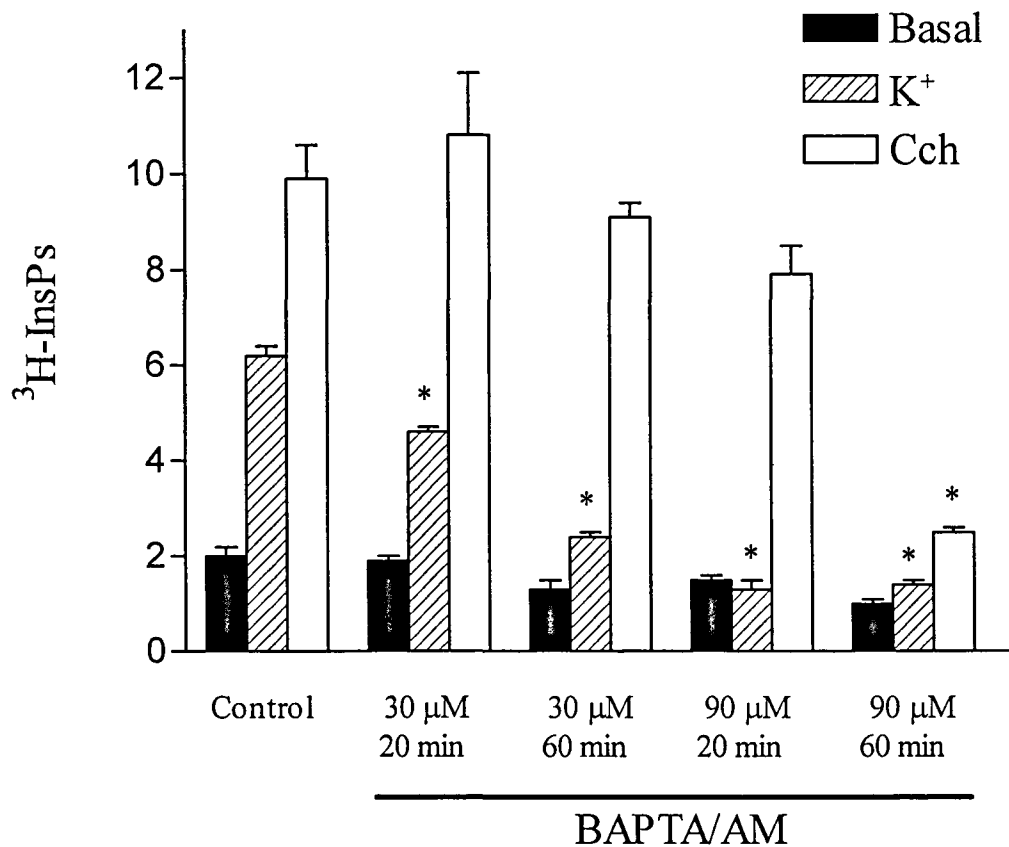
Seguint amb els nostres estudis mecanístics, hem analitzat el paper del  $Ca^{2+}$  intracel·lular lliure (concentració de  $Ca^{2+}$  citosòlica) en l'activació de la PLC per Cch amb un quelant de  $Ca^{2+}$  permeable a la membrana cel·lular, el BAPTA/AM (Tsien, 1980). A més a més, i per tal de verificar els efectes d'aquest quelant de  $Ca^{2+}$  en l'activació de la PLC induïda per increments en la concentració de  $Ca^{2+}$  citoplasmàtica, hem mesurat també les acumulacions d' $^3H$ -InsPs degudes a KCl 40 mM.

Podem observar a la figura 2.9. com l'estimulació de la PLC per KCl 40 mM és reduïda significativament si les cèl·lules són preincubades 20 o 60 min amb BAPTA/AM 30  $\mu$ M i és totalment abolida si les preincubacions es fan amb BAPTA/AM 90  $\mu$ M. Tanmateix, l'estimulació de la PLC per Cch és insensible al tractament de les cèl·lules amb aquest quelant de  $Ca^{2+}$  i només hi ha reducció de la resposta per incubació amb BAPTA/AM 90  $\mu$ M durant 60 min, condició molt extrema que podria afectar la viabilitat cel·lular (figura 2.9.).

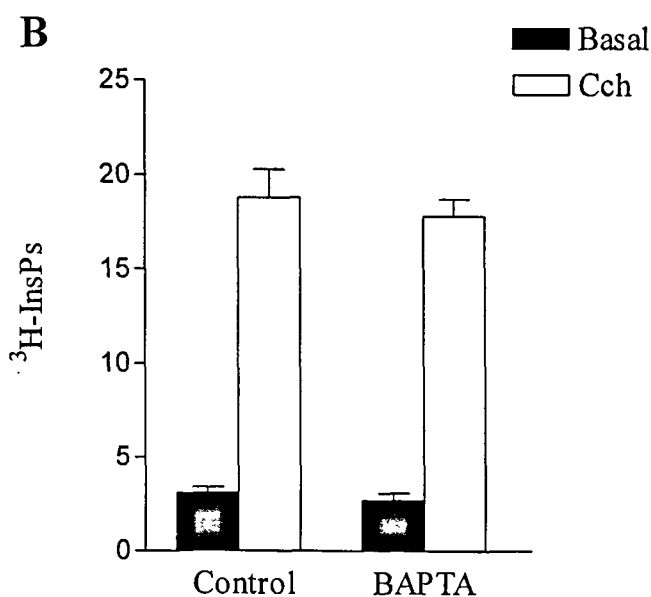
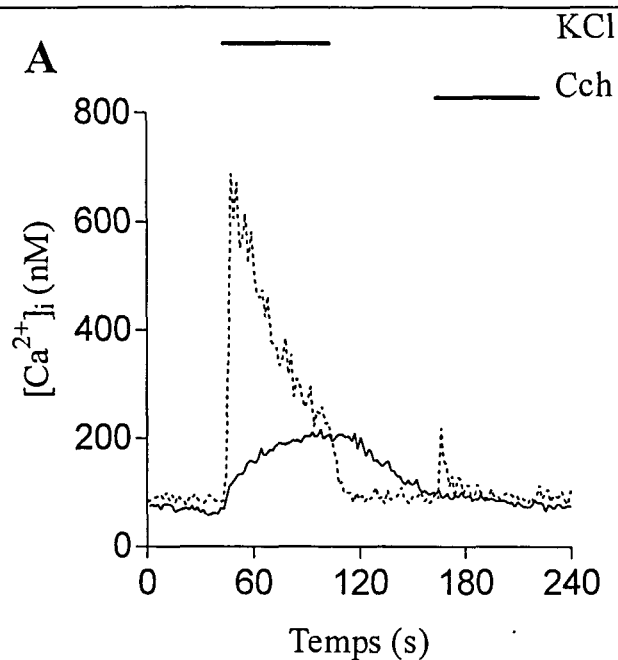
Per altra banda, hem volgut analitzar l'efecte d'una preincubació de 20 min amb BAPTA/AM 30  $\mu$ M sobre la resposta de  $Ca^{2+}$  i l'estimulació de la PLC induïda per Cch en cèl·lules predespolaritzades.

Tal i com es veu a la figura 2.10.A. el tractament esmentat no canvia els nivells basals de la concentració de  $Ca^{2+}$  citosòlica ja que promitjant els valors de 25 cèl·lules de 3 experiments diferents trobem que aquesta és de  $73,0 \pm 9,1$  nM en cèl·lules pretractades amb BAPTA/AM (la concentració de  $Ca^{2+}$  en condicions control és de  $69,7 \pm 2,1$  nM). Ara bé, sí que es disminueix notablement tan el pic com la fase sostinguda de la resposta induïda per KCl 40 mM, s'alenteix el retorn a nivells basals en la concentració de  $Ca^{2+}$  quan posteriorment el KCl es redueix a 5,9 mM i, a més a més, s'elimina totalment la resposta de  $Ca^{2+}$  induïda pel Cch després de la despolarització cel·lular.

Per contra, la preincubació de les cèl·lules amb BAPTA/AM no efecta la potenciació de l'estimulació de la PLC per Cch deguda a una prèvia despolarització (figura 2.10.B.), fet que indica que aquesta amplificació del senyal no és deguda a l'increment en la concentració de  $Ca^{2+}$  citosòlica resultat de l'alliberament de  $Ca^{2+}$  dels reservoris intracel·lulars.



**Figura 2.9. Efecte de quelar el  $\text{Ca}^{2+}$  intracel·lular lliure amb BAPTA/AM en l'estimulació de la PLC per Cch i KCl.** Les cèl·lules han estat preincubades amb tampó KH amb  $\text{Ca}^{2+}$  1,3 mM i sense (control) o amb BAPTA/AM a les concentracions i durant els temps indicats a la figura. Posteriorment els cultius s'han estimulat durant 1 min amb Cch 1mM o bé amb KCl 40 mM. Els resultats són mitges  $\pm$  S.E.M de 3 experiments diferents realitzats per triplicat i s'expressen com a  $^3\text{H-InsPs} \times 100 / (^3\text{H-InsPs} + ^3\text{H-lípids})$ . \*Respostes significativament diferents a les respostes induïdes per les respectives cèl·lules control ( $p < 0,05$ ).



**Figura 2.10.** Efecte del BAPTA/AM en la mobilització de  $\text{Ca}^{2+}$  intracel·lular i en l'activació de la PLC per Cch en cèl·lules predespolaritzades. **A:** Les cèl·lules premarcades amb fura-2/AM han estat preincubades amb tampó KH amb (línia contínua) o sense (línia discontinua) BAPTA/AM  $30 \mu\text{M}$  durant 20 min, tractades amb KCl  $40 \text{ mM}$  1 min, i, després d'un rentat amb tampó KH amb KCl  $5,9 \text{ mM}$ , estimulades amb Cch  $1 \text{ mM}$ . El perfil presentat correspon a una cèl·lula individual representativa de 25 cèl·lules analitzades. Resultats similars s'han obtingut per tres cultius diferents. **B:** Hem seguit el mateix protocol exposat en la figura A però determinant l'acumulació d' $^3\text{H}$ -InsPs. Per tant, el LiCl a una concentració final de  $10 \text{ mM}$  ha estat addicionat al mateix temps que el Cch  $1 \text{ mM}$ . Els resultats són mitges  $\pm$  S.E.M de 3 experiments independents realitzats per triplicat i s'expressen com a  $^3\text{H}$ -InsPs  $\times 100 / (^3\text{H}$ -InsPs +  $^3\text{H}$ -lípid).

## 2.7. Estimació de l'estat d'ompliment dels reservoris intracel·lulars de $\text{Ca}^{2+}$

Com a últim pas en l'estudi del mecanisme d'activació de la PLC hem volgut verificar l'efecte de les diferents condicions experimentals en l'estat d'ompliment dels reservoris intracel·lulars de  $\text{Ca}^{2+}$ . El protocol seguit s'explica als mètodes, breuement però, consistiria en sotmetre les cèl·lules marcades amb fura-2/AM a la condició que interessa i posteriorment tractar-les 1 min amb tampó KH sense  $\text{Ca}^{2+}$  extracel·lular per després afegir ionomicina a concentració final de 2  $\mu\text{M}$ . Aquest tractament implica increments en la concentració de  $\text{Ca}^{2+}$  citosòlica com a conseqüència de l'alliberament del  $\text{Ca}^{2+}$  intracel·lular enmagatzemat, ja que per una banda la concentració de  $\text{Ca}^{2+}$  extracel·lular és molt baixa, i per una altra banda la ionomicina a aquesta concentració té més preferència per les membranes intracel·lulars que per la membrana plasmàtica ( ). La quantificació d'aquest increment en la concentració de  $\text{Ca}^{2+}$  ha estat proposat com a índex indicatiu de l'estat d'ompliment dels reservoris intracel·lulars de  $\text{Ca}^{2+}$  (Montero et al., 1990).

L'aplicació d'aquesta tècnica indirecte de determinació de l'estat d'ompliment de  $\text{Ca}^{2+}$  dels magatzems intracel·lulars en cultius primaris de CGC, mostra com una preincubació de les cèl·lules amb tampó KH 1,3 mM de  $\text{Ca}^{2+}$  es tradueix en un increment de la concentració de  $\text{Ca}^{2+}$  de  $32,40 \pm 1,7$  nM quan s'aplica la ionomicina ( $n = 4$  cultius analitzant 25 cèl·lules per cultiu) (figura 2.11.). Aquest increment net és pràcticament anul·lat quan la ionomicina s'addiciona després de deixar les cèl·lules 30 min sense  $\text{Ca}^{2+}$  ( $87,7 \pm 6,1$  % de reducció, com a mitjana de 3 cultius analitzant 25 cèl·lules per cultiu), i és ampliat substancialment si les cèl·lules s'han predespolaritzat durant 1 min amb KCl 40 mM ( $83,6 \pm 8,0$  % d'increment net com a mitjana de 4 cultius, també analitzant 25 cèl·lules per cultiu). Aquests resultats, per tant, confirmen els efectes d'ambdós tractaments sobre els reservoris intracel·lulars de  $\text{Ca}^{2+}$  que hem estat pressuposant fins ara (figura 2.11.).

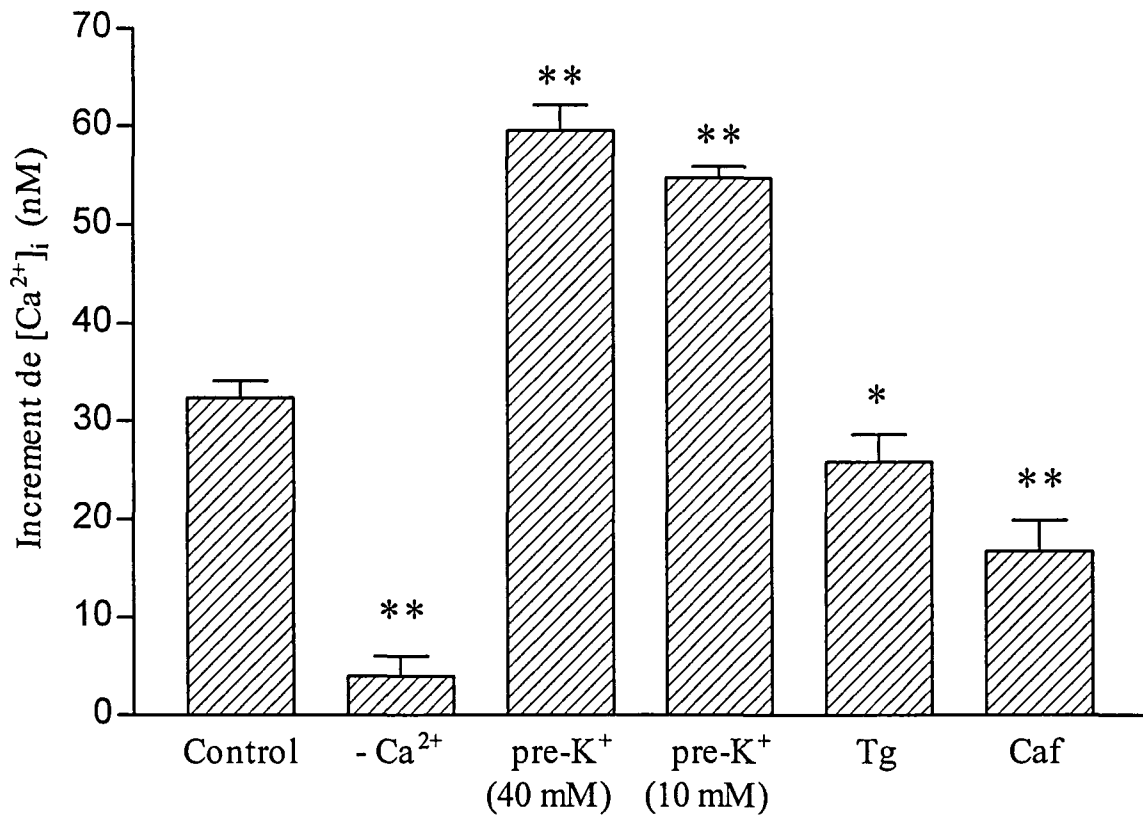
Per altra banda, una preincubació de les cèl·lules amb cafeïna 10 mM o thapsigargina 10  $\mu\text{M}$  també redueixen significativament la resposta induïda per la ionomicina, tot i que la magnitud de l'efecte d'aquests compostos és diferent (figura 2.11.). Analitzant 25 cèl·lules per cultiu en 3 cultius diferents trobem un  $48,5 \pm 10,1$  i un  $20,4 \pm 8,9$  % de reducció per la cafeïna i la thapsigargina, respectivament, percentatges que s'assemblen molt a la disminució que indueixen de l'estimulació de la PLC per Cch, i que alhora suggereixen que el grau de depleció dels magatzems intracel·lulars de  $\text{Ca}^{2+}$  aconseguit per ambdues condicions és diferent.

L'efecte d'una despolarització amb KCl 40 mM en cèl·lules preincubades 20 min amb BAPTA/AM 30  $\mu$ M no pot ser estudiat directament per aquest procediment experimental degut a que el BAPTA quela el  $\text{Ca}^{2+}$  alliberat per la ionomicina. Per tant, l'hem estimat indirectament mesurant l'efecte de la ionomicina després d' 1 min d'exposició a KCl 10 mM, ja que aquesta condició implica un increment de la concentració de  $\text{Ca}^{2+}$  citosòlica similar a la que s'observa en cèl·lules pretractades amb BAPTA/AM i exposades a KCl 40 mM, tal i com es pot observar a la **gràfica 2.12**. i mostren els increments de  $\text{Ca}^{2+}$  (pic de la resposta) obtinguts a partir de l'anàlisi de 75 cèl·lules de 3 cultius diferents:

KCl 10 mM  $189 \pm 45$  nM

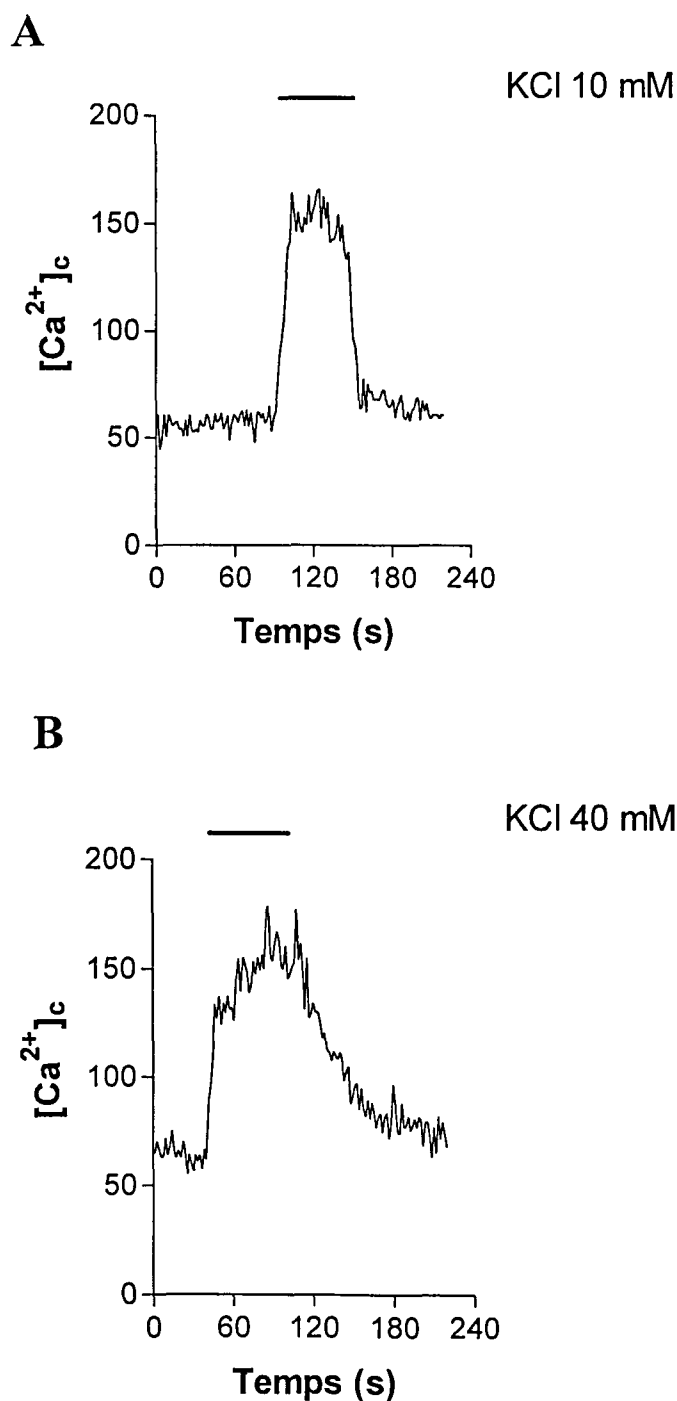
KCl 40 mM + BAPTA/AM 30  $\mu$ M 20 min  $180 \pm 17$  nM

Els resultats mostren com, l'increment de la concentració de  $\text{Ca}^{2+}$  després d'estimular les cèl·lules amb KCl 10 mM i d'afegir ionomicina en absència de  $\text{Ca}^{2+}$  és del mateix grau que l'enregistrat per KCl 40 mM. Això permet suposar que el tractament de les cèl·lules amb BAPTA/AM 30  $\mu$ M durant 20 min, tot i quelar parcialment el  $\text{Ca}^{2+}$  que entra com a resultat de la despolarització, no efecta l'ompliment dels reservoris intracel·lulars de  $\text{Ca}^{2+}$  que es produeix en aquestes condicions.



**Figura 2.11. Estimació de l'estat d'ompliment dels reservoris intracel·lulars de  $Ca^{2+}$ .** Les cèl·lules preincubades amb fura-2/AM, han estat rentades durant 1 min amb tampó KH sense  $Ca^{2+}$  i exposades a ionomicina  $2 \mu M$  després d'una preincubació de 30 min amb KH amb (control) o sense  $Ca^{2+}$  (- $Ca^{2+}$ ), o després d'una predespolarització amb KCl 40 o 10 mM (pre- $K^+$ ), o bé després d'una preincubació de 20 min amb thapsigargina  $10 \mu M$  (Tg) o cafeïna 10 mM (Caf). Els promitjos dels increments de la concentració de  $Ca^{2+}$  citosòlica sobre el valor inicial (abans de l'aplicació de ionomicina) de 20-25 cèl·lules han estat mesurats i les mitges  $\pm$  S.E.M. de 3 experiments independents (4 pel control i pre- $K^+$  40 mM) han estat calculades. \*Significativament diferent de les cèl·lules control ( $p < 0,05$ ). \*\*Significativament diferent de les cèl·lules control ( $p < 0,01$ ).





**Figura 2.12. Increments en la concentració de  $Ca^{2+}$  citoplasmàtica induïda per KCl 10 mM i KCl 40 mM en presència de BAPTA/AM.** **A:** Els cultius de CGC premarcats amb fura-2/AM, han estat estimulats amb tampó KCl 10 mM durant 1 min. En tot moment, el tampó KH contenia  $Ca^{2+}$  1,3 mM. **B:** Els cultius de CGC premarcats amb fura-2/AM han estat primerament preincubats 20 min en tampó KH amb  $Ca^{2+}$  1,3 mM i BAPTA/AM 30  $\mu$ M per després ser estimulats amb KCl 40 mM durant 1 min. El perfil presentat correspon a una cèl·lula individual representativa de 25 cèl·lules analitzades del mateix cultiu. Resultats similars s'han obtingut per tres cultius independents

## 2.9. Resum i conclusions parcials del capítol

Les dades experimentals obtingudes en l'estudi dels mecanismes d'activació de la PLC estimulada per receptors muscarínics mostren com canvis en la concentració de  $\text{Ca}^{2+}$  extracel·lular a diferents temps previs a l'addició del Cch modulen la seva estimulació de la PLC. Aquests canvis, però, no es correlacionen molt bé amb els canvis en la concentració de  $\text{Ca}^{2+}$  citosòlic que aquestes mateixes manipulacions indueixen.

Tanmateix, les manipulacions del contingut de  $\text{Ca}^{2+}$  dels reservoris intracel·lulars per diferents aproximacions experimentals, com ara l'ompliment per despolarització, el parcial buidament per tractament amb thapsigargina i cafeïna o la depleció total per preincubació de les cèl·lules durant 30 min amb tampó KH sense  $\text{Ca}^{2+}$ , es correlacionen molt bé amb la potenciació, disminució o inhibició total de l'estimulació de la PLC per Cch, respectivament.

Cal ressaltar a més, que l'ompliment dels reservoris intracel·lulars de  $\text{Ca}^{2+}$  per una predespolarització de les cèl·lules potencia l'estimulació de la PLC per Cch de manera independent al  $\text{Ca}^{2+}$  extracel·lular i a l'alliberació del  $\text{Ca}^{2+}$  dels reservoris intracel·lulars que aquest agonista indueix. Així ens ho demostra el fet de que, en cèl·lules predespolaritzades, el quelant de  $\text{Ca}^{2+}$  citosòlic BAPTA/AM no efecti a la potenciació de l'estimulació de la PLC per Cch però sí que anul·li la seva resposta de  $\text{Ca}^{2+}$ .

El conjunt d'aquestes dades, suggereix que l'estimulació de la PLC per receptors muscarínics en cultius primaris de neurones granulars és regulada pel contingut de  $\text{Ca}^{2+}$  dels reservoris intracel·lulars més que no pels canvis en la concentració de  $\text{Ca}^{2+}$  citosòlica produïts per l'agonista.

### **3. Expressió i caracterització farmacològica dels receptors metabotròpics del glutamat responsables de l'estimulació de la PLC i dels senyals de Ca<sup>2+</sup>**

#### **3.1. Introducció**

En el primer capítol dels resultats hem observat com els mGluRs estimulaven la PLC en cultius de CGC de 9 DIV d'acord amb dades publicades per altres autors (Nicoletti et al., 1986; Aronica et al., 1993). Tanmateix, la inexistència d'eines moleculars i farmacològiques selectives pels diferents subtipus de mGluRs fins al moment i la heterogenitat de les seves respostes, han fet que no es coneixi amb exactitud el subtipus d'mGluR responsable d'aquesta resposta i només existeixin dades procedents d'una caracterització farmacològica limitada en cultius de 4-6 DIV que suggereixen que l'activació de la PLC és deguda al receptor mGluR1 (Toms et al., 1995). A més a més, existeixen estudis tan sobre l'expressió dels ARNm dels mGluRs del grup I (Aronica et al., 1993; Prézeau et al., 1994; Santi et al., 1994) com de la proteïna-receptor (Copani et al., 1998) però els resultats descrits sobre el perfil temporal de la seva expressió són divergents.

Així, doncs, abans de procedir en estudis mecanístics derivats de l'activació de receptors acoblats a proteïnes G en neurones, hem cregut oportú analitzar l'expressió i caracteritzar el subtipus de mGluR responsable de l'activació de la PLC i del senyal de Ca<sup>2+</sup> en cultius de CGC madurs, de 8-9 DIV.

### 3.2. Anàlisi de l'expressió dels mGluR1 $\alpha$ i mGluR5 en CGC per Western blot

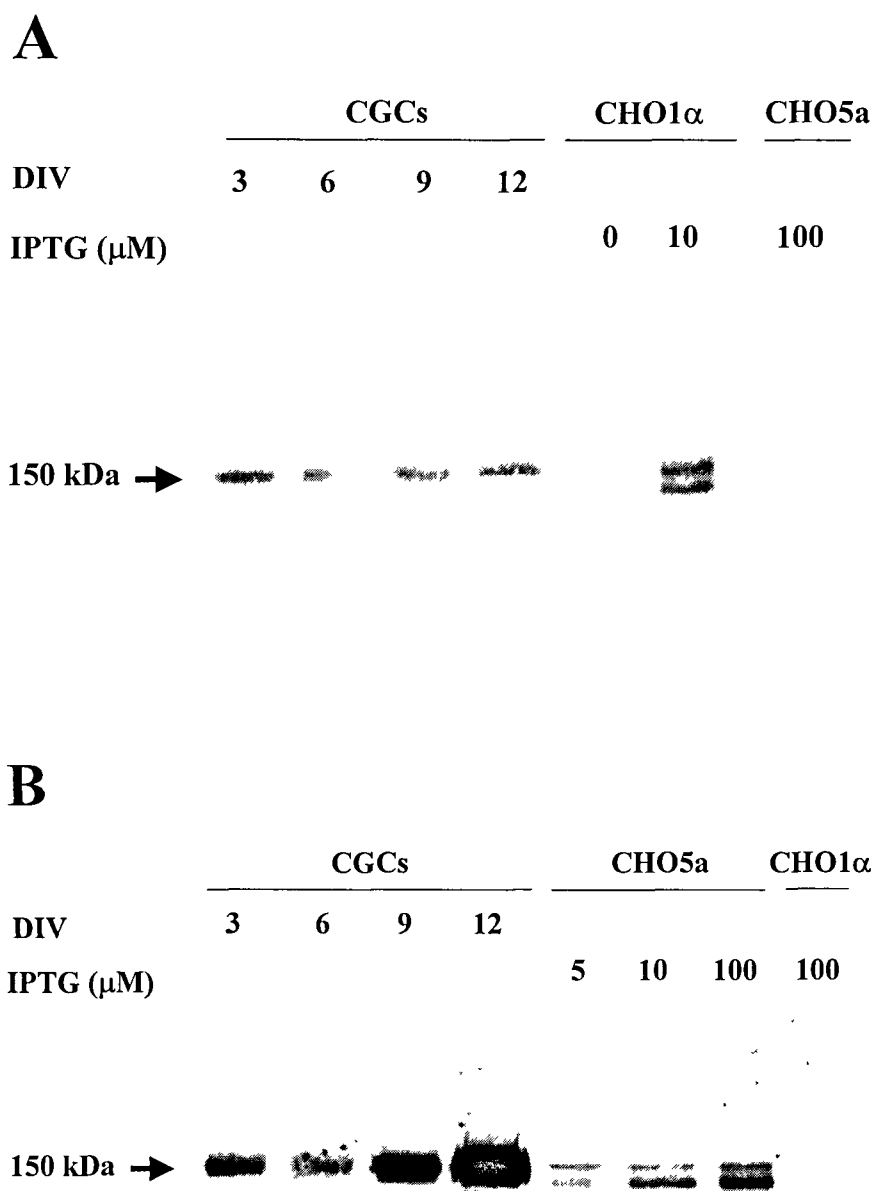
Hem estudiat el patró d'expressió dels receptors mGluR1 $\alpha$  i mGluR5 en cultius de CGC de 3 a 12 DIV, utilitzant anticossos policlonals selectius. Per excloure cap inespecificitat en la detecció, hem fet controls amb cèl·lules CHO transfectades amb els receptors humans hmGluR1 $\alpha$  o hmGluR5, tal i com es descriu als mètodes.

Els western blots obtinguts, dels quals s'en mostra un de representatiu a la figura 3.1., mostren que ambdós receptors s'expressen en neurones granulars als diferents DIV estudiats. En els minigels desnaturalitzats i en condicions reductores, el mGluR1 $\alpha$  migra com a única banda d'aproximadament 150 kDa mentre que el mGluR5 ho fa com a dues bandes diferents.

En cèl·lules CHO transfectades, tan el hmGluR1 $\alpha$  com el hmGluR5 s'expressen com a dues bandes diferents (Hermans et al., 1998a), fet que ha estat atribuït a una diferent glicosilació del receptor dins de la cèl·lula (Mody et al., 1999). Per tant, aquesta també podria ser l'explicació de que en CGC l'anticòs anti-mGluR5 detecti dues bandes de massa molecular molt similar així com de les diferències entre ambdós tipus cel·lulars.

En CGC, l'expressió del mGluR1 $\alpha$  es manté constant entre els 3 i 12 DIV, mentre que els nivells de proteïna del mGluR5 augmenten amb el temps *in vitro*. Aquests resultats es correlacionen amb els nivells de ARNm d'ambdós subtipus descrits per Santi et al., 1994 i, en part, amb l'anàlisi d'expressió proteïca realitzat per Copani et al., 1998. Per altra banda, si es considera que els astròcits expressen predominantment el subtipus mGluR5 (Balázs et al., 1997; Condorelli et al., 1997), no podem excloure del tot que part de l'increment en l'expressió del mGluR5 en els nostres cultius sigui degut a la proliferació d'algunes cèl·lules glials.

Finalment, comentarem que els nivells d'expressió del mGluR1 $\alpha$  semblen similars als que s'indueixen en les cèl·lules CHO transfectades amb hmGluR1 $\alpha$  quan són tractades amb 10  $\mu$ M d'IPTG durant unes 20 hores, però els nivells de mGluR5 en CGC són inferiors als que es troben en qualsevol mostra de cèl·lules CHO transfectades amb hmGluR5 i tractades amb IPTG (cal tenir present que a la figura 3.1.B. els nivells de proteïna de les cèl·lules CHO transfectades amb hmGluR5 és 4 vegades inferior a la quantitat de proteïna de les mostres de CGC).



**Figura 3.1. Anàlisi per immunoblot dels mGluRs del grup I en extractes cel·lulars. A:** Extractes de cultius primaris de neurones granulars (CGC) a 3,6,9 i 12 DIV; cèl·lules CHO transfectades amb el hmGluR1 $\alpha$  incubades 20 hores sense o amb IPTG 10  $\mu$ M (que indueix l'expressió del gen transfectat); i cèl·lules CHO transfectades amb el hmGluR5 incubades 20 hores amb IPTG 100  $\mu$ M, han estat analitzats per Western blot i immunodetectats amb un anticòs específic anti-mGluR1 $\alpha$ . 10  $\mu$ g de proteïna han estat carregats a cada carril del minigel. **B:** extractes cel·lulars de cultius primaris de neurones granulars (CGC) a 3,6,9 i 12 DIV; cèl·lules CHO transfectades amb el hmGluR5 incubades 20 hores amb IPTG 5, 10 o 100  $\mu$ M; i cèl·lules CHO transfectades amb el hmGluR1 $\alpha$  incubades 20 hores amb IPTG 100  $\mu$ M, han estat anilitzats per Western blot i immunodetectats amb un anticòs específic anti-mGluR5. Cada mostra analitzada conté 10  $\mu$ g de proteïna, excepte les mostres de cèl·lules CHO transfectades amb hmGluR5 que tenen 2,5  $\mu$ g de proteïna i la mostra de CGC a 6 DIV que té 5  $\mu$ g.

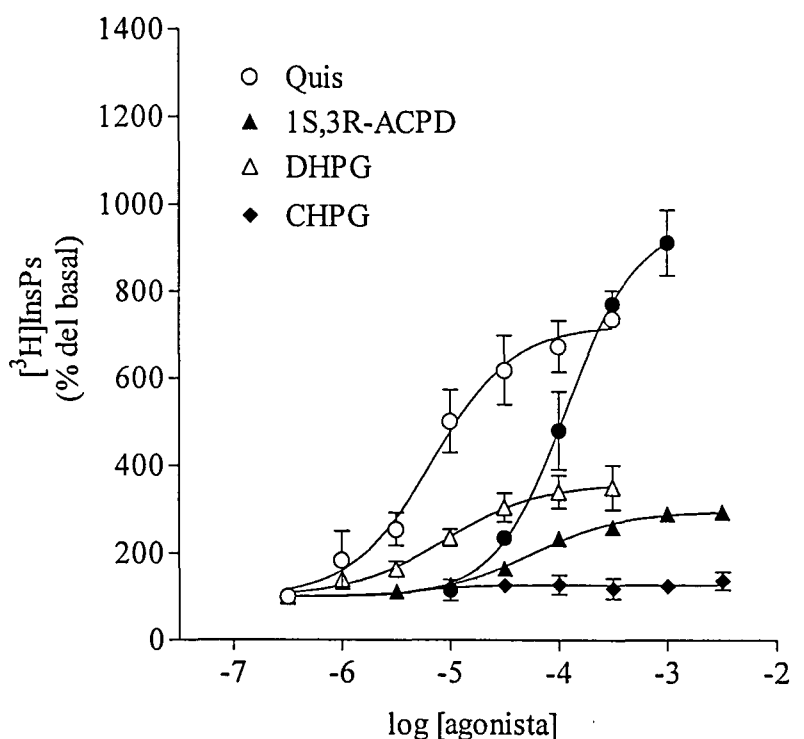
### 3.3. Caracterització dels subtipus de mGluRs implicats en l'activació de la PLC

Els resultats que acabem d'exposar mostren com tan el mGluR1 $\alpha$  com el mGluR5 s'expressen en cultius de CGC madurs, és a dir de 8-9 DIV, i tots dos són candidats a ser els responsables de l'activació PLC que es detecta en aquest sistema neuronal. Per tant, era important realitzar una caracterització farmacològica d'aquesta resposta.

Per tal de tenir respostes quantificables, hem determinat l'activació de la PLC com l'acumulació d'<sup>3</sup>H-InsPs després de 30 minuts de l'aplicació dels diferents agonistes i de LiCl a una concentració final de 10 mM. En les condicions en què preteniem mesurar l'activació els mGluRs per Glu o quisqualat (Quis) hem preincubat les cèl·lules 20 min amb CNOX 30  $\mu$ M i AP5 50  $\mu$ M, per tal d'eliminar la participació dels iGluRs, ja que el primer és un inhibidor dels receptors AMPA i el segon dels NMDA.

En cultius de CGC a 9 DIV, el Glu, Quis, l'agonista inespecífic dels mGluRs 1*S*,3*R*-ACPD i l'agonista selectiu dels mGluRs del grup I (S)-3,5-dihydroxyphenylglycine (DHPG) però no l'agonista selectiu pel receptor mGluR5 (RS)-2-cloro-5-hidroxifenilglicina (CHPG) estimulen la PLC tal i com es pot observar a la figura 3.2. D'aquests, el Quis és l'agonista més potent amb un valor de EC<sub>50</sub> de  $8,2 \pm 1,1$   $\mu$ M (n = 4), seguit pel DHPG amb una EC<sub>50</sub> de  $9,1 \pm 1,1$   $\mu$ M (n = 3), el 1*S*,3*R*-ACPD ( $56,4 \pm 6,4$   $\mu$ M, n = 3) i finalment pel Glu que presenta una EC<sub>50</sub> de  $116,1 \pm 13,6$   $\mu$ M (n = 3). Per contra, però, el Glu exhibeix un efecte màxim superior als altres agonistes ( $1344 \pm 47$  % del basal). El Quis té un efecte màxim de  $725 \pm 25$  % el basal, mentre que el DHPG i el 1*S*,3*R*-ACPD amb uns efectes màxims de  $362 \pm 8$  i  $295 \pm 5$  % del basal, respectivament, tal i com es pot comprovar a la taula 3.1.

Considerant que la seqüència ordenada d'agonistes segons la seva potència correspon al perfil farmacològic característic dels mGluRs del grup I (Conn i Pin, 1997; Schoepp et al., 1999) i el CHPG no indueix cap activació de la PLC, aquestes dades suggereixen que en l'esmentada resposta l'únic receptor implicat és el mGluR1.



**Figura 3.2. Corbes concentració-efecte de l'estimulació de la PLC per agonistes dels receptors mGluRs.** Els cultius premarcats amb  $^3\text{H}$ -Inositol han estat incubats durant 30 minuts amb Glu Quis, DHPG, 1S,3R-ACPD i CHPG a les concentracions indicades i en presència de LiCl 10 mM. En el cas del Glu i Quis, les cèl·lules, a més a més, han estat preincubades amb els antagonistes dels iGluRs, CNQX 30  $\mu\text{M}$  i AP5 50  $\mu\text{M}$ . L'activitat basal era de  $4,20 \pm 0,26$   $^3\text{H}$ -InsPs  $\times 100 / (^3\text{H}\text{-InsPs} + ^3\text{H}\text{-lípid})$ . Els resultats s'expressen com a percentatge del basal i són mitges  $\pm$  S.E.M de 3 experiments independents fets per triplicat.

	Emàx	EC <sub>50</sub> ( $\mu\text{M}$ )	n <sub>H</sub>
Glu	1344 $\pm$ 47	116,1 $\pm$ 13,6	1,0 $\pm$ 0,1
Quis	725 $\pm$ 25	8,2 $\pm$ 1,1	1,1 $\pm$ 0,2
DHPG	362 $\pm$ 8	9,1 $\pm$ 1,1	1,0 $\pm$ 0,1
1S,3R-ACPD	295 $\pm$ 5	56,4 $\pm$ 6,4	

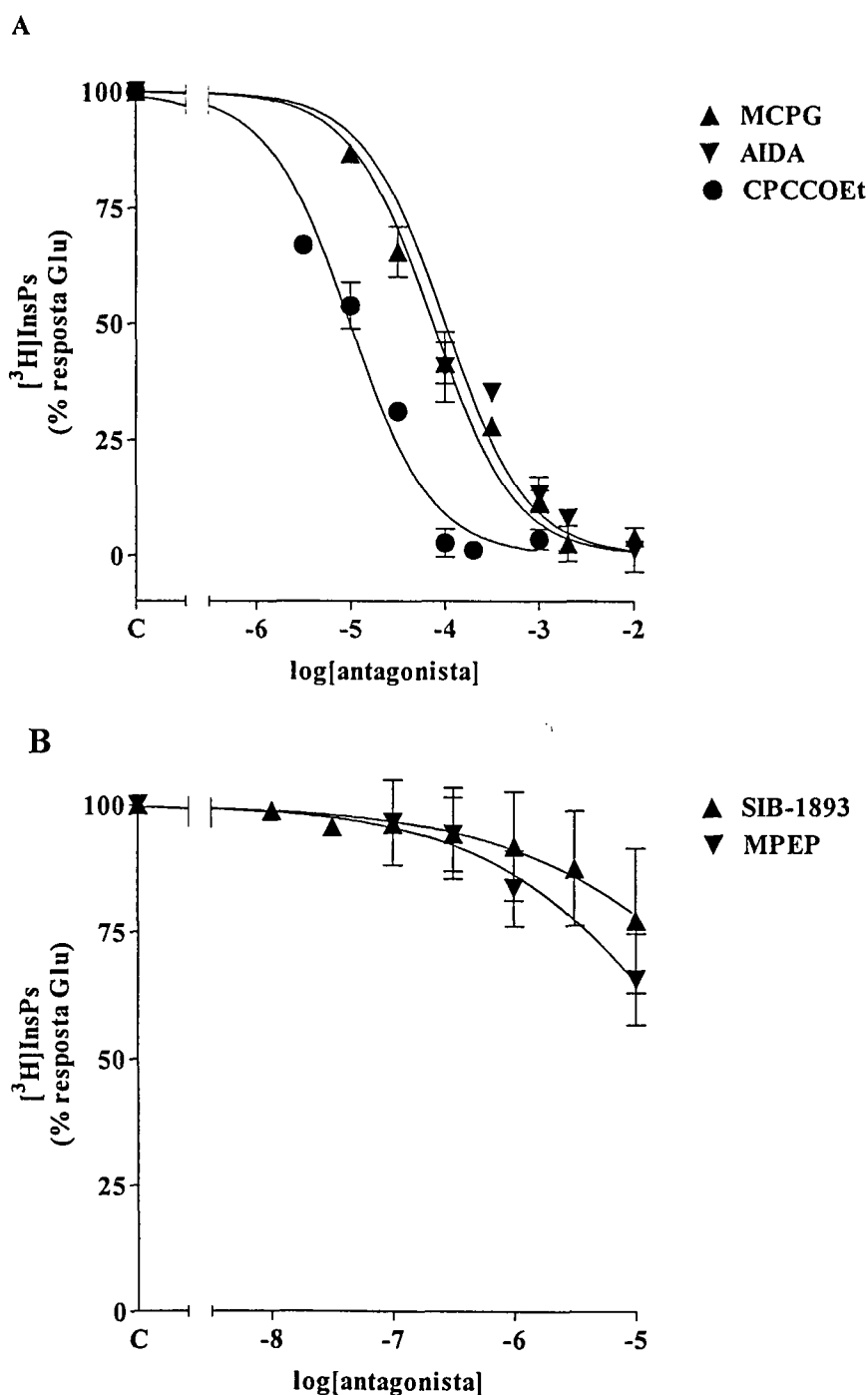
**Taula 3.1. Paràmetres de l'activació de la PLC per agonistes dels mGluRs en monocapes de neurones granulars de cerebel.** Els paràmetres: efecte màxim (Emàx), concentració que produeix el 50% de l'Emàx (EC<sub>50</sub>) i coeficient de Hill (n<sub>H</sub>) s'han determinat per ajust a l'equació de Hill per regressió no lineal, a partir de les dades de la fig. 3.2. Els valors d'Emax s'expressen com a % del basal, essent  $4,20 \pm 0,26$   $^3\text{H}$ -InsPs  $\times 100 / (^3\text{H}\text{-InsPs} + ^3\text{H}\text{-lípid})$ .

Hem continuat l'estudi farmacològic de l'estimulació de la PLC pels mGluRs, determinant l'efecte de diferents antagonistes sobre l'acumulació d' $^3\text{H}$ -InsPs induïda per Glu 100  $\mu\text{M}$ . Els compostos escollits, primerament, han estat el (S)- $\alpha$ -metil-4-carboxifenilglicina (MCPG) i l'àcid 1-aminoindan-1,5,-dicarboxílic (AIDA), que mostren una potència més elevada antagonitzant l'efecte del Glu a través del mGluR1 que del mGluR5 (Brabet et al., 1995; Moroni et al., 1997) i d'altra banda l'àcid ciclopropan[b]cromen-1a-carboxílic (CPCCOEt), antagonista no competitiu del mGluR1 (Casabona et al., 1997; Hermans et al., 1998b), tal i com es pot veure a la figura 3.3.A. Tots aquests tres antagonistes inhibeixen l'estimulació de la PLC per Glu amb valors de la  $\text{IC}_{50}$  de  $66,5 \pm 12,0 \mu\text{M}$ ,  $91,8 \pm 15,0 \mu\text{M}$  i  $12,1 \pm 1,4 \mu\text{M}$ , respectivament ( $n = 3$ ).

Recentment, el compost 2-metil-6-(feniletíl)-piridina (MPEP) i el seu derivat estructural (E)-2-metil-6-(2-feniletíl)piridina (SIB-1983), han estat descrits com a potents i selectius antagonistes del receptor mGluR5 (Varney et al., 1999; Gasparini et al., 1999). Aquests compostos són capaços d'inhibir, en sistemes d'expressió heteròloga, les respostes del receptor hmGluR5a amb una  $\text{IC}_{50}$  de 0,29  $\mu\text{M}$  i 39 nM, respectivament. Per contra, la seva inhibició de respostes mitjançades pel receptor hmGluR1 $\beta$  es caracteritza per presentar valors d' $\text{IC}_{50}$  superiors a 100  $\mu\text{M}$ . A la figura 3.3.B., es pot observar com ni el MPEP ni el SIB-1893 poden inhibir significativament l'estimulació de la PLC per Glu 100  $\mu\text{M}$ , només es produeix una petita inhibició (34,3 %) per concentracions altes de MPEP (10  $\mu\text{M}$ ). Cap dels antagonistes emprats afecten l'activitat PLC basal.

El conjunt d'aquestes dades farmacològiques ens demostren que el receptor mGluR1 és l'únic subtipus de mGluR que participa en l'activació de la PLC per Glu o altres agonistes.





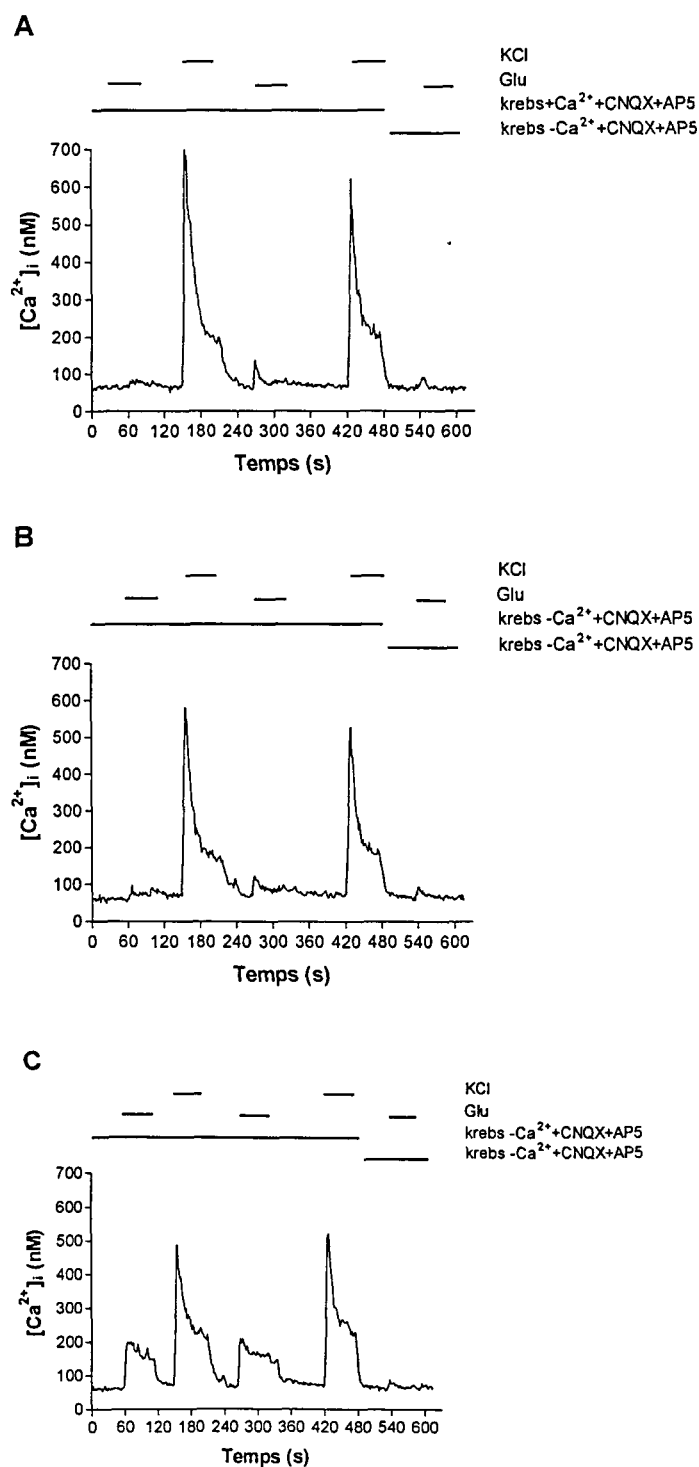
**Figura 3.3. Efecte d'antagonistes dels mGluRs del grup I en l'activació de la PLC per Glu. A:** Els cultius primaris de neurones granulars marcats amb  $^3\text{H}$ -Inositol han estat preincubats 20 minuts amb CNQX  $30\ \mu\text{M}$ , AP5  $50\ \mu\text{M}$  i els antagonistes indicats, selectius pels receptors mGluRs del grup I (AIDA i MCPG) o pel receptors mGluR1 (CPCCOEt), abans d'una incubació addicional de 30 min amb Glu  $100\ \mu\text{M}$  i LiCl  $10\ \text{mM}$ . **B:** Els cultius de neurones granulars han estat tractats d'igual manera que en l'apartat A, però ara els antagonistes utilitzats són el MPEP i el SIB-1893, selectius pel receptors mGluR5. Els resultats s'expressen com a percentatge de la resposta en cèl·lules preincubades només amb els antagonistes dels receptors iGluRs i estimulades amb Glu  $100\ \mu\text{M}$ , i són mitges  $\pm$  S.E.M. d'almenys 3 experiments fets per triplicat.

### 3.3. Caracterització dels subtipus de receptors implicats en el senyal de $\text{Ca}^{2+}$ induït per agonistes dels mGluRs

Fins al moment, les nostres dades indiquen que els cultius de CGC madurs expressen tan el receptor mGluR1 $\alpha$  com el receptor mGluR5, però només el primer activa la PLC. Ambdós receptors poden, en altres sistemes neuronals, generar senyals de  $\text{Ca}^{2+}$ . Per investigar aquesta possibilitat hem realitzat una caracterització de la resposta similar a la descrita anteriorment per l'activació de la PLC.

Així, primerament hem estudiat les respostes de  $\text{Ca}^{2+}$  en cultius de CGC de 9 DIV premarcats amb fura-2/AM i preincubats 20 min amb CNQX 30  $\mu\text{M}$  i AP5 50  $\mu\text{M}$ . El Glu, a 1mM, l'hem aplicant durant 1 min abans i després d'una despolarització de les cèl·lules amb KCl 40 mM. El protocol seguit ha estat, per tant, el mateix que el descrit al capítol 2 dels resultats per les respostes induïdes pels receptors muscarínics.

Els senyals de  $\text{Ca}^{2+}$  induïts pel Glu mostren una gran heterogeneïtat entre cèl·lules d'un mateix cultiu i entre diferents cultius. Així, en cèl·lules predespolaritzades, el Glu indueix un increment en la concentració de  $\text{Ca}^{2+}$  citosòlica ràpid i transitori (pic) de  $1,84 \pm 0,08$  vegades el basal en el 60 % de les cèl·lules de 5 dels 8 cultius analitzats i en més del 90 % dels 3 cultius restants (figura 3.4.A i B). Quan s'adiciona el Glu a les cèl·lules abans de despolaritzar-les durant 1 min, és a dir, d'emplenar els seus reservoris intracel·lulars de  $\text{Ca}^{2+}$ , el Glu 1mM és incapaç d'induir cap resposta de  $\text{Ca}^{2+}$  en 3 dels 8 cultius analitzats (figura 3.4.A) però sí que propicia un increment de  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmàtic ( $1,62 \pm 0,06$  vegades el basal) en el 20 % de les cèl·lules que també responen al Glu després de la despolarització en els altres 5 cultius (figura 3.4.B). En absència de  $\text{Ca}^{2+}$  extracel·lular, el Glu només indueix un increment en la concentració de  $\text{Ca}^{2+}$  en cèl·lules predespolaritzades i aquest és més petit que el que es registra en presència de  $\text{Ca}^{2+}$ , essent com a promig de 25 cèl·lules de 3 cultius analitzats de  $1,27 \pm 0,02$  vegades el basal (figura 3.4. A i B.). Cal fer esment que, en tots els cultius analitzats, el Glu és capaç d'induir grans respostes de  $\text{Ca}^{2+}$  en molt poques cèl·lules (< 8 % de cèl·lules totals). El perfil d'aquestes respostes, i el fet de que són totalment suprimides en absència de  $\text{Ca}^{2+}$  extracel·lular, permet afirmar que es tracta de respostes mitjançades pels receptors iGluRs que en algunes cèl·lules no queden del tot bloquejats (figura 3.4.C).



**Figura 3.4. Efecte del Glu en la concentració de  $\text{Ca}^{2+}$  citosòlica.** Després del marcatge amb fura-2/AM i una preincubació de 20 min amb CNQX 30  $\mu\text{M}$  i AP5 50  $\mu\text{M}$ , les cèl·lules han estat estimulades amb Glu 1 mM abans i després d'una despolarització transitoria amb KCl 40 mM en presència i absència de  $\text{Ca}^{2+}$  extracel·lular, tal i com s'indica. Els perfils presentats corresponen a tres cèl·lules individuals representatives de les respostes que el Glu indueix en 8 cultius analitzats.

Per altra banda, també hem estudiat l'efecte d'altres agonistes dels mGluRs. El Quis 30  $\mu\text{M}$  (en cèl·lules preincubades 20 min amb CNQX 30  $\mu\text{M}$  i AP5 50  $\mu\text{M}$ ), el 1S,3R-ACPD 300  $\mu\text{M}$  i el DHPG 100  $\mu\text{M}$  també indueixen respostes de  $\text{Ca}^{2+}$  en forma de pic en cèl·lules predespolaritzades, els valors de les quals són  $1,60 \pm 0,07$ ,  $2,03 \pm 0,34$  i  $1,85 \pm 0,23$  vegades el basal, respectivament ( $n = 3$  cultius, analitzant 25 cèl·lules/cultiu). De totes maneres, aquestes respostes només s'observen en cèl·lules predespolaritzades i el percentatge de cèl·lules que responen depèn de l'agonista: 35-45 % pel Quis, 50-55 % pel 1S,3R-ACPD i 15-20 % pel DHPG. A més a més, aquestes respostes són totalment dependents de la presència de  $\text{Ca}^{2+}$  extracel·lular durant l'estimulació, tal i com s'observa a la figura 3.5. i ha estat descrit anteriorment pel 1S,3R-ACPD (Irving et al., 1992a).

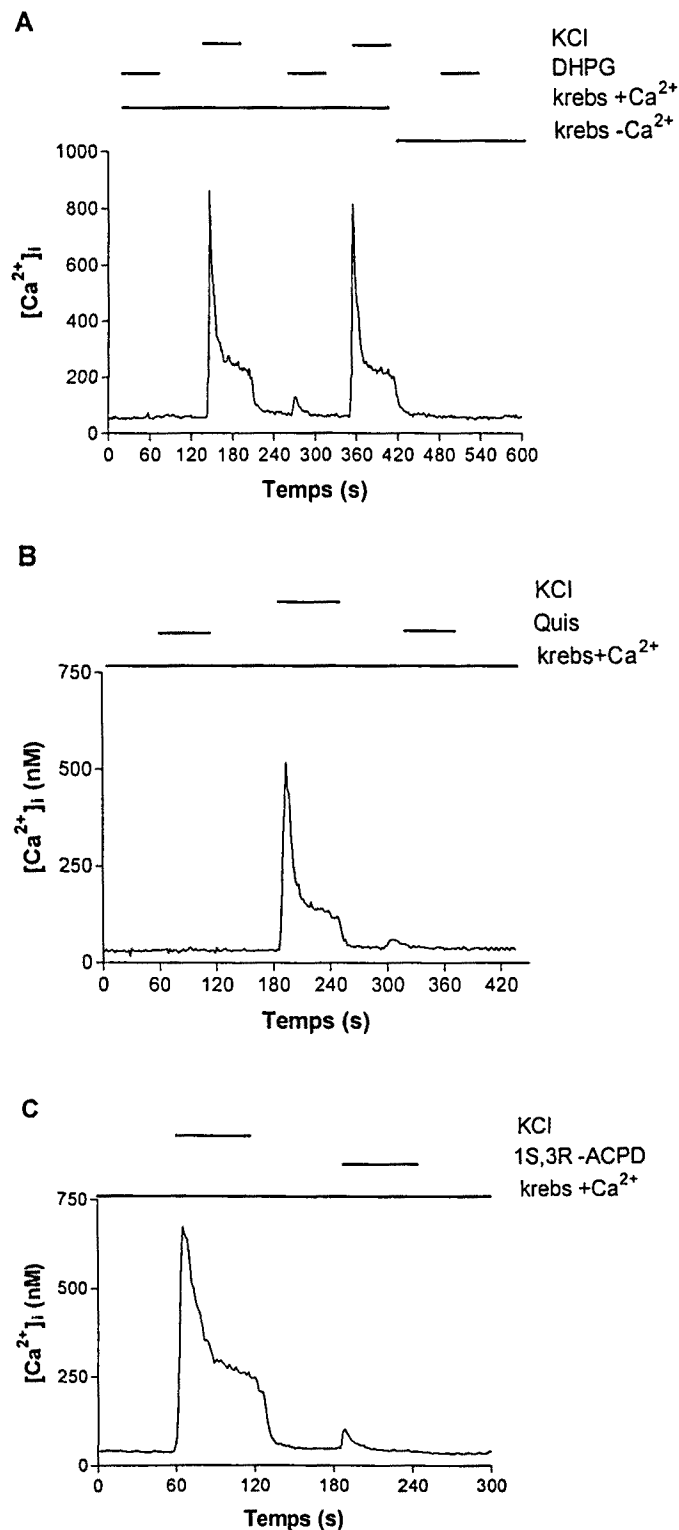
Ara bé, l'aplicació de l'agonista selectiu dels receptors mGluR5 CHPG a diferents concentracions i fins a 2 mM, no genera cap senyal de  $\text{Ca}^{2+}$ , ni en cèl·lules control ni en cèl·lules predespolaritzades (figura 3.6.A.). I finalment, la preincubació de les cèl·lules durant 20 min amb l'antagonista selectiu dels receptors mGluR1 CPCCOEt 100  $\mu\text{M}$ , resulta en una inhibició total del senyal de  $\text{Ca}^{2+}$  que genera el Glu 1mM (figura 3.6.B.).

Tots aquests resultats, per tant, indiquen que el subtipus de mGluR que mitjança les respostes de  $\text{Ca}^{2+}$  en cultius de CGC de 9 DIV és també el receptor mGluR1.

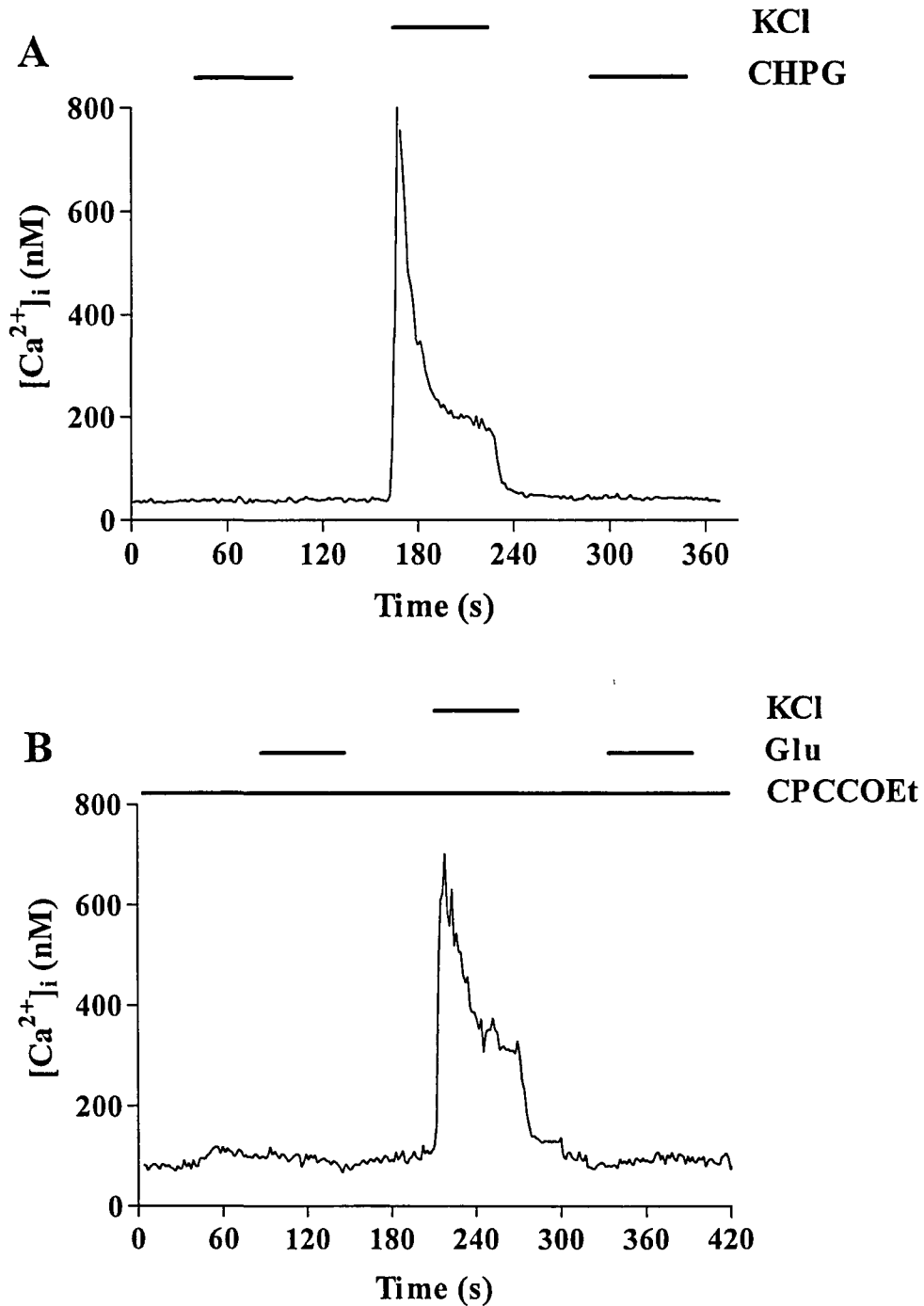
### 3.5. Resum i conclusions del capítol

Les dades dels westerns blots mostren com cultius de neurones granulars a diferents dies expressen els receptors mGluR1 $\alpha$  i mGluR5, essent l'expressió del primer constant i la del segon creixent amb el temps *in vitro* del cultiu.

Malgrat l'expressió d'ambdós receptors, però, els nostres estudis farmacològics mostren com només el mGluR1 és responsable de l'activació de la PLC i la resposta de  $\text{Ca}^{2+}$  que diferents agonistes dels mGluRs indueixen en cultius de CGC de 9 DIV.



**Figura 3.5. Respostes de Ca<sup>2+</sup> induïdes per diferents agonistes dels mGluRs.** Cultius de CGC de 9 DIV premarcats amb Fura-2/AM han estat estimulats amb DHPG 100 μM (A), Quis 30 μM (B) o 1S,3R-ACPD 300 μM (C) durant 1 min, abans i després d'una despolarització de 1 min amb KCl 40 mM, i en presència (+Ca<sup>2+</sup>) i absència (-Ca<sup>2+</sup>) de Ca<sup>2+</sup> extracel·lular. Els perfils mostrats corresponen a una única cèl·lula representativa de 25 cèl·lules del mateix cultiu analitzades. Resultats similars s'han obtingut en tres cultius diferents.



**Figura 3.6. Efecte d'agonistes i antagonistes en les respostes de  $Ca^{2+}$ .** **A:** Cultius de CGC de 9 DIV han estat estimulats amb CHPG 2 mM durant 1 min abans i després d'una despolarització de 1 min amb KCl 40 mM, i en presència de  $Ca^{2+}$  extracel·lular. **B:** Cultius de les mateixes característiques que A han estat preincubats 20 min amb CNQX 30  $\mu$ M, AP5 50  $\mu$ M i CPCCOEt 100  $\mu$ M i posteriorment estimulats amb Glu 1 mM durant 1 min abans i després d'una despolarització transitòria amb KCl 40 mM, també d'1 min. Els perfils mostrats corresponen a una única cèl·lula representativa de 25 cèl·lules del mateix cultiu analitzades. Resultats similars s'han obtingut en tres cultius diferents.

## 4. Modulació pel $\text{Ca}^{2+}$ intra- i extracel·lular de l'activació de la PLC pels receptors metabotròpics del glutamat

### 4.1. Introducció

Les nostres dades mostren, fins al moment, que en cultius primaris de neurones granulars de cerebel, el Glu estimula la PLC i indueix senyals de  $\text{Ca}^{2+}$  exclusivament a través dels receptors mGluR1. Aquestes respostes són sensibles al  $\text{Ca}^{2+}$  extracel·lular i, almenys l'activació de la PLC és mitjançada per una proteïna G, tot i que la diferència en la magnitud de la mateixa estimulació en membranes i cèl·lules senceres, ens condueix a considerar la participació d'algun altre element regulador d'aquesta resposta.

Els mGluRs, juntament amb els receptors de  $\text{Ca}^{2+}$  i els receptors de  $\text{GABA}_B$ , pertanyen a un subgrup de receptors que sembla presentar característiques especials i diferenciadores de la resta de GPCRs, entre les quals cal destacar la capacitat de sensar el  $\text{Ca}^{2+}$  extracel·lular (Schoepp et al., 1999). Així, mentre alguns autors han descrit com canvis de l'orde de mM en la concentració de  $\text{Ca}^{2+}$  extracel·lular resulten en una regulació directa de l'activació de la PLC pels mGluRs en sistemes d'expressió heteròloga (Saunders et al., 1998; Kubo et al., 1998), altres autors han clonat un receptor mGluR de cervell de salmó bifuncional, és a dir, que és activat tan per Glu com per ions  $\text{Ca}^{2+}$  (Kubokawa et al., 1996).

Per altra banda, s'ha proposat que en CGC despolaritzades, els mGluRs induïrien un acoblament entre els receptors RyR i els canals de voltatge de tipus L (Chavis et al., 1996) i també s'ha hipotitzat un acoblament entre els receptors mGluRs i els RyR, independent de la formació d'Ins1,4,5P<sub>3</sub> (del Río et al., 1999). Finalment, en el mateix sistema neuronal, nosaltres hem demostrat que l'activació de la PLC pels receptors muscarínics és regulada pels reservoris intracel·lulars de  $\text{Ca}^{2+}$ .

El conjunt d'aquestes dades ens aporten, per tant, diferents possibilitats en relació

als mecanismes d'activació de la PLC per receptors mGluR1 i la seva regulació pel  $\text{Ca}^{2+}$ . Així, el  $\text{Ca}^{2+}$  extracel·lular podria interaccionar directament amb el domini extracel·lular del receptor i modular la seva resposta, la qual podria ser alhora o alternativament regulada per la concentració de  $\text{Ca}^{2+}$  citosòlic i/o pels reservoris intracel·lulars de  $\text{Ca}^{2+}$ , especialment aquells que expressen receptors RyR.

Per tal d'estudiar aquests possibles i interessants mecanismes de l'activació de la PLC pels mGluR1s hem fet un estudi paral·lel al realitzat per l'estimulació del mateix sistema efector per part dels receptors muscarínics (capítol 2 dels resultats).

#### **4.2. Efectes de canvis en la concentració extracel·lular de $\text{Ca}^{2+}$ en l'estimulació de la PLC per Glu**

Anteriorment hem demostrat que el grau d'activació de la PLC inicial es pot determinar mesurant l'acumulació dels  $^3\text{H}$ -InsPs en cèl·lules permarcades amb [ $^3\text{H}$ ]inositol i estimulades 1 min amb agonista en presència de LiCl 10 mM (apartat 2.1. dels resultats). Utilitzant aquest procediment hem estudiat els mecanismes d'activació de la PLC per Glu 1 mM en cultius de CGC a 9 DIV, pretactant-los 20 min, abans de qualsevol estimulació, amb els antagonistes CNQX i AP5 a una concentració de 30  $\mu\text{M}$  i 50  $\mu\text{M}$ , respectivament. D'aquesta manera, ens assegurem d'anul·lar una possible contribució dels receptors iGluRs.

Com a pas inicial en els estudis acabats d'esmentar hem determinat la dependència de la resposta al  $\text{Ca}^{2+}$  extracel·lular en aquesta activitat PLC inicial introduint canvis en la concentració d'aquest ió abans i durant l'estimulació amb Glu. Els resultats mostren com el Glu indueix una considerable acumulació d' $^3\text{H}$ -InsPs ( $172,8 \pm 9,8$  % del basal,  $n = 3$ ) si les cèl·lules han estat preincubades i estimulades en presència de  $\text{Ca}^{2+}$  a una concentració de 1,3 mM. La substitució del tampó KH per un tampó igual però nominalment lliure de  $\text{Ca}^{2+}$  a diferents intervals de temps previs a l'addició del Glu i el  $\text{Li}^+$ , es tradueix en una ràpida disminució de l'activació de la PLC induïda per l'agonista ( $48,8 \pm 9,1$  %,  $48,8 \pm 5,1$  % i  $59,9 \pm 11,4$  % de reducció de la resposta en comparació amb la que es dona quan les cèl·lules es preincuben i s'estimulen en presència de  $\text{Ca}^{2+}$  extracel·lular, després de 1,3 i 10 min de l'omissió de  $\text{Ca}^{2+}$ , respectivament;  $n = 3$ ). Aquestes respostes no són significativament diferents de la resposta que té lloc quan els cultius són preincubats 30



min i estimulats en absència de  $\text{Ca}^{2+}$  extracel·lular, tal i com es pot observar a la figura 4.1.. Per altra banda, si després de la preincubació de 30 min sense  $\text{Ca}^{2+}$ , es substitueix el tampó KH per un tampó KH amb  $\text{Ca}^{2+}$  1,3 mM a diferents intervals temporals abans de l'estimulació de la PLC amb Glu, la resposta es recupera completament. Així, fins i tot la resposta que es registra quan l'estimulació té lloc 1 min després de l'addició del  $\text{Ca}^{2+}$  no és significativament diferent de la que podem determinar en cèl·lules control, és a dir, preincubades i estimulades en presència de  $\text{Ca}^{2+}$  1,3 mM (figura 4.1.).

La conclusió més evident que aquests resultats suggereixen és la importància de la presència del  $\text{Ca}^{2+}$  extracel·lular durant l'estimulació de la PLC pels receptors mGluR1. Ara bé, si recordem les dades exposades anteriorment a la figura 2.4. que indiquen clarament com l'omissió del  $\text{Ca}^{2+}$  extracel·lular resulta en una ràpida disminució de la concentració de  $\text{Ca}^{2+}$  citosòlic (aproximadament un 36 % de reducció) i que aquesta torna als nivells basals en menys d' 1 min després de l'addició de  $\text{Ca}^{2+}$ , cal considerar la possibilitat de que els ràpids efectes dels tractament acabats d'exposar sobre l'activació de la PLC per Glu puguin ser un reflexe dels efectes dels canvis en la concentració de  $\text{Ca}^{2+}$  citosòlic sobre la resposta.

A part d'aquests factors, l'absència de  $\text{Ca}^{2+}$  extracel·lular resulta també en una depleció dels reservoris intracel·lulars de  $\text{Ca}^{2+}$ , per tant cal estudiar la possible participació d'aquests en l'activació de la PLC per Glu.

### 4.3. Estimulació de la PLC per Glu en cèl·lules predespolaritzades

Per tal d'explorar les possibilitats comentades hem determinat l'estimulació de la PLC en cèl·lules prèviament despolaritzades amb KCl 40 mM durant 1 min. Aquest tractament, tal i com s'ha demostrat anteriorment, emplena els reservoris intracel·lulars de  $\text{Ca}^{2+}$  i és necessari per a què el Glu indueixi increments transitoris (en forma de pic) de la concentració de  $\text{Ca}^{2+}$  citosòlica en la majoria de les cèl·lules (veure figura 3.4. dels resultats).

Tal i com es pot veure a la figura 4.2., les cèl·lules tractades 1 min amb KCl 40 mM, preincubades 1 min amb tampó KH i estimulades 1 min amb Glu 1 mM coadicionat amb LiCl a una concentració final de 10 mM, presenten una activació de la PLC superior a la que es registra en cèl·lules control, és a dir, no predespolaritzades (augment

d'aproximadament el 60 %,  $n = 3$ ). Aquesta resposta és sensible al  $\text{Ca}^{2+}$  extracel·lular, ja que si l'estimulació de la PLC per Glu es fa en absència d'aquest ió es produeix una disminució ( $36,8 \pm 4,0$  % de reducció). Alhora, si la despolarització es fa en absència de  $\text{Ca}^{2+}$  la potenciació de la resposta no té lloc, i per tant l'activació metabotrópica de la PLC és igual en cèl·lules tractades o no amb KCl 40 mM (figura 4.2.).

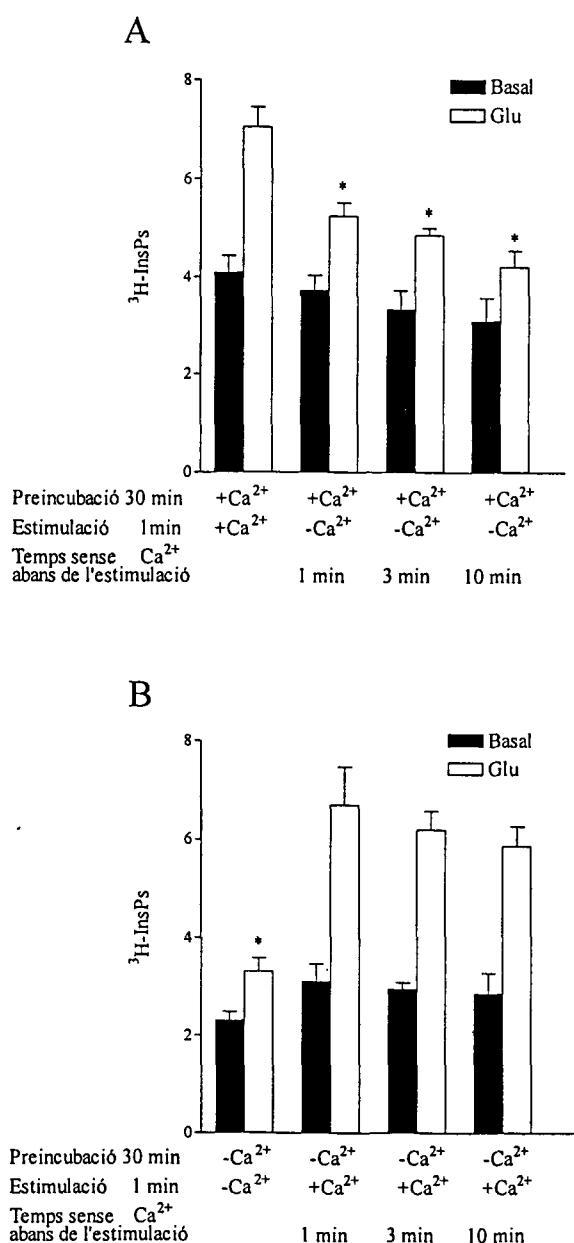
La inhibició per absència de  $\text{Ca}^{2+}$  de l'activació de la PLC i el senyal de  $\text{Ca}^{2+}$  induïts per Glu és del mateix ordre, i això suggereix que canvis en la concentració citosòlica de  $\text{Ca}^{2+}$  modulen l'activació de la PLC per Glu.

#### 4.4. Efectes del BAPTA/AM en les respostes del Glu

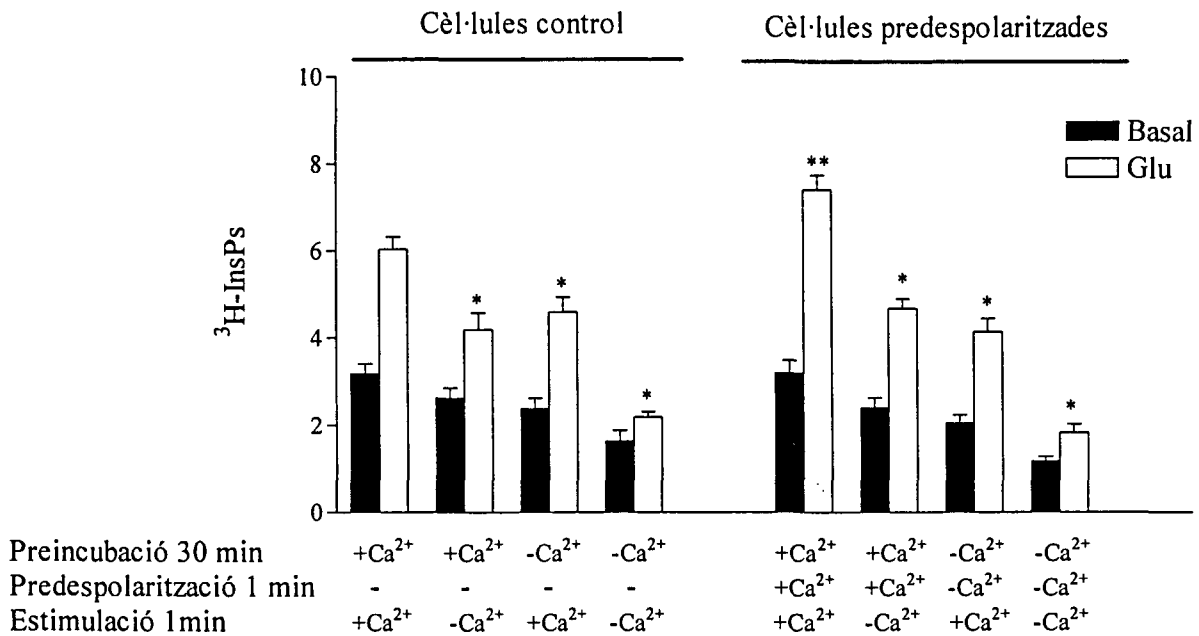
La predespolarització implica un major estat d'ompliment dels reservoris intracel·lulars que podrien regular positivament una posterior activació de la PLC per Glu, tal i com hem proposat pel Cch, però alhora permet un increment de la concentració de  $\text{Ca}^{2+}$  citosòlica quan aquest agonista és addicionat, i aquest també podria regular l'activació de la PLC per Glu.

Per explorar aquest fet amb més detall, hem determinat les respostes del Glu en cèl·lules predepolaritzades i que prèviament han estat preincubades durant 20 min amb el quelant de  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmàtic permeable a la membrana, BAPTA/AM (30  $\mu\text{M}$ ). Cal recordar que aquest tractament permet anul·lar petits increments en la concentració de  $\text{Ca}^{2+}$  però no impedeix l'ompliment dels reservoris intracel·lulars de  $\text{Ca}^{2+}$  (veure apartat 2.7. dels resultats).

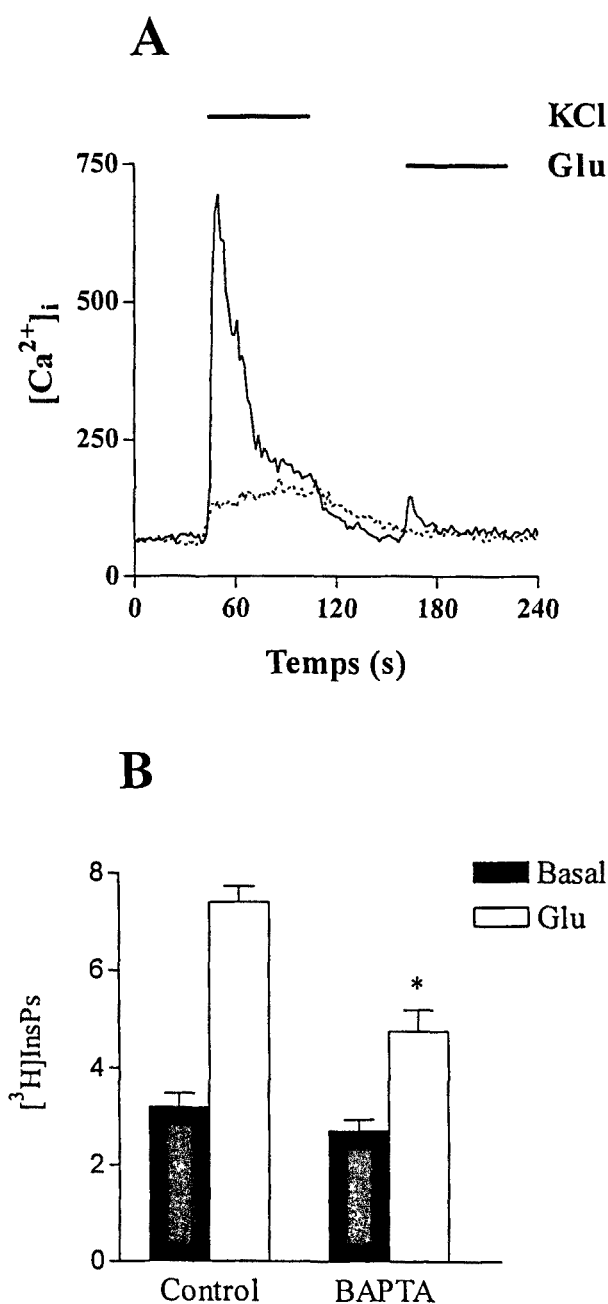
Tal i com es pot veure a la figura 4.3., la preincubació de les cèl·lules amb BAPTA/AM 30  $\mu\text{M}$  disminueix significativament l'acumulació d' $^3\text{H}$ -InsPs ( $52,5 \pm 10,5$  % reducció,  $n = 3$ ) i anul·la la senyal de  $\text{Ca}^{2+}$ , ambdues induïdes pel Glu en cèl·lules predespolaritzades. Aquestes dades apunten, per tant, a que la potenciació de l'estimulació de la PLC per Glu és deguda a que l'ompliment dels reservoris intracel·lulars de  $\text{Ca}^{2+}$  permet la mobilització de  $\text{Ca}^{2+}$  i el conseqüent increment de la concentració de  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmàtica.



**Figura 4.1. Dependència del Ca<sup>2+</sup> extracel·lular de l'estimulació de la PLC per Glu.** **A:** els cultius de neurones granulars han estat marcats amb <sup>3</sup>H-Inositol i posteriorment mantinguts 30 minuts amb tampó KH 1,3 mM de Ca<sup>2+</sup>. Les cèl·lules, posteriorment, han estat estimulades durant 1 min amb Glu 1 mM tan en presència (+Ca<sup>2+</sup>) com en absència de Ca<sup>2+</sup> (-Ca<sup>2+</sup>). En aquest últim cas, les cèl·lules han estat mantingudes durant diferents intervals de temps en absència de Ca<sup>2+</sup> abans de l'addició de l'agonista i el Li<sup>+</sup>. **B:** Els cultius premarcats han estat incubats durant 30 min amb un tampó KH sense Ca<sup>2+</sup> afegit i estimulats durant 1 min en presència (+Ca<sup>2+</sup>) o absència de Ca<sup>2+</sup> (-Ca<sup>2+</sup>). En aquest últim cas, les cèl·lules han estat tractades amb Glu i LiCl després de ser exposades durant diferents temps a un tampó KH amb Ca<sup>2+</sup> 1,3 mM. Els resultats s'expressen com a <sup>3</sup>H-InsPs x 100/(<sup>3</sup>H-InsPs + <sup>3</sup>H-lípids) i són mitges ± S.E.M de 3 experiments independents fets per triplicat i duts a terme sobre mostres del mateix cultiu per ambdues condicions (A i B). \*Efecte del Glu significativament diferent al que es troba en cèl·lules preincubades i estimulades en presència de Ca<sup>2+</sup> 1,3 mM (p<0,05).



**Figura 4.2. Efecte d'una prèvia despolarització en l'estimulació de la PLC per mGluR1.** Els cultius de CGC han estat preincubats amb tampó KH durant 30 min i tractats 1 min amb tampó KH amb KCl 5,9 mM (cèl·lules control) o 40 mM (cèl·lules predespolaritzades). Posteriorment, el tampó ha estat substituït per un tampó KH de KCl 5,9 mM i 1 min més tard, les cèl·lules han estat estimulades amb Glu 1mM i LiCl 10 mM. Tots els passos, preincubació, predespolarització i estimulació, han estat realitzats tan en presència (+Ca<sup>2+</sup>) com en absència (-Ca<sup>2+</sup>) de Ca<sup>2+</sup> 1,3 mM, tal com està indicat. Els resultats són mitges ± S.E.M de 3 experiments independents i realitzats per triplicat i s'expressen com a <sup>3</sup>H-InsPs x 100/(<sup>3</sup>H-InsPs + <sup>3</sup>H-lípids). \*Respostes significativament diferents de les que es troben en les respectives cèl·lules preincubades i estimulades en presència de Ca<sup>2+</sup> extracel·lular tan en cèl·lules control com en cèl·lules predespolaritzades. \*\*Respostes de cèl·lules predespolaritzades que són significativament diferents de la resposta de les cèl·lules control preincubades i estimulades en presència de Ca<sup>2+</sup> extracel·lular (p<0,05).



**Figura 4.3. Efecte del BAPTA/AM en la mobilització de  $Ca^{2+}$  intracel·lular i en l'activació de la PLC per Glu en cèl·lules predepolariades.** A: Les cèl·lules premarcades amb fura-2/AM han estat preincubades amb tampó KH amb (línia contínua) o sense (línia discontinua) BAPTA/AM 30  $\mu$ M durant 20 min, tractades amb KCl 40 mM 1 min, i, després d'un rentat amb tampó KH amb KCl 5,9 mM, estimulades amb Glu 1 mM. El perfil presentat correspon a una cèl·lula individual representativa de 25 cèl·lules analitzades pel sistema de ' $Ca^{2+}$  imaging'. Resultats similars s'han obtingut per tres cultius independents. B: S'ha seguit el mateix protocol exposat en la figura A però determinant l'acumulació d' $^3H$ -InsPs. Per tant, LiCl 10 mM ha estat addicionat al mateix temps que el Glu 1 mM. Els resultats són mitges  $\pm$  S.E.M de 3 experiments independents realitzats per triplicat i s'expressen com a  $^3H$ -InsPs  $\times$  100/ $(^3H$ -InsPs +  $^3H$ -lípid). \*Resposta significativament diferent de la que es troba en cèl·lules control.

#### 4.5. Participació dels receptors de rianodina en l'estimulació de la PLC per Glu

Finalment hem analitzat l'implicació dels RyR en l'estimulació de la PLC per Glu, ja que tal i com s'ha dit anteriorment, s'ha descrit que aquests receptors tenen un paper principal en el senyal de  $\text{Ca}^{2+}$  induïda per receptors mGluRs en CGC despolaritzades (Chavis et al., 1996; del Río et al., 1999). Així, hem preincubat les cèl·lules durant 20 min amb rianodina a 10  $\mu\text{M}$ , concentració a la qual aquest compost actua com a inhibidor dels receptors RyR.

Els resultats, exposats a la figura 4.4.A, indiquen com el bloqueig dels RyR implica una significant disminució de l'estimulació de la PLC per Glu en cèl·lules predespolaritzades ( $42,3 \pm 11,2$  % de reducció,  $n = 3$ ), però no efectiva a la mateixa resposta en cèl·lules control, és a dir, no despolaritzades.

A més a més, en presència de rianodina, l'acumulació d' $^3\text{H}$ -InsPs induïda pel Glu és similar en cèl·lules control i cèl·lules predespolaritzades, fet que suggereix una implicació de l'alliberament de  $\text{Ca}^{2+}$  a través dels receptors RyR en la modulació de l'activació de la PLC pels mGluR1. I això, representa un altre tret diferencial dels mGluRs respecte els receptors muscarínics, ja que l'acumulació d' $^3\text{H}$ -InsPs induïda pel Cch no es veu afectada per una preincubació amb rianodina 10  $\mu\text{M}$ , ni en cèl·lules control ni en cèl·lules despolaritzades (figura 4.4.B).

#### 2.8. Resum i conclusions del capítol

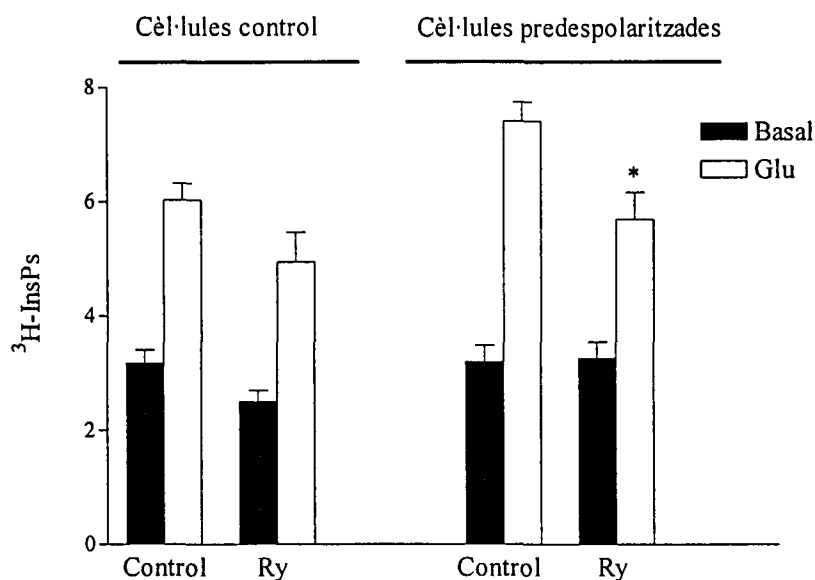
L'estudi dels mecanismes d'activació de la PLC per receptors mGluR1 en neurones granulars de cerebel mostra, en primer lloc, com la presència de  $\text{Ca}^{2+}$  extracel·lular durant l'estimulació és important per aquesta activitat, ja que per una banda, l'estimulació en presència de  $\text{Ca}^{2+}$  és independent d'una prèvia preincubació de les cèl·lules amb tampó KH sense  $\text{Ca}^{2+}$ ; i per altra banda, l'omissió del  $\text{Ca}^{2+}$  només un min abans de l'addició del Glu es tradueix en una considerable disminució de la resposta. Aquestes dades són consistents amb recents estudis que suggereixen com el  $\text{Ca}^{2+}$  pot unir-se directament als mGluRs i modular-ne la seva activitat (Saunders et al., 1998; Kuboe t al., 1998).

---

Adicionalment, aquests canvis en la concentració de  $\text{Ca}^{2+}$  extracel·lular a diferents temps previs a l'estimulació modulen l'activitat PLC estimulada per Glu de manera proporcional als canvis en la concentració de  $\text{Ca}^{2+}$  citosòlica que aquestes mateixes manipulacions indueixen. Fet que insinua com canvis moderats en la concentració citosòlica de  $\text{Ca}^{2+}$  poden regular l'estimulació de la PLC pels mGluR1 en CGC.

Aquesta conclusió està recolzada per altres dades experimentals. Així, l'acumulació dels  $^3\text{H}$ -InsPs induïda pel Glu pot ser incrementada si les cèl·lules han estat prèviament despolaritzades. En aquestes condicions, el Glu també indueix un increment transitori de la concentració de  $\text{Ca}^{2+}$  citosòlica, i els nostres resultats utilitzant el quelant de  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmàtic BAPTA/AM indiquen que pot ser precisament aquest últim increment el responsable de la potenciació de l'estimulació de la PLC per Glu.

Finalment, els nostres resultats suggereixen que en cèl·lules despolaritzades, la mobilització de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de receptors de RyR induïda pel Glu, regula l'activitat PLC.



**Figura 4.4. Efecte de la rianodina en l'activació de la PLC per Glu. Comparació amb l'estimulació muscarínica. A:** Les cèl·lules han estat preincubades 20 min amb (Ry) o sense (control) rianodina 10  $\mu$ M, tractades amb tampó KH amb KCl 5,9 mM (cèl·lules control) o 40 mM (cèl·lules predepolaritzades) durant 1 min, rentades amb un tampó KH no despolaritzant un altre min i posteiorment estimulades amb Glu 1 mM en presència de LiCl 10 mM. **B:** S'ha seguit el mateix protocol que per la figura A, però estimulant els cultius amb Cch 1 mM. Per les condicions en què els cultius han estat tractats amb rianodina, aquest compost ha estat present també durant la despolarització i l'estimulació. Els resultats són mitges  $\pm$  S.E.M de 3 experiments independents realitzats per triplicat i s'expressen com a  $^3\text{H-InsPs} \times 100 / (^3\text{H-InsPs} + ^3\text{H-lípids})$ . \*Resposta significativament diferent de la que es troba en cèl·lules control.



## **5. Expressió dels isoenzims de la PLC en cultius primaris de neurones granulars. Translocació de la PLC- $\beta$ 1 induïda per activació dels receptors muscarínics de l'acetilcolina.**

### **1.1. Introducció**

Com s'ha dit a la introducció, l'activitat PLC de mamífers està representada per tres famílies: PLC- $\beta$ , PLC- $\gamma$  i PLC- $\delta$ , que es caracteritzen per tenir diferents mecanismes d'activació. Alhora, aquests tres grups principals presenten diferents isoenzims amb patrons d'expressió característics i podrien estar activats per diferents receptors, almenys en cervell (Ross et al., 1989; Tanaka et al., 1994 i Watanabe et al., 1998). Així la PLC- $\beta$ 1 s'expressa majoritàriament a l'escorça cerebral i a l'hipocamp on és activada pels receptors muscarínics, i la PLC- $\beta$ 4 es localitza principalment al cerebel i és estimulada majoritàriament pels receptors metabotòpics del glutamat (Kim et al., 1997).

Per altra banda, la sensibilitat al  $\text{Ca}^{2+}$  també sembla ser diferent per cada isoenzim, proposant-se que la PLC- $\delta$  com a més sensible que la PLC- $\beta$  i PLC- $\gamma$  (Allen et al., 1997), fet que implica una regulació diferencial per part d'aquest ió de l'activitat de cada un dels isoenzims.

Nosaltres hem demostrat que en cultius primaris de CGC existeixen isoenzims sensibles a la concentració de  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmàtic, que poden ser activats per despolarització amb altes concentracions de KCl, i que el mecanisme d'activació i regulació de la PLC és diferent depenent del receptor que estimula aquesta activitat. Així, els receptors muscarínics estimulen la PLC per un mecanisme que sembla sensar els nivells de  $\text{Ca}^{2+}$  dels reservoris intracel·lulars i sembla ser independent de canvis moderats en la concentració de  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmàtic, mentre que l'estimulació de la PLC per receptors metabotòpics del glutamat sembla dependre de la presència de  $\text{Ca}^{2+}$  extracel·lular durant l'estimulació i ser regulat per la concentració de  $\text{Ca}^{2+}$  al citosol cel·lular. Aquests resultats

podrien tenir relació amb l'expressió a granulars de varis isoenzims, cada un o el diferent combinació dels quals, podria ser responsable de les estimulacions per KCl, Cch i Glu.

Com a pas inicial per entendre l'especificitat i el paper fisiològic dels diferents isoenzims, així com per clarificar els components implicats en les mecanismes estudiats d'activació de la PLC, hem determinat l'expressió dels seus diferents isoenzims en cultius primaris de CGC de 9 DIV i, en el cas de la PLC- $\beta$ 1, hem analitzat la translocació del citosol a la membrana per activació dels receptors muscarínics.

### 5.1. Expressió dels diferents isoenzims de la PLC en CGC

Hem determinat quins isoenzims de la PLC s'expressen en cultius primaris de CGC als 9 DIV. Per això, hem utilitzat, primerament, la tècnica de 'Western Blot' seguida d'una immunodetecció amb anticossos específics contra la PLC- $\beta$ 1, - $\beta$ 2, - $\beta$ 3, - $\beta$ 4, - $\gamma$ 1, - $\gamma$ 2, - $\delta$ 1 i - $\delta$ 2, tal i com es descriu als mètodes.

Els blots resultants, dels qual s'en mostra un de representatiu a la figura 5.1., mostren com tots els anticossos esmentats detecten una banda de massa molecular dintre el rang esperat per cada isoenzim. De totes maneres, alguns anticossos presenten bandes addicionals més febles, les quals solen ser les mateixes per tots els anticossos que presenten aquesta inespecificitat.

Un mètode alternatiu i que aconsegueix més especificitat i sensibilitat, és la immunoprecipitació. Aquesta tècnica parteix dels extractes cel·lulars i aconsegueix una mostra rica en la proteïna a determinar, ja que es tracten els primers amb l'anticòs contra la proteïna a determinar, es separa aquest anticòs, unit o no a la proteïna, de la mostra amb una matriu de sefarosa i se'l sotmet a Wester blot (veure mètodes).

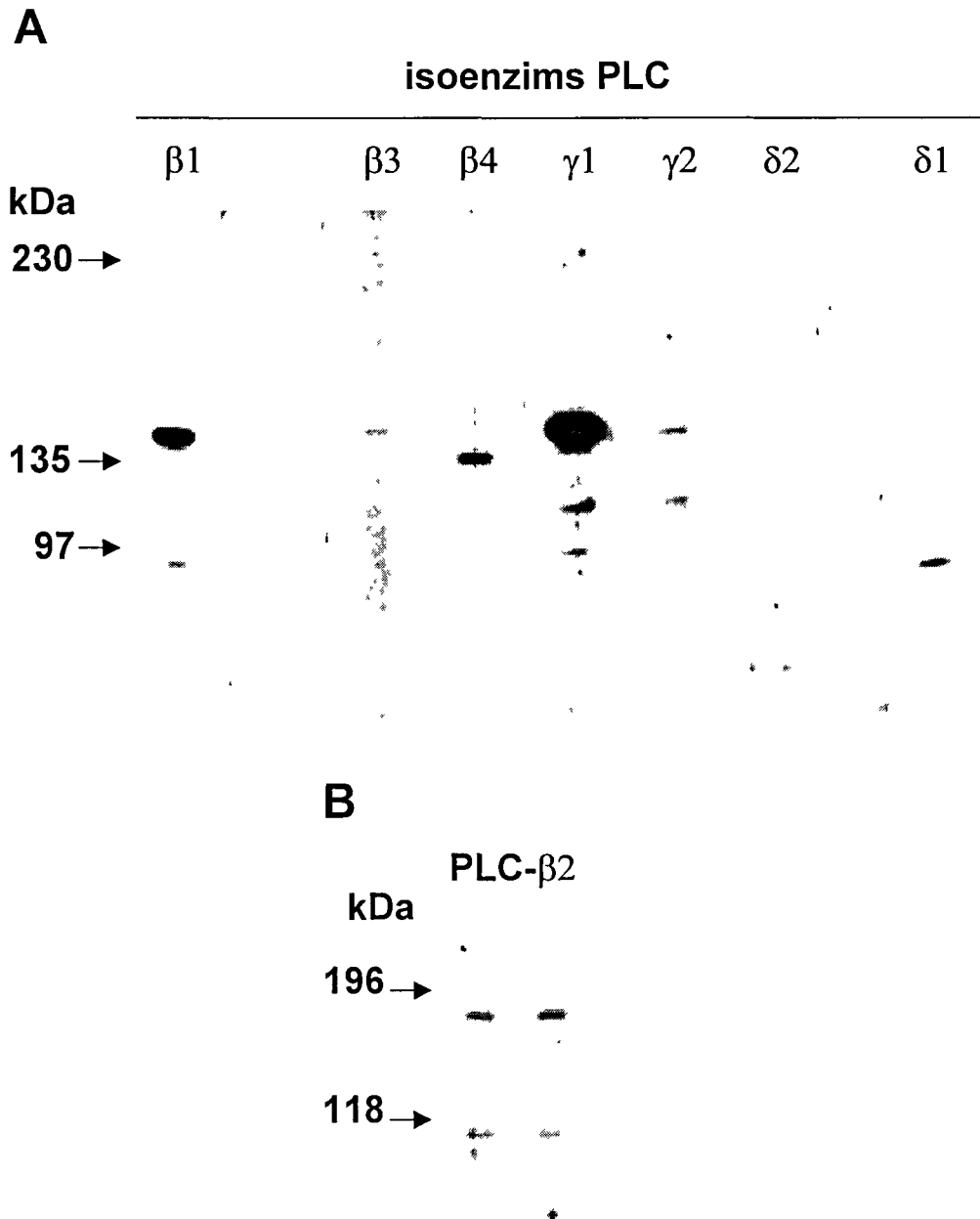
Si es fa una immunodetecció dels isoenzims PLC- $\beta$ 1, - $\beta$ 2, - $\beta$ 3, - $\beta$ 4, - $\gamma$ 1, - $\gamma$ 2 i - $\delta$ 2 s'observa que cada un dels anticossos reconeix una banda específicament, i que alhora tots presenten 3 bandes més de massa molecular inferior a 118 kDa i iguals, tan en termes quantitius com en massa molecular, per a tots ells, tal i com es pot veure a la figura 5.2..

Les bandes que cada anticòs reconeix específicament presenten una massa molecular que es correspon molt bé en els diferents blots, obtinguts tan per immunodetecció dels extractes cel·lulars com de mostres obtingudes per immunoprecipitació, fet que ens dóna total confiança tan a l'hora d'afirmar que es tracten

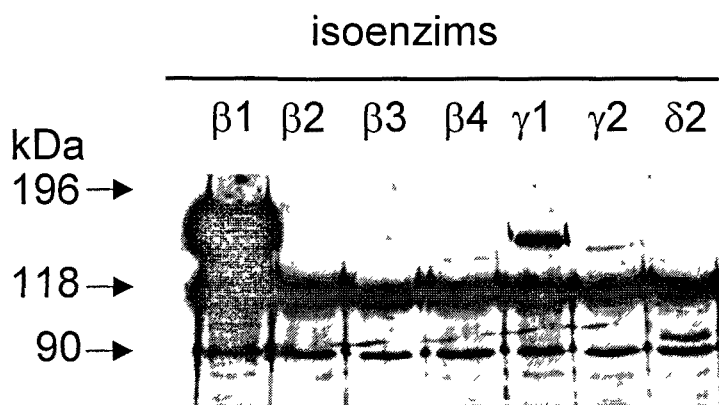
de bandes corresponents a un determinat isoenzim de la PLC com a l'hora de determinar-ne la massa molecular aproximada (taula 5.1.).

	Masses moleculars
PLC- $\beta$ 1	154
PLC- $\beta$ 2	149
PLC- $\beta$ 3	161
PLC- $\beta$ 4	136
PLC- $\gamma$ 1	155
PLC- $\gamma$ 2	154
PLC- $\delta$ 1	99
PLC- $\delta$ 2	95

**Taula 5.1. Masses moleculars aproximades dels diferents isoenzims de la PLC que s'expressen en cultius primaris de CGC a 9 DIV.** Els valors són determinacions a partir de 12 blots (3, per PLC- $\delta$ 1).



**Figura 5.1. Determinació dels isoenzims de la PLC en cultius primaris de CGC a 9 DIV.** Les cèl·lules han estat solubilitzades i el lisat cel·lular obtingut (200  $\mu$ l diluïts a una meitat amb tampó de càrrega) ha estat sotmès a una electroforesis de SDS/PAGE 8 %. **A:** Posteriorment a la transferència del gel a una membrana de nitrocel·lulosa, hem fet una immunodetecció amb els anticossos contra la PLC- $\beta 1$ , - $\beta 3$ , - $\beta 4$ , - $\gamma 1$ , - $\gamma 2$ , - $\delta 1$  i - $\delta 2$ . **B:** La immunodetecció ha estat feta amb l'anticòs específic contra la PLC- $\beta 2$ . Les imatges presentades són representatives de 7 (3, per la PLC- $\delta 1$ ) experiments d'extractes de cultius diferents.



**Figura 5.2. Immunoprecipitació i detecció dels isoenzims de la PLC en mostres de CGC.** Les cèl·lules han estat solubilitzades i immunoprecipitades amb els anticossos contra les PLC- $\beta$ 1, - $\beta$ 2, - $\beta$ 3, - $\beta$ 4, - $\gamma$ 1, - $\gamma$ 2 i - $\delta$ 2, seguint el protocol descrit als mètodes. Posteriorment, les mostres han estat sotmeses a electroforesis (8 % SDS/PAGE) i han estat immunodetectades amb el corresponent anticòs. La imatge presentada és representativa de 5 blots corresponents a mostres de 5 cultius diferents.

### 5.3. Estudis de la translocació de la PLC- $\beta$ 1 induïda pels receptors muscarínics

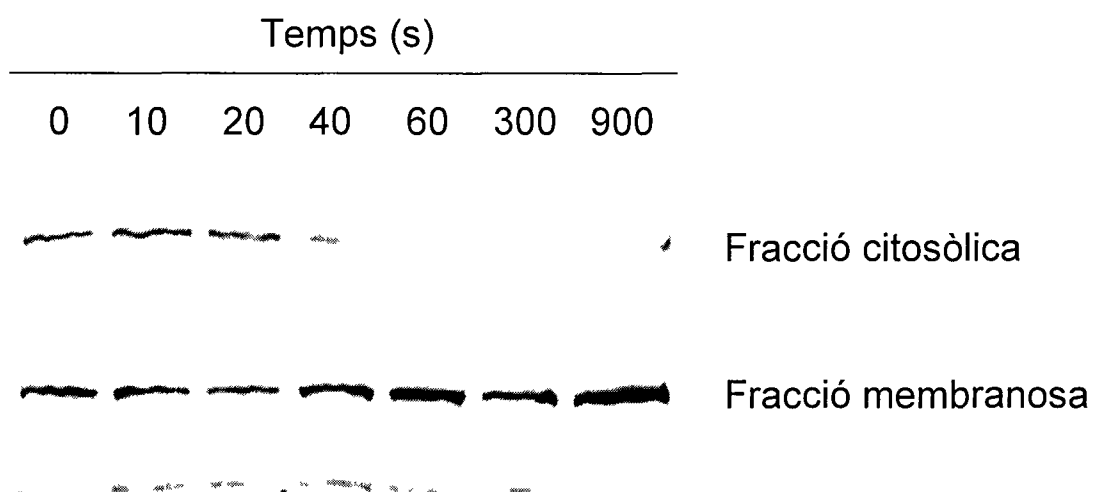
No existex cap aproximació experimental per estudiar directament l'activació selectiva d'un determinat isoenzim resultat d'un estimulació d'un determinat receptor, a no ser que sigui en sistemes reconstituïts. Tanmateix, recentment s'ha proposat que canvis en la distribució subcel·lular d'un isoenzim de la PLC, i més concretament el seu moviment del citosol a la membrana (procés anomenat translocació), després de l'estimulació d'un receptor poden indicar la seva activació (Wheldon et al., resultats no publicats). En el nostre cas, assumint aquesta possibilitat, caldria determinar la localització subcel·lular de tots els 8 isoenzims que s'expressen a CGC en estat basal i mirar la seva translocació després d'estimular les cèl·lules amb Cch i Glu, per saber si els diferents mecanismes d'activació i regulació de l'activitat PLC que aquests agonistes indueixen es poden associar en translocacions de diferents isoenzims o d'un/uns mateixos isoenzims però amb

cinètiques temporals d'activació diferencials. Es tracta, per tant, d'un estudi llarg, costós i amb moltes dificultats experimentals degut a la difícil detecció de determinats isoenzim.

Com a pas inicial d'aquests estudis, hem analitzat la translocació de la PLC- $\beta$ 1 per receptors muscarínics. Hem escollit la PLC- $\beta$ 1 principalment per dues raons, primerament perquè s'ha suggerit que al cerebel de rata adulta la PLC- $\beta$ 1, l'isoenzim amb expressió més alta, està acoblada majoritàriament als receptors muscarínics (Kim et al., 1997); i segonament perquè en cultius primaris de CGC és l'isoenzim més fàcilment detectable i semblaria més abundant, tot i que aquesta és una afirmació relativa (i per comparació amb immunodeteccions amb els mateixos anticossos d'extractes de cèl·lules SH-SY5Y, dades no mostrades) ja que l'eficàcia de detecció depèn de cada anticòs.

L'anàlisi de mostres de 4 cultius diferents mostren com en condicions basals aproximadament el 72 % de la PLC- $\beta$ 1 total es localitza a la membrana i que estimulacions de les cèl·lules amb Cch 1 mM de 10 i 20s no canvien aquest percentatge (74 i 78 %, respectivament), però una estimulació de 40 s incrementa el percentatge a aproximadament el 93 %, fet que suggereix una ràpida translocació de quasi tota la PLC- $\beta$  1 citosòlica a la membrana. Exposicions de les cèl·lules amb Cch 1 mM més llargues, fins a 15 min, no indueixen més alteracions de la distribució de l'isoenzim, així totem a membrana aproximadament el 97 %, 96 % i el 99 % després de 1, 3 i 15 min d'estimulació, respectivament (veure figura 5.3.).

Es conclou, per tant, que els receptors muscarínics indueixen un moviment ràpid de la PLC- $\beta$ 1 citosòlica a la membrana aproximadament 40 s després de l'addició d'un agonista d'aquests receptors.



**Figura 5.3. Translocació de la PLC- $\beta$ 1 després de diferents temps d'estimulació de les cèl·lules amb Cch.** Les cèl·lules han estat estimulades amb Cch 1 mM durant diferents temps, lisades, i separades en dues fraccions, la citosòlica i la membranosa, tal i com es descriu als mètodes. Una al·lquota de les diferents mostres de cada una de les dues fraccions han estat sotmeses a electroforesis i immunodetectades utilitzant un anticòs anti PLC- $\beta$ 1. La imatge que es mostra és representativa de 4 experiments en cultius diferents.

## 5.4. Resum

Els nostres estudis de l'expressió proteïca dels diferents isoenzims de la PLC demostren com en cultius primaris de neurones granulars de cerebel es detecten els isoenzims la PLC  $-\beta 1$ ,  $-\beta 2$ ,  $-\beta 3$ ,  $-\beta 4$ ,  $-\gamma 1$ ,  $-\gamma 2$ ,  $-\delta 1$  i  $-\delta 2$ , els quals presenten una massa molecular dintre el rang esperat.

Per altra banda, en condicions de repòs, la PLC- $\beta 1$  està majoritàriament associada a membrana (aproximadament el 72 %) i una estimulació curta amb Cch (de 40 s), produeix una ràpida translocació a la membrana de la quasi totalitat de l'isoenzim (> 90 %). Aquesta situació es manté almenys fins a 15 min en presència de l'agonista.



# DISCUSSIÓ

## 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

La primera part d'aquest treball ha estat plantejada per tal d'esbrinar si les diferències trobades prèviament en algunes característiques de l'activació de la PLC per diferents receptors en teixit cerebral intacte, s'observaven també en preparacions neuronals homogènies. També es volia verificar si les aquestes característiques tenien relació amb mecanismes d'activació de la PLC.

En cultius de CGC de 9 DIV, hem trobat que, quan la PLC és activada per estimulació de diversos receptors de neurotransmissors, les característiques de la resposta no són les mateixes per a tots els agonistes, tot i que es tracta d'una preparació homogènia des del punt de vista cel·lular i que tots els receptors implicats pertanyen a la superfamília dels acoblats a proteïnes G.

La primera característica analitzada ha estat l'eficàcia de cada agonista per induir l'acumulació d' $^3\text{H}$ -InsPs i de  $^3\text{H}$ CDP-DAG en presència de  $\text{Li}^+$ , dos respostes que deriven directament de la hidròlisi dels fosfoinosítids per la PLC. El  $\text{Li}^+$  en una concentració de 5-20 mM inhibeix acompetitivament dos enzims del metabolisme de l'Ins1,4,5P<sub>3</sub>: l'inositol monofosfatasa i l'inositol polifosfat 1-fosfatasa.. De resultes d'aquesta inhibició, a l'estimular la PLC en presència d'aquest ió, es trenca el cicle dels fosfoinosítids i, per tant, s'acumulen els InsPs i, com a conseqüència de la manca d'inositol, el CDP-DAG. Això permet adoptar dues estratègies a l'hora de determinar l'activitat PLC: *a)* mesurar l'acumulació dels  $^3\text{H}$ -InsPs del metabolisme de l' $^3\text{H}$ -Ins1,4,5P<sub>3</sub> amb teixits premarcats amb  $^3\text{H}$ Inositol o *b)* determinar l'acumulació del  $^3\text{H}$ CDP-DAG provinent del reciclatge de l' $^3\text{H}$ DAG, marcant prèviament el teixit amb  $^3\text{H}$ citidina. La primera metodologia està àmpliament acceptada com a un reflex directe de l'activitat de la PLC. Però l'acumulació

del [ $^3\text{H}$ ]CDP-DAG té el problema de dependre d'altres factors a part de la intensitat de l'estimulació de la PLC per receptors, com ara la concentració d'inositol lliure i les característiques del seu transport intracel·lular. Així, si la cèl·lula té elevades concentracions d'inositol lliure en estat basal, el [ $^3\text{H}$ ]CDP-DAG, enlloc d'acumular-se, s'uneix a aquest formant  $^3\text{H}$ -PtdIns.

Als cultius de CGC, l'agonista dels receptors muscarínics Cch, i els agonsites dels receptors metabotrópics del glutamat, el 1*S*,3*R*-ACPD i el Glu, en presència d'antagonistes ionotrópics, provoquen una acumulació de [ $^3\text{H}$ ]CDP-DAG amb una potència similar a la mostrada per l'acumulació dels  $^3\text{H}$ -InsPs. Aquest fet suggereix que aquestes neurones tenen només una petita reserva d'inositol lliure i que, per tant, la determinació del [ $^3\text{H}$ ]CDP-DAG acumulat és un bon reflex de l'activitat PLC. Aquesta hipòtesi estaria corroborada per dades publicades per altres autors que han observat una acumulació al llarg del temps similar pels  $^3\text{H}$ -InsPs i [ $^3\text{H}$ ]CDP-DAG (Gray et al., 1994) i han determinat l'acumulació de [ $^3\text{H}$ ]CDP-DAG a diferents concentracions extracel·lulars d'inositol (Del Río et al., 1996). A més a més, els primers han comprovat que les neurones granulars tenen una capacitat d'acumular inositol intracel·lular inferior a la d'altres cultius neuronals.

Tots els agonistes estudiats tenen la capacitat de provocar l'acumulació d' $^3\text{H}$ -InsPs, fet que també es descriu a la bibliografia pel Cch (Xu and Chuang, 1987b; Whitmam et al., 1991) pel Glu (Nicoletti et al, 1986; Wroblewski et al., 1987), per l'endotelina (Lin et al., 1990a; Chuang et al., 1991), i per la NA, HA i la 5-HT (Xu and Chuang, 1987a; Dillon-Carter and Chuang, 1989). L'eficàcia dels diferents agonistes per a acumular InsPs però, no és igual. Així, mentres el Cch, els agonistes dels mGluRs, Glu i 1*S*,3*R*-ACPD i l'ET-1 tenen una eficàcia alta d'estimulació de la PLC, essent el primer l'agonista més eficaç, la NA, HA i 5-HT, mostren una baixa eficàcia. per altra banda, cal destacar que també existeixen diferències en el perfil de l'acumulació al llarg del temps.

En contrast amb això, no es pot dir que tots els esmentats agonistes estimulin significativament l'acumulació de [ $^3\text{H}$ ]CDP-DAG en cultius primaris de neurones granulars de cerebel. Així, pel Cch, la 5-HT, el Glu i el t-ACPD es detecten nivells de [ $^3\text{H}$ ]CDP-DAG significativament superiors als que es produeixen en condicions basals, mentre que l'eficàcia de l'ET-1, NA i HA és pràcticament nul·la. Aquests resultats reafirmen, i alhora amplien, les dades publicades per Del Río et al. (1996), on no es detecta acumulació de CDP-DAG per la NA ni per la HA, però sí per la 5-HT i el Cch. Per aquest

últim agonista, hem trobat una acumulació de CDP-DAG molt superior al basal, resultat que coincideix totalment amb els descrits per Gray et al. (1994).

Si es comparen les acumulacions de  $^3\text{H}$ -InsPs i [ $^3\text{H}$ ]CDP-DAG pel Cch, la 5-HT, el Glu, el t-ACPD, l'ET-1, la NA i l'HA, i referim els resultats obtinguts al cas del Cch, s'observa com els dos primers tenen una relació de producció de [ $^3\text{H}$ ]CDP-DAG i  $^3\text{H}$ -InsPs semblant mentre que, per la resta d'agonistes la relació és molt més inferior, fet que indica que l'acumulació de [ $^3\text{H}$ ]CDP-DAG és menor a la dels  $^3\text{H}$ -InsPs. Aquesta classificació dels neurotransmissors estudiats en dos grups segons la seva habilitat d'acumular CDP-DAG vers InsPs es correlaciona perfectament amb els resultats obtinguts en miniprismes d'escorça cerebral de rata (Sarri et al., 1995). Per tant, es dona suport a la idea de que és una característica dependent del receptor i no del teixit, ja que el comportament de cada agonista es reproduceix a preparacions de teixit diferents. D'acord amb les propostes de l'esmentat treball (Sarri et al., 1995) aquestes diferències poden ser degudes a un reciclatge defectiu del DAG a CDP-DAG en el cas dels receptors de NA, HA, ET-1 i mGluRs. Donat que l'estimulació d'aquests receptors no activa la PLC en preparacions de membranes cerebrals en presència d'anàlegs. no hidrolitzables de GTP, s'ha proposat que en el teixit intacte l'activació de la PLC podria ser secundària a una entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  (Sarri et al., 1995). Conseqüentment, hem estudiat la dependència de les dues acumulacions,  $^3\text{H}$ -InsPs i [ $^3\text{H}$ ]CDP-DAG, al  $\text{Ca}^{2+}$  extracel·lular.

Per altra banda, la presència al tampó de reacció d'una concentració d'EGTA que anul·li casi completament el  $\text{Ca}^{2+}$  extracel·lular d'aquest medi suposa una completa inhibició de l'acumulació d'InsPs induïda pels diferents agonistes, fet que reflecteix la necessitat d'uns nivells mínims en la concentració de  $\text{Ca}^{2+}$ , per tal de que actui i s'activi la PLC, d'acord amb conclusions d'altres autors (Del Río et al., 1994). Ara bé, quan en el tampó de reacció tenim una concentració de  $\text{Ca}^{2+}$  inferior a 1  $\mu\text{M}$  però no nul·la (tampó nominalment lliure de  $\text{Ca}^{2+}$ , pero sense EGTA), la PLC pot ser estimulada per Cch, Glu i ET-1, tot i que la magnitud de la resposta és menor a la enregistrada quan el tampó de reacció té  $\text{CaCl}_2$  1,3 mM. La sensibilitat al  $\text{Ca}^{2+}$  extracel·lular en l'acumulació dels  $^3\text{H}$ -InsPs i en la del [ $^3\text{H}$ ]CDP-DAG és molt similar pel Glu però no pel Cch. Així, aquest últim agonista presenta una acumulació d' $^3\text{H}$ -InsPs més sensible al  $\text{Ca}^{2+}$  extracel·lular, almenys en condicions d'esimtimulació prolongada.

La regulació de l'activitat PLC pel  $\text{Ca}^{2+}$  extracel·lular en CGC, però, no sembla ser deguda a un possible influx de  $\text{Ca}^{2+}$  induït per activació dels receptors de membrana i el

seu conseqüent increment de la concentració de  $[Ca^{2+}]_c$ , ja que una preincubació de les cèl·lules amb inhibidors de canals de  $Ca^{2+}$  inespecífics o dels canals de  $Ca^{2+}$  depenents de voltatge de l'entrada de  $Ca^{2+}$ , no efecta a l'estimulació de PLC per Cch ni Glu. En aquesta línia estarien les dades publicades per del Ríó et al., (1994) que mostren com en cultius de CGC madurs, l'estimulació de la PLC per Cch no és sensible a increments en la  $[Ca^{2+}]_c$  induïts pel ionòfor ionomicina, però sí que ho és a increments en la  $[Ca^{2+}]_c$  quan es produeix sota condicions despolaritzants. Així, doncs, cal considerar la possibilitat de que el  $Ca^{2+}$  extracel·lular reguli l'activitat PLC a través de mecanismes més complexos i atípics, com ara la modulació dels nivells de  $Ca^{2+}$  dels reservoris intracel·lulars o la possibilitat de que el  $Ca^{2+}$ , a més de l'agonista, activi directament el receptor modulant-ne la seva activitat, tal i com ha estat proposat pels mGluR1 $\alpha$  en línies cel·lulars (Kubo et al., 1998; Saunders et al., 1998). Això, però, es discuteix més endavant, en relació en els mecanismes de regulació de la PLC activada per Cch i Glu.

Per altra banda, aquesta modulació del  $Ca^{2+}$  en la producció de  $[^3H]$ CDP-DAG i  $^3H$ -InsPs en cultius primaris de neurones granulars no es correspon amb la descrita per miniprismes d'escorça cerebral (Claro et al., 1993a), en els quals la sensibilitat al  $Ca^{2+}$  extracel·lular dels dos senyals és similar en el cas dels receptors muscarínics. Per tant, es pot dir que el  $Ca^{2+}$  influeix en les acumulacions de  $^3H$ -InsPs i  $[^3H]$ CDP-DAG per activació de la PLC per un receptor de manera diferent segons el teixit on es produeixi aquesta resposta. Aquesta observació no és sorprenent ja que els diferents tipus cel·lulars poden expressar diferents elements de la transducció del senyal, com ara diferents isoenzims de la PLC amb diferent sensibilitat al  $Ca^{2+}$ , diferents proteïnes G o factors citosòlics no identificats que regulin aquesta activitat o diferents elements de l'homeostasi de  $Ca^{2+}$ . En aquest context, i com s'ha discutit prèviament (Claro et al., 93a; Sarri et al., 1995), si diferents receptors activen diferents isoenzims de la PLC, aquests, a més de mostrar possibles diferències de sensibilitat al  $Ca^{2+}$ , poden tenir diferent localització a la cèl·lula i generar DAG en llocs diferents amb diferent eficàcia en la formació de CDP-DAG.

La segona característica estudiada ha estat la ruta preferent del metabolisme de l' $[^3H]$ Ins1,4,5P<sub>3</sub> associada a l'estimulació de la PLC pels diferents agonistes. Així, s'ha determinat l'acumulació dels  $^3H$ -InsPs individuals separats per HPLC. En condicions basals, els nivells d' $[^3H]$ Ins1P són superiors als de  $[^3H]$ Ins4P+ $[^3H]$ Ins1,4P<sub>2</sub>; però després

d'estimular les cèl·lules durant 30 minuts amb Cch i Glu aquesta relació s'inverteix, ja que l'acumulació de l' $[^3\text{H}]\text{Ins1P}$  no incrementa molt, però sí que es registren grans augments en l'acumulació dels altres dos intermediaris (de 10 a 12 vegades pel Cch i d'unes 8 vegades pel Glu). Estimulacions amb Cch però de 10 min resulten en increments petits en els nivells d'Ins1P i acumulacions d'Ins4P+Ins1,4P<sub>2</sub> de 8 a 10 vegades superiors a les basals. Per altra banda, els agonistes que tenen menor eficàcia en estimular la PLC, com ara l'ET-1, la 5-HT, la NA i el 1S,3R-ACPD, no potencien molt la via de desfosforilació i, per tant, l'acumulació de l' $[^3\text{H}]\text{Ins1P}$  continua essent predominant. El conjunt de totes aquestes dades, per tant, permet afirmar que el metabolisme de l' $[^3\text{H}]\text{Ins1,4,5P}_3$  format per estimulació de la PLC per Cch i Glu, però no pels altres agonistes, es produeix majoritàriament per desfosforilació i és dependent del temps. Resultats semblants han estat descrits anteriorment en estimulacions amb Cch durant 1-10 minuts (Gray et al., 1995). Aquests autors apunten la hipòtesi que, en l'estimulació del Cch, i per analogia amb la del Glu, inicialment s'augmentaria enormement el metabolisme de l'Ins1,4,5P<sub>3</sub> iniciat per desfosforilació i que més tard es desencadenaria una lleugera potenciació de la via de fosforilació, però sense que es poguessin registrar nivells d'acumulació dels intermediaris d'aquesta ruta semblants als de la desfosforilació.

Per altra banda, s'observa que el  $\text{Ca}^{2+}$  modula ambdues vies d'aquest metabolisme, encara que no ben bé igual. La via de fosforilació és inhibida per omissió del  $\text{Ca}^{2+}$  extracel·lular d'una manera semblant en condicions basals i per estimulació amb tots els agonistes, mentre que la via de desfosforilació presenta diferent sensibilitat al  $\text{Ca}^{2+}$  depenent del neurotransmissor, essent de nou el Cch el que mostra una major inhibició al baixar el  $\text{Ca}^{2+}$  extracel·lular. En línies generals, però, la disminució és superior per la via de desfosforilació que per la de fosforilació, i conseqüentment el log ((Ins1,4P<sub>2</sub>+Ins4P)/Ins1P) es fa més petit per a tots els agonistes.

Les dades dels estudis de la determinació dels InsPs globals acumulats per activació de la PLC i les del perfil dels diferents InsPs individuals de resultes de la mateixa estimulació, tan a altes com baixes concentracions de  $\text{Ca}^{2+}$  extracel·lular, mostren com hi ha una bona correlació entre les acumulacions d'Ins4P+Ins1,4P<sub>2</sub> i l'eficàcia d'estimulació associada a cada agonista, mentre que els nivells d'Ins 1P no reflexen aquesta estimulació. Aquests resultats estan d'acord amb dades prèvies de la literatura que suggereixen que en CGC, el metabolisme de l'Ins1,4,5P<sub>3</sub> estimulat per receptors dóna lloc preferencialment a l'Ins4P (Hynie et al., 1989).

Calculant el  $\log((\text{Ins}4\text{P}+\text{Ins}1,4\text{P}_2)/\text{Ins}1\text{P})$  i comparant els resultats amb els obtinguts en miniprismes d'escorça cerebral (Sarri et al., 1995) s'observa una absoluta desavinença. En els miniprismes, el Cch -així com la 5-HT- acumula més intermediaris de la ruta de fosforilació i la NA, HA, ET-1 i el t-ACPD més els de la desfosforilació. A més a més, el  $\log((\text{Ins}1,4\text{P}_2+\text{Ins}4\text{P})/\text{Ins}1\text{P})$  dels segons depèn del  $\text{Ca}^{2+}$  extracel·lular fet que no succeix pel Cch ni 5-HT. Una possible explicació d'aquestes diferències entre les dues preparacions biològiques caldria buscar-la en els nivells baixos d'expressió de l'mRNA que codifica per la  $\text{Ins}1,4,5\text{P}_3$  3-quinasa, responsable de la fosforilació de l' $\text{Ins}1,4,5\text{P}_3$  a  $\text{Ins}1,3,4,5\text{P}_4$ , en neurones granulars (Mailleux et al., 1991). Altres estudis demostren com l'activitat de la  $\text{Ins}1,4,5\text{P}_3$  3-quinasa al cervell de rata és molt baixa al naixement i va incrementant fins a aconseguir nivells d'activitat elevats en l'edat adulta (Heacock et al., 1990; Gray et al., 1995). Per tant, s'evidencia que la ruta preferent del metabolisme de l' $\text{Ins}1,4,5\text{P}_3$  és una característica molt dependent del teixit, així com també de l'estadi de desenvolupament de l'animal, ja que aquests factors determinen l'expressió i l'activitat dels enzims implicats en aquest metabolisme. Les nostres dades, a més, indiquen que, almenys en neurones granulars de cerebel, la ruta preferent del metabolisme de l' $\text{Ins}1,4,5\text{P}_3$  no sembla un índex que tingui relació amb el mecanisme d'activació de la PLC.

Pel que fa referència a la sensibilitat al  $\text{Ca}^{2+}$  extracel·lular, desconeixem els mecanismes pels quals el  $\text{Ca}^{2+}$  modularia el metabolisme de l' $\text{Ins}1,4,5\text{P}_3$ . Si es té en compte que la  $\text{Ins}1,4,5\text{P}_3$ -3 quinasa és un enzim modulats per calci/calmodulina, però no la inositol polifosfat 5 fosfatasa, s'hauria d'esperar que la disminució de la concentració d'aquest ió inhibís la fosforilació de l' $\text{Ins}1,4,5\text{P}_3$  (i, per tant, l'acumulació de l' $\text{Ins}1\text{P}$ ) potenciant la seva desfosforilació (i l'acumulació de l' $\text{Ins}4\text{P}$  i  $\text{Ins}1,4\text{P}_2$ ). Els resultats mostren com, en neurones granulars i en miniprismes d'escorça cerebral, passa justament el contrari, fet que indica que poden haver-hi altres mecanismes d'intervenció del calci encara no caracteritzats. De totes maneres, en CGC, com que existeix una bona relació entre l'acumulació de l' $\text{Ins}4\text{P}$  i  $\text{Ins}1,4\text{P}_2$  i l'activitat PLC, es pot considerar que la disminució de l'acumulació d'aquest intermediaris per absència de  $\text{Ca}^{2+}$  és degut a una disminució en l'estimulació de la PLC.

Finalment, cal tenir present que l'acumulació d'aquests InsPs podria també ser deguda a la hidròlisi del PtdIns que dona  $\text{Ins}1\text{P}$ , i a la del PtdIns4P que origina  $\text{Ins}1,4\text{P}_2$ . De totes maneres, en neurones granulars i en altres cèl·lules intactes, es considera molt improbable que la PLC actuï sobre els PtdIns (Whitham et al., 1991; Claro et al., 1993b;

Gray et al., 1995) tot i que el fet de que no hagi estat inequívocament demostrat fa que no es pugui excloure del tot aquesta possibilitat.

Per investigar si les diferents característiques de l'activació de la PLC es correlacionen amb diferents mecanismes d'activació hem fet un estudi inicial determinant la capacitat de diferents receptors per estimular la PLC via proteïna G, en membranes de neurones granulars. Els agonistes escollits per a aquest estudi han estat el Cch, el Glu i l'ET-1, ja que són els que tenen més eficàcia en acumular  $^3\text{H}$ -InsPs i alhora presenten característiques de la resposta diferents, tant en l'habilitat d'acumular CDP-DAG vers InsPs com en el metabolisme de l'Ins1,4,5P<sub>3</sub>. Els resultats obtinguts no ens permeten trobar diferències significatives en l'estimulació induïda pels tres agonistes, per contra del que succeeix en cèl·lules senceres, ja que tot els agonistes potencien l'estimulació de la PLC per GTP $\gamma$ S amb la mateixa eficàcia. Aquests resultats també contrasten amb els trobats en membranes d'escorça cerebral, ja que en aquestes preparacions es detecta estimulació de la PLC pel Cch i la 5-HT amb GTP $\gamma$ S, però no pels altres agonistes, com ara l'ET-1 o el 1S,3R-ACPD (Sarri et al., 1995). És a dir, la capacitat de determinats agonistes com ara l'endotelina o els mGluRs, per activar la PLC directament en membranes depèn de la preparació biològica de la que procedeixen les cèl·lules. En altres paraules, els mecanismes d'activació de la PLC per un receptor poden variar amb el teixit.

Aquests resultats mostren com, en CGC, els receptors muscarínics, els mGluRs i els receptors de l'ET estimulen la PLC via proteïnes G, i que la diferent eficàcia d'estimulació de la PLC en cèl·lules per part d'aquests receptors, i possiblement les característiques de la resposta que desencadenen depenen de la integritat cel·lular. És a dir, estem davant una evidència clara que els mGluRs i sobretot els receptors muscarínics activen la PLC per acoblament directe a través d'una proteïna G però també a través d'un altre mecanisme que podria ser secundari. Es poden considerar moltes hipòtesis sobre la naturalesa d'aquest mecanisme. Considerant que el Ca<sup>2+</sup> a concentracions de l'ordre de micromolar és capaç d'activar la PLC en membranes i homogenats cel·lulars, fet que demostra que les CGC expressen isoenzims de la PLC sensibles a aquest ió; es podria pensar amb una potenciació de l'estimulació de la PLC per Cch i Glu deguda a un augment de la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>c</sub> com a conseqüència d'un influx de Ca<sup>2+</sup>. De totes maneres, aquest procés sembla poc probable ja que, tal i com s'ha dit abans, diferents inhibidors de l'entrada de Ca<sup>2+</sup> no efecten aquestes respostes. Per altra banda, el fet de que l'eficàcia dels agonistes dels receptors muscarínics

sigui regulada merament per factors citoplasmàtics, sembla poc probable car l'estimulació de la PLC per Cch en homogenats és molt semblant a l'observada en membranes en les mateixes condicions experimentals, tot i que s'ha descrit que diferents antagonistes dels subtipus  $m_2$  i  $m_3$  tenen una major selectivitat en cèl·lules intactes que en membranes (Saunders et al., 1995). Finalment dir que també es pot excloure l'heterogeneïtat cel·lular dels cultius com a responsable de les diferències entre receptors, ja que les estimulacions de la PLC per Cch i Glu en astròcits de cerebel, cèl·lules més nombroses als cultius després de les neurones granulars però inferiors al 5 % del total, són molt petites.

Es conclou per tant, que les neurones granulars de cerebel tenen mecanismes complexos que permeten regular l'activació de la PLC per diferents receptors. L'estudi d'aquests processos de senyalització cel·lular ha estat abordat en aquest treball i es discuteix a continuació.



## 2. Els receptors muscarínics i mGluRs responsables de l'activació de la PLC i els senyals de $Ca^{2+}$ en cultius primaris de CGC

Els cultius primaris de CGC expressen molts receptors de neurotransmissors acoblats a la PLC, tal i com està publicat a la bibliografia i ho demostren les nostres dades, anteriorment presentades i discutides. L'estudi dels mecanismes d'activació i regulació per receptors GPCRs, els muscarínics de l'acetilcolina i els mGluRs, ha estat un dels principals objectius d'aquest treball. Tanmateix, al tractar-se d'un cultiu primari, cal una prèvia caracterització dels receptors implicats en aquestes respostes.

Està àmpliament demostrat i acceptat que, en cultius de CGC de rata, el receptor m3 és el responsable de l'estimulació de la PLC i els senyals de  $Ca^{2+}$  induïts pels diferents agonistes dels receptors muscarínics (Whitham et al., 1991). Ara bé, en cultius primaris de CGC de cerebel de ratolí s'ha descrit una gran densitat de receptors muscarínics de l'acetilcolina, els quals poden activar la PLC de forma secundària a l'entrada de  $Ca^{2+}$  (Didier et al., 1995). Nosaltres, però, descartem que l'activació de la PLC per Cch en els nostres cultius de CGC de cerebel de rata, sigui deguda a ambdós tipus de receptors ja que l'addició d'atropina, un antagonista dels receptors metabotòpics, inhibeix totalment l'acumulació d'InsPs, tal i com varen descriure per primera vegada Xu i Chuang, (1987b). A més a més, també hem despreciat la possibilitat que la gran estimulació produïda pel Cch en neurones granulars de cerebel sigui deguda a una activació addicional per alliberament de Glu, ja que antagonistes dels mGluRs i iGluRs no tenen efecte sobre la resposta del Cch.

Eixisteixen dades de la bibliografia sobre la identitat molecular del mGluR del grup I responsable de l'activació de la PLC i els senyals de  $Ca^{2+}$ . Aquestes, però, són contradictòries i reflecteixen una variabilitat de l'expressió i funcionalitat d'aquests receptors en funció de les condicions i edat del cultiu. Per tant, hem estudiat l'expressió d'aquests mGluRs del grup I en CGC durant el desenvolupament del cultiu i hem determinat la seva participació en l'estimulació de la PLC i en la mobilització de  $Ca^{2+}$  per Glu als 9 DIV. Utilitzant anticossos policlonals hem demostrat com els receptors mGluR1 $\alpha$  i mGluR5 s'expressen en aquestes cèl·lules. L'expressió del mGluR1 $\alpha$  es manté constant en les diferents DIV del cultiu, mentre que els nivells de proteïna corresponents al mGluR5 incrementen amb el temps en cultiu. La possibilitat de que l'increment d'expressió d'aquest últim receptor sigui deguda en part a una proliferació de

cèl·lules glials en el cultiu no pot ésser excluida, i més si es considera que els astròcits expressen predominantment el mGluR5 (Balázs et al., 1997; Condorelli et al., 1997).

Patrons d'expressió diferents han estat descrits per altres autors que han estudiat tan els nivells dels mARN com la proteïna d'aquests receptors. Així, Aronica et al. (1993) han mostrat com els nivells dels mARN del mGluR1 presenta un pic als 4 DIV seguit d'una progressiva disminució, mentre que Prézeau et al. (1994) han detectat mARN corresponents al mGluR1 però no al mGluR5 als 10 DIV. Per altra banda, Copani et al. (1998) han descrit una expressió proteïca del mGluR5 amb un màxim als 4 DIV i només han detectat mGluR1 a partir dels 8 DIV, en cultius de CGC crescuts amb condicions despolaritzants (KCl 25 mM). Els nostres resultats, però, estan d'acord parcialment amb Santi et al. (1994), els quals mostren uns nivells de mARN de mGluR1 $\alpha$  relativament constants al llarg del desenvolupament del culiu, amb l'excepció dels 9 DIV, i nivells de mARN de mGluR5 creixent amb el temps *in vitro* i atribuïts a un increment en una sub població de cèl·lules de Golgi contaminants.

Davant el fet de que els culitus de CGC expressen mGluR1 $\alpha$  i mGluR5, hem realitzat una caracterització farmacològica de l'estimulació de la PLC i el senyal de Ca<sup>2+</sup> per saber el grau d'implicació d'ambdós receptors en aquestes respostes als 9 DIV. Els nostres resultats mostren com l'ordre dels agonistes segons la seva potència en activar la PLC (Quis>DHPG>1S,3R-ACPD>Glu) és igual al descrit en cultius de CGC als 4 DIV per alguns d'aquests agonistes (Toms et al., 1995) i correspon a la descita per les respostes mitjançades pels mGluRs del grup I en varies preparacions de teixit neriviós (Conn i Pin, 1997; Sacaan et al., 1998; Schoepp et al., 1999; Servitja et al., 1999) i pel mGluR1 $\alpha$  en línies cel·lulars (Aramori i Nakanishi, 1992). Per altra banda, l'acumulació d'<sup>3</sup>H-InsPs induïda pel Glu a una conentració pròxima a la seva EC<sub>50</sub> (100  $\mu$ M) és inhibida pels compostos MCPG i AIDA, que presenten un antagonisme preferencial sobre les accions del Glu mitjançades pel mGluR1 (Brabet et al., 1995; Moroni et al., 1997), i el CPCCOEt, antagonista no competitiu selectiu pel mGluR1 (Hermans et al., 1998b), amb unes IC<sub>50</sub> que suggereixen la participació única del mGluR1 (Schoepp et al., 1999). Alhora, l'agonista selectiu pel mGluR5 CHPG (Doherty et al., 1997) és incapaç d'estimular la PLC mentre que els recentment sintetitzats antanogistes selectius del mGluR5, MPEP i SIB-1893 (Gasparini et al., 1999; Varney et al., 1999) no poden inhibir la resposta del Glu 100  $\mu$ M a una IC<sub>50</sub> específica pel mGluR5. Totes aquestes dades, per tant, mostren com en culius de CGC als 9 DIV el mGluR1 però no el mGluR5 estimula la PLC.

Els estudis farmacològics de la resposta de  $\text{Ca}^{2+}$  induïda per receptors mGluRs en cultius de CGC predespolaritzats permet arribar a la mateixa conclusió, ja que tots els agonistes menys el CHPG són capaços d'incrementar la  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  en un determinat percentatge de cèl·lules prespolaritzades i la resposta del Glu en aquestes condicions és inhibida pel CPCCOEt. A més a més, el senyal de  $\text{Ca}^{2+}$  en forma d'un únic pic induït pel Glu, Quis, DHPG i 1S,3R-ACPD es correspon més amb els increments de  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  descrits per línies cel·lulars que expressen el mGluR1 que amb els que tenen lloc en cèl·lules que expressen el mGluR5 (Kawabata et al., 1998).

El fet de que el mGluR5 no participi en les dues respostes mitjançades pel Glu acabades d'esmentar indica que aquest receptor pot estar present en una forma inactiva. Això podria explicar-se per processos de desensibilització sobre el mGluR5 però no sobre el mGluR1, com a resultat de la presència de Glu endogen, el qual és alliberat per les CGC en les condicions en què són cultivades (Gallo et al., 1987). Aquesta hipòtesi, per tant, consideraria que la desensibilització d'ambdós subtipus de mGluRs pogués donar-se a través de mecanismes diferents per cada cas. Així, s'ha descrit que el receptor mGluR5 no s'acopla amb la mateixa eficàcia a la PLC que el receptor mGluR1 (Casabona et al., 1997) i consegüentment, podria ser també que la desensibilització d'aquest acoblament fos diferent. Alhora, els diferents patrons dels increments de  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  induïts per cada un dels dos receptors en sistemes d'expressió heteròloga (Kuwabata et al., 1998) han estat atribuïts a una regulació de la PKC sobre la resposta del mGluR5 però no sobre la del mGluR1 (Nakanishi et al., 1998), fet que evidencia una diferent regulació dels dos receptors.

### 3. Mecanismes d'activació i regulació de la PLC estimulada per receptors m3 i mGluR1

#### 3.1. Paper del $\text{Ca}^{2+}$ extracel·lular i del $\text{Ca}^{2+}$ citosòlic

Per estudiar els mecanismes d'activació de la PLC per receptors muscarínics de l'acetilcolina i metabotròpics del glutamat hem determinat l'activitat d'aquest sistema efector mesurant l'acumulació dels  $^3\text{H}$ -InsPs després d'estimulacions d'1 min en presència de LiCl 10 mM. L'activitat PLC també pot ser quantificada mesurant l'Ins1,4,5P<sub>3</sub> format, però, en cultius primaris de CGC l'estimulació d'aquest sistema efector per receptors muscarínics indueix una acumulació transitòria caracteritzada per un pic inicial als 10 s després de l'addició de l'agonista caracteritzat per ser unes tres vegades superior al basal i disminuir progressivament fins arribar altra vegada aproximadament als nivells basals al minut d'estimulació (Whithman et al., 1991; Simpson et al., 1993; del Río et al., 1998). Aquesta resposta no pot ser modificada per la presència de Li<sup>+</sup> almenys fins 5 minuts després de grans estimulacions de la PLC (del Río et al., 1998). Per contra, tal i com hem comentat repetitivament, l'acumulació dels  $^3\text{H}$ -InsPs sí que pot ser notablement incrementada per la presència de LiCl, i la resposta resultant, fins i tot a 1 min d'estimulació, és suficientment gran per permetre estudis quantitius.

Les dades discutides en el primer apartat mostren com el  $\text{Ca}^{2+}$  extracel·lular regula l'estimulació de la PLC per Cch i Glu de manera complexa. Per tal d'explorar aquesta dependència del  $\text{Ca}^{2+}$  primerament hem determinat els efectes de canvis en la concentració de  $\text{Ca}^{2+}$  extracel·lular previs a l'estimulació. Aix , l'omissió i readdició de  $\text{Ca}^{2+}$  extracel·lular resulta en canvis graduals en l'activació de la PLC per Cch, però implica una ràpida pèrdua i recuperació, respectivament, de la resposta induïda pels mGluR1. Per tant, aquests resultats mostren com l'activació de la PLC per Cch  s dependent de la presència de  $\text{Ca}^{2+}$  extracel·lular durant un temps abans de l'aplicació de l'agonista mentre que la mateixa resposta induïda pels mGluR1 necessita del  $\text{Ca}^{2+}$  extracel·lular durant l'estimulació. Recentment s'ha demostrat que alguns mGluRs, entre ells el mGluR1  són activats no només pel Glu però també per  $\text{Ca}^{2+}$  extracel·lular (Saunders et al., 1998; Kubo et al., 1998). Es tracta d'una regulació directe del  $\text{Ca}^{2+}$  sobre el receptor i no d'una modulació de l'activitat PLC per entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  i ja s'han suggerit diferents llocs d'unió del mGluR1  al  $\text{Ca}^{2+}$  extracel·lular, tan a l'extrem N-terminal (Brown et al., 1993; Kubo et

al., 1998) com fora d'aquest domini (Pshenichkin et al., 1999). Per tant, aquesta necessària presència de  $\text{Ca}^{2+}$  extracel·lular en l'activació de la PLC pel mGluR1 juntament amb el fet de que en aquestes condicions no es produeix una entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  en la gran majoria de CGC, constitueix una aportació addicional a aquesta innovadora teoria del  $\text{Ca}^{2+}$  com a coactivador dels mGluRs i que ha estat implicada en la mort neuronal en processos d'isquèmia, hipoglicèmia i anòxia (Saunders et al., 1998).

Les aproximacions experimentals anteriors també impliquen canvis petits però significants en la  $[\text{Ca}^{2+}]_c$ , per tant, es podria considerar que l'activació de la PLC per Cch i Glu poden ser modulades per petits canvis en la  $[\text{Ca}^{2+}]_c$ . Aquesta conclusió ha estat suggerida anteriorment en estudis amb els neuroblastomes SH-SY5Y, pels quals l'activació de la PLC per receptors muscarínics pot ser augmentada per increments en la  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  resultat de la mobilització de  $\text{Ca}^{2+}$  intracel·lular induïda per l'agonista (Wojcekiwicz et al., 1994; Willars i Nahorski, 1995b). Un mecanisme similar també va estar proposat per del Río et al. (1994), ja que van trobar una bona correlació entre petits increments en la  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  i la magnitud de l'estimulació de la PLC per Cch en CGC despolaritzades -quan el Cch es coaplica amb KCl 20 mM- tot i que els mateixos autors reconeixen que aquesta correlació no es manté quan els increments de la  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  són deguts a un ionòfor. Els nostres resultats, però, mostren una bona correlació entre canvis en els nivells de  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  i l'estimulació de la PLC per Glu però no per Cch, ja que al treure el  $\text{Ca}^{2+}$  extracel·lular es produeix una lleugera i progressiva disminució dels nivells de  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  durant els 3 posteriors minuts però mantenint-se constant després, i una addició de  $\text{Ca}^{2+}$  després de 30 min en absència de  $\text{Ca}^{2+}$  extracel·lular resulta en una ràpida recuperació dels nivells de  $\text{Ca}^{2+}$  citosòlic inicials. Aquestes dades suggereixen que canvis en la  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  regulen l'estimulació del PLC per Glu però no per Cch en cultius de CGC madurs.

En resum podem concloure que l'activació de la PLC per mGluR1 és dependent de la presència de  $\text{Ca}^{2+}$  extracel·lular durant l'activació, fet que podria ser degut a la participació d'aquest ió com a coagonista del receptor, i regulada per increments de la  $[\text{Ca}^{2+}]_c$ , factors que no tenen cap influència en l'activació de la PLC per receptors muscarínics. Tot i així, aquesta última resposta no es pot atribuir únicament a l'acoblament del receptor a proteïnes G.

### 3.2. Els reservoris intracel·lulars de $\text{Ca}^{2+}$ i l'activació de la PLC per receptors m3 i mGluR1

Hem estudiat la hipòtesi de que els reservoris intracel·lulars de  $\text{Ca}^{2+}$  regulin l'estimulació de la PLC per Cch i Glu. davant el fet que la preincubació de les cèl·lules amb tampó KH sense  $\text{Ca}^{2+}$  també resulta en una disminució dels nivells de  $\text{Ca}^{2+}$  dels reservoris intracel·lulars, tal i com ho demostren les nostres dades amb ionomicina i com ha estat suggerit per Fohrman et al. (1993). Les CGC en estat de repòs, a l'igual que les neurones d'hipocamp, tenen molt poc  $\text{Ca}^{2+}$  en els reservoris intracel·lulars de  $\text{Ca}^{2+}$  segons, també, els nostres experiments amb ionomicina i el que altres autors (Irving i Collingridge, 1998) Per tant, per analitzar com participen els reservoris intracel·lulars en l'estimulació de la PLC per receptors muscarínics i metabotròpics hem determinat aquesta resposta sota diferents condicions en CGC a les quals s'havia omplert prèviament els reservoris intracel·lulars de  $\text{Ca}^{2+}$ . L'estratègia experimental que hem portat a terme ha estat despolaritzar les cèl·lules amb KCl 40 mM abans de la seva estimulació. L'aplicació de ionomicina després d'aquest tractament permet assegurar que s'assoleixen nivells de  $\text{Ca}^{2+}$  superiors dins dels reservoris, tal i com ja havia estat suggerit per altres autors (Murphy i Miller, 1989; Irving et al., 1992a).

L'ompliment dels reservoris intracel·lulars de  $\text{Ca}^{2+}$  és un requisit per observar senyals de  $\text{Ca}^{2+}$  induïdes per Cch i Glu en la majoria de CGC cultivades a les nostres condicions. El senyal de  $\text{Ca}^{2+}$  que s'observa a l'estimular amb Cch les CGC predespolaritzades presenta les mateixes característiques temporals (increment ràpid en forma de pic) i espacials (simultani a tota la neurona) que el que és induït per Glu. Tot i així, la primera resposta és independent del  $\text{Ca}^{2+}$  extracel·lular i molt homogènia entre CGC d'un mateix cultiu i CGC de diferents cultius, mentre que la resposta induïda pels receptors mGluR1 es veu reduïda per ommissió del  $\text{Ca}^{2+}$  extracel·lular durant l'estimulació i és més heterogènia entre les diferents CGC. Considerant que l'expressió del mGluR1 -responsable de l'estimulació de la PLC i d'aquesta resposta de  $\text{Ca}^{2+}$  en CGC- es manté constant durant el temps *in vitro* del cultiu, però que alhora s'ha descrit que l'activitat PLC és màxima als 4 DIV, es podria relacionar el nombre de cèl·lules en repòs que responen, tan activant la PLC com induïnt senyals de  $\text{Ca}^{2+}$ , amb el nombre de receptors mGluR1 funcionalment actius a la membrana cel·lular de les CGC. En aquest sentit, s'ha trobat que el percentatge de cèl·lules CHO transfectades amb mGluR1 $\alpha$  que responen a Quis és funció de l'expressió del receptor

induïda per pretractament amb IPTG (Hermans et al, 1998a).

Per tant, es dedueix que ambdós receptors tenen la capacitat de mobilitzar  $\text{Ca}^{2+}$  intracel·lular quan els reservoris intracel·lulars estan suficientment plens per donar-se aquest procés, però els receptors metabotrópics, a més, poden induir entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  xtracel·lular simultània a aquest procés, tal i com també s'ha observat pels receptors muscarínics en cultius primaris de neurones d'hipocamp (Irving i Collingridge, 1998). Les nostres dades sobre el senyal de  $\text{Ca}^{2+}$  induït pels receptors muscarínics en CGC estan d'acord amb les publicades per Fohman et al. (1993), però discrepen amb les d'altres autors que descriuen la capacitat de mobilitzar  $\text{Ca}^{2+}$  per part d'aquests receptors sense haver d'omplir els reservoris intracel·lulars prèviament (Courtney i Nicholls 1992; Irving et al., 1992a; Simpson et al., 1996). L'explicació més lògica per aquestes desavienències podrien trobar-se en les diferents condicions del cultiu de les CGC o en les diferents aproximacions experimentals per la mesura de la  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  que podrien efectar els nivells de  $\text{Ca}^{2+}$  dels reservoris intracel·lulars. Així, recentment s'ha descrit que en cèl·lules PC12 i en neurones d'hipocamp en cultiu l'estat d'ompliment dels reservoris intracel·lulars de  $\text{Ca}^{2+}$  pot augmentar la freqüència dels senyals elementals d'alliberació intracel·lular de  $\text{Ca}^{2+}$  i conseqüentment induir respostes globals (Koizumi et al., 1999). Per altra banda, resultats diferents sobre l'habilitat dels receptors mGluRs en mobilitzar  $\text{Ca}^{2+}$  intracel·lular també han tingut lloc. En aquest cas, però, estan relacionats amb l'edat de cultiu ja que increments en la  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  en cèl·lules en repòs s'han observat en culius de CGC de 3-6 DIV (Courtney i Nicholls, 1990; Pizzi et al., 1996; Simpson et al., 1996) però només minoritàriament en cultius madurs de 7-9 DIV (Irving et al., 1992a,b; del Río et al., 1999).

En CGC predespolaritzades, l'activació de la PLC per Glu és aproximadament el 60 % més gran que en cèl·lules en repòs. Aquesta resposta és dependent de la presència de  $\text{Ca}^{2+}$  extracel·lular durant l'estimulació ja que en la seva absència disminueix aproximadament el 37 %. Hi ha per tant, una perfecte correlació entre el senyal de  $\text{Ca}^{2+}$  i l'activació de la PLC pels mGluR1, que es veu reforçada pel fet que un pretractament de les cèl·lules amb el quelant de  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmàtic i permeable a la membrana BAPTA/AM anul·la completament la primera resposta i disminueix la segona fins a una magnitud equivalent a la que s'enregistra en neurones granulars no predespolaritzades.

Cal fer esment abans de tot, que diferents pretractaments amb BAPTA/AM de les CGC en repòs no modifiquen els nivells de  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  basals, l'activitat PLC basal, l'estimulació de la PLC per Glu i Cch en condicions de repòs, ni impedeixen l'ompliment

de  $\text{Ca}^{2+}$  dels reservoris intracel·lulars, tot i que si que es redueixen els increments de la  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  induïts per la despolarització cel·lular amb KCl 40 mM i lògicament també es disminueix l'activació de la PLC deguda als augments de  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  per aplicació de KCl. Es dedueix, conseqüentment que el BAPTA/AM, no interfereix en l'estat cel·lular en repòs ni impedeix l'ompliment dels reservoris de  $\text{Ca}^{2+}$ .

Les dades anteriors, per tant, tornen a subratllar el fet de que la  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  regula l'estimulació de la PLC per Glu, però a més permeten concloure que el  $\text{Ca}^{2+}$  luminal no participa en aquesta resposta a no ser que sigui alliberat al citosol cel·lular. Alguns autors han proposat que aquest alliberament de  $\text{Ca}^{2+}$  dels reservoris intracel·lulars per part dels mGluR1s en CGC es realitza a través dels RyR i de manera independent de la formació d'Ins1,4,5P<sub>3</sub> (del Río et al., 1999), i altres autors han suggerit que, en CGC de ratolí, els mGluRs faciliten un acoplament independent de la PLC entre els RyR i canals depenents de voltatge de tipus L activats degut a condicions semidespolaritzants (Chavis et al., 1996). Es tractaria d'un mecanisme similar al que té lloc en la contracció de cèl·lules musculars (Rios i Brum, 1987; Nakai et al., 1996) i que sembla que també tindria lloc a altres neurones com les del gangli dorsal (Crawford et al., 1997). En aquest context nosaltres aportem dades que mostren com la rianodina inhibeix la potenciació de l'estimulació de la PLC per mGluR1 deguda a l'increment de la  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  que té lloc en CGC predespolaritzades. Es confirma per tant, que les RyR estan implicats en la transducció de senyals intracel·lulars induïts pels mGluR1. Per altra banda, també s'ha mostrat com en CGC l'activació de la PLC però no el senyal de  $\text{Ca}^{2+}$  induït per agonistes dels mGluRs és sensible a la toxina pertussis (del Río et al., 1999). Considerant que les nostres dades demostren que ambdues respostes estan mitjançades pel mateix receptor, el mGluR1, es pot suggerir l'activació d'aquest receptor implica el seu acoblament a diferents proteïnes G responsables d'induir l'activació de la PLC i senyals de  $\text{Ca}^{2+}$  per vies separades. L'habilitat dels receptors mGluR1 $\alpha$  a acoblar-se a proteïnes G sensibles a la toxina pertussis (Gi/o) i alhora a proteïnes insensibles a aquesta toxina ja ha estat hipotitzada anteriorment en cèl·lules de ronyó de hamster jove (BHK) transfectades amb aquest receptor (Carruthers et al., 1997).

Per altra banda, sota aquestes condicions per les quals els dipòsits intracel·lulars de  $\text{Ca}^{2+}$  estan més plens i per tant el receptors són capaços de mobilitzar  $\text{Ca}^{2+}$  intracel·lular, l'estimulació de la PLC per Cch es veu potenciada un 80 %, i a diferència de la resposta induïda per Glu, aquesta implicació és independent de la presència de  $\text{Ca}^{2+}$  extracel·lular



durant l'estimulació i d'un pretractament de les neurones amb BAPTA/AM. Aquesta última condició, però, anul·la totalment la mobilització de  $\text{Ca}^{2+}$  induïda pel Cch i per tant es demostra que la major estimulació de la PLC per receptors muscarínics en cèl·lules amb els reservoris intracel·lulars més plens de  $\text{Ca}^{2+}$ , no és degut a un increment de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , sinó al propi fet de que hi hagi més  $\text{Ca}^{2+}$  luminal.

Evidències addicionals de la implicació de la importància dels nivells de  $\text{Ca}^{2+}$  dels reservoris intracel·lulars l'aporten els efectes de dos compostos moduladors del seu estat d'ompliment. La cafeïna i, en menys extensió, la thapsigargina disminueixen l'alliberament de  $\text{Ca}^{2+}$  dels reservoris induït per la ionomicina i alhora redueixen l'activació de la PLC per Cch. En CGC, s'ha demostrat que la thapsigargina inhibeix els senyals de  $\text{Ca}^{2+}$  induïts pel Cch (Courtney i Nicholls, 1992, Irving et al., 1992a; Fohrman et al., 1993; Simpson et al., 1996) i que la cafeïna allibera  $\text{Ca}^{2+}$  dels reservoris intracel·lulars (Irving et al., 1992b; Simpson et al., 1996), però també s'ha suggerit que existeix un solapament entre els reservoris intracel·lulars de  $\text{Ca}^{2+}$  sensibles a ambdós, thapsigargina i cafeïna (Irving et al., 1992b; Simpson et al., 1993, 1994, 1996). Sense despreciar la presència i participació en aquesta resposta de reservoris intracel·lulars de  $\text{Ca}^{2+}$  insensibles a la thapsigargina i la cafeïna, existents en cèl·lules no neuronals (Pizzo et al., 1997), ni tampoc efectes secundaris de la cafeïna tals com la inhibició directa sobre la PLC possible en cèl·lules pancreàtiques (Toescu et al., 1992), podem ressaltar que els nostres resultats mostren com cada un dels dos esmentats compostos produeix una diferent magnitud de deplecció dels reservoris intracel·lulars i això es tradueix en una diferent reducció de l'estimulació de la PLC per Cch. Per tant, podem afirmar que els nivells de  $\text{Ca}^{2+}$  dels reservoris intracel·lulars regulen la transducció d'aquesta resposta intracel·lular.

Els reservoris intracel·lulars de  $\text{Ca}^{2+}$  poden participar de diferents maneres en la senyalització i en la funcionalitat cel·lular en general. Així, tal i com el seu nom indica, inicialment es pensava que la seva funció exclusiva era la d'actuar com a reservoris de  $\text{Ca}^{2+}$  alliberant-lo immediatament després de determinades senyals cel·lulars per tal de potenciar i transmetre respostes (Berridge i Irving, 1989). Més endavant, però, es va demostrar que també poden actuar com a magatzems guardant  $\text{Ca}^{2+}$  i alliberant-lo més tard, fet que dota a les cèl·lules d'una espècie de memòria que els hi permet respondre de forma simultània a un conjunt de senyals successives prèvies (Simpson et al., 1995; Berridge, 1998). Però a més, els reservoris intracel·lulars de  $\text{Ca}^{2+}$  poden regular processos cel·lulars de manera independent al  $\text{Ca}^{2+}$  citosòlic, és a dir, el  $\text{Ca}^{2+}$  luminal pot actuar com a

senyalitzador sense la necessitat de ser alliberat o recaptat del citosol cel·lular. Cada vegada es coneixen més funcions i processos cel·lulars regulats pel contingut de  $\text{Ca}^{2+}$  de dins els reservoris, entre els quals cal destacar l'entrada capacitativa de  $\text{Ca}^{2+}$  -l'inducció d'un influx de  $\text{Ca}^{2+}$  extracel·lular degut a nivells baixos de  $\text{Ca}^{2+}$  dels reservoris intracel·lulars- (Berridge, 1995), la inducció de l'expressió gènica (Gissel et al., 1997), la inhibició de la síntesis proteïca i el tràfic intermembranal de proteïnes (Pashen et al., 1996), la inhibició de la  $\text{PLA}_2$  insensible a  $\text{Ca}^{2+}$  (Nowatzke et al., 1998), entre d'altres (Meldonesi i Pozzan, 1998; Alvarez et al., 1999). Els mecanismes responsables d'aquesta regulació de diferents processos per part del  $\text{Ca}^{2+}$  luminal, però, són pel moment molt desconeguts i només per l'entrada capacitativa de  $\text{Ca}^{2+}$  s'han apuntat diferents hipòtesis que impliquen varis elements, com ara missatgers endògens que poden comunicar l'estat d'ompliment dels reservoris intracel·lulars de  $\text{Ca}^{2+}$  als canals de  $\text{Ca}^{2+}$  localitzats a la membrana plasmàtica (Fassolato et al., 1994; Berridge, 1997; Barrit 1999).

El present treball constitueix la primera evidència a la literatura de la regulació de l'activitat PLC per part dels nivells de  $\text{Ca}^{2+}$  dels reservoris intracel·lulars tan en neurones com en altres sistemes cel·lulars, però alhora s'enmarca dintre les noves filosofies que per una banda qüestionen la relació entre increments en la  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  com a causa i conseqüència universal de l'estimulació de la PLC, i per altra atribueixen al ER i a altres reservoris intracel·lulars de  $\text{Ca}^{2+}$  funcions extramadament específiques, especialitzades i de gran importància pels diferents processos, ja siguin tan per a la viabilitat com per a la mort cel·lulars (Berridge 1998; Bootman et al., 1999).

Desconeixem el mecanisme d'aquesta regulació per part del  $\text{Ca}^{2+}$  luminal de l'activació de la PLC per receptors muscarínics, tot i que varies hipòtesis són possibles. Així, a part de l'existència a les CGC d'un element mediador i difusible dins la cèl·lula, el mecanisme podria implicar un complex de senyalització que podria comportar l'activació d'isoenzims de la PLC capaços de sensar els nivells de  $\text{Ca}^{2+}$  dels reservoris intracel·lulars i els quals no participarien en respostes mitjançades per altres receptors. Aquest fet seria consistent en la gran diferència entre CGC intactes i membranes d'aquestes neurones en la magnitud d'estimulació de la PLC per Cch, i amb el fet de que en aquestes últimes preparacions biològiques, però en les primeres, l'activació de la PLC per Cch és similar a la d'altres receptors. Alhora, les nostres dades mostren com l'estimulació dels cultius de CGC de 9 DIV amb Cch indueix un moviment de les molècules de la PLC- $\beta$ 1 citosòliques a la membrana, fet que es podria representar una activació d'aquestes molècules. Per tant,

segons aquesta hipòtesi i sense descartar altres isoenzims, la PLC- $\beta$  1 podria ser una candidata a ser un isoenzim de la PLC estimulat per receptors muscarínics i tenir capacitat de sensar els nivells de  $\text{Ca}^{2+}$  extracel·lular. Tot i així, cal tenir present que estem fent moltes especulacions i es necessiten estudis posteriors per confirmar-ho.

Independentment del mecanisme, la modulació de l'estimulació de la PLC per Cch per part dels reservoris intracel·lulars de  $\text{Ca}^{2+}$  pot ajudar a regular la quantitat d'Ins1,4,5P<sub>3</sub> format i pot constituir un mecanisme d'encreuament entre l'estimulació muscarínica i altres estímuls mobilitzadors de  $\text{Ca}^{2+}$ . Alhora, cal tenir present que l'estat d'ompliment dels reservoris intracel·lulars de  $\text{Ca}^{2+}$  determina la mobilització de  $\text{Ca}^{2+}$  intracel·lular per part dels receptors muscarínics, tot i que en aquest cas, els senyals de  $\text{Ca}^{2+}$  induïts per Cch, a l'igual que els induïts per Glu, només depenen de si hi ha suficient  $\text{Ca}^{2+}$  als reservoris per ser alliberat.

El conjunt de totes aquestes dades, per tant, indiquen que els mecanismes reguladors de l'activació de la PLC per agonistes depenen del receptor implicat, almenys en cultius de CGC. La base per aquesta diferència la desconeixem, però es podria especular que diferents isoenzims de la PLC, amb diferent sensibilitat al  $\text{Ca}^{2+}$  i regulats de diferent manera, podrien estar implicats en la transducció del senyal per part dels receptors m3 i mGluR1 ja que els nostres anàlisis d'expressió proteïca mostren com els cultius de CGC madurs expressen els isoenzims PLC- $\beta$ 1, - $\beta$ 2, - $\beta$ 3, - $\beta$ 4, - $\delta$ 1, - $\delta$ 2, - $\gamma$ 1 i - $\gamma$ 2. Aquesta hipòtesi ha estat suggerida per Irving et al. (1992) en CGC, mentre que Kim et al. (1997) han demostrat que en ratolins transgènics els receptors muscarínics estan acoblats majoritàriament a la PLC- $\beta$ 1 a l'escorça cerebral i a l'hipocamp i els mGluRs a la PLC- $\beta$ 4 al cerebel



## CONCLUSIONS

1. La relació entre les acumulacions d' $^3\text{H}$ -InsPs i  $^3\text{H}$ ]CDP-DAG degudes a l'activació de la PLC per diferents agonistes de receptors acoblats a proteïnes G és una característica que sembla dependre més del tipus de receptor que del teixit, tipus de preparació o estadi de desenvolupament, ja que el comportament de cada agonista es similar en cultius de neurones granulars de cerebel i en miniprismes d'escorça cerebral d'animal adult.

2. En neurones granulars hi ha una bona correlació entre les acumulacions d' $^3\text{H}$ ]Ins4P+ $^3\text{H}$ ]Ins1,4P<sub>2</sub> -procedents de la desfosforilació de l' $^3\text{H}$ ]Ins1,4,5P<sub>3</sub>- i l'eficàcia d'estimulació de la PLC associada a cada agonista, mentre que els nivells d' $^3\text{H}$ ]Ins1P -resultant de la via de fosforilació de l' $^3\text{H}$ ]Ins1,4,5P<sub>3</sub>- no donen informació sobre aquesta estimulació. Aquests resultats divergeixen dels descrits anteriorment en miniprismes d'escorça cerebral fet que indica que el metabolisme de l' $^3\text{H}$ ]Ins1,4,5P<sub>3</sub> és una característica dependent del teixit, així com de l'estadi de desenvolupament de l'animal.

3. L'activació de la PLC per un determinat receptor i el metabolisme de l' Ins1,4,5P<sub>3</sub> format són modulats de manera diferent pel  $\text{Ca}^{2+}$  extracel·lular dependent del teixit on es produeixi la resposta. A més a més, canvis en la concentració extracel·lular d'aquest ió influeixen de manera diferent en l'activació de la PLC per diferents agonistes.

4. A diferència del que s'ha observat en estudis previs en el teixit cerebral intacte, en neurones granulars en cultius, les característiques estudiades de l'activació de la PLC (relació entre les acumulacions d' $^3\text{H}$ -InsPs i  $^3\text{H}$ ]CDP-DAG i relació entre les acumulacions dels inositols fosfats corresponents a diferents vies del metabolisme de l'Ins1,4,5P<sub>3</sub>) no es correlacionen amb el mecanisme d'activació de la PLC, ja que agonistes amb característiques marcadament diferents, activen la PLC mitjançant la participació d'una proteïna G en preparacions membranals.

5. La similar eficàcia dels receptors muscarínics, de l' endotelina i mGluRs en estimular la PLC en preparacions membranals de neurones granulars de cerebel, en contrast amb les grans diferències trobades en cèl·lules senceres, indiquen que en aquest últim cas hi ha mecanismes reguladors que potencien la resposta, almenys en el cas dels receptors muscarínics i mGluRs.

6. Els cultius primaris de CGC expressen els receptors mGluR1 $\alpha$  i mGluR5, essent l'expressió del primer constant i la del segon creixent amb el temps *in vitro* de cultiu. Malgrat això, en cultius madurs només el receptor mGluR1 és responsable de l'activació de la PLC i el senyal de Ca<sup>2+</sup> induïts per diferents agonistes dels mGluRs. En aquestes respostes semblen participar-hi els RyR.

7. Els nivells de Ca<sup>2+</sup> dels reservoris intracel·lulars en la gran majoria de neurones granulars de cerebel en repòs són molt baixos, això fa que el seu ompliment sigui un requisit per tal de que diferents receptors, entre ells els muscarínics de l'actetilcolina i metabotròpics del glutamat, puguin induir senyals de Ca<sup>2+</sup>. Aquestes respostes de Ca<sup>2+</sup> tenen les mateixes característiques temporals i espaials però estan induïdes a través de diferents mecanismes, contemplant una possible entrada de Ca<sup>2+</sup> extracel·lular en la resposta mitjançada pels mGluRs.

8. En cultius primaris de CGC, l'estimulació de la PLC per receptors muscarínics i mGluRs és regulada de manera diferent pel Ca<sup>2+</sup>. Així, l'activació de la PLC pels mGluR1s és dependent de la presència de Ca<sup>2+</sup> extracel·lular durant l'estimulació i altament sensible a canvis moderats en la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>c</sub>, mentre que l'estimulació de la PLC per receptors muscarínics és regulada pel contingut de Ca<sup>2+</sup> dels reservoris intracel·lulars.

9. Els cultius de CGC madurs expressen els diferents isoenzims de la PLC:  $\beta$ 1,  $\beta$ 2,  $\beta$ 3,  $\beta$ 4,  $\delta$ 1,  $\delta$ 2,  $\gamma$ 1 i  $\gamma$ 2. La PLC- $\beta$ 1 està majoritàriament associada a la membrana, i estimulacions curtes amb Cch produeixen una ràpida translocació a la membrana de la quasi totalitat de l'isoenzim.

## BIBLIOGRAFIA

ABE T., SUGIHARA H., NAWA H., SHIGEMOTO R., MIZUNO N. AND NAKANISHI S. (1992) Molecular characterization of a novel metabotropic glutamate receptor mGluR5 coupled to inositol phosphate/  $Ca^{2+}$  signal transduction. *J.Biol.Chem.* **267**, 13361-13368.

ALLEN J.W., ELDADAH B.A. AND FADEN A.I. (1999)  $\beta$ -Amyloid-induced apoptosis of cerebellar granule cells and cortical neurons: exacerbation by selective inhibition of group I metabotropic glutamate receptors. *Neuropharmacol.* **38**, 1243-1252.

ALLEN V., SWIGART P., CHEUNG R., COCKCROFT S. AND KATAN M. (1997) Regulation of inositol lipid-specific phospholipase C $\delta$  by changes in  $Ca^{2+}$  ion concentrations. *Biochem.J.* **327**, 545-552.

ALVAREZ J., MONTERO M. AND GARCÍA-SANCHO J. (1999) Subcellular  $Ca^{2+}$  dynamics. *News Physiol.Sci.* **14**, 161-168.

ANNOURA H., FUKUNAGA A., VESUGI M., TATSUOKU T. AND HORIKAWA Y. (1996) A novel class of antagonist for metabotropic glutamate receptors, 7-(Hydroxyimino)cyclopropa[b]chromen-1 $\alpha$ -carboxylates. *Bioorganic Med.Chem.Lett.* **6**, 763-766.

ARAMORI I. AND NAKANISHI S. (1992) Signal transduction and pharmacological characteristics of a metabotropic glutamate receptor, mGluR1, in transfected CHO cells. *Neuron*, **8**, 757-765.

ARAMORI I. AND NAKANISHI S. (1992) Signal transduction and pharmacological characteristics of a metabotropic glutamate receptor, mGluR1, in transfected CHO cells. *Neuron*. **5**, 757-765.

ARONICA E., CONDORELLI D.F., NICOLETTI F., DELL'ALBANI P., AMICO C. AND BÁLAZ R. (1993) Metabotropic glutamate receptors in cultured cerebellar granule cells: developmental profile. *J.Neurochem.* **60**, 559-565.

ARTEAGA C.L., JOHNSON M.D., TODDERUD G., COFFEY R.J., CARPENTER G., HUANG K.P. AND RHEE S.G. (1991) Elevated content of the tyrosine kinase substrate phospholipase C-gamma 1 in primary human breast carcinomas. *Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A.* **88**, 10435-10439.

ASHKENAZI A., WINSLOW J.W., PERALTA E.G., PETERSON F.L., SCHIMERLIK M.I., CAPON D.J. AND RAMACHANDRAN J. (1987) An m2 muscarinic receptor subtype coupled to both adenylyl cyclase and phosphoinositide turnover. *Science*. **238**, 672-675.

BABA H., FUSS B., URANO J., POULLET P., WATSON J.B., TAMANOI F. AND MACKLIN W.B. (1995) GapIII, a new brain-enriched member of the GTPase-activating protein family. *J.Neuosci.Res.* **41**, 846-85

BAE Y.S., CANTLEY L.G., CHEN C.-S., KIM S.-R., KWON K.-S. AND RHEE S.G. (1998) Activation of phospholipase C- $\gamma$  by phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate. *J.Biol.Chem.* **273**, 4465-4469.

BAHK Y.Y., LEE Y.H., LEE T.G., SEO J., RYU S.H. AND SUH P.-G. (1994) Two forms of phospholipase C- $\beta$ 1 generated by alternative splicing. *J.Biol.Chem.* **269**, 8240-8245.

BAHK Y.Y., SONG H., HAEK S.H., PARK B.Y., KIM H., RYU S.H. AND SUH P.G. (1998) Localization of two forms of phospholipase C- $\beta$ 1, a and b, in C6Bu-1 cells. *Biochem. Biophys. Acta* **1389**, 76-80.

BAIRD J.G. AND NAHORSKI S.R. (1990) Increased intracellular calcium stimulates  $^3\text{H}$ -inositol polyphosphate accumulation in rat cerebral cortical slices. *J.Neurochem.* **54**, 556-561.

BÁLAZS R., GALLO V., KINGSBURY A., THANGNIPON W., SMITH R., ATTERWILL C. AND WOODHAMS P.. (1987) Factors affecting the survival and maturation of nerve cells in culture. *Glial-neuronal Communication in Developmental Regeneration* Eds.Athaus H.H.and Seifert W. Springer-Verlag. Germany.

BALÁZS R., MILLER S., ROMANO C., DE VRIES A., CHUN Y., AND COTMAN C.W. (1997) Metabotropic glutamate receptor mGluR5 in astrocytes: pharmacological properties and agonist regulation. *J. Neurochem.* **69**, 151-163.

BALLA T., BAUKAL A.J., GUILLEMETTE G. AND CATT K.J. (1988) Multiple pathways of inositol poliphosphate metabolism in angiotensin-stimulated adrenal glomerulosa cells. *J.Biol.Chem.* **263**, 4083-XX

BANNO Y. AND NOZAWA Y. (1987) *Biochem.J.* **248**, 95-101.

BARRITT G.J. (1999) Receptor-activated  $\text{Ca}^{2+}$  inflow in animal cells: a variety of pathways tailored to meet different intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  signalling requirements. *Biochem J.* **337**, 153-169.

BERMAN D.M. AND GILMAN A.G. (1998) Mammalian RGS proteins: barbarians at the gate. *J.Biol.Chem.* **273**, 1269-1272.

BERRIDGE M.J. (1998) Neuronal calcium signaling. *Neuron.* **21**, 13-26.

BERRIDGE M.J. (1997) Elementary and global aspects of calcium signalling. *J.Physiol.* **499**, 291-306.

BERRIDGE M.J. (1995) Capacitative calcium entry. *Biochem.J.* **312**, 1-11.



- BERRIDGE M.J. (1993) Inositol triphosphate and calcium signalling. *Nature*. **361**, 315-325.
- BERRIDGE M.J. (1983) Rapid accumulation of inositol triphosphate reveals that agonists hydrolyse polyphosphoinositides instead of phosphatidylinositol. *Biochem.J.* **212**, 849-858.
- BERRIDGE M.J. AND IRVINE R.F. (1989) Inositol phosphates and cell signalling. *Nature*. **341**, 197-205.
- BERRIDGE M.J., BOOTMAN M.D. AND LIPP P. (1998) Calcium - a life and death signal. *Nature*. **395**, 645-648.
- BERRIDGE M.J., DOWNES C.P. AND HANLEY M.R. (1989) *Cell*. **59**, 411-419.
- BERSTEIN G., BLANK J.L., SMRCIAMA.V., HIGASHIJIMA T., STERNWEIS P.C., EXTON J.H. AND TOSS E.M. (1992) Reconstitution of agonist-stimulated phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate hydrolysis using purified m1 muscarinic receptor, G<sub>q/11</sub>, and phospholipase C-β1. *J.Biol.Chem.* **267**, 8081-8088.
- BERSTEIN G., BLANK J.L., SMRCKA A., HIGASHIJIMA T., STERNWEIS P.C., EXTON J.H. AND ROSS E.M. (1992) Reconstitution of agonist-stimulated phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate hydrolysis using purified m1 muscarinic receptor, G<sub>q/11</sub>, and phospholipase C-β1. *J.Biol.Chem.* **267**, 8081-8088.
- BESHO Y., NAWA H. AND NAKANISHI S. (1993) Glutamate and quisqualate regulate expression of metabotropic glutamate receptor mRNA in cultured cerebellar granule cells. *J.Neurochem* **60**, 253-259.
- BIAN J., GHOSH T.K., EANG J.C. AND GILL D.L. (1991) Identification of intracellular calcium pools. Selective modification by thapsigargin. *J.Biol.Chem.* **266**, 8801-8806.
- BIRNBAUMER L., ABRAMOWITZ J. AND BROWN A.M. (1990) Receptor-effector coupling by G proteins. *Biochem. Biophys. Acta.* **1031**, 163-224.
- BIZZARRI C., GIROLAMO M.D., D'ORAZIO M.C. AND CORDA D. (1990) Evidence that a guanine nucleotide-binding protein linked to a muscarinic receptor inhibits directly phospholipase C. *Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A.* **87**, 4889-4893.
- BLANK J.L., BRATTAIN K.A. AND EXTON J.H. (1992) Activation of cytosolic phosphoinositide phospholipase C by G-protein βγ-subunits. *J.Biol.Chem.* **267**, 23069-23075.
- BLANK J.L., SHAW K., ROSS A.H. AND EXTON J.H.  
(1993) Purification of a 110 kDa phosphoinositide phospholipase C that es activated by G-protein βγ-subunits. *J.Biol.Chem* **268**, 25184-25191.

BOARD L.M., CANNON T.R. AND TAYLOR C.W. (1999) A non-capacitative pathway activated by arachidonic acid is the major  $Ca^{2+}$  entry mechanism in rat A7r5 smooth muscle cells stimulated with low concentration of vasopressin. *J.Physiol.* **517**, 121-134.

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

BOLSOVER S., ASHWORTH R. AND ARCHER F. (1999) Activator of calcium influx proves a slippery customer. *J.Physiol.* **517** 2

BOOTMAN M.D. AND BERRIDGE M.J. (1995) *Nature.* **361**, 315-325.

BOSS V. AND CONN P.J. (1992) Metabotropic excitatory amino acid receptor activation stimulates phospholipase D in hippocampal slices. *J.Neurochem.* **59**, 2340-2343.

BOTTOMLEY M.J., SALIM K. AND PANAYOTOU G. (1998) Phospholipid-binding protein domains. *Biochem. Biophys. Acta* **1436**, 165-183.

BRABET I., MARY S., BOCKAERT J., AND PIN J.-P. (1995) Phenylglycine derivatives discriminate between mGluR1 and mGluR5-mediated responses. *Neuropharmacol.* **34**, 895-903.

BREER H., BOEKHOFF I. AND TAREILUS E. (1990) Rapid kinetics of second messenger formation in olfactory transduction. *Nature.* **345**, 65-68.

BRINI M., DE GIORGI F., MURGIA M., MARSAULT R., MASSIMINO M.L., CANTINI M., RIZZUTO R. AND POZZAN T. (1997) Subcellular analysis of  $Ca^{2+}$  homeostasis in primary cultures of skeletal muscle myotubes. *Mol.Biol.Cell.* **8**, 129-143.

BROWN E.M., GAMA G., RICCARDI D., LOMBARDI M., BUTTERS R., KIFOR O., SUN A., HEDIGER M.A., LYTTON J. AND HEBERT S.C. (1993) Cloning and characterisation of an extracellular  $Ca^{2+}$ -sensing receptor from bovine parathyroid. *Nature* **366**, 575-580.

CAMACHO P. AND LECHLEITER J.D. (1995) Calreticulin inhibits repetitive intracellular  $Ca^{2+}$  waves. *Cell.* **82**, 765-771.

CAMPS M., HOU C., SIDIROPOULOS D., STOCK J.B., JAKOBS K.H. AND GIERSCHIK P. (1992) Stimulation of phospholipase C by guanine-nucleotide-binding protein  $\beta\gamma$ -subunits. *Eur.J.Biochem.* **206**, 821-831.

CARRUTHERS A.M., CHALLISS R.A.J., MISTRY R., SAUNDERS R., THOMSEN C. AND NAHORSKI S.R. (1997) Enhanced type  $1\alpha$  metabotropic glutamate receptor-stimulated phosphoinositide signaling after pertussis toxin treatment. *Am.Soc.Pharmacol.Exp.Therap.* **52**, 406-414.

CASABONA G., KNÖPFEL T., KUHN R., GASPARINI F., BAUMANN P., SORTINO M.A., COPANI A. AND NICOLETTI F. (1997) Expression and coupling to

polyphosphoinositide hydrolysis of group I metabotropic glutamate receptors in early postnatal and adult rat brain. *Eur.J.Neurosci.* **9**, 12-17.

CATANIA M.V., LANDERWEHRMEYER G.B., TESTA C.M., STANDAERT D.G., PENNEY J.B. Jr AND YOUNG A.B. (1994) Metabotropic glutamate receptors are differentially regulated during development. *Neurosci.* **61**, 481-495.

CAUFIELD M.P. (1993) Muscarinic receptors- characterization, coupling and function. *Pharmacol. Ther.* **58**, 319-379.

CHANDER L.J. AND CREWS F.T. (1990) Calcium versus G protein-mediated phosphoinositide hydrolysis in rat cerebral cortical synaptoneurosomes. *J.Neurochem.* **55**, 1022-1030.

CHEN F.H., RATTERMAN D.M. AND SZE H. (1993) A plasma membrane-type  $Ca^{2+}$  - ATPase of 120 kilodaltons on the endoplasmic reticulum from carrot (*Daucus carota*) cells. *Plant Physiol.* **102**, 651-661.

CHIU S.M., LI P.P. AND WARSH J.J. (1988) G-protein involvement in central-nervous-system muscarinic receptor-coupled polyphosphoinositide hydrolysis. *Biochem. J.* **265**, 995-999

CHUANG D.M., LIN W.-W. AND LEE C.Y. (1991) Endothelin-induced activation of phosphoinositide turnover, calcium mobilization, and transmitter release in cultured neurons and neurally related cells types. *J.Cardiovascular Pharmacol* **17**, S85-S88

CHUNG D.S., TRAYNELIS S.F., MURPHY T.J. AND CONN P.J. (1997) Methylhomobotenic acid activates a novel metabotropic glutamate receptor coupled to phosphoinositide hydrolysis. *Journal of Pharmacol.* **283**, 742-749.

CLAPHAM D.E. (1995) Calcium signaling. *Cell.* **80**, 259-268.

CLAPHAM D.E. (1994) A mysterious new influx factor? *Nature.* **364**, 763-764.

CLARO E., FAIN J.N. AND PICATOSTE F. (1993a) Noradrenaline stimulation unbalances the phosphoinositide cycle in rat cerebral cortical slices. *J.Neurochem.* **60**, 2078-2086.

CLARO E., GARCIA A. AND PICATOSTE F. (1989b) Carbachol and histamine stimulation of guanine-nucleotide dependent phosphoinositide hydrolysis in rat brain cortical membranes. *Biochem. J.* **261**, 29-35.

CLARO E., SARRI E. AND PICATOSTE F. (1995) Measurement of phospholipase C activity in brain membranes. *Meth. Mol. Biol.* Vol.41. Signal Transduction Protocols. Eds.DA Kendall and SJ Hill. Humana Press Inc. Totowa, NJ.

CLARO E., SARRI E. AND PICATOSTE F. (1993b) Endogenous phosphoinositide precursors of inositol phosphates in rat brain cortical membranes. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **193**, 1061-1067.

CLARO E., WALLACE M.A., LEE H.M. AND FAIN J.N. (1989a) Carbachol in the presence of guanosine 5'-O-(3-thiotriphosphate) stimulates the breakdown of exogenous phosphatidylinositol by rat brain membranes. *J.Biol.Chem.* 264, 18288-18295.

CLEMENTI E. AND MELDONESI J. (1996) Pharmacological and functional properties of voltage-independent  $Ca^{2+}$  channels. *Cell Calcium*. 19, 269-279.

COCCO L., RUBBINI S., MANZOLI L., BILLI A.M., FAENZA I., PERUZZI D., MATTEUCCI A., ARTICO M., GILMOUR R.S. AND RHEE S.G. (1999) Inositides in the nucleus: presence and characterisation of the isozymes of phospholipase  $\beta$  family in NIH 3T3 cells. *Biochem. Biophys. Acta* 1438, 295-299.

CONDORELLI D.F., DELL'ALBANI P., CORSARO M., GIUFFRIDA R., CARUSO A., SALINARO A.T., SPINELLA F., NICOLETTI F., ALBANESE V., AND GIUFFRIDA A.M. (1997) Metabotropic glutamate receptor expression in cultured rat astrocytes and human gliomas. *Neurochem. Res.* 22, 1127-1133.

CONDORELLI D.F., DELLIALBANI P., AMICO C., CASABONA G., GENAZZANI A.A, SORTINO M.A. AND NICOLETTI F. (1992) Developmental profile of metabotropic glutamate receptor mRNA in rat brain. *Mol.Pharmacol.* 41, 660-664.

CONN P.J. AND PIN J.-P. (1997) Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.* 37, 205-237.

CONN P.J., WINDER D.G. AND GEREAU R.W. (1994) Regulation of neuronal circuits and animal behavior by metabotropic glutamate receptors. *The metabotropic glutamate receptors* Totowa, NJ Humana.

CONNOR J., TSENG H.-. AND HOCKBERGER P. (1987) Depolarisation and transmitter-induced changes in intracellular  $Ca^{2+}$  of rat cerebellar granule cells in explant cultures. *J.Neurosci.* 7, 1384-1400.

CONNOR J., TSENG H.Y. AND HOCKBERGER P. (1987) Depolarization and transmitter-induced changes in intracellular  $Ca^{2+}$  of rat cerebellar granules cells in explant cultures. *J.Neurosci.* 7, 1384-1400.

COPANI A., CASABONA G., BRUNO V., CARUSO A., CONDORELLI D.F., MESSINA A., DI GIORGI GEREVINI V., PIN J.-P., KUHN R., KNÖPFEL T. AND NICOLETTI F. (1998a) The metabotropic glutamate receptor mGlu5 controls the onset of developmental apoptosis in cultured cerebellar neurons. *Eur.J.Neurosci.* 10, 2173-2184.

COPANI A., CASABONA G., BRUNO V., PARENTI R., CICIRATA F., KNÖPFEL T., KUHN R. AND NICOLETTI F. (1998b) Metabotropic glutamate receptor mGluR5: a key regulator of neuronal selection? *Metabotropic glutamate receptors and brain function. Portland Press Proceedings*

COURTNEY M.J. AND NICHOLLS D.G. (1992) Interactions between phospholipase C-coupled and N-methyl-D-aspartate receptors in cultured cerebellar granule cells: protein

kinase C mediated inhibition of N-methyl-D-aspartate responses. *J. Neurochem.* **59**, 983-992.

COURTNEY M.J., LAMBERT J.J. AND NICHOLLS D.G. (1990) The interactions between plasma membrane depolarization and glutamate receptor activation in the regulation of cytoplasmatic free calcium in cultured cerebellar granule cells. *J. Neurosci.* **10**, 3873-3879.

CROCKCROFT S. AND THOMAS G.M.H. (1992) Inositol-lipid-specific phospholipase C isoenzymes and their differential regulation by receptors. *Biochem.J.* **288**, 1-14.

CROUCH M.F. AND SIMSON L. (1997) The G-protein G(i) regulates mitosis but not DNA synthesis in growth factor-activated fibroblasts: a role for the nuclear translocation of G(i). *FASEB J.* **11**, 189-198.

CUADRADO A. AND MOLLOY C.J. (1990) Overexpression of phospholipase C- $\gamma$  in NIH 3T3 fibroblasts results in increased phosphatidylinositol hydrolysis in response to platelet-derived growth factor and basic fibroblast growth factor. *Mol. Cell. Biol.* **10**, 6069-XX

CULLEN P.J. (1998) Bridging the GAP in inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate signalling. *Biochem. Biophys. Acta* **1436**, 35-47.

CULLEN P.J., HSUAN J.J., TRUONG O., LETCHER A.J., JACKSON T.R., DAWSON A.P. AND IRVINE R.F. (1995) Identification of a specific Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub>-binding protein as a member of the GAP1 family. *Nature.* **376**, 527-530.

D'SANTO C.S., CLARKE J.H. AND DIVECHA N. (1998) Phospholipid signalling in the nucleus. *Biochem. Biophys. Acta* **1436**, 201-232.

DAVIES E.V. AND HALLETT M.B. (1995) A soluble cellular factor directly stimulates Ca<sup>2+</sup> entry in neutrophils. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **206**, 348-354.

DE VINO M., CHEN J., CODINA J. AND LYENGAR R.J. (1992) Enhanced phospholipase C stimulation and transformation in NIH-3T3 cells expressing Q209LGq-alpha-subunits. *J. Biol. Chem.* **267**, 18263-18266.

DEL RÍO E., MCLAUGHLIN M., DOWNES C.P., AND NICHOLLS D.G. (1999) Differential coupling of G-protein-linked receptors to Ca<sup>2+</sup> mobilization through inositol(1,4,5)triphosphate or ryanodine receptors in CGC in primary culture. *Eur. J. Neuroscience* **11**, 3015-3022.

DEL RÍO E., NICHOLLS D.G. AND DOWNES C.P. (1994) Involvement of calcium influx in muscarinic cholinergic regulation of phospholipase C in cerebellar granule cells. *J. Neurochem.* **63**, 535-543.

DEL RÍO E., NICHOLLS D.G. AND DOWNES C.P. (1996) Characterization of the effects of lithium and inositol on phosphoinositide turnover in cerebellar granule cells in primary culture. *J. Neurochem.* **66**, 517-524.

DEL RIO E., SHINOMURA T., VAN DER KAAY J, NICHOLLS D.G. AND DOWNES C.P. (1998) Disruption by lithium of phosphoinositide signalling in cerebellar granule cells in primary culture. *J.Neurochem.* **70**, 1662-1669.

DEMAUREX N., MONOD A., LEW D.P. AND KRAUSE K.-H. (1994) Characterization of receptor-mediated and store-regulated  $Ca^{2+}$  influx in human neutrophils. *Biochem.J.* **297**, 595-601.

DIAZ-MUÑOZ M., HAMILTON S.L., KAETZEL M.A., HAZARIKA P. AND DEDMAN J.R. (1990) Modulation of  $Ca^{2+}$  release channel activity from sarcoplasmic reticulum by annexin VI (67-kDa calcimedlin). *J.Biol.Chem.* **265**, 15894-15899.

DIDIER M., BERMAN S.A., LINDSTROM J. AND BURZTAJN S. (1995) Characterization of nicotinic acetylcholine receptors expressed in primary cultures of cerebellar granule cells. *Mol.Brain Research* **30**, 17-28.

DIDIER M., BERMAN S.A., LINDSTROM J. AND BURZTAJN S. (1995) Characterization of nicotinic acetylcholine receptors expressed in primary cultures of cerebellar granule cells. *Mol.Brain Research.* **30**: 17-28.

DILLON-CARTER O. AND CHUANG D.-M. (1989) Homologous desensitization of muscarinic cholinergic, histaminergic, adrenergic, and serotonergic receptors coupled to phospholipase C in cerebellar granule cells. *J.Neurochem* **52**, 598-603.

DIVECHA N., RHEE S.G., LETCHER A.J. AND IRVINE R.F. (1993) Phosphoinositide signalling enzymes in rat liver nuclei: phosphoinositidase C isoform beta 1 is specifically, but not predominantly, located in the nucleus. *Biochem.J.* **289**, 617-620.

DOHERTY A.J., PALMER M.J., HENLEY J.M., COLLINGRIDGE G.L., AND JANE D.E. (1997) (RS)-2-chloro-5-hydroxyphenylglycine (CHPG) activates mGlu<sub>5</sub>, but not mGlu<sub>1</sub>, receptors expressed in CHO cells and potentiates NMDA responses in the hippocampus. *Neuropharmacol.* **36**, 265-267.

DREJER J., HONORE T., MEIER E. AND SCHOUSBOE A.. (1986) Pharmacologically distinct glutamate receptors on cerebellar granule cells. *Life Sci.* **38**, 2077-2085.

DROZ B., RAMBOURT A. AND KOENIG H.L. (1975) The smooth endoplasmatic reticulum: structure and role in the renewal of axonal membrane and synaptic vesicles by fast axonal transport. *Brain Res.* **93**, 1-13.

DUCHEN M.R. (1999) Contributions of mitochondria to animal physiology: from homeostatic sensor to calcium signalling and cell death. *J.Physiol.* **516**, 1-17.

EBERHARD D.A. AND HOLZ R.W. (1988) Intracellular  $Ca^{2+}$  activates phospholipase C. *Trends in Neurosci.* **11**, 517-XX

ERNEUX C., GOVAERTS C., COMMUNI D. AND PESESSE X. (1998) The diversity and possible functions of the inositol polyphosphate 5-phosphatases. *Biochem. Biophys. Acta* **1436**, 185-199.

- EXTON J.H. (1997) New developments in phospholipase D. *J.Biol.Chem.* **272**, 15579-15582.
- FADDOL D.A. AND ACHE B. (1992) Plasma membrane inositol 1,4,5-trisphosphate-activated channels mediate signal transduction in lobster olfactory receptor neurons. *Neuron*. **9**, 907-918.
- FAN G.-F., KAUSIK R., ZHAO X.-M., GOLDSMITH P.K. AND SPIEGEL A.M. (1998) Mutational analysis of the cysteines in the extracellular domain of the  $Ca^{2+}$  receptor ; Effects on cell surface expression, dimerization and signal transduction. *FEBS Lett.* **436**, 353-356.
- FASOLATO C., INNOCENTI B. AND POZZAN T. (1994) Receptor-activated  $Ca^{2+}$  influx: how many mechanisms for how many channels? *TiPS*. **15**, 77-83.
- FELDER C.C., MAC ARTHUR L., MA A.L., GUSOVSKY F. AND KOHN E.C. (1993) Tumor suppressor function of muscarinic acetylcholine receptors is associated with activation of receptor-operated calcium influx. *Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A.* **90**, 1706-1710.
- FELDER C.C., POULTER M. AND WESS J. (1991) Muscarinic receptor-operated  $Ca^{2+}$  influx in transfected fibroblast cells is independent of inositol phosphates and release of intracellular calcium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**, 509-513.
- FELDER C.C.. (1995) Muscarinic acetylcholine receptors: signal transduction multiple effectors. *FASEB J.* **9**, 619-513.
- FILTZ T.M., CUNNINGHAM M.L., STANIG K.J., PATERSON A. AND HARDEN T.K. (1999) Phosphorylation by protein kinase C decreases catalytic activity of acian phospholipase C- $\beta$ . *Biochem.J.* **338**, 257-264.
- FINN J.T., GRUNWALD M.E. AND YAU K.-W. (1996) Cyclic nucleotide-gated ion channels: an extended family with diverse functions. *Annu.rev.Physiol.* **58**, 395-426.
- FISHER S.K. (1995) Homologous and heterologous regulation of receptor-stimulated phosphoinositide hydrolysis. *Eur.J.Pharmacol.* **288**, 231-250.
- FISHER S.K., SLOWIEJKO D.M. AND McEWEN E.L. (1994) A rapid attenuation of muscarinic agonist stimulated phosphoinositide hydrolysis precedes receptor sequestration in human SH-SY-5Y neuroblastoma cells. *Neurochem.Res.* **19**, 549-XX.
- FISHER S.K., HAECOCK A.M., SEGUIN E.B. AND AGRANOFF B.W. (1990) Polyphosphoinositides are the major source of inositol phosphates in carbamoycholine-stimulated SK-N-SH neuroblastoma cells. *Mol.Pharmacol.* **288**, 231-250.
- FISHER S.K., HEACOCK A.M. AND AGRANOFF B.W. (1992) Inositol lipids and signal transduction in the nervous system: an update. *J.Neurochem* **58**, 18-38.

FOHRMAN E.B., DE ERAUSQUIN G., COSTA E., AND WOJCIK (1993) Muscarinic m<sub>3</sub> receptors and dynamics of intracellular Ca<sup>2+</sup> cerebellar granule cells. *Eur. J. Pharmacol.* **245**, 263-271.

FUKAMAUCHI F., HOUGH C. AND CHUANG D.-M. (1991) Expression and agonist-induced down regulation of mRNAs of m<sub>2</sub>- and m<sub>3</sub>-muscarinic acetylcholine receptors in cultures cerebellar granule cells. *J.Neurochem* **56**, 716-719.

FUKAMAUCHI F., HOUGH C. AND CHUANG D.-M. (1991) Expression and agonist-induced down regulation of mRNAs of m<sub>2</sub>- and m<sub>3</sub>-muscarinic acetylcholine receptors in cultures cerebellar granule cells. *J.Neurochem.* **56**, 716-719.

FUKAMI K., ENDO T., IMANURA M., TAKENAWA T. (1994)  $\alpha$ -Actinin and vinculin are PIP<sub>2</sub>-binding proteins involved in signaling by tyrosine kinase. *J.Biol.Chem.* **269**, 1518-1522.

FURUICHI T., FURUTAMA D., HAKAMATA Y., NAKAI J., TAKESHIMA H. AND MIKOSHIBA D. (1994) Multiple types of ryanodine receptor/ Ca<sup>2+</sup> release channels are differentially expressed in rabbit brain. *J.Neurosci.* **14**, 4794-4805.

GALLAGHER J.P., SHENG F. AND SHINNICK-GALLAGHER P. (1994) Long-lasting modulation of synaptic transmission by metabotropic glutamate receptors. *The metabotropic glutamate receptors Totowa, NJ Humana.*

GALLO V., CIOTTI M.Y., COLETTI A., ALOISI F. AND LEVI G. (1982) Selective release of glutamate from cerebellar granule cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **79**, 7919-1923

GALLO V., KIGNSBURY A., BÁLAZS R. AND JORGENSEN O.S. (1987) The role of depolarization in the survival and differentiation of cerebellar granule cells in culture. *J. Neurosci.* **7**, 2203-2213.

GALLO V., SUERGIU R., GIOVANNINI C. AND LEVI G. (1987) Glutamate receptor subtypes in cultured cerebellar neurons: modulation of glutamate and  $\gamma$ -aminobutyric acid release. *J. Neurochem* **49**, 1801-1809.

GARNIER D.M. AND GREY R.D. (1983) Membrane junctions in *Xenopus* eggs - their distribution suggest a role in calcium regulation. *J.Physiol.* **490**, 305-318.



GASPARINI F., LINGENHOEHL K., STOEHR N., FLOR P.J., VRANESIC I., BIOLLAZ M., ALLGEIER H., HECKENDORN R., URWYLER S., VARNEY A., JOHNSON E., HESS S.D., RAO S.P., SCAAN A.I., SANTORI E.M., VELICELEBI G. AND KUHN R. (1999) 2-Methyl-6-(Phenylethynyl)-Pyridine (MPEP), a potent, selective and systemically active mGluR5 receptor antagonist. *Neuropharmacol.* **38**, 1493-1503.

GERASIMENKO O.V., GERASIMENKO J.V., BELAN P.V., PETERSEN O.H. (1996) Inositol triphosphate and cyclic ADP-ribose-mediated release of  $Ca^{2+}$  from single isolated pancreatic zymogen granules. *Cell.* **84**, 473-480.

GETHER U. AND KOBILKA B.K. (1998) G Protein-coupled receptors. II. Mechanism of agonist activation. *J.Biol.Chem.* **273**, 17979-17982.

GILCHRIST J.S.C., BELCASTRO A.N. AND KATZ S. (1992) Intraluminal  $Ca^{2+}$  dependence of  $Ca^{2+}$  and ryanodine-mediated regulation of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$  release. *J.Biol.Chem.* **267**, 20850-20856.

GOMEZA J., MARY S., BRABET I., PARMENTIER M.-L., TESTITUITO S. AND BOCKAERT J. (1996a) The second intracellular loop of metabotropic glutamate receptor 1 cooperates with the other intracellular domains to control coupling to G-proteins. *J.Biol.Chem.* **271**, 2199-2205.

GRAHAM M.E. AND BURGOYNE R.D. (1995) Effects of calcium channel antagonists on calcium entry and glutamate release from cultured rat cerebellar granule cells. *J.Neurochem.* **65**, 2517-2524.

GRAY D.W., CHALLISS R.A.J. AND NAHORSKI S.R. (1994) Differential effects of lithium on muscarinic cholinergic-stimulated synthesis and degradation of Inositol 1,4,5-triphosphate in rat cerebellar granule cells. *J.Neurochem.* **63**, 1354-1360.

GRAY D.W., WHITHAM E.M., CHALLISS R.A.J. AND NAHORSKI S.R. (1995) Muscarinic cholinergic-stimulated synthesis and degradation of Inositol 1,4,5-triphosphate in rat cerebellar granule cell. *J.Neurochem.* **64**, 1143-1151.

GRYNKIEWICZ G., PEONIE M., AND TSIEN R.Y. (1985) A new generation of  $Ca^{2+}$  indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* **260**, 3440-3450.

GUERINI D., BARCÍA-MARTIN E., GERBER A., VOLBRACHT C., LEIST M., CUTIÉRREZ MERINO C. AND CARAFOLI E. (1999) The expression of plasma membrane  $Ca^{2+}$  pump isoforms in cerebellar granule neurons is modulated by  $Ca^{2+}$ . *J.Biol.Chem.* **274**, 1667-1676.

GUSOVSKY F., LEUDEN J.E., KOHN E.C. AND FELDER C.C. (1993) Muscarinic receptor-mediated tyrosine phosphorylation of phospholipase C-gamma. *J.Biol.Chem.* **268**, 7768-7772.

GUTKIND J.S., NOVOTNY E.A., BRANN M.R. AND ROBBINS K. C. (1991) Muscarinic acetylcholine receptor subtypes as agonist-dependent oncogenes. *Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A.* **88**, 4703-4707.

HALL R.A., PREMONT R.T. AND LEFKOWITZ R.J. (1999) Heptahelical receptor signaling: beyond the G protein paradigm. *J. Cell Biol.* **145**, 927-932.

HAMMERLAND L.G., KRAPCHO K.J., GARETT J.E., ALASTI N., HUNG C.P., SIMIN R.T., LEVINHAL C., NEMETH E.-F. AND FULLER F.H. (1999) Domains determining ligand specificity for  $Ca^{2+}$  receptors *Mol. Pharmacol.* **77**, 642-648.

HARDIE R.C. AND MINKE B. (1993) Novel  $Ca^{2+}$  channels underlying transduction in Drosophila photoreceptors: implications for phosphoinositide-mediated  $Ca^{2+}$  mobilization. *Trends Neurosci.* **16**, 371-376.

HARTMANN H., ECKERT A., CREWS F.T. AND MÜLLER W.E. (1996) Beta-amyloid amplifies PLC activity and  $Ca^{2+}$  signalling in fully differentiated brain cells of adult mice. *Amyloid-Int. J. Exp. Clin. Invest.* **3**, 234-241.

HEACOCK A.M., SEGUIN E.B. AND AGRANOFF B.W. (1990) Developmental and regional studies of the metabolism of Inositol 1,4,5-triphosphate in rat brain. *J. Neurochem* **54**, 1405-1411.

HELLIWELL R.M. AND LARGE W.A. (1997)  $\alpha_1$ -Adrenoreceptor activation of a non-selective cation current in rabbit portal vein by 1,2-diacyl-*sn*-glycerol. *J. Physiol.* **499**, 417-428.

HENZI V. AND MACDERMOTT A.B. (1992) Characteristics and function of  $Ca^{2+}$ - and inositol 1,4,5-trisphosphate-releasable stores of  $Ca^{2+}$  in neurons. *Neurosci.* **46**, 251-273.

HERMANS E., CHALLISS R.A.J. AND NAHORSKI S.R. (1998b) Reversible and non-competitive antagonist profile of CPCCOEt at the human type 1a metabotropic glutamate receptor. *Neuropharmacol.* **37**, 1645-1647.

HERMANS E., NAHORSKI S.R., AND CHALLISS R.A. (1998b) Reversible and non-competitive antagonist profile of CPCCOEt at the human type 1alpha metabotropic glutamate receptor. *Neuropharmacol.* **37**, 1645-1647.

HERMANS E., YOUNG K.W., CHALLISS R.A.J. AND NAHORSKI S.R. (1998a) Effects of human type 1 $\alpha$  metabotropic glutamate receptor expression level on phosphoinositide and  $Ca^{2+}$  signalling in an inducible expression system. *J. Neurochem.* **70**, 1772-1775.

HERMANS E., YOUNG K.W., CHALLISS R.A.J. AND NAHORSKI S.R. (1998a) Effects of human type 1 $\alpha$  metabotropic glutamate receptor expression level on phosphoinositide and  $Ca^{2+}$  signalling in an inducible cell expression system. *J. Neurochem.* **70**, 1772-1775.

HERRERO I., MIRAS-PORTUGAL M.T. AND SANCHEZ-PRIETO J. (1992) Positive feedback of glutamate exocytosis by metabotropic presynaptic receptor stimulation. *Nature.* **360**, 163-166.

- HEUSS C., SCANZIANI M., GÄHWILER B.H. AND GERBER U. (1999) G-protein-independent signaling mediated by metabotropic glutamate receptors. *Nature Neurosci.* **2**, 1070-1077.
- HODGKIN M.N., PETTITT T.R., MARTIN A., MICHELL R.H., PEMBERTON A.J. AND WAKELAM M.J.O. (1998) Diacylglycerols and phosphatidates: which molecular species are intracellular messengers? *TIBS* 200-204.
- HOLOPAINEN I., ENKVIST M.O.K. AND AKERMAN K.E.O. (1989) Glutamate receptor agonist increase intracellular  $Ca^{2+}$  independently of voltage-gate  $Ca^{2+}$  channels in rat cerebellar granule cells. *Neurosci. Lett.* **98**, 57-62.
- HOTH M. AND PENNER T. (1992) Depletion of intracellular calcium stores activates a calcium current in mast cells. *Nature.* **355**, 353-356.
- HUGES A.R. AND PUTNEY Jr.J.W. (1989) Source of  $^3H$ -labeled inositol bis- and monophosphates in agonist-activated rat parotid acinar cells. *J.Biol.Chem.* **264**, 9400-9407.
- HUSSAIN A., GARNETT C., KLEIN M.G., TASI-WU J.J., SCHNEIDER M.F. AND INESI G. (1995) Direct involvement of intracellular  $Ca^{2+}$  transport ATPase in the development of thapsigargin resistance by Chinese hamster lung fibroblasts. *J.Biol.Chem.* **270**, 12140-12146.
- HWANG K.-C., GRAY C.D., SIVASUBRAMANIAN N. AND IM M.-J. (1995) Interaction site of GTP binding Gh (transglutaminase II) with phospholipase C. *J.Biol.Chem.* **270**, 27058-27062.
- HWANG P.M., VERMA A., BREDET D.S. AND SNYDER S.H. (1990) Localization of phosphatidylinositol signaling components in rat taste cells: role in bitter taste transduction. *Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A.* **87**, 7395-7399.
- HWANG S.C., JHON D.Y., BAE Y.S., KIM J.H. AND RHEE S.G. (1996) Activation of phospholipase C-gamma by the concerted action of tau proteins and arachidonic acid. *J.Biol.Chem.* **271**, 18342-18349.
- HYNIE S., WROBLEWSKI J.T. AND COSTA E. (1989) Profile of phosphatidylinositol metabolism stimulated by carbachol and glutamate in primary cultures of rat cerebellar neurons. *Neuropharmacol.* **28**, 1309-1315.
- HYNIE S., WROBLEWSKI J.T. AND COSTA E. (1989) Profile of phosphatidylinositol metabolism stimulated by carbachol and glutamate in primary cultures of rat cerebellar neurons. *Neuropharmacol.* **28**, 1309-1315.
- INESI G. AND SAGARA Y. (1994) Specific inhibitors of intracellular  $Ca^{2+}$  APTases. *J.Membr.Biol.* **141**, 1-6.
- IRVINE R.F. (1990) "Quantal"  $Ca^{2+}$  release and the control of  $Ca^{2+}$  entry by inositol phosphates: a possible mechanism. *FEBS Lett.* **263**, 5-9.

IRVINE R.F. AND DAWSON R.M.C. (1978) The distribution of calcium-dependent phosphatidylinositol-specific phosphodiesterase in rat brain. *J.Neurochem.* **31**, 1427-1434.

IRVINE R.F. AND MOOR R.M. (1986) Micro-injection of inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate activates sea urchin eggs by a mechanism dependent on external  $Ca^{2+}$ . *Biochem.J.* **240**, 917-920.

IRVING A.J., COLLINGRIDGE G.L., AND SCHOFIELD J.G. (1992b) Interactions between  $Ca^{2+}$  mobilizing mechanisms in culture rat cerebellar granule cells. *J.Physiol.* **456**, 667-680.

IRVING A.J., COLLINGRIDGE G.L., AND SCHOFIELD J.G. (1992a) L-Glutamate and acetylcholine mobilise  $Ca^{2+}$  from the same intracellular pool in cerebellar granule cells using transduction mechanisms with different  $Ca^{2+}$  sensitivities. *Cell Calcium* **13**, 293-301.

ISHIKAWA H., OZAWA H., SAITO T., TAKAHATA N. AND TAKEMURA H. (1998) Calcium mobilization evoked by amyloid  $\beta$ -protein involves inositol 1,4,5-triphosphate production in human platelets. *Life Sci.* **62**, 705-713.

JASPER J.R. (1998) Stepping back and looking forward: downregulation of G proteins as a mechanism of desensitization in tissues. Focus on "Carbachol-induced desensitization of PLC- $\beta$  pathway in rat myometrium: downregulation of  $G_q\alpha/G_{11}\alpha$ ". *Am.J.Physiol.Soc.* **275**, C634-C646.

JI T.H., GROSSMANN M. AND JI I. (1998) G protein-coupled receptors. I. Diversity of receptor-ligand interactions. *J.Biol.Chem.* **273**, 17299-17302.

JI T.H., MURDOCH W.J. AND JI I. (1995) *Endocrine* **3**, 187-194.

JONES G.A. AND CARPENTER G. (1993) The regulation of phospholipase C-gamma 1 by phosphatidic acid. Assessment of kinetic parameters. *J.Biol.Chem.* **268**, 20845-20850.

JULIUS D., LIVELLI T.J., JESSEL T.M. AND AXEL R. (1989) *Science.* **244**, 1057-1062.

KANFER J.N., SORRENTINO G. AND SITAR D.S. (1998) Phospholipases as mediators of amyloid beta peptide neurotoxicity: an early event contributing to neurodegeneration characteristic of Alzheimer's disease. *Neurosci.Lett.* **257**, 93-96.

KASAHARA J. AND SUGIYAMA H. (1994) Inositol phospholipid metabolism in *Xenopus* oocytes mediated by endogenous  $G_o$  and  $G_i$  proteins. *FEBS Lett.* **355**, 41-44.

KATAN M. (1998) Families of phosphoinositide-specific phospholipase C: structure and function. *Biochem. Biophys. Acta.* **1436**, 5-17.

KATO H., FUKAMI K., SHIBASAKI F., HOMMA Y. AND TAKENAWA T. (1992) Enhancement of phospholipase C delta 1 activity in the aortas of spontaneously hypertensive rats. *J.Biol.Chem.* **267**, 6483-6487.

- KAUPMANN K., HUGGEL K., HEID J., FLOR P.J., BISCHOFF S., MICKEL S.J., MCMASTER G., ANGST C., BITTIGER H., FROESTL W AND BETTLER B. (1997) Expression cloning of GABA<sub>B</sub> receptors uncovers similarity to metabotropic glutamate receptors. *Nature*, **386**, 239-246.
- KAWABATA S., KOHARA A., TSUTSUMI R., ITAHANA H., HAYASHIBE S., YAMAGUCHI T. AND OKADA M. (1998) Diversity of calcium signaling by metabotropic glutamate receptors. *J.Biol.Chem.* **273**, 17381-17385.
- KHAN A.A., SOLOSKI M.J., SHARP A.H., SCHILLING G., SABATINI D.M., LI S.-H., ROSS C.A. AND SNYDER S.H. (1996) Lymphocyte apoptosis: mediation by increased type 3 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *Science*. **273**, 503-507.
- KIM D., JUN K.S., LEE S.B., KANG N.G., MIN D.S., KIM Y.H., RYU S.H., SUH P.-G. AND SHIN H.-S. (1997) Phospholipase C isozymes selectively couple to specific neurotransmitter receptors. *Nature*. **389**, 290-293.
- KIM D., JUN K.S., LEE S.B., KANG N.-G., MIN D.S., KIM Y.-H., TYU S.H., SUH P.-G. AND SHIN H.-S. (1997) Phospholipase C isozymes selectively couple to specific neurotransmitter receptors. *Nature*. **389**, 290-293.
- KIM M.J., MIN D.S., TYU S.H. AND SUH P.-G. (1998) A cytosolic, Gαq- and βγ-insensitive splice variant of phospholipase C-β4. *J.Biol.Chem.* **273**, 3618-3624.
- KINGSBURY A., GALLO V., WOODHAMS P.L. AND BÁLAZS R. (1985) Survival, morphology and adhesion properties of cerebellar interneurons cultures in chemically defined and serum-supplemented medium. *Dev.Brain Research* **17**, 17-25.
- KINGSBURY A., GALLO V., WOODHAMS P.L. AND BÁLAZS R. 1985 Survival, morphology and adhesion properties of cerebellar interneurons cultures in chemically defined and serum-supplemented medium. *Dev.Brain Research* **17**, 17-25.
- KLEIN J., IOVINO M., VAKIL M., SHINOZAKI H. AND LÖFFELHOLZ K. (1997) Ontogenic and pharmacological studies on metabotropic glutamate receptors coupled to phospholipase D activation. *Neuropharmacol.* **36**, 305-311.
- KLEUSS C., SCHERUBL H., HESCHELER J., SCHULTZ G. AND WITTING B. (1992) Different beta-subunits determine G-protein interaction with transmembrane receptors. *Nature*. **358**, 424-426.
- KOIZUMI S., BOOTMAN M.D., BOBANOVIC L.K., SCELL M.J, BERRIDGE M.J. AND LIPP P. (1999) Characterization of elementary Ca<sup>2+</sup> release signals in NGF-differentiated PC12 cells and hippocampal neurons. *Neuron*. **22**, 125-137.
- KRAUSE K.-H. AND MICHALAK M. (1997) Calreticulin. *Cell*. **88**, 439-443.
- KRITZ R., LIN L.-L., SUTLZMAN L., ELLIS C., HELDIN C.-K., PAWSON T. AND KNOPF J. (1990) Phospholipase C isozymes: structural and functional similarities. *Ciba Found.Symp.* **150**, 112-127.

- KUBO Y., MIYASHITA T. AND MURATA Y. (1998) Structural basis for a  $Ca^{2+}$  - sensing function of the metabotropic glutamate receptors. *Science*. **279**, 1722-1725.
- KUBOKAWA K., MIYASHITA T., NAGASAWA H. AND KUBO Y. (1996) Cloning and characterization of a bifunctional metabotropic receptor activated by both extracellular calcium and glutamate. *FEBS Lett.* **392**, 71-76.
- KUNER R., KOHR G., GRUNEWALD S., EIXXENHARDT G., BACH A. AND KORNAU H.-C. (1999) Role of heteromer formation in GABA<sub>B</sub> receptor function. *Science* **283**, 74-77.
- KUNO M. AND GARDNER P. (1987) Ion channels activated by inositol 1,4,5-trisphosphate in plasma membrane of human T-lymphocytes. *Nature*. **326**, 301-304.
- LAJAT S., HARBON S. AND TANFIN Z. (1998) Carbachol-induced desensitization of PLC- $\beta$  pathway in rat myometrium: downregulation of G<sub>q</sub> $\alpha$ /G<sub>11</sub> $\alpha$ . *Am.J.Physiol.Soc.* **275**, C636-C645.
- LAMBERT D.G., BURFORD N.T. AND NAHORSKI S.R. (1992) Muscarinic receptor subtypes: inositol phosphates and intracellular calcium. *Biochem Soc. Trans.* **20**, 130-135.
- LAWRIE A.M., RIZZUTO R., POZZAN T. AND SIMPSON A.W.M. (1996) A role for calcium influx in the regulation of mitochondrial calcium in endothelial cells. *J.Biol.Chem.* **271**, 10753-10759.
- LE MELLAY V., GROSSE B. AND LIEBERHERR M. (1997) Phospholipase C  $\beta$  and membrane action of calcitriol and estradiol. *J.Biol.Chem.* **272**, 11902-11907.
- LEE C.-W., LEE K.-H., LEE S.B., PARK D. AND RHEE S.G. (1994) Regulation of phospholipase C- $\beta$ 4 by ribonucleotides and the  $\alpha$  subunit of G<sub>q</sub>. *J.Biol.Chem.* **269**, 25335-25338.
- LEE K.Y., RYU S.H., MOON K.H. AND THEE S.G. (1988) *Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A.* **85**, 5540-5544.
- LEE L.-Y., RYU S.H., SUH P.-G., CHOI W.C. AND RHEE S.G. (1987) Phospholipase C associated with particulate fractions of bovine brain. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **84**, 5540-5544.
- LEE S.B. AND RHEE S.G. (1996) Molecular cloning, splice variants, expression, and purification of phospholipase C- $\delta$ 4 *J.Biol.Chem.* **271**, 25-31.
- LEE S.B. AND RHEE S.G. (1995) Significance of PIP<sub>2</sub> hydrolysis and regulation of phospholipase C isoenzymes. *Curr. Opin. Cell Biol* **7**, 183-189.
- LENZ T. AND KLEINEKE J.W. (1997) Hormone-induced rise in cytosolic Ca<sup>2+</sup> in axolotl hepatocytes: properties of the Ca<sup>2+</sup> influx channel. *Am.J.Physiol.* **273**, C1526-C1532.

- LIN W.-W., LEE C.Y. AND CHUANG D.-M. (1990a) Comparative studies of phosphoinositide hydrolysis induced by endothelin-related peptides in cultures cerebellar astrocytes, C<sub>6</sub>-glioma and cerebellar granule cells. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **168**, 512-519.
- LIPP P. AND NIGGLI E. (1996) A hierarchical concept of cellular and subcellular Ca(2+)-signalling *Prog.biophys.Mol.Biol.* **65**, 265-296.
- LITSCHIG S., GASPARINI F., RUEEGG D., STOEHR N., FLOR P.J., VRANESIC I., PREZEAU L., PIN J.-P., THOMSEN C. AND KUHN R. (1999) CPCCOEt, a noncompetitive metabotropic glutamate receptor 1 antagonist, inhibits receptor signaling without affecting glutamate binding. *Mol.Pharmacol.* **55**, 453-461.
- LIU N., FUKAMI K., YU H. AND TAKENAWA T. (1996) A new phospholipase C  $\delta$ 4 is induced at S-phase of the cell cycle and appears in the nucleus. *J.Biol.Chem.* **271**, 355-360.
- LONGONE P., MOCCHETTI I., RIVA M.A. AND WOJCIK W.J. (1993) Characterization of decrease in muscarinic m<sub>2</sub> mRNA in cerebellar granule cells by carbachol. *Exp.Ther.* **265**: 441-XX.
- LOWRY O.H., ROSEBROUGH L.W., FARR L.W. AND RANDALL R.J. (1951) Protein measurement with Folin phenol reagent. *J.Biol.Chem.* **193**, 265-275.
- LÜCKHOFF A. AND CLAPHAM D.E. (1992) Inositol 1,3,4,5-tetakisphosphate activates an endothelial Ca<sup>2+</sup>-permeable channel. *Nature.* **355**, 356-358.
- MACKRILL J.J. (1999) Protein-protein interactions in intracellular Ca<sup>2+</sup>-release channel function. *Biochem.J.* **337**, 345-361.
- MADGE L., MARSHALL I.C.B. AND TAYLOR C.W. (1997) Delayed autoregulation of the Ca<sup>2+</sup> signals resulting from capacitative Ca<sup>2+</sup> entry to bovine pulmonary artery endothelial cells. *J.Physiol.* **498**, 351-369.
- MAGGIO R., BARBIER P., FORNAI F. AND CORSINI G.U. (1996) Functional role of the third cytoplasmic loop in muscarinic receptor dimerization. *J.Biol.Chem.* **271**, 31055-31060.
- MAILLEUX P., TAKAZAWA K., ERNEUX C. AND VANDERHAEGHEN J.-J. (1991) Inositol 1,4,5-tetraphosphate 3-kinase mRNA: high levels in the rat hippocampal CA1 pyramidal and dentate gyrus granule cells and in cerebellar purkinje cells. *J.Neurochem.* **56**, 345-347.
- MAJERUS P.W., ROS T.S., CUNNINGHAM T.W., CADWELL K.K., JEFFERSON A.B. AND BANSAL V.S. 1990 Recent insights of phosphatidylinositol signalling *Cell* **63**, 459-466.

MALGAROLI A., MILANI D., MELDOLESI J. AND POSSAN T. (1987) Fura-2 measurement of cytosolic free  $Ca^{2+}$  in monlayers and suspensions of various types of animal cells. *J.Cell Biol.* 105, 2145-2155.

MARALDI N.M., COCCO L., CAPITANI S., MAZOTTI G., BARNABEI O. AND MANZOLI F.A. (1994) Lipid-dependent nuclear signalling: morphological and functional features. *Adv.Enzyme Regul.* 34, 129-143.

MARGOLIS B., ZIBERSTEIN A., FRANKS C, FELDER S., KREMER S., ULLRICH A., RHEE S.G., SKORECKI K. AND SCHLESSINGER J. (1988) Effect of phospholipase C- $\gamma$  overexpression on PDGF-induced second messengers and mitogenesis. *Science.* 248, 607-xx

MARTELLI A.M., GILMOUR R.S., BERTAGNOLO V., NERI L.M., MANZOLI L. AND COCCO L. (1992) Nuclear localization and signalling activity of phosphoinositidase C beta in Swiss 3T3 cells. *Nature* 358, 242-245.

MARTONE M.E., ALBA S.A., EDELMAN V.M., AIREY J.A. AND ELLISMAN M.H. (1993) Distribution of inositol-1,4,5-trisphosphate and ryanodine receptors in rat neostriatum. *Brain Res.* 756, 9-21.

MATSUMOTOT M., NAKAGAWA T., INOUE T., NAGATA E., TANAKA K, TANAKO H., MINOEA O., KUNO J., SAKAKIBARA S., YAMADA M., YONESHIMA H., MIYAWAKI A., FUKUUCHI Y., FURUICHI T., OKANO H., MIKOSHIBA K. AND NODA T. (1996) Ataxia and epileptic seizures in mice lacking type 1 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *Nature*, 379, 168-171.

MCCLURE R.J., KANFER J.N., PANCHALINGAM K., KLUNK W.E. AND PETTEGREW J.W. (1995) Magnetic resonance spectroscopy and its application to aging and Alzheimer disease. *Neuroimaging Clin.N.Am.* 5, 69-86.

McLESKEY S.W. AND WOJCIK W.J. (1990) Identification of muscarinic receptor subtypes present in cerebellar granule cells: prevention of [ $^3$ H]propylbenzilylcholine mustard binding with specific antagonist. *Neuropharmacol.* 29: 861-XX.

MELDONESI J. AND POZZAN T. (1998) The endoplasmatic reticulum  $Ca^{2+}$  store: a view from the lumen. *TIBS* 23, 10-14.

MENNITI F.S., OLIVER K.G., PUTNEY J.W.Jr. AND SHEARS S.B. (1993) Inositol phosphates and cell signaling: new views of InsP5 and InsP6 *Trends Biochem.Sci.* 18, 11167-11176.

MENNITI F.S., TAKEMURA H., OLIVER K.G. AND PUTNEY J.W. Jr. (1991) Different modes of regulation for receptors activating phospholipase C in the rat pancreatoma cell line AR4-2J. *Mol.Pharmacol.* 40, 727-733.

MICHELANGELI F., MEZNA M., TOVEY S. AND SAYERS L.G. (1995) Pharmacological modulators of the inositol-1,4,5-triphosphate receptor. *Neuropharmacol.* 34, 111-1122.



- MIKOSHIBA K. (1997) The InsP3 receptor and intracellular Ca<sup>2+</sup> signaling. *Curr.Opin.Neurobiol.* **7**, 339-345.
- MILJANICH G.P. AND RAMACHANDRAN J. (1995) Antagonists of neuronal calcium channels: structure, function, and therapeutic implications. *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.* **35**, 707-734.
- MINAKAMI R., JINNAI N. AND SURGIYAMA H. (1997) Phosphorylation and calmodulin binding of the metabotropic glutamate receptor subtype 5 (mGluR5) are antagonistic in vitro. *J.Biol.Chem.* **272**, 20291-20298.
- MINKE B. AND SELINGER Z. (1992) The inositol-lipid pathway is necessary for light excitation in fly photoreceptors. *Soc.Gen.Physiol.Ser.* **47**, 201-217.
- MISTRY R., PRABHU G., GODWIN M. AND CHALLISS R.A.J. (1996) Stimulatory effects of the putative metabotropic glutamate receptor antagonist L-AP3 on phosphoinositide turnover in neonatal rat cerebral cortex. *Br.J.Pharmacol.* **117**, 1309-1317
- MISTRY T., GOLDING N. AND CHALLISS R.A.J. (1998) Regulation of phosphoinositide turnover in neonatal rat cerebral cortex by group I- and II-selective metabotropic glutamate receptor agonists. *Br.J.Pharmacol.* **123**, 581-589.
- MITCHELL R., McCULLOCH D., LUTZ E., JONHSON M., MACKENZIE C., FENNEL M., FINK G., SHOU W. AND SEALFON S.C. (1998) Rhodopsin-family receptors associate with small G proteins to activate phospholipase D. *Nature.* **392**, 411-414.
- MODY N., HERMANS E., NAHORSKI S.R. AND CHALLISS R.A.J. (1999) Inhibition of the N-linked glycosylation of the human type Ialpha metabotropic glutamate receptor by tunicamycin: effect on cell-surface receptor expression and function. *Neuropharmacol.* **38**, 1493-1503.
- MONTEITH G.R. AND ROUFOGALIS B.D. (1995) The plasma membrane calcium pump- a physiological perspective on its regulation. *Cell Calcium.* **18**, 459-470.
- MONTELL C. (1997) New light on TRP and TRPL. *Mol.Pharmacol.* **52**, 755-763.
- MONTERO M., ALVAREZ J., AND GARCIA-SANCHO J. (1990) Uptake of Ca<sup>2+</sup> and refilling of intracellular Ca<sup>2+</sup> stores in Ehrlich-ascites-tumour cells and in rat thymocytes. *Biochem. J.* **271**, 535-540.
- MORONI F., LOMBARDI G., THOMSEN C., LEONARDI P., ATTUCCI S., PERUGINELLI F., TORREGROSSA S.A., PELLEGRINI-GIAMPIETRO D.E., LUNEIA R., AND PELLICCIARI R. (1997) Pharmacological characterization of 1-aminoindan-1,5-dicarboxylic acid, a potent mGluR1 antagonist. *J.Pharmacol. Exp. Ther.* **281**, 721-729.
- MORRIS A.J. AND SCARLATA S. (1997) Regulation of effectors by G-protein alpha- and beta gamma-subunits. Recent insights from studies of the phospholipase c-beta isoenzymes *Biochem. Pharmacol.* **54**, 429-435.

MULLANEY I., DODD M.W., BUCKLEY N. AND MILLIGAN G. (1993) Agonist activation of transfected human M1 muscarinic acetylcholine receptors in CHO cells results in down-regulation of both the receptor and the  $\alpha$  subunit of the G-protein  $G_q$ . *Biochem.J.* **289**, 125-131.

MUNARON L., ANTONIOTTI S., DISTASI C. AND LOVISOLO D. (1997) Arachidonic acid mediates calcium influx by basic fibroblast growth factor in Balb-3T3 fibroblasts. *Cell Calcium.* **22**, 179-188.

MURPHY S.N. AND MILLER R.J. (1989) Two distinct quisqualate receptors regulate  $Ca^{2+}$  homeostasis in hippocampal neurons in vitro. *Mol Pharmacol.* **35**, 671-680.

MURPHY T.H., WRIGHT D.D. AND BARABAN J.M. (1992) Phosphoinositide turnover associated with synaptic transmission. *J.Neurochem.* **59**, 2336-2339.

MYLES M.E. AND FAIN J.N. (1994) Carbachol, but not norepinephrine, NMDA, ionomycin, ouabain, or phorbol myristate acetate, increases inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate accumulation in rat brain cortical slices. *J.Neurochem.* **62**, 2333-2339.

NAHOSKI S.R., JENKINSON S. AND CHALLISS R.A.J. (1992) Disruption of phosphoinositide signalling by lithium. *Biochem.Soc.Trans.* **20**, 430-434.

NAKANISHI S. (1992) Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain function. *Science.* **258**, 597-603.

NAKANISHI S., NAKAJIMA Y., MASU M., UEDA Y., NAKAHARA K., WATANABE D., YAMAGUCHI S., KAWABATA S., AND OKADA M. (1998) Glutamate receptors: brain function and signal transduction. *Brain Res. Rev.* **26**, 230-235.

NAKANISHI S., NAKAJIMA Y., MASU M., UEDA Y., NAKAHARA K., WATANABE D., YAMAGUCHI S., KAWABATA S., AND OKADA M. (1998) Glutamate receptors: brain function and signal transduction. *Brain Res. Rev.* **26**, 230-235.

NICOLETTI F., BRUNO V., CATANIA M.V., BATTAGLIA G., COPANI A., BARBAGALLO G., CEÑA V., SANCHEZ-PRIETO J., SPANO P.F. AND PIZZI M. (1999) Group-I metabotropic glutamate receptors: hypotheses to explain their dual role in neurotoxicity and neuroprotection. *Neuropharmacol.* **38**, 1477-1484.

NICOLETTI F., WROBLEWSKI J.T., NOVELLI A., ALHO H., GUIDOTTI A. AND COSTA E. (1986) The activation of Inositol Phospholipid metabolism as a signal-transducing system for excitatory amino acids in primary cultures of cerebellar granule cells. *J.Neurosci.* **7**, 1905-1911.

NISHIZUKA Y. (1995) Protein kinase C and lipid signalling for sustained cellular responses. *FASEB.J.* **9**, 484-496.

NORI A.R., FULCERI A., GAMBERUCCI A., BENEDETTI A., VOLPE P. (1996) Biochemical and functional heterogeneity of rat microsomal membranes in relation to SERCA  $Ca^{2+}$ -ATPases and  $Ca^{2+}$  release channels. *Cell calcium.* **19**, 375-381.

NOWYCKY M.C., FOX A.P. AND TSIEN R.W. (1985) Three types of neuronal calcium currents with different calcium agonist-sensitivity. *Nature*. **316**, 440-443.

O'HARA P.J., SHEPPARD P.O., THOGERSEN H., VENEZIA F., HALDEMAN B.A., MCGRANE V., HOUAMED K.M., THOMSEN C., GILBERT T.L. AND MULVIHILL E.R. (1993) The ligand-binding domain in metabotropic glutamate receptors is related to bacterial periplasmic binding proteins. *Neuron* **11**, 41-52.

OBERDORF J., VALLANO M. AND WOJCIKIEWICZ R.J.H. (1997) Expression and regulation of types I and II inositol 1,4,5-triphosphate receptors in rat cerebellar granule cells preparations. *J.Neurochem.* **69**, 1897-1903.

OIKE M., KITAMURA K. AND KURIYAMA H. (1993) Protein kinase C activates the non-selective cation channel in the rabbit portal vein. *Pflügers Archiv*. **424**, 159-164.

OKAMOTO T. AND NISHIMOTO I. (1992) Detection of G protein-activator regions in m4 muscarinic subtype cholinergic and alpha 2-adrenergic receptors based upon characteristics in primary structure. *J.Biol.Chem.* **267**, 8342-8346.

OLIVERA B.M., GRAY W.R., ZEIKUS R., MCINTOSH J.M., VARGA J., RIVIER J., DE SANTOS S.V. AND CRUZ L.J. (1985) Peptide neurotoxins from fish hunting cone snails. *Science*. **230**, 1338-1343.

PAGANO A., RÜEGG D., LITSCHIG S., STOEHR N., STIERLIN C., VRANESIC I., HEINRICH M., FLOR P.J., FLOERSHEIM P., GASPARINI F. AND KUHN R. (1999) The potent mGluR5 antagonist MPEP acts at a novel site in the transmembrane domain.  
**MIAMI**

PAREKH A.B., TERLAU H. AND STÜHMER W. (1993) Depletion of InsP<sub>3</sub> stores activates a Ca<sup>2+</sup> and K<sup>+</sup> current by means of a phosphatase and a diffusible messenger. *Nature*. **364**, 565-568.

PARK D., JHON D.-Y., LEE C.-W., LEE K.-H. AND RHEE S.G. (1993) Activation of phospholipase C isozymes by G protein  $\beta\gamma$  subunits. *J.Biol.Chem.* **268**, 4573-4576.

PARMENTIER M.-L., PIN J.-P., BOCKAERT J. AND GRAU Y. (1996) Cloning and functional expression of a Drosophila metabotropic glutamate receptor expressed in the embryonic central nervous system. *J.Neurosci.* **16**, 6687-6694.

PEARSON H.A., SUTTON K.G., SCOTT R.H. AND DOLPHIN A.C. (1995) Characterization of Ca<sup>2+</sup> channel currents in cultured rat cerebellar granule cells. *J. Physiol* **482**: 493-509.

PELLIGRINI-GIAMPIETRO D.E., TORREGROSSA S.A. AND MORONI F. (1996) Pharmacological characterization of metabotropic glutamate receptors coupled to phospholipase D in the rat hippocampus. *Br.J.Pharmacol.* **118**, 1035-1043.

PEPPELENBOSCH M.P., TERTOOLEN L.G.J., DEN HERTOOG J. AND DE LAAT S.W. (1992) Epidermal growth factor activates calcium channels by phospholipase A2/5-lipoxygenase-mediated leukotriene C4 production. *Cell*. **69**, 295-303.

PETERSEN C.C.H., BERRIDGE M.J., BORGESE M.F. AND BENNETT D.L. (1995) Putative capacitative calcium entry channels: expression of *Drosophila trp* and evidence for the existence of vertebrate homologues. *Biochem.J.* **311**, 41-44.

PETERSEN O.H. (1996) New aspects of cytosolic calcium signalling. *News Physiol.Rev.* **77**, 901-930.

PETERSEN O.H., GERASIMENKO O.V., GERASIMENKO J.V., MOGAMI H. AND TEPIKIN A.V. (1998) The calcium store in the nuclear envelope. *Cell Calcium*. **23**, 87-90.

PICKERING D.S., THOMSEN C., SUZDAK P.D., FLETCHER E.J., ROBITAILLE R., SALTER M.W., MACDONALD J.F., HUANG X.-P. AND HAMPSON D.R. (1993) A comparison of two alternatively spliced forms of a metabotropic glutamate receptor coupled to phosphoinositide turnover. *J.Neurochem.* **61**, 85-92.

PIN J.-P. AND DUVOISIN R. (1995) The metabotropic glutamate receptors: structure and functions. *Neuropharmacol.* **34**, 1-26.

PIN J.-P., GOMEZA J., JOLY C. AND BOCKAERT J. (1995) The metabotropic glutamate receptors: their second intracellular loop plays a critical role in the G-protein coupling specificity. *Biochem.Soc.Trans.* **23**, 91-96.

PINTON P., POZZAN T. AND RIZZUTO R. (1998) The golgi apparatus is an inositol trisphosphate-sensitive  $Ca^{2+}$  store, with distinct functional properties from the endoplasmatic reticulum. *EMBO J.* **17**, 5298-5308.

PIZZI M., FALLACARA C., ARRIGHI V., MEMO M. AND SPANO P.F. (1993) Attenuation of excitatory amino toxicity by metabotropic glutamate receptor agonist and aniracetam in primary cultures of cerebellar granule cells. *J. Neurochem.* **61**, 683-689.

PIZZI M., GALLI P., CONSOLANDI O., ARRIGHI V., MEMO M AND SPANO P.F. (1996) Metabotropic and ionotropic transducers of glutamate signal inversely control cytoplasmatic  $Ca^{2+}$  concentration and excitotoxicity in cultured cerebellar granule cells: pivotal role of protein kinase C. *Mol. Pharmacol* **49**, 586-594.

PIZZO P., FASOLATO C. AND POZZAN T. (1997) Dynamic properties of an inositol 1,4,5-triphosphate- and thapsigargin-insensitive calcium pool in mammalian cell lines. *J.Cell Biol.* **136**, 355-366.

PORTER J.T. AND MCCARTHY K.D. (1997) Astrocytic neurotransmitter receptors *in situ* and *in vivo*. *Progr.Neurobiol.* **51**, 439-455.

POZZAN T., RIZZUTO R., VOLPE P. AND MELDONESI J. (1994) Molecular and cellular physiology of intracellular calcium stores. *Physiol.Rev.* **74**, 595-636.

- PRÉZEAU L., CARETTE J., HELPAP B., CURRY K., PIN J.-P. AND BOCKAERT J. (1994) Pharmacological characterization of metabotropic glutamate receptors in several types of brain cells in primary cultures. *Mol. Pharmacol.* **45**, 570-577.
- PUTNEY J.W. (1990) Capacitative calcium entry revisited. *Cell Calcium.* **11**, 611-624.
- PUTNEY J.W. (1986) A model for receptor-regulated calcium entry. *Cell Calcium.* **7**, 1-12.
- RANDALL A. AND TSIEN R. (1995) Pharmacological dissection of multiple types of  $Ca^{2+}$  channel currents in rat cerebellar granule neurons. *J. Neurosci.* **15**, 2995-3012.
- RANDRIAMAMPITA C., TSIEN R.Y. (1993) Emptying of intracellular  $Ca^{2+}$  stores releases a novel small messenger that stimulates  $Ca^{2+}$  influx. *Nature.* **363**, 809-814.
- RENARD D.C., BOLTON M.M., RHEE S.G., MARGOLIS B.L., SILBERSTEIN A., SCHLESSINGER J. AND THOMAS A.P. (1992) Modified kinetics of platelet-derived growth factor-induced  $Ca^{2+}$  increases in NIH-3T3 cells overexpressing phospholipase C- $\gamma$ 1. *Biochem. J.* **281**, 775-XX.
- RESTREPO D., MIYAMOTO T., BRYANT B.P. AND TEETER J.H. (1990) Odor stimuli trigger influx of calcium into olfactory neurons of the channel catfish. *Science.* **249**, 1166-1168.
- REYES-HARDE M. AND STANTON P.K. (1998) Postsynaptic phospholipase C activity is required for the induction of homosynaptic long-term depression in rat hippocampus. *Neurosci. Lett.* **252**, 155-158.
- RHEE S.G. AND BAE Y.S. (1997) Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C isozymes. *J. Biol. Chem.* **272**, 25045-15048.
- RHEE S.G., KIM H., SUH P.-G. AND CHOI W.C. (1991) Multiple forms of phosphoinositide-specific phospholipase C. *Science.* **255**, 255-XX
- RITTENHOUSE K. (1983) Human platelets contain phospholipase C that hydrolyzes polyphosphoinositides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **80**, 5417-5420.
- RIZZUTO R., BRINI M., MURGIA M. AND POZZAN T. (1993) Microdomains with high  $Ca^{2+}$  close to  $IP_3$ -sensitive channels that are sensed by neighboring mitochondria. *Science.* **262**, 744-747.
- RIZZUTO R., PINTON P., CARRINGTON W., FAY F.S., FOGARTY K.E., LIFSHITZ L.M., TUFT R.A. AND POZZAN T. (1998) Close contacts of endoplasmic reticulum as determinants of mitochondrial  $Ca^{2+}$  responses. *Science.* **280**, 1763-1766.
- ROMANO C., SESMA M.A., MACDONALD C., O'MALLEY K., VAN DEN POL A.N. AND OLNEY W. (1995) Distribution of metabotropic glutamate receptor mGluR5 immunoreactivity in the rat brain. *J. Comp. Neurol.* **355**, 455-469.

ROMANO C., YANG W.-L. AND O'MALLEY K.L. (1996) Metabotropic glutamate receptor 5 is a disulfide-linker dimer. *J.Biol.Chem.* **271**, 28612-28616.

SANTI M.R., IKNOMOVIC S., WROBLEWSKI J.T. AND GRAYSON D.R. (1994) Temporal and depolarization-induced changes in the absolute amounts of mRNAs encoding metabotropic glutamate receptors in cerebellar granule neurons in vitro. *J. Neurochem.* **63**, 1182-1189.

SARRI E., PICATOSTE F. AND CLARO E. (1995) Neurotransmitter-specific profiles of Inositol Phosphates in rat brain cortex: relation to mode of receptor activation of phosphoinositide phospholipase C. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* **272**, 77-84.

SASAGURI T., HIRATA M. AND KURIYAMA H. (1985) Dependence on  $Ca^{2+}$  of activities of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate phosphodiesterase and inositol 1,4,5-triphosphate phosphatase in smooth muscles of the porcine coronary artery. *Biochem.J.* **231**, 497-503.

SAUNDERS P.A., HOUGH C.J. AND CHUANG D.-M. 1996 Antagonists have a greater selectivity for muscarinic receptor subtypes in intact cerebellar granule cells than in membranes. *Brain Research.* **713**, 29-35.

SAUNDERS R., NAHORSKI S.R. AND CHALLISS R.A.J. (1998) A modulatory effect of extracellular  $Ca^{2+}$  on type 1 $\alpha$  metabotropic glutamate receptor-mediated signalling. *Neuropharmacol.* **37**, 273-276.

SCAAN A.I., SANTORINI E.M., AND RAO T.S. (1998) (S)-4-Carboxy-3-hydroxyphenylglycine Activates phosphatidylinositol linked metabotropic glutamate receptors in different brain regions of the neonatal rat. *Neurochem. Int.* **32**, 77-85.

SCHOEPP D.D., JANE D.E. AND MONN J.A. (1999) Pharmacological agents acting at subtypes of metabotropic glutamate receptors. *Neuropharmacol.* **38**, 1431-1476.

SCHOEPP D.D., SALHOFF C.R., WRIGHT R.A., JOHNSON B.G., BURNET J.P., MAYNE N.G., BELAGAJE R., WU S. AND MONN J.A. (1996b) The novel metabotropic glutamate receptor agonist 2R,4R-APDC potentiates stimulation of phosphoinositide hydrolysis in the rat hippocampus by 3,5-dihydroxyphenylglycine: evidence for a synergistic interaction between group I and group 2 receptors. *Neuropharmacol.* **35**, 1661-1672

SCHÖNEBERG T., LIU J. AND WESS J. (1995) *J.Biol.Chem.* **270**, 18000-18006.

SCOTT R.H., CURRIE K.P.M., SUTTON K.G. AND DOLPHIN A.C. (1992) Modulation of neuronal  $Ca^{2+}$ -dependent currents by neurotransmitters, G-proteins and toxins. *Biochem.Soc.Trans.* **20**, 443-449.

SEKIYA F., BAE Y.S., JHON D.Y., HWANG S.V. AND RHEE S.G. (1999) AHNAK, a protein that binds and activates phospholipase C- $\gamma$ 1 in the presence of arachidonic acid. *J.Biol.Chem.* **274**, 13900-13907.

- SERVITJA J.-M., MASGRAU R., SARRI E. AND PICATOSTE F. (1999) Group I metabotropic glutamate receptors mediate phospholipase D stimulation in rat cultured astrocytes. *J.Neurochem.* **72**, 1441-1447.
- SHEARS S.B. (1998) The versatility of inositol phosphates as cellular signals. *Biochem. Biophys. Acta.* **1436**, 49-67.
- SHEARS S.B. (1989) Metabolism of the inositol phosphates produced upon receptor activation. *Biochem. J.* **260**, 313-324.
- SHUTTLEWORTH T.J. (1996) Arachidonic acid activates noncapacitative entry of  $Ca^{2+}$  during  $[Ca^{2+}]_i$  oscillations. *J.Biol.Chem.* **271**, 21710-21725.
- SIMPSON P.B., CHALLISS R.A.J. AND NAHORSKI S.R. (1995) Neuronal  $Ca^{2+}$  stores: activation and function. *TINS.* **18**, 299-306.
- SIMPSON P.B., CHALLISS R.A.J. AND NAHORSKI S.R. (1994) Chronic activation of muscarinic and metabotropic glutamate receptors down-regulates type I inositol 1,4,5-triphosphate receptor expression in cerebellar granule cells. *J.Neurochem.* **63**, 2369-2373.
- SIMPSON P.B., CHALLISS R.A.J. AND NAHORSKI S.R. (1993) Involvement of intracellular stores in the  $Ca^{2+}$  responses to N-methyl-D-aspartate and depolarization in cerebellar granule cells. *J.Neurochem.* **61**, 760-763.
- SIMPSON P.B., CHALLISS R.A.J., AND NAHORSKI S.R. (1995) Neuronal  $Ca^{2+}$  stores: activation and function. *Trends Neurosci.* **7**, 299-306.
- SIMPSON P.B., NAHORSKI S.R., AND CHALLISS R.A.J. (1996) Agonist-evoked  $Ca^{2+}$  mobilization from stores expressing inositol 1,4,5-trisphosphate receptors and ryanodine receptors in cerebellar granule cells. *J. Neurochem.* **67**, 364-373.
- SINGH I.N., SORRENTINO G. AND KANFER J.N. (1997) Amyloid  $\beta$  protein (25-35) stimulation of phospholipase C in LA-N-2 cells. *Alshemers Res.* **2**, 252-258.
- SMRCKA A.V. AND STERNWEIS P.C. (1993) Regulation of purified subtypes of phosphatidylinositol-specific phospholipase C  $\beta$  by G protein  $\alpha$  and  $\beta\gamma$ -subunits. *J.Biol.Chem.* **268**, 9667-74
- SORIANO S. AND BANTING G. (1997) Possible roles of inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase B in calcium homeostasis. *FEBS Lett.* **403**, 1-4.
- SPIEGEL S., FOSTER D. AND KOLESNICK R. (1996) Signal transduction through lipid second messengers. *Curr.Opin.Cell Biol.* **8**, 159-167.
- STAUDERMAN K.A. AND PRUSS R.M. (1990) Different patterns of agonist-stimulated increases of  $^3H$ -inositol phosphate isomers and cytosolic  $Ca^{2+}$  in bovine adrenal chromaffin cells: comparison of the effects of histamine and angiotensin II. *J.Neurochem.* **54**, 946-XX.

STEHNO-BITTEL L., KRAPIVINSKY G., KRAPIVINSKY L., PEREZ-TERZIC C. AND CLAPHAM D.E. (1995) The G protein  $\beta\gamma$  subunit transduces the muscarinic receptor signalling for  $\text{Ca}^{2+}$  release in *Xenopus* oocytes. *J.Biol.Chem.* **270**, 30068-30074.

STREB H., IRVINE R.F., BERRIDGE M.J. AND SCHULZ L.. (1983) Release of  $\text{Ca}^{2+}$  from a nonmitochondrial intracellular store in pancreatic acinar cells by inositol 1,4,5-triphosphate. *Nature.* **306**, 67-69.

SUNAHARA R.K., DESSAUER C.W. AND GILMAN A.G. (1996) Complexity and diversity of mammalian adenylyl cyclases. *Ann.Rev.Pharmacol.Toxicol.* **36**, 461-480.

TAKAHASHI K., TSUCHIDA K., TANABE Y., MASU M. AND NAKANISHI S. (1993) Role of the large extracellular domain of metabotropic glutamate receptors in agonist selectivity determination. *J.Biol.Chem.* **268**, 19341-10345.

TAKEMURA H., HUGUES A.R., THASTRUP O. AND PUTNEY J.W. JR. (1989) Activation of calcium entry by the tumor promoter thapsigargin in parotid acinar cells. Evidence that an intracellular calcium pool, and not an inositol phosphate, regulates calcium fluxes at the plasma membrane. *J.Biol.Chem.* **264**, 12266-12271.

TANABE Y., MASU M., ISHII T., SHIGEMOTO R. AND NAKANISHI S. (1992) A family of metabotropic glutamate receptors *Neuron.* **8**, 169-179.

TANAKA C. AND NISHIZUKA Y. (1994) The protein kinase C family for neuronal signalling. *Annu. Rev. Neurosci* **17**, 551-567.

TAREILUS E. AND BREER H. (1995) Presynaptic calcium channels: pharmacology and regulation. *Neuropharmacol.* **26**, 539-558.

TAYLOR C.W. (1995) Who do hormones stimulate  $\text{Ca}^{2+}$  mobilization? *Biochem.Soc.Trans.* **23**, 637-642.

TAYLOR C.W. (1998) Inositol trisphosphate receptors:  $\text{Ca}^{2+}$  -modulated intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  channels. *Biochem. Biophys. Acta* **1436**, 19-33.

TAYLOR C.W. AND BROAD L.M. (1998) Pharmacological analysis of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  signalling: problems and pitfalls. *Trends Pharmacol. Sci.* **19**, 370-375.

TAYLOR C.W. AND TRAYNOR D. (1995) Calcium and inositol triphosphate receptors. *J.Membr.Biol.* **145**, 109-118.

TERASAKI M., TRAVERSE SLATER N., FEIN A., SCHMIDEK A. AND REESE T.S. (1994) Continuous network of endoplasmic reticulum in cerebellar purkinje neurons. *Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A.* **91**, 7510-7514.

THANGNIPON W., KINGSBURY A., WEBB M. AND BÁLAZS R. (1983) Observations on rat cerebellar cells in vitro: influence of substratum, potassium concentration and relationship between neurones and astrocytes. *Dev.Brain Research* **11**, 177-189.



THANGNIPON W., KINGSBURY A., WEBB M. AND BÁLAZS R. (1983) Observations on rat cerebellar cells in vitro: influence of substratum, potassium concentration and relationship between neurones and astrocytes. *Dev. Brain Research*. 11, 177-189.

THOMAS G.M.H., GENY B. AND COCKROFT S. (1991) Identification of a novel cytosolic poly-phosphoinositide-specific phospholipase C (PLC-86) as the major G-protein-regulated enzyme. *EMBO J.* 10, 2507-2512.

THOMSEN C., MULVIHILL E.R., HALDEMAN B., PICKERING D.S., HAMPSON D.R. AND SUZDAK P.F. (1993) A pharmacological characterization of the mGluR1 $\alpha$  subtype of the metabotropic glutamate receptor expressed in a cloned baby hamster kidney cell line. *Brain Res.* 619, 22-28.

TOBIN A.B., KEYS B. AND NAHORSKI S.R. (1996) Identification of a novel receptor kinase that phosphorylates a phospholipase C-linked muscarinic receptor. *J. Biol. Chem.* 271, 3907-3916.

TOBIN A.B., TOTTY N.F., STERLIN A.E. AND NAHORSKI S.R. (1997) Stimulus-dependent phosphorylation of G-protein-coupled receptors by casein kinase 1 $\alpha$ . *J. Biol. Chem.* 33, 20844-20849.

TOESCU E.C., O'NEILL S.C., PETERSEN O.H., EISNER D.A. (1992) Caffeine inhibits the agonist-evoked cytosolic Ca<sup>2+</sup> signal in mouse pancreatic acinar cells by blocking inositol trisphosphate production. *J. Biol. Chem.* 267, 23467-23470.

TOKER A. (1998) The synthesis and cellular roles of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Cur. Op. Cell Biol.* 10, 254-261.

TOMS N.J., JANE D.E., TSE H.W. AND ROBERTS P.J. (1995) Characterization of metabotropic glutamate receptor-stimulated phosphoinositide hydrolysis in rat cultured cerebellar granule cells. *Br. J. Pharmacol* 116, 2824-2827.

TONES M.A., BENDALI N., FLOR P.J., KNÖPFEL T. AND KUHN R. (1995) The agonist selectivity of a class III metabotropic glutamate receptor, human mGluR4a is determined by the N-terminal extracellular domain. *Neuroreport* 7, 117-120.

TORRES R., FIRESTEIN B.L., DONG H., STAUDINGER J., OLSON E.N., HUGANIR R.L., BREDT D.S., GALE N.W. AND YANCOPOULOS D. (1998) PDZ protein binds, clusters, and synaptically colocalizes with Eph receptors and their Ephrin ligands. *Neuron.* 21 1453-1463.

TOYOSHIMA C., SASSABE H. AND STOKES D.L. (1993) Three-dimensional cryo-electron microscopy of the calcium ion pump in the sarcoplasmic reticulum membrane. *Nature.* 362, 469-471.

TSIEN R.Y. (1980) New calcium indicators and buffers with high selectivity against magnesium and protons: design, synthesis, and properties of prototype structures. *Biochem.* 19, 2396-2404.

TU J.C., XIAO B., NAISBITT S., YUAN J.P., PETRALIA R.S., BRAKEMAN P., DOAN A., AAKALU V.K., LANAHAN AA., SHENG M. AND WORLEY P.F. (1999) Coupling of mGluR/Homer and PSD-95 complexes by the Shank family of postsynaptic density proteins. *Neuron*. **23**, 583-592.

- VAJANAPHANICH M., SCHULTZ C., RUDOLF M.T., WASSERMAN M., ENYEDI P., CRAXTON A., SHEARS S.B., TSIEN R.Y., BARRETT K.E. AND TRAYNOR-KAPLAN A.E. (1994) Long-term uncoupling of chloride secretion from intracellular calcium levels by Ins(3,4,5,6)P<sub>4</sub>. *Nature*. **371**, 7711-714.
- VAN DEN POL A.N., (1994) Metabotropic glutamate receptor mGluR1 distribution and ultrastructural localization in hypothalamus. *J.Comp.Neurol.* **349**, 615-632.
- VAN DEN POL A.N., ROMANO C. AND GHOSH P. (1995) Metabotropic glutamate receptor mGluR5 subcellular distribution and developmental expression in hypothalamus. *J.Comp.Neurol.* **362**, 134-150.
- VARNEY M.A., COSFORD N.D.P., JACHEC C., RAO S.P., LIN F.-F., BLEICHER L., SANTORINI E.M., FLOR P.J., ALLGEIER H., GASPARINI F., KUHN R., HESS S.D., VELIÇELEBI G. AND JOHNSON E.C. (1999) SIB-1757 and SIB-1893, noncompetitive antagonists of metabotropic glutamate receptor type 5. *J.Pharmacol. Exp. Ther.* **290**, 170-181.
- VERKHRATSKY A.J. AND PTERSEN O.H. (1998) Neuronal calcium stores. *Cell Calcium* **24**, 333-343.
- VIGNES M., BLANC E., DAVOS F., GUIRAMAND J. AND RÉCASSENS M. (1996) Cadmium rapidly and irreversibly blocks presynaptic phospholipase C-linked metabotropic glutamate receptors *Neurochem.Int* **29**, 371-381.
- WAKELAM M.J.O. (1998) Diacylglycerol - when is it an intracellular messenger? *Biochem. Biophys. Acta* **1436**, 117-126.
- WALLACE M.A. (1994) Effects of Alzheimer's disease-related  $\beta$ -amyloid protein fragments on enzymes metabolizing phosphoinositides in brain. *Biochem. Biophys. Acta* **1227**, 183-187.
- WALZ B. (1982) Calcium-sequestering smooth endoplasmatic reticulum in retinula cells of the blowfly. *J.Ultrastruc.Res.* **81**, 240-248.
- WATANABE M., NAKAMURA M., SATO K., KANO M., SIMON M.I. AND INOUE Y. (1998) Patterns of expression for the mRNA corresponding to the four isoforms of phospholipase C $\beta$  in mouse brain. *Eur.J.Neurosci.* **10**, 2016-2025.
- WES P.D., CHEVESICH J., JEROMIN A., ROSENBERG C., STETTEN G. AND MONTELL C. (1995) TRPC1, a human homolog of *Drosophila* store-operated channel. *Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A.* **92**, 9652-9656.
- WESS J., BONNER T.I., DORJE F. AND BRANN M.R. (1990) Delineation of muscarinic receptor domains conferring selectivity of coupling to guanine nucleotide-binding proteins and second messengers. *Mol.Pharmacol.* **38**, 517-523.

WHITHAM E.M., CHALLISS R.A.J. AND NAHORSKI S.R. (1991) M<sub>3</sub> muscarinic cholinergic receptors are linked to phosphoinositide metabolism in rat cerebellar granule cells. *Eur.J.Pharmacol.* **206**, 181-189.

WILLARS G.B. AND NAHORSKI S.R. (1995) Heterologous desensitization of both phosphoinositide and Ca<sup>2+</sup> signaling in SH-SY5Y neuroblastoma cells: a role for intracellular Ca<sup>2+</sup> store depletion?. *Mol. Pharmacol.* **47**, 509-516.

WILLARS G.B. AND NAHORSKI S.R. (1995b) Heterologous desensitization of both phosphoinositide and Ca<sup>2+</sup> signaling in SH-SY5Y neuroblastoma cells: a role for intracellular Ca<sup>2+</sup> store depletion?. *Mol. Pharmacol.* **47**, 509-516.

WILLARS G.B. AND NAHORSKI S.R. (1995a) Quantitative comparisons of muscarinic and bradykinin receptor-mediated Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> and Ca<sup>2+</sup> signalling in human neuroblastoma cells. *Br.J.Pharmacol.* **114**, 1133-1142.

WILLARS G.B., CHALLISS R.A.J. , STUART J.A. AND NAHORSKI S.R. (1996) Contrasting effects of phorbol ester and agonist-mediated activation of protein kinase C on phosphoinositide and Ca<sup>2+</sup> signalling in a human neuroblastoma. *Biochem.J.* **316**, 905-913.

WILLARS G.B., NAHORSKI S.R. AND CHALLISS R.A.J. (1998) Differential regulation of muscarinic acetylcholine receptor-sensitive polyphosphoinositide pools and consequences for signaling in human neuroblastoma cells. *J.Biol.Chem.* **273**, 5037-5046.

WROBLEWSKI J.T., NICOLETTI F. AND COSTA E. (1987) Different coupling of excitatory amino acid receptors with Ca<sup>2+</sup> channels in primary cultures of cerebellar granule cells. *Neuropharmacol.* **24**, 919-921.

WROJCIKIEWICZ R.J.H., LAMBERT D.G. AND NAHORSKI S.R. (1990) Regulation of muscarinic agonist-induced activation of phospholipase C in electrically permeabilized SH-SY5Y human neuroblastoma cells by guanine nucleotides. *J.Neurochem.* **34**, 676-685.

WROJCIKIEWICZ R.J.H., TOBIN A.B. AND NAHORSKI S.R. (1993) Desensitization of cell signalling mediated by phosphoinositidase C. *Trends.Pharmacol.Sci.* **14**, 279-285.

WROJCIKIEWICZ R.J.H., TOBIN A.B. AND NAHORSKI S.R. (1994a) Muscarinic receptor mediated inositol 1,4,5-triphosphate formation in SH-SY5Y neuroblastoma cells is regulated acutely by cytosolic Ca<sup>2+</sup> and by rapid desensitization. *J.Neurochem.* **63**, 177-185.

WROJCIKIEWICZ R.J.H., FURUICHI T., NAKADE S., MIKOSHIBA K AND NAHORSKI S.R. (1994b) Muscarinic receptor activation down-regulates the type I inositol 1,4,5-triphosphate receptor by accelerating its degradation. *J.Biol.Chem.* **269**, 7963-XX

WU D., LEE C.H., RHEE S.G. AND SIMON M.I. (1992) Activation of phospholipase C by the  $\alpha$ -subunits of the G<sub>q</sub> and G<sub>11</sub> proteins in transfected COS-7 cells. *J.Biol.Chem* **267**, 1811-1817.

WU K.D., LEE W.S., WEY J., BUNGARD D. AND LYTTON J. (1995) Localization and quantification of endoplasmatic reticulum  $Ca^{2+}$ -ATPase isoform transcripts. *Am.J.Physiol.* **269**, C775-C784.

XU J. AND CHUANG D.-M. (1987b) Muscarinic acetylcholine receptor-mediated phosphoinositide turnover in cultured cerebellar granule cells: desensitization by receptor agonists. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* **242**, 238-244.

XU J. AND CHUANG D.-M. (1987a) Serotonergic, adrenergic and histaminergic receptors coupled to phospholipase C in cultured cerebellar granule cells of rats. *Biochem.Pharmacol.* **36**, 2353-2358.

YAGISAWA H., TANASE H. AND NOJIMA H. (1991) Phospholipase C-delta gene of the spontaneously hypertensive rat harbors point mutations causing amino acid substitutions in a catalytic domain. *J.Hypertens.* **9**, 997-1004.

YAN G.-M., IRWIN R.P. AND PAUL S.M. (1994) Activation of muscarinic cholinergic receptors blocks apoptosis of cultured cerebellar granule neurons. *Mol. Pharmacol.* **47**, 248-257.

YAUD C.M., CHOU S.-P., WANG Y.-Y., HSIEH J.-T. AND ONG R. (1993) Muscarinic regulation of cytosolic free calcium in canine tracheal smooth muscle cells:  $Ca^{2+}$  requirement for phospholipase C activation. *Br.J.Pharmacol.* **110**, 1239-1247.

YOO S.H. (1994) pH-dependent interaction of chromogranin A with integral membrane proteins of secretory vesicle including 260-kDa protein reactive to inositol 1,4,5-triphosphate receptor antibody. *J.Biol.Chem.* **269**, 12001-12006.

YOO S.H. AND LEWIS M.S. (1995) Thermodynamic study of the pH-dependent interaction of chromogranin A with an intraluminal loop peptide of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *Biochem.* **34**, 632-638.

ZHANG G., KAZANICTZ M.G., BLUMBERG P.M. AND HURLEY J.H. (1995) Crystal structure of the Cys2 activator binding domain of protein kinase  $C\gamma$  in complex with phorbol ester. *Cell.* **81**, 917-924.

ZHANG J.-F., RANDALL A.D., ELLINOR P.T., HORNE W., SATHER W.A., TANABE T., SCHWARZ T.L. AND TSIEN R.W. (1993) Distinctive pharmacology and kinetics of cloned neuronal  $Ca^{2+}$  channels and their possible counterparts in mammalian CNS neurons. *Neuropharmacol.* **32**, 1075-1088.

ZHANG X., HARTZ P.A., PHILIP E., RACUSEN L.C. AND MAJERUS P.W. (1998) Cell lines from kidney proximal tubules of a patient with Lowe syndrome lack OCRL inositol polyphosphate 5-phosphatase and accumulate phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *J.Biol.Chem.* **273**, 1574-1582.

ZHU X. AND BRNBAUMER L. (1998) Calcium channels formed by mammalian Trp homologues. *News.Phys.Sci.* **13**, 211-217.

ZHU X., JIANG M.S., PEYTON M., BOULAY G., HURST R., STEFANI E. AND BIRNBAUMER L. (1996) TRP, a novel mammalian gene family essential for agonist-activated capacitative  $Ca^{2+}$  entry. *Cell* **85**, 661-671.

ZITT C., SOBEL A., OBUKHOV A.G., HARTENECK C., KALKBRENNER F., LUCKHOFF A. AND SCHULTZ G. (1996) Cloning and functional expression of a human  $Ca^{2+}$ -permeable cation channel activated by calcium store depletion. *Neuron*. **16**, 1189-1196.

**ANNEX**





## Intracellular Ca<sup>2+</sup> Stores Regulate Muscarinic Receptor Stimulation of Phospholipase C in Cerebellar Granule Cells

Roser Masgrau, Joan-Marc Servitja, Elisabet Sarri, \*Kenneth W. Young, \*Stefan R. Nahorski, and Fernando Picatoste

*Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Facultat de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra (Barcelona), Catalonia, Spain, and \*Department of Cell Physiology and Pharmacology, Medical Science Building, University of Leicester, Leicester, England*

**Abstract:** Muscarinic receptor activation of phosphoinositide phospholipase C (PLC) has been examined in rat cerebellar granule cells under conditions that modify intracellular Ca<sup>2+</sup> stores. Exposure of cells to medium devoid of Ca<sup>2+</sup> for various times reduced carbachol stimulation of PLC with a substantial loss (88%) seen at 30 min. A progressive recovery of responses was observed following the reexposure of cells to Ca<sup>2+</sup>-containing medium (1.3 mM). However, these changes did not appear to result exclusively from changes in the cytosolic Ca<sup>2+</sup> concentration ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>), which decreased to a lower steady level (~25 nM decrease in 1–3 min after extracellular omission) and rapidly returned (within 1 min) to control values when extracellular Ca<sup>2+</sup> was restored. Only after loading of the intracellular Ca<sup>2+</sup> stores through a transient 1-min depolarization of cerebellar granule cells with 40 mM KCl, followed by washing in nondepolarizing buffer, was carbachol able to mobilize intracellular Ca<sup>2+</sup>. However, the same treatment resulted in an 80% enhancement of carbachol activation of PLC. In other experiments, partial depletion of the Ca<sup>2+</sup> stores by pretreatment of cells with thapsigargin and caffeine resulted in an inhibition (18 and 52%, respectively) of the PLC response. Furthermore, chelation of cytosolic Ca<sup>2+</sup> with BAPTA/AM did not influence muscarinic activation of PLC in either the control or predepolarized cells. These conditions, however, inhibited both the increase in [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> and the PLC activation elicited by 40 mM KCl and abolished carbachol-induced intracellular Ca<sup>2+</sup> release in predepolarized cells. Overall, these results suggest that muscarinic receptor activation of PLC in cerebellar granule cells can be modulated by changes in the loading state of the Ca<sup>2+</sup> stores. **Key Words:** Phospholipase C—Ca<sup>2+</sup> stores—Muscarinic receptors—Cerebellar granule cells

*J Neurochem* 74, 818–826 (2000).

inositol 1,4,5-trisphosphate (Ins1,4,5,-P<sub>3</sub>), which mobilizes Ca<sup>2+</sup> from intracellular stores. Agonist stimulation of PLC has been shown to be Ca<sup>2+</sup>-dependent in several receptor systems, and the significance of such signalling in excitable cells has been outlined recently (Simpson et al., 1995; Berridge, 1998).

Cerebellar granule cells in primary culture express several neurotransmitter receptors coupled to PLC activation and have been used as a neuronal model system to study the characteristics of this signalling pathway (Nicoletti et al., 1986; Xu and Chuang, 1987; Dillon-Carter and Chuang, 1989; Lin et al., 1990a). In these cells, muscarinic cholinergic receptors of the M<sub>3</sub> subtype (Whitham et al., 1991) elicit a robust PLC response that is dependent on extracellular Ca<sup>2+</sup> (Lin et al., 1990b; del Río et al., 1994; Lin and Wang, 1996). Depolarization of these cells with high K<sup>+</sup> concentrations results in extracellular Ca<sup>2+</sup> entry (Ciardo and Meldolesi, 1991; Irving et al., 1992a,b; Fohrman et al., 1993; del Río et al., 1994) and synergistic potentiation of muscarinic activation of PLC (del Río et al., 1994). Under these conditions, del Río et al. (1994) have reported a correlation between small increases of cytosolic free Ca<sup>2+</sup> concentrations ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>) and the potentiation of PLC activation, suggesting a high Ca<sup>2+</sup> sensitivity of the stimulated PLC. This correlation, however, is not maintained when Ca<sup>2+</sup> entry is triggered by a Ca<sup>2+</sup> ionophore, raising the possibility that factors other than increased [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> could be involved in the Ca<sup>2+</sup> dependency of muscarinic stimulation of PLC.

Received June 9, 1999, revised manuscript received August 2 1999, accepted September 30, 1999

Address correspondence and reprint requests to Dr. F. Picatoste at Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Facultat de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra (Barcelona), Catalonia, Spain. E-mail: Fernando.Picatoste@uab.es

**Abbreviations used.** AM, acetoxymethyl ester, BAPTA, 1,2-bis(4-aminophenoxy)ethane-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid, [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, cytosolic Ca<sup>2+</sup> concentration, Cch, carbachol, InsPs, inositol phosphates, Ins1,4,5-P<sub>3</sub>, inositol 1,4,5-trisphosphate, KH buffer, Krebs-Henseleit, HEPES buffer, PLC, phosphoinositide phospholipase C

In the nervous tissue, stimulation of phosphoinositide phospholipase C (PLC) may be elicited by a wide variety of neurotransmitter receptors (Fisher et al., 1992). This response leads to the generation of diacylglycerol, which stimulates several isoenzymes of protein kinase C and

Although muscarinic receptor activation can mobilize Ca<sup>2+</sup> from intracellular stores in cerebellar granule cells, some discrepant results have been reported. Several authors have shown that, under nondepolarizing conditions, muscarinic agonists elicit a rapid and transient increase of [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, due to intracellular Ca<sup>2+</sup> mobilization (Courtney and Nicholls, 1992; Irving et al., 1992a; Simpson et al., 1996). Other authors, however, observed this response only after a previous period of high K<sup>+</sup> depolarization (Fohrman et al., 1993), which triggers Ca<sup>2+</sup> entry and allows the replenishment of intracellular Ca<sup>2+</sup> stores (Murphy and Miller, 1989). Under such conditions, agonist-induced Ca<sup>2+</sup> mobilization becomes independent of extracellular Ca<sup>2+</sup> and dependent on the filling state of the intracellular Ca<sup>2+</sup> stores.

In this work, we have determined the effect of different conditions that modify either the levels of stored Ca<sup>2+</sup> or the [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, on carbachol (Cch)-stimulated PLC. These included lowering of stored Ca<sup>2+</sup> by preincubation in low extracellular Ca<sup>2+</sup>, thapsigargin, or caffeine, filling of the stores by a previous depolarization, and treatment with the cytosolic Ca<sup>2+</sup> chelator 1,2-bis(*o*-aminophenoxy)ethane-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid acetoxy methyl ester (BAPTA/AM). Our results suggest that changes in the levels of Ca<sup>2+</sup> in the intracellular stores can modulate muscarinic receptor activation of PLC in cerebellar granule cells.

## MATERIALS AND METHODS

### Cell culture

Experiments were performed on primary cerebellar granule cell cultures prepared from 7–8-day-old rats. In brief, rats were decapitated and cerebella immediately dissected out. After meninges and blood vessels were removed, the tissue was minced and incubated for 10 min at 37°C in Ca<sup>2+</sup>-free Krebs–Ringer buffer containing 0.0025% trypsin. Cells were then mechanically triturated through a fine-polished glass pipette and filtered through a 40- $\mu$ m nylon mesh in the presence of 0.52 mg/ml soybean trypsin inhibitor and 170 IU/ml DNase. After centrifugation (500 g), cells were plated on poly-L-lysine-precoated plates or glass coverslips at a density of  $1.5 \times 10^6$  viable cells/ml, respectively, in basal medium Eagle, supplemented with 10% fetal calf serum, 33 mM glucose, 2 mM glutamine, 50 IU/ml penicillin, 50  $\mu$ g/ml streptomycin, and 25 mM KCl. After 24 h, cytosine arabinoside was added to a final concentration of 10  $\mu$ M to prevent glial cell proliferation. Cultures were incubated at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>/95% air and used after 8–9 days in vitro.

### Determination of PLC activity

PLC activity was assayed by measuring the accumulation of <sup>3</sup>H-labeled inositol mono- and polyphosphates (<sup>3</sup>H-InsPs) in the presence of 10 mM LiCl. Cerebellar granule cell monolayers in 24-well plates were prelabeled with 2  $\mu$ Ci/ml *myo*-[<sup>3</sup>H]inositol for 24 h. Media were then removed, and cells were washed and incubated for 30 min in Krebs–Henseleit/HEPES (KH) buffer (in mM: NaCl 113, KCl 4.7, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2, MgSO<sub>4</sub> 1.2, NaHCO<sub>3</sub> 25, glucose 11, and HEPES 5, with or without CaCl<sub>2</sub> 1.3 added, pH 7.4 equilibrated with 5% O<sub>2</sub>/95% CO<sub>2</sub> at 37°C). Omission of CaCl<sub>2</sub> in the KH buffer resulted in extracellular Ca<sup>2+</sup> concentrations of <1  $\mu$ M as fluorimetrically

assessed with fura-2. Buffer was then aspirated, and cells were incubated for 1 min with 0.5 ml of buffer containing 10 mM LiCl with or without agonist. When appropriate, cells were preincubated for 20 min with antagonists or other compounds before the addition of agonists, and these compounds were also present during stimulation. Reactions were terminated with 0.8 ml of ice-cold methanol, cells were then scraped and transferred to test tubes with 0.9 ml of chloroform, and two phases were generated by adding 0.75 ml of 0.17 M HCl. After a 5-min centrifugation at 2,000 g, 1-ml aliquots of the aqueous phases were neutralized with 1.5 M NH<sub>4</sub>OH and applied to a Dowex (AG1-X8) formate column. <sup>3</sup>H-InsPs were eluted with 9 ml of 1 M ammonium formate/0.1 M formic acid and counted by liquid scintillation spectrometry as described previously (Claro et al., 1993). The organic phases containing <sup>3</sup>H-InsPs were washed with 1.55 ml of methanol/water (1:1, vol/vol), and 0.2-ml aliquots were also counted for radioactivity. Accumulation of <sup>3</sup>H-InsPs was calculated as the percentage of <sup>3</sup>H-lipids. Statistical significances were evaluated by analysis of variance followed by Dunnett's test for multiple comparisons using the SAS statistical package. Significance was fixed at  $p < 0.05$ .

### [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>

Experiments were performed with cerebellar granule cell monolayers grown on glass coverslips. In brief, culture medium was removed and cells loaded with the Ca<sup>2+</sup> indicator fura-2 by bathing them in a KH buffer containing 2  $\mu$ M fura-2/AM for 60 min at room temperature. Cells were then rinsed and the coverslips mounted on the stage of a Nikon Diaphot inverted epifluorescence microscope. When cells were loaded with both fura-2 and BAPTA, BAPTA/AM was added. From this point, cells were maintained in KH buffer at 37°C. After excitation at 340 and 380 nm, fluorescent images at wavelengths of >510 nm were collected with an intensified charge-coupled device camera (Photonic Science), and the 340/380 ratios were converted to approximated Ca<sup>2+</sup> concentrations using the Applied Imaging Quanticell 700 System. A calibration curve was performed according to the method of Grynkiewicz et al. (1985). When [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> levels were estimated, 20–25 cells were analyzed in each culture, and the mean values from different cultures were averaged.

### Materials

Cch chloride, fura-2/AM, trypsin, soybean trypsin inhibitor, DNase I, and poly-L-lysine were purchased from Sigma. Ionomycin free acid was from Calbiochem and BAPTA/AM, thapsigargin, and caffeine were from Alexis Biochemicals. *myo*-[<sup>3</sup>H]inositol was from Amersham, and all cell culture media and reagents were from GIBCO Life Technologies. Other chemicals used were of analytical grade.

## RESULTS

### Effect of changes of extracellular Ca<sup>2+</sup> on Cch and K<sup>+</sup> stimulation of PLC

Stimulation of *myo*-[<sup>3</sup>H]inositol-labelled cerebellar granule cells with 1 mM Cch for 1 min in the presence of 10 mM LiCl resulted in an increased accumulation of <sup>3</sup>H-InsPs (3.5–4.0-fold of basal). The addition of LiCl at the same time as Cch was found to be effective allowing the accumulation of <sup>3</sup>H-InsPs, because in its presence the net Cch response was amplified more than threefold (in the presence of LiCl: basal,  $3.54 \pm 0.21$  dpm of

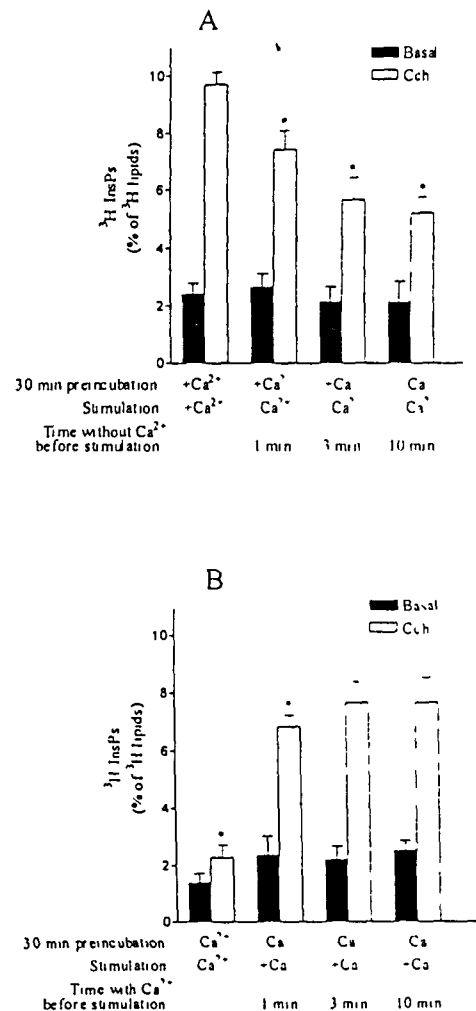
$^3\text{H}$ -InsPs/100 dpm of  $^3\text{H}$ -lipids, and Cch,  $12.10 \pm 0.88$ , in the absence of LiCl basal,  $2.93 \pm 0.12$ , and Cch,  $5.50 \pm 0.58$ ,  $n = 3$ ). The  $\text{Ca}^{2+}$  dependency of this response was first studied by determining the time course of the effects of changing the extracellular  $\text{Ca}^{2+}$ . After culture medium was removed, cells were maintained for 30 min in KH buffer containing  $1.3 \text{ mM}$   $\text{Ca}^{2+}$ . The KH buffer was then replaced with a nominally  $\text{Ca}^{2+}$ -free KH buffer and, after different time intervals, cells were stimulated with  $1 \text{ mM}$  Cch for 1 min. As shown in Fig 1A, the extent of the response decreased in the absence of  $\text{Ca}^{2+}$ . The omission of added  $\text{Ca}^{2+}$  during a 30-min preincubation and a subsequent 1-min stimulation resulted in a marked decrease of the Cch effect ( $88.0 \pm 5.0\%$  reduction,  $n = 3$ ). Under these conditions, stimulation for 1 min at various time intervals after replacement of the  $\text{Ca}^{2+}$ -free medium with a buffer containing  $1.3 \text{ mM}$   $\text{Ca}^{2+}$  resulted in a progressive recovery of the Cch response that, after 3 min, was not significantly different from that shown by control cells preincubated and stimulated in the presence of extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  (Fig 1B). In all experiments, cells were left equilibrating with the replacing medium for at least 1 min before Cch addition, and, in subsequent experiments, stimulations were always performed 1 min after medium replacement.

The above manipulations were found to result in small changes of  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  in single cerebellar granule cells monitored using fura-2 fluorimetry (Fig 2). Average values of  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  under the different conditions were  $69.7 \pm 2.1 \text{ nM}$  in cells preincubated in the presence of  $1.3 \text{ mM}$  extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  and  $51.9 \pm 3.8$ ,  $47.0 \pm 4.3$ , and  $43.9 \pm 4.0 \text{ nM}$  1, 3, and 10 min, respectively, after replacement of the medium with a  $\text{Ca}^{2+}$ -free buffer ( $n = 3$ ). After 30 min in a  $\text{Ca}^{2+}$ -free medium,  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  was  $44.7 \pm 3.0 \text{ nM}$  and restoration of extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  raised  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  values to  $75.3 \pm 4.0 \text{ nM}$  ( $n = 3$ ) in  $< 1$  min, after which they remained.

In contrast to the Cch response, the activation of PLC by a 1-min stimulation with  $40 \text{ mM}$   $\text{K}^+$  ( $2.54 \pm 0.30$ -fold over basal,  $n = 3$ ) was totally dependent on the presence of extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  (Fig 3). However, PLC activation due to high  $\text{K}^+$  was not reduced significantly by a 30-min preincubation of the cells in the absence of  $\text{Ca}^{2+}$ . These results are consistent with the suggestion that high  $\text{K}^+$  activates PLC as a consequence of depolarization-induced  $\text{Ca}^{2+}$  entry and  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  elevation.

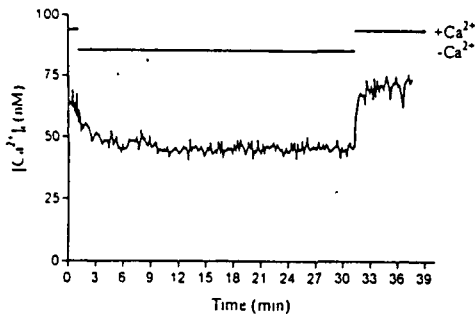
#### Effect of changes in intracellular $\text{Ca}^{2+}$ stores on Cch stimulation of PLC

The relationship between intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  stores and the Cch stimulation of PLC was first studied by measuring the effect of a previous filling of the stores by a transient depolarization. In agreement with previous reports (Connor et al., 1987; Murphy and Miller, 1989; Irving et al., 1992a; Simpson et al., 1993),  $40 \text{ mM}$   $\text{K}^+$  elicited a peak of  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  increase followed by a plateau that declined rapidly to basal levels after returning the  $\text{K}^+$  concentration to  $5.9 \text{ mM}$  (Fig 4A). This treatment, which has been considered to fill the intracellular  $\text{Ca}^{2+}$



**FIG. 1.** Extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  dependency of Cch stimulation of PLC. **A:** *myo*- $^3\text{H}$ inositol-labelled cells were maintained for 30 min in a KH buffer containing  $1.3 \text{ mM}$   $\text{Ca}^{2+}$ . The cells were then stimulated with  $1 \text{ mM}$  Cch for 1 min either in the presence of  $1.3 \text{ mM}$   $\text{Ca}^{2+}$  ( $+\text{Ca}^{2+}$ ) or in a  $\text{Ca}^{2+}$ -free KH buffer ( $-\text{Ca}^{2+}$ ). In the latter case, cells were maintained for different time intervals in the absence of  $\text{Ca}^{2+}$  before the agonist and LiCl addition. **B:** Labelled cells were preincubated for 30 min in a  $\text{Ca}^{2+}$ -free KH buffer and stimulated for 1 min in either the absence ( $-\text{Ca}^{2+}$ ) or presence of  $1.3 \text{ mM}$   $\text{Ca}^{2+}$  ( $+\text{Ca}^{2+}$ ). In the latter case, cells were treated with agonist and LiCl after leaving them for different time intervals in  $1.3 \text{ mM}$   $\text{Ca}^{2+}$  KH buffer. In each experiment, cell samples corresponding to both experimental conditions (A and B) were from the same tissue culture. Results are expressed as  $^3\text{H}$ -InsPs accumulated as a percentage of  $^3\text{H}$ -lipids in each sample and are the means  $\pm$  SEM from three independent experiments performed in triplicate. \*Cch effect significantly different from the response shown by cells preincubated and stimulated in the presence of  $1.3 \text{ mM}$   $\text{Ca}^{2+}$  ( $p < 0.05$ ).

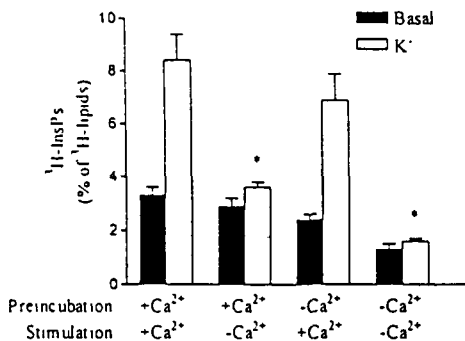
stores (Murphy and Miller, 1989; Irving et al., 1992a) allowed Cch to evoke a small and brief  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  increase (Fig 4A), which was independent of extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  (Fig 4B), as previously shown by Fohrman et al. (1993). This muscarinic response was observed only in some



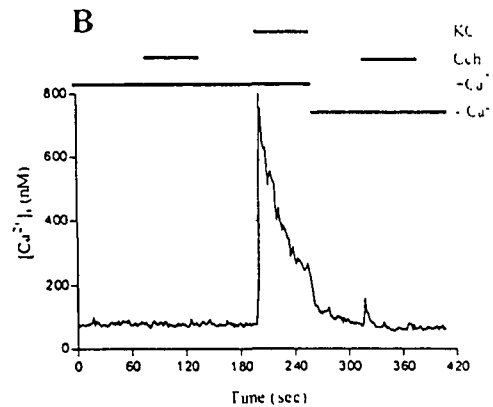
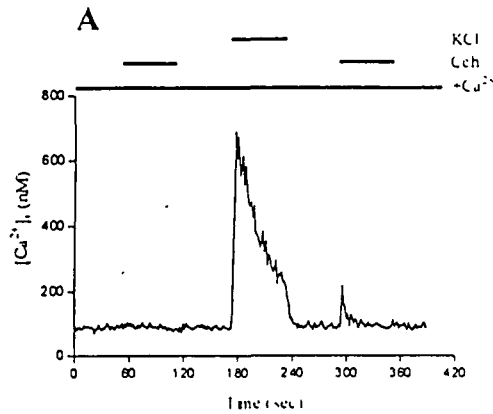
**FIG. 2.** Effect of changes of extracellular Ca<sup>2+</sup> on [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> in single cerebellar granule cells. Cells were initially maintained in KH buffer containing 1.3 mM Ca<sup>2+</sup>. The medium was replaced with a Ca<sup>2+</sup>-free buffer (-Ca<sup>2+</sup>) and, after 30 min, changed again to a Ca<sup>2+</sup>-containing medium (+Ca<sup>2+</sup>). The trace corresponds to an individual cell and is representative of 25 different imaged cells. Similar results were obtained in three independent cultures.

nonpredepolarized cells in one of 10 different cultures analysed and then only in a very few cells.

The effect of predepolarization on the Cch activation of PLC was determined following a scheme similar to that used in the Ca<sup>2+</sup>-mobilization studies. After a 30-min preincubation, cells were treated for 1 min with 40 mM K<sup>+</sup> and the medium replaced with KH buffer containing 5.9 mM K<sup>+</sup>. One minute later, cells were stimulated with 1 mM Cch for 1 min in the same medium in the presence of LiCl. The absence of LiCl during the treatment with 40 mM K<sup>+</sup> prevented the accumulation of <sup>3</sup>H-InsPs at that stage (basal, 2.90 ± 0.30% of <sup>3</sup>H-lipids; 40 mM K<sup>+</sup>, 3.80 ± 0.60% of <sup>3</sup>H-lipids; n = 3). As shown in Fig. 5, the previous depolarization resulted in ~80% increase of the Cch response. This effect was largely independent of the presence of extracellular Ca<sup>2+</sup>



**FIG. 3.** Extracellular Ca<sup>2+</sup> dependency of K<sup>+</sup> stimulation of PLC. Cells were preincubated for 30 min in a KH buffer with or without 1.3 mM Ca<sup>2+</sup> and stimulated with 40 mM KCl for 1 min in either the absence (-Ca<sup>2+</sup>) or presence of 1.3 mM Ca<sup>2+</sup> (+Ca<sup>2+</sup>). LiCl was added to a final concentration of 10 mM at the same time as KCl. Results are expressed as <sup>3</sup>H-InsPs accumulated as a percentage of <sup>3</sup>H-lipids in each sample and are the means ± SEM from three independent experiments performed in triplicate. \*K<sup>+</sup> effect significantly different from that shown by cells preincubated and stimulated in the presence of 1.3 mM Ca<sup>2+</sup> (p < 0.01).



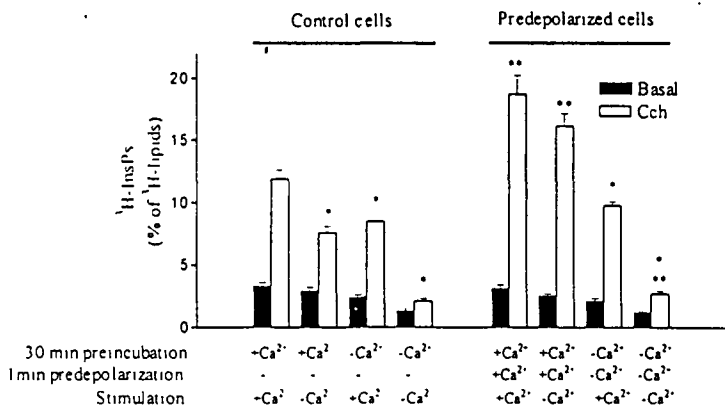
**FIG. 4.** Effect of Cch on [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> before and after a transient depolarization with 40 mM K<sup>+</sup>. **A:** Cells were challenged for 1 min with 1 mM Cch before and after a transient depolarization with 40 mM KCl. Extracellular Ca<sup>2+</sup> was present in all the steps. **B:** Cells were stimulated with 1 mM Cch for 1 min before and after a transient depolarization with 40 mM KCl, but during the second Cch addition extracellular Ca<sup>2+</sup> was omitted, as indicated in the figure. The traces are from individual cells representative of 25 different cells analyzed. Similar results were obtained in six independent cultures.

during stimulation and was not found when depolarization was achieved in the absence of Ca<sup>2+</sup>.

The Ca<sup>2+</sup> content of the intracellular Ca<sup>2+</sup> stores can also be modified by agents such as thapsigargin, which inhibits the endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> pump, and caffeine, which triggers Ca<sup>2+</sup> release through ryanodine receptors (Inesi and Sagara, 1994; Simpson et al., 1995; Taylor and Broad, 1998). A 20-min pretreatment with thapsigargin (10 μM) or caffeine (10 mM) in a Ca<sup>2+</sup>-containing medium lowered significantly the Cch stimulation of PLC (Fig. 6).

**Effect of BAPTA/AM on the response to Cch and K<sup>+</sup>**

The role of intracellular free Ca<sup>2+</sup> in PLC activation by Cch was studied with the cell-permeant Ca<sup>2+</sup> chelator BAPTA/AM (Tsien, 1980). We determined the K<sup>+</sup>-induced <sup>3</sup>H-InsPs accumulation to verify the effects of this



**FIG. 5.** Effect of a previous  $K^+$  depolarization on Cch stimulation of PLC. Cells were preincubated for 30 min in KH buffer and treated for 1 min with 5.9 mM  $K^+$  (control cells) or 40 mM  $K^+$  (predepolarized cells). The medium was then replaced with KH buffer containing 5.9 mM  $K^+$  and, 1 min later, 1 mM Cch and 10 mM LiCl were added for 1 min in the same medium. Preincubation, predepolarization, and stimulation were performed in either the presence (+Ca<sup>2+</sup>) or the absence (-Ca<sup>2+</sup>) of 1.3 mM extracellular Ca<sup>2+</sup> as indicated. Results are the means  $\pm$  SEM from four independent experiments performed in triplicate. \*Responses significantly different from that found in the respective cells preincubated and stimulated in the presence of external Ca<sup>2+</sup> in both control and predepolarized cells ( $p < 0.05$ ). \*\*Responses shown by predepolarized cells that are significantly different from control cells preincubated and stimulated in the presence of external Ca<sup>2+</sup> ( $p < 0.05$ ).

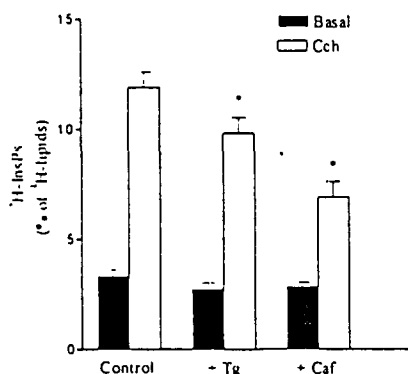
chelator on the activation of PLC elicited by increased [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>. This response was attenuated significantly by preincubation of the cells with 30  $\mu$ M BAPTA/AM for 20 or 60 min and totally abolished when the chelator concentration was increased to 90  $\mu$ M (Fig. 7). In contrast, the stimulation of PLC by Cch was much more resistant to the chelator treatment, being inhibited only after 60 min in the presence of 90  $\mu$ M BAPTA/AM.

On the other hand, treatment of the cells with 30  $\mu$ M BAPTA/AM for 20 min did not change the basal [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> levels (73.0  $\pm$  9.1 nM in BAPTA/AM-treated cells,  $n = 3$ ), but notably decreased both the peak and plateau of [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> elevation elicited by 40 mM  $K^+$ , slowed the decay of [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> after the normal  $K^+$  concentration was restored, and suppressed the Cch-induced Ca<sup>2+</sup> mobilization in predepolarized cells (Fig. 8A). This treatment, however, had no effect on the potentiation of the Cch stimulation of PLC achieved by a previous depolariza-

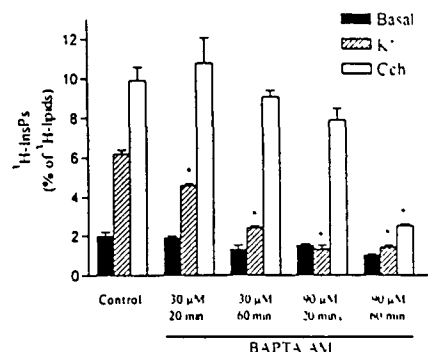
tion (Fig. 8B), indicating that this potentiation does not depend on the increase of [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> resulting from intracellular Ca<sup>2+</sup> release.

#### Estimation of the filling state of the intracellular Ca<sup>2+</sup> stores

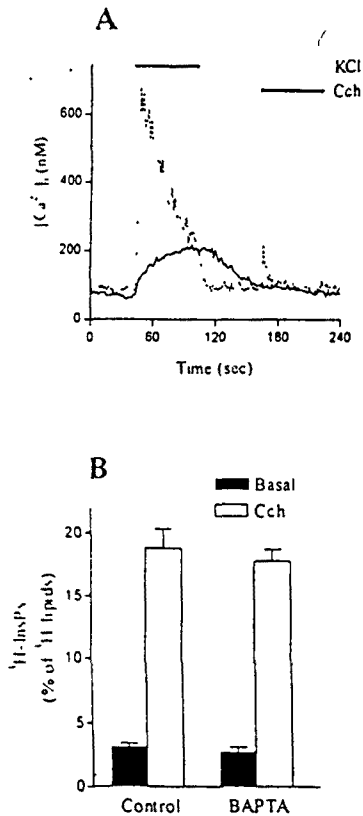
To verify the effect of the different experimental conditions on the filling state of intracellular Ca<sup>2+</sup> stores, fura-2-loaded cells were subjected to the corresponding treatments and then exposed to 2  $\mu$ M ionomycin 1 min after the extracellular Ca<sup>2+</sup> was omitted. These conditions result in transient [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> increases as a consequence of the release of stored Ca<sup>2+</sup>, and the extent of this effect, measured as the net increase achieved in the peak of [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> elevation, has been proposed to reflect indirectly the filling state of the intracellular stores (Montero et al., 1990). As shown in Fig. 9, the net [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> increase elicited by ionomycin was almost abolished (87.7  $\pm$  6.1% of reduction) by a 30-min preincubation in the absence of extracellular Ca<sup>2+</sup>, whereas it



**FIG. 6.** Effect of modulation of intracellular Ca<sup>2+</sup> stores on Cch stimulation of PLC. Cells were preincubated for 20 min with either 10  $\mu$ M thapsigargin (Tg) or 10 mM caffeine (Caf) and stimulated with 1 mM Cch for 1 min in KH buffer containing 1.3 mM extracellular Ca<sup>2+</sup>. Results are the means  $\pm$  SEM from four independent experiments performed in triplicate. \*Cch responses significantly different from that of control cells ( $p < 0.05$ ).



**FIG. 7.** Effect of intracellular Ca<sup>2+</sup> chelation with BAPTA/AM on the Cch and  $K^+$  stimulation of PLC. Cells were incubated in a Ca<sup>2+</sup>-containing medium without (control) or with BAPTA/AM at the concentrations and for the times indicated in the figure and then stimulated for 1 min with either 40 mM  $K^+$  or 1 mM Cch. Results are the means  $\pm$  SEM from three independent experiments performed in triplicate. \*Effect is significantly different from that shown by the respective control cells ( $p < 0.05$ ).



**FIG. 8.** Effect of BAPTA/AM on Cch-elicited Ca<sup>2+</sup> mobilization and PLC activation in predepolarized cells. **A:** After fura-2/AM was removed, cells were preincubated with (solid line) or without (dotted line) 30  $\mu$ M BAPTA/AM for 20 min, treated for 1 min with 40 mM K<sup>+</sup>, and, after 1 min in 5.9 mM K<sup>+</sup>, stimulated for 1 min with 1 mM Cch. The traces are from individual cells representative of 25 different cells. Similar results were obtained in three independent cultures. **B:** The same protocol was followed to assay the activation of PLC, but 10 mM LiCl was added together with Cch. Results are the means  $\pm$  SEM from three independent experiments performed in triplicate.

was enhanced after store refilling by a previous 1-min exposure to 40 mM K<sup>+</sup> (83.6  $\pm$  8.0% of increase), in agreement with the expected effects of both treatments on the level of stored Ca<sup>2+</sup>. Preincubation for 20 min with either 10 mM caffeine or 10  $\mu$ M thapsigargin also reduced the ionomycin response, although to a different extent (48.5  $\pm$  10.1 and 20.4  $\pm$  8.9% reduction by caffeine and thapsigargin, respectively), suggesting that a different degree of store depletion is achieved by both conditions.

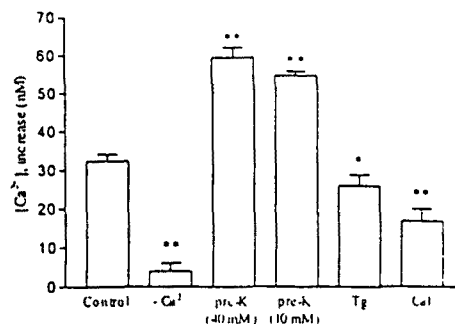
In contrast, the effect of a previous depolarization with 40 mM K<sup>+</sup> on the Ca<sup>2+</sup> stores in cells preincubated with 30  $\mu$ M BAPTA/AM could not be studied directly by the above procedure. Therefore, it was estimated indirectly by measuring the effect of ionomycin after a 1-min exposure to 10 mM K<sup>+</sup> because this condition resulted in an increase of [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> similar to that observed in BAPTA-loaded cells exposed to 40 mM K<sup>+</sup> (189  $\pm$  45 and 180  $\pm$  17 nM, respectively). The [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> increase elicited by ionomycin was similar after preincubation

with either 40 or 10 mM K<sup>+</sup>, indicating a similar degree of store filling in both cases.

## DISCUSSION

In this study, PLC activation has been determined by measuring the accumulation of <sup>3</sup>H-InsPs after 1-min stimulations in the presence of 10 mM LiCl. PLC can also be assayed by measuring the formation of Ins1,4,5-P<sub>3</sub>. However, in primary cultures of cerebellar granule cells, muscarinic stimulation causes a transient steady-state increase of Ins1,4,5-P<sub>3</sub> that peaks 10 s after agonist application, reaching no more than twofold of basal levels and declining to basal in  $\sim$ 5 min (Whitham et al., 1991; Simpson et al., 1993; del Río et al., 1998). This response is not modified by LiCl for at least 5 min after large PLC stimulations (del Río et al., 1998). In contrast, the muscarinic-stimulated accumulation of <sup>3</sup>H-InsPs, which shows a similar twofold increase after a 1-min stimulation with Cch, can be notably enhanced by LiCl, thus resulting in a greater response range for quantitative studies.

We have explored the possibility of a modulatory role of intracellular Ca<sup>2+</sup> stores on the Cch stimulation of PLC in cultured cerebellar granule cells by performing experimental manipulations that modify the Ca<sup>2+</sup> content of these stores. Omission of extracellular Ca<sup>2+</sup> lowered the Cch activation of PLC, whereas addition of external Ca<sup>2+</sup> to cells preincubated in its absence resulted in a time-dependent recovery of the response. These results indicate that, in addition to an extracellular Ca<sup>2+</sup> requirement during stimulation, the Cch response is dependent on the presence of Ca<sup>2+</sup> for some time before agonist application. As the same treatments also evoked minor but significant changes of [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, the



**FIG. 9.** Estimation of the filling state of the Ca<sup>2+</sup> stores. Fura-2-preloaded cells were washed for 1 min with Ca<sup>2+</sup>-free buffer and exposed to 2  $\mu$ M ionomycin after a 30-min incubation of the cells in the presence (control) or in the absence of Ca<sup>2+</sup> (-Ca<sup>2+</sup>), a 1-min predepolarization with KCl at 40 or 10 mM (pre-K<sup>+</sup>), or a 20-min preincubation with either 10  $\mu$ M thapsigargin (Tg) or 10 mM caffeine (Caf). The average net increases of [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> over the initial value (before the application of the Ca<sup>2+</sup> ionophore) of 20–25 cells were measured, and the means  $\pm$  SEM of three independent experiments were calculated [ $n$  = 4 for control and pre-K<sup>+</sup> (40 mM)]. \*Significantly different from control cells ( $p$  < 0.05). \*\*Significantly different from control cells ( $p$  < 0.01).

above results could be interpreted as reflecting a possible effect of small variations of  $[Ca^{2+}]_i$  on the Cch response. This conclusion was suggested previously in studies using SH-SY5Y neuroblastoma cells, in which agonist activation of PLC was proposed to be enhanced by the increase of  $[Ca^{2+}]_i$ , resulting from agonist-induced intracellular  $Ca^{2+}$  mobilization (Wojcikiewicz et al, 1994, Willars and Nahorski, 1995). A similar mechanism was also proposed by del Rio et al (1994), who found a good correlation between relatively small  $[Ca^{2+}]_i$  increases and the extent of Cch activation of PLC in depolarized cerebellar granule cells, although this correlation was less consistent when  $[Ca^{2+}]_i$  was increased with a  $Ca^{2+}$  ionophore. Our present results however do not show such a good correlation when comparing the Cch stimulation of PLC and the levels of  $[Ca^{2+}]_i$  after extracellular  $Ca^{2+}$  changes. Muscarinic PLC activation was much lower after 30 min than after 3–10 min in a  $Ca^{2+}$ -free medium, whereas the  $[Ca^{2+}]_i$  level was similar at both times, and  $[Ca^{2+}]_i$  recovered more rapidly than the PLC response when extracellular  $Ca^{2+}$  was restored. Moreover, chelation of cytosolic  $Ca^{2+}$  by preincubation with BAPTA/AM under conditions resulting in inhibition of the  $K^+$ -induced  $[Ca^{2+}]_i$  increase and PLC activation had no effect on Cch-stimulated accumulation of  $^3H$ -InsPs. More notably, in prepolarized cells, where Cch induced the mobilization of stored  $Ca^{2+}$  and the PLC response was potentiated, treatment with BAPTA/AM abolished the Cch-elicited  $[Ca^{2+}]_i$  increase, but did not change the PLC activation, indicating that the enhancement of this response did not result from an agonist-induced  $[Ca^{2+}]_i$  increase. The resistance of muscarinic activation of PLC to inhibition by conditions that are efficiently chelating the intracellular free  $Ca^{2+}$  suggests that factors other than merely the changes in  $[Ca^{2+}]_i$  are involved in the regulation of the muscarinic activation of PLC.

As deprivation or restoration of external  $Ca^{2+}$  resulted in depletion or refilling of the internal stores, respectively an alternative possibility may be that the intracellular  $Ca^{2+}$  stores regulate the Cch response. This interpretation was supported by the effect of increasing the  $Ca^{2+}$  content of the intracellular stores on the Cch responses. Release of stored  $Ca^{2+}$  by ionomycin was increased by a brief  $K^+$  depolarization, indicating that this treatment increased the level of stored  $Ca^{2+}$  as previously proposed (Murphy and Miller, 1989, Irving et al, 1992a). In agreement with Fohrman et al (1993), we found that this treatment was a prerequisite to observe Cch induced  $Ca^{2+}$  mobilization in these cells. As this signal was unaffected by the omission of extracellular  $Ca^{2+}$  during stimulation and no  $[Ca^{2+}]_i$  increase was found in nonprepolarized cells we conclude that Cch does not direct intrinsic  $Ca^{2+}$  entry. Similar results have been reported recently in cultured hippocampal neurons where  $Ca^{2+}$  mobilization by Cch was not observed unless  $Ca^{2+}$  stores were allowed to refill by a mild  $K^+$  depolarization (Irving and Collingridge, 1998). On the other hand loading of the intracellular  $Ca^{2+}$  stores en-

hanced Cch stimulation of PLC, which under these conditions, became independent of extracellular  $Ca^{2+}$ .

Additional evidence of an involvement of  $Ca^{2+}$  stores was given by the effects of  $Ca^{2+}$ -store modulators. Treatment with either thapsigargin or caffeine lowered the ionomycin-elicited release of stored  $Ca^{2+}$  as well as the Cch activation of PLC, although the effects of thapsigargin were modest compared with those found in the presence of caffeine. In cerebellar granule cells thapsigargin has been shown to inhibit the agonist induced increase of  $[Ca^{2+}]_i$  (Courtney and Nicholls 1992, Irving et al 1992a, Fohrman et al 1993, Simpson et al 1996) whereas caffeine releases intracellular  $Ca^{2+}$  (Irving et al, 1992b, Simpson et al 1996) and overlapping between both thapsigargin and caffeine sensitive stores has been proposed (Irving et al, 1992b, Simpson et al 1993, 1995, 1996). In this context our results suggest that a different extent of store depletion was induced by each agent, and this could result in a different reduction of the PLC response to Cch. On the other hand  $Ca^{2+}$  stores insensitive to both thapsigargin and caffeine described in some nonneural cell systems (Pizzo et al 1997) might also be present and have a role in regulating Cch activation of PLC in cerebellar granule cells. Finally, caffeine has been shown to reduce the muscarinic receptor-mediated formation of  $Ins(1,4,5)P_3$  in pancreatic acinar cells (Toescu et al, 1992). Thus a possible contribution of an inhibitory effect of caffeine on the activation of PLC cannot be excluded.

Taken together, our results suggest that the loading state of the intracellular  $Ca^{2+}$  stores regulates muscarinic receptor activation of PLC as well as provides a  $Ca^{2+}$  source for agonist-stimulated release although both responses appear to be modulated by different mechanisms. Various cellular effects have been shown to result from depletion of intracellular  $Ca^{2+}$  stores. These include inhibition of protein synthesis (Paschen et al 1996), activation of gene expression (Gissel et al 1997), activation of capacitative  $Ca^{2+}$  influx (Berridge 1995) and stimulation of a  $Ca^{2+}$ -insensitive phospholipase  $A_2$  (Nowatzke et al, 1998). The mechanisms underlying these effects have not yet been elucidated although several proposals have been made in the case of the capacitative  $Ca^{2+}$  entry, including the involvement of various types of endogenous messengers that may communicate the  $Ca^{2+}$  level of the internal stores to plasma membrane-located channels. In the present work we do not know how the filling state of the intracellular  $Ca^{2+}$  stores could regulate the Cch stimulation of PLC which initially takes place in the plasma membrane. Besides the possibility of the formation of a diffusible mediator the mechanism could involve a signalling complex in which the additional activation of intracellular PLC isoforms sense the  $Ca^{2+}$  level of the intracellular stores. This would be consistent with the large difference observed between the high PLC activation elicited by Cch in intact cerebellar granule cells and the low response found in membrane preparations from the same cells where the effect is similar to the modest PLC activation induced by

other receptor agonists (R Masgrau, unpublished observations) Regardless of the linking mechanism, the modulation of PLC activation by the intracellular Ca<sup>2+</sup> stores may help to regulate the extent of Ins1,4,5-P<sub>3</sub> formation as a function of the levels of stored Ca<sup>2+</sup> and might constitute a mechanism of cross-talk between muscarinic stimulation and other Ca<sup>2+</sup>-mobilizing stimuli

In conclusion, this study provides evidence of the involvement of intracellular Ca<sup>2+</sup> stores in the modulation of muscarinic activation of PLC in cerebellar granule cells. As, under the conditions used in this work, these cells respond to muscarinic stimulation with high PLC activation but negligible [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> changes, they have proved to be suitable to characterize this modulation further and to explore the mechanisms involved

**Acknowledgment:** Roser Masgrau and Joan-Marc Servitja are recipients of doctoral fellowships from FPI-MEC and DGR-Generalitat de Catalunya (Spain), respectively. This work was supported by DGICYT grant PB97/0168 and Wellcome Trust grant 048460Z/96

## REFERENCES

- Bernidge M J (1995) Capacitative calcium entry *Biochem J* 312, 1-11
- Bernidge M J (1998) Neuronal calcium signaling *Neuron* 21, 13-26
- Ciarlo A and Meldolesi J (1991) Regulation of intracellular calcium in cerebellar granule neurons: effects of depolarization and of glutamatergic and cholinergic stimulation *J Neurochem* 56, 184-191
- Claro E, Fain J N and Picatoste F (1993) Noradrenaline stimulation unbalances the phosphoinositide cycle in rat cerebral cortical slices *J Neurochem* 60, 2078-2086
- Connor J, Tseng H Y and Hockberger P (1987) Depolarization and transmitter induced changes in intracellular Ca<sup>2+</sup> of rat cerebellar granule cells in explant cultures *J Neurosci* 7, 1384-1400
- Courtney M J and Nicholls D G (1992) Interactions between phospholipase C-coupled and N-methyl-D-aspartate receptors in cultured cerebellar granule cells: protein kinase C mediated inhibition of N-methyl-D-aspartate responses *J Neurochem* 59, 983-992
- del Rio E, Nicholls D G and Downes C P (1994) Involvement of calcium influx in muscarinic cholinergic regulation of phospholipase C in cerebellar granule cells *J Neurochem* 63, 535-543
- del Rio E, Shinomura T, van der Kaay J, Nicholls D G, and Downes C P (1998) Disruption by lithium of phosphoinositide signalling in cerebellar granule cells in primary culture *J Neurochem* 70, 1662-1669
- Dillon-Carter O and Chuang D M (1989) Homologous desensitization of muscarinic cholinergic, histaminergic, adrenergic, and serotonergic receptors coupled to phospholipase C in cerebellar granule cells *J Neurochem* 52, 598-603
- Fisher S K, Heacock A M, and Agranoff B W (1992) Inositol lipids and signal transduction in the nervous system: an update *J Neurochem* 58, 18-38
- Fohrman E B, de Erausquin G, Costa E, and Wojcik W J (1993) Muscarinic m3 receptors and dynamics of intracellular Ca<sup>2+</sup> in cerebellar granule neurons *Eur J Pharmacol* 245, 263-271
- Gissel C, Doutheil J and Paschen W (1997) Temporal analysis of changes in neuronal c-fos mRNA levels induced by depletion of endoplasmic reticulum calcium stores: effect of clamping cytoplasmic calcium activity at resting levels *J Neurochem* 69, 2538-2545
- Grynkiewicz G, Peonie M, and Tsien R Y (1985) A new generation of Ca<sup>2+</sup> indicators with greatly improved fluorescence properties *J Biol Chem* 260, 3440-3450
- Inesi G and Sagara Y (1994) Specific inhibitors of intracellular Ca<sup>2+</sup>-ATPases *J Membr Biol* 141, 1-6
- Irving A J and Collingridge G L (1998) A characterization of muscarinic receptor mediated intracellular Ca<sup>2+</sup> mobilization in cultured rat hippocampal neurones *J Physiol (Lond)* 511, 747-759
- Irving A J, Collingridge G L, and Schofield J G (1992a) L-Glutamate and acetylcholine mobilize Ca<sup>2+</sup> from the same intracellular pool in cerebellar granule cells using transduction mechanisms with different Ca<sup>2+</sup> sensitivities *Cell Calcium* 13, 293-301
- Irving A J, Collingridge G L and Schofield J G (1992b) Interactions between Ca<sup>2+</sup> mobilizing mechanisms in cultured rat cerebellar granule cells *J Physiol (Lond)* 456, 667-680
- Lin W W and Wang C W (1996) SK&F 96365 inhibits carbachol induced phosphoinositide turnover in human neuroblastoma SH-SY5Y and rat cerebellar granule cells *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 354, 53-58
- Lin W W, Lee C Y, and Chuang D M (1990a) Comparative studies of phosphoinositide hydrolysis induced by endothelin related peptides in cultured cerebellar astrocytes, C<sub>6</sub> glioma and cerebellar granule cells *Biochem Biophys Res Commun* 168, 512-519
- Lin W W, Lee C Y, Yasumoto T and Chuang D M (1990b) Maitotoxin induces phosphoinositide turnover and modulates glutamatergic and muscarinic cholinergic receptor function in cultured cerebellar neurons *J Neurochem* 55, 1563-1568
- Montero M, Alvarez J, and Garcia-Sancho J (1990) Uptake of Ca<sup>2+</sup> and refilling of intracellular Ca<sup>2+</sup> stores in Ehrlich-ascites tumour cells and in rat thymocytes *Biochem J* 271, 535-540
- Murphy S N and Miller R J (1989) Two distinct quisqualate receptors regulate Ca<sup>2+</sup> homeostasis in hippocampal neurons in vitro *Mol Pharmacol* 35, 671-680
- Nicoletti F, Wroblewski J T, Novelli A, Alho H, Guidotti A and Costa E (1986) The activation of inositol phospholipid metabolism as a signal-transducing system for excitatory amino acids in primary cultures of cerebellar granule cells *J Neurosci* 6, 1905-1911
- Nowatzke W, Ramanadham S, Ma Z, Hsu F F, Bohrer A and Turk J (1998) Mass spectrometric evidence that agents that cause loss of Ca<sup>2+</sup> from intracellular compartments induce hydrolysis of arachidonic acid from pancreatic islet membrane phospholipids by a mechanism that does not require a rise in cytosolic Ca<sup>2+</sup> concentration *Endocrinology* 139, 4073-4085
- Paschen W, Doutheil J, Gissel C, and Treiman M (1996) Depletion of neuronal endoplasmic reticulum calcium by thapsigargin: effect on protein synthesis *J Neurochem* 67, 1735-1743
- Pizzo P, Fasolato C, and Pozzan T (1997) Dynamic properties of an inositol 1,4,5-trisphosphate- and thapsigargin insensitive calcium pool in mammalian cell lines *J Cell Biol* 136, 355-366
- Simpson P B, Challiss R A J and Nahorski S R (1993) Involvement of intracellular stores in the Ca<sup>2+</sup> responses to N-methyl-D-aspartate and depolarization in cerebellar granule cells *J Neurochem* 61, 760-763
- Simpson P B, Challiss R A J, and Nahorski S R (1995) Neuronal Ca<sup>2+</sup> stores: activation and function *Trends Neurosci* 7, 299-306
- Simpson P B, Nahorski S R, and Challiss R A J (1996) Agonist-evoked Ca<sup>2+</sup> mobilization from stores expressing inositol 1,4,5-trisphosphate receptors and ryanodine receptors in cerebellar granule neurones *J Neurochem* 67, 364-373
- Taylor C W and Broad L M (1998) Pharmacological analysis of intracellular Ca<sup>2+</sup> signalling: problems and pitfalls *Trends Pharmacol Sci* 19, 370-375
- Toescu E C, O'Neill S C, Petersen O H and Eisner D A (1992) Caffeine inhibits the agonist-evoked cytosolic Ca<sup>2+</sup> signal in mouse pancreatic acinar cells by blocking inositol trisphosphate production *J Biol Chem* 267, 23467-23470



- Tsien R Y (1980) New calcium indicators and buffers with high selectivity against magnesium and protons: design, synthesis, and properties of prototype structures *Biochemistry* **19**, 2396–2404
- Whitham E M, Challiss R A J, and Nahorski S R (1991) M<sub>3</sub> muscarinic cholinergic receptors are linked to phosphoinositide metabolism in rat cerebellar granule cells *Eur J Pharmacol* **206**, 181–189
- Willars G B and Nahorski S R (1995) Heterologous desensitization of both phosphoinositide and Ca<sup>2+</sup> signaling in SH-SY5Y neuroblastoma cells: a role for intracellular Ca<sup>2+</sup> store depletion? *Mol Pharmacol* **47**, 509–516
- Wojcikiewicz R J H, Tobin A B, and Nahorski S R (1994) Muscarinic receptor-mediated inositol 1,4,5-trisphosphate formation in SH-SY5Y neuroblastoma cells is regulated acutely by cytosolic Ca<sup>2+</sup> and by rapid desensitization *J Neurochem* **63**, 177–185
- Xu J and Chuang D M (1987) Muscarinic acetylcholine receptor-mediated phosphoinositide turnover in cultured cerebellar granule cells: desensitization by receptor agonists *J Pharmacol Exp Ther* **242**, 238–244









Servei de Biblioteques

Reg. 1500465933

Sig. TUAB/5222

Ref. 12500

