

————— *Artículo Original* —————

Activación de la calcio calmodulina quinasa II, CaMKII, por el uridin nucleósido difosfato, UDP, en neuronas granulares de cerebelo

CRISTINA HERVÁS, DAVID LEÓN, RAQUEL P. SEN
Y M.^a TERESA MIRAS-PORTUGAL

Departamento de Bioquímica. Facultad de Veterinaria. UCM

RESUMEN

Las neuronas granulares de cerebelo en cultivo presentan receptores metabotrópicos de nucleótidos de tipo P2Y₆, cuyo agonista fisiológico específico es el nucleótido, uridina difosfato, UDP. Estudios de PCR muestran la presencia de este receptor y el incremento de la expresión con el tiempo. Los estudios de respuesta en célula individual mediante microfluorimetría muestran un incremento del calcio citosólico al estimular con UDP, siendo los incrementos más significativos en el soma. El incremento del calcio citosólico produce la activación de diversas enzimas dependientes de calcio y concretamente de la calcio-calmodulina quinasa II, CaMKII, enzima que se encuentra ampliamente distribuida en toda la topografía de la neurona granular. Este enzima al activarse se auto-fosforila y mediante anticuerpos contra la forma fosforilada se pueden detectar las zonas más activas en la célula. Cuando se estimula con UDP, la CaMKII fosforilada aparece fundamentalmente asociada al soma neural, con mucha menor actividad en las prolongaciones axodendríticas, lo que se corresponde con la distribución de los receptores P2Y₆ funcionales.

Palabras clave: Neuronas granulares.—Cerebelo.—Receptores de nucleótidos.—Receptores P2Y.—Purinérgico.—CaMKII.—Señal de calcio.

ABSTRACT

Cultured granule cells from cerebellum exhibit nucleotide metabotropic receptors such as the P2Y₆ subtype, which physiological agonist is the uridine

diphosphate, UDP. The PCR analysis show the presence of P2Y₆ messenger RNA, increasing with the days in culture. Single cell microfluorimetric studies show cytosolic calcium increase in response to UDP, this being more significant at the soma level. The cytosolic calcium increase triggers cellular responses mediated by calcium dependent enzymes. This is the case for calcium-calmodulin kinase II, CaMKII, which is extensively distributed through the granule neuron, according the immunocytochemical studies. This enzyme once activated is able to auto-phosphorylate and by using antibodies against the phosphorylated form the active zones can be detected. After UDP stimulation, the location of the phosphorylated form of CaMKII appears to be mainly at the neural soma, with lower presence at the axodendritic prolongations, which correlates with the functional P2Y₆ subtype receptor distribution.

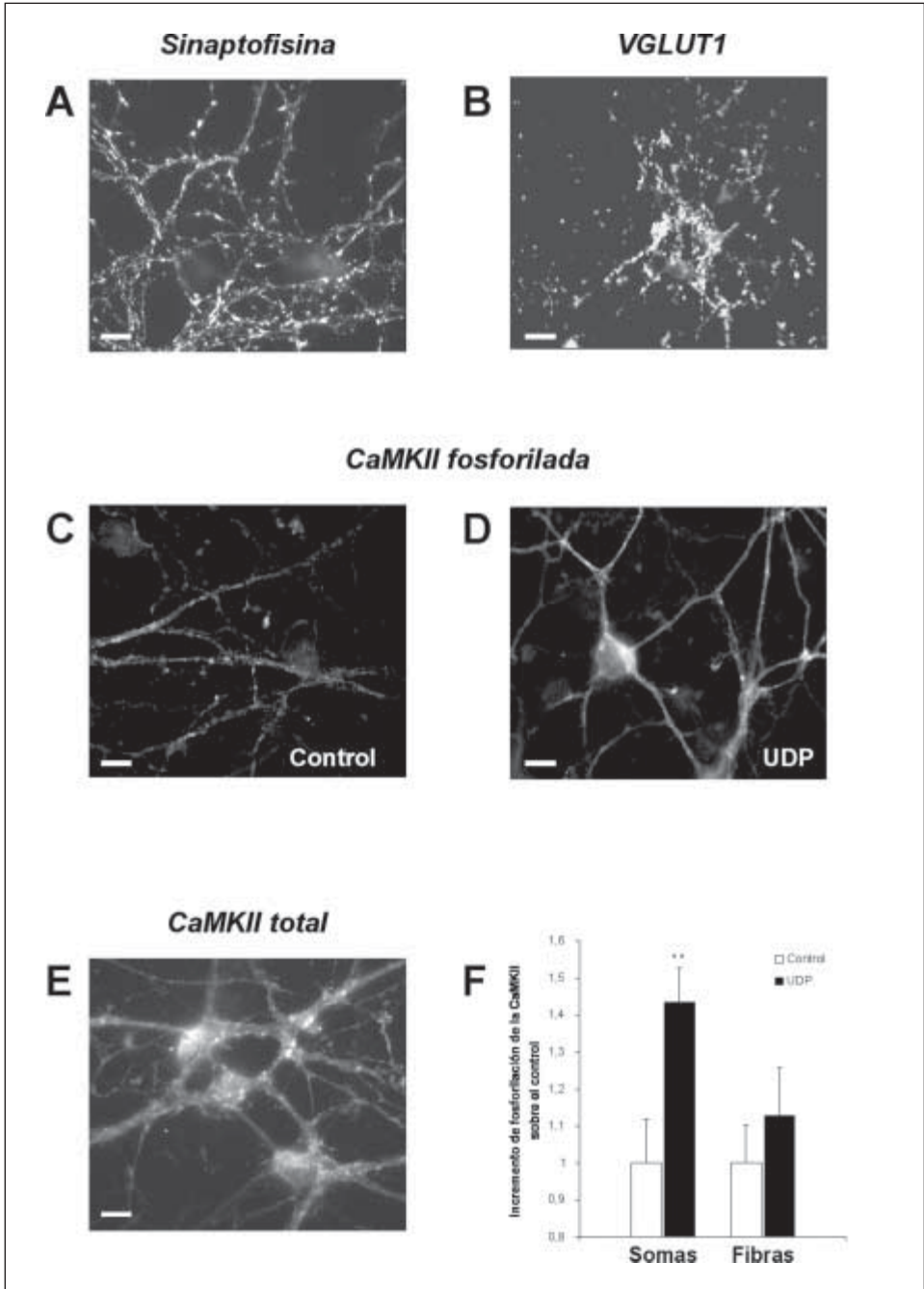
Key words: Granule neurons.—Cerebellum.—Nucleotide receptors.—P2Y receptors.—Purinergetic.—CaMKII.—Calcium signaling.

En el Sistema Nervioso Central (SNC) de los vertebrados se encuentra el cerebelo que tiene una estructura relativamente sencilla y repetitiva, lo que permite identificar con cierta facilidad sus tipos celulares. La corteza cerebelosa se divide en tres capas, la más externa o molecular, la intermedia donde están los somas de las neuronas de Purkinje, y la granular donde están las células denominadas granulares, por su pequeño tamaño y la forma redondeada de su soma. En los mamíferos el cerebelo es inmaduro al nacer, lo que permite realizar cultivos primarios de sus neuronas (Mateo y col., 1998). En la rata las neuronas granulares se pueden obtener antes de los 7 días de edad y una vez en cultivo se diferencian y adquieren morfologías complejas. En trabajos previos del grupo hemos caracterizado estos cultivos y demostrado la naturaleza glutamatérgica de las neuronas granulares mediante inmunohistoquímica. La presencia del transportador de glutamato, VGLUT1, que es un marcador de vesículas de secreción neural identifica las neuronas con fenotipo glutamatérgico (Hervás y col., 2003).

Las neuronas granulares en cultivo se pueden emplear para estudios de diferenciación, expresión de diversas proteínas, como receptores, etc., y para respuestas funcionales en poblaciones o en células individuales. Es de destacar que son un valioso utensilio para el ensayo de compuestos con potencialidad farmacológica en el sistema nervioso, y proporcionan la posibilidad de estudiar los efectos en

poblaciones neurales homogéneas. En este modelo se demostró la presencia de receptores funcionales para nucleótidos, tanto ionotrópicos denominados P2X, como metabotrópicos denominados P2Y, siendo la mayoría capaz de incrementar los niveles intracelulares de calcio. Hasta el momento se han caracterizado siete subunidades de receptores P2X₁₋₇, que se asocian como homo u heteroligómeros, lo que permite la formación del poro iónico para la entrada de los cationes Na⁺ y Ca²⁺. El agonista fisiológico para todos los receptores P2X caracterizados hasta el momento es el ATP. Los receptores P2Y son una amplia familia que contiene 8 miembros, P2Y_{1,2,4,6,11,12,13,14}, que pueden responder a diversos nucleótidos según el subtipo. Los P2Y_{1,12,13} responden fundamentalmente a ADP, mientras que el P2Y₁₁ parece ser el más exclusivo para el ATP, el P2Y₂ responde a ATP y UTP, y el P2Y₄ a UTP y en rata también a ATP. El P2Y₆ responde exclusivamente a UDP, finalmente el P2Y₁₄ es activado por las formas activas de los azúcares, como la UDP-glucosa (Burnstock, 2005). Todos los receptores metabotrópicos están acoplados a proteínas G, que pueden activar diversos sistemas efectores, el P2Y₁₁ acoplado a G_s es capaz de activar la adenilato ciclasa de membrana, mientras que los P2Y₁₂, P2Y₁₃ y P2Y₁₄, que están acoplados a G_i inhiben la adenilato ciclasa. El resto de los receptores de nucleótidos, P2Y_{1,2,4,6} están acoplados a G_q y activan la cascada de señalización de la fosfolipasa C, PLC, que hidroliza el fosfatidilinositol bisfosfato produciendo diacilglicerol e inositoltrisfosfato, IP3. Este metabolito, produce la salida de calcio del retículo, que junto con el diacilglicerol inducen posteriormente la activación de proteína quinasa C y otras cascadas de proliferación o diferenciación celular, según el tipo de célula (Neary y col., 2003).

Un enzima de especial relevancia en neuronas e implicada en los procesos de reorganización del citoesqueleto es la Calcio Calmodulina quinasa II, CaMKII. Este enzima es muy abundante en cerebro, donde constituye entre un 1-2% de la proteína total. Funcionalmente es una serina treonina quinasa, que necesita la presencia de la calcio calmodulina para su activación. El enzima una vez activado se autofosforila, permaneciendo activa aunque desaparezca la señal de calcio. Esto permite que pueda coordinar una gran variedad de funciones, tanto en la excitabilidad de la membrana, como en el metabolismo. Se puede localizar tanto presináptica, como post-sináptica-



mente y es uno de los enzimas clave en la plasticidad neuronal requerida para el aprendizaje y la memoria (Bayer y Schulman, 2001).

Debido a la existencia de un elevado número de receptores para nucleótidos, en este trabajo nos hemos centrado en el receptor P2Y₆ y trataremos de demostrar que está presente en neuronas granulares, que es funcional y que su activación produce un incremento de calcio en el citosol celular, lo que lleva emparejada la activación de la CaMKII.

Los cultivos de células granulares han sido descritos en trabajos previos del grupo (Hervás y col., 2003). En la figura 1 se puede observar un cultivo típico. La inmunohistoquímica con anticuerpos contra el marcador de vesículas neurales, sinaptofisina (anticuerpos de la casa comercial Sigma), confirma la naturaleza neural de las células y la ausencia de células contaminantes (figura 1 A). La inmunohistoquímica positiva con respecto al marcador de vesículas glutamatérgicas, el VGLUT-1 (de la casa comercial Synaptic systems), nos confirma la naturaleza de neuronas glutamatérgicas, que son las granulares de cerebelo (figura 1 B). En las figuras 1C y 1D podemos observar el inmunomarcaje con el anticuerpo para la forma fosforilada de la CaMKII (anticuerpos contra el epítipo de rata realizados en conejo, de la casa comercial Upstate). En 1C se muestra el control sin estimular con el agonista, el nucleótido de uridina UDP (Sigma). En 1D se muestran las células granulares después de activar con el

FIGURA 1. *Las neuronas granulares de 14 DIV se fijaron con una solución de paraformaldehído al 4% tras lo cual se incubaron con anticuerpos específicos. (A) Inmunodetección de la sinaptofisina (Sigma) 1:200 utilizando un anticuerpo secundario acoplado a FITC (Sigma) 1:500. (B) La identificación del transportador vesicular de glutamato VGLUT1 con el anticuerpo anti-VGLUT1 (Synaptic Systems) 1:1000 se reveló con TRITC (Sigma) 1:500. Las neuronas se estimularon con un medio control (C) y con UDP 100 μ M (D) durante 5 minutos y se fijaron para obtener el inmunomarcaje con el anticuerpo para la Calmodulina quinasa II fosforilada (Upstate) 1:100. El marcaje de la CaMKII total (Zymed) 1:100 se muestra en (E). La barra de escala corresponde a 5 μ m. (F) Las barras muestran los porcentajes de incremento \pm SEM en la intensidad de fluorescencia sobre el control sin tratar ejercido por el UDP y medido en cuerpos celulares y fibras. Para cuantificar la fluorescencia se promedió, utilizando el programa Lucida Analysis, los niveles de grises correspondientes a regiones tomadas sobre los somas y las fibras por separado. N=3 cultivos distintos; 6-8 imágenes por tratamiento y cultivo.*

agonista. Es de destacar que no todas las células responden y que además la distribución en la topografía neuronal es muy restringida, siendo especialmente marcada en el soma y mas escasa en las prolongaciones axo-dendriticas de las neuronas en cultivo. Sin duda esta distribución tiene un significado funcional y circunscribe la acción de los receptores a lugares definidos de la célula. En la figura 1E se puede observar la gran abundancia de CaMKII, ya que el anticuerpo reconoce el enzima fosforilado y sin fosforilar. Tanto el soma como las prolongaciones axo-dendriticas contienen gran cantidad del enzima, pero según cual sea la distribución de los receptores que movilizan calcio, se activará la CaMKII que esté localizada en la proximidad. En la figura 1F se representa mediante barras la incidencia relativa en la activación de la CaMKII del soma y de las fibras en respuesta al UDP.

La presencia de la CaMKII en su forma fosforilada después de estimular con UDP, sugiere la presencia de receptores P2Y₆ funcionales. Para confirmarlo, se han realizado estudios de PCR en células granulares en cultivo, con la pareja de oligonucleótidos en sentido de avance y en sentido reverso; secuencia CGTGAGGATTT-CAAGCGACTG (*forward primer*) y secuencia CCAAACGACTCCACA-TACCA (*reverse primer*). El fragmento se corresponde en PCR con un tamaño de 371 pares de bases. La expresión se compara a los 7 y 14 días en cultivo, y también con astrocitos en la figura 2A. En la figura 2B pueden observarse mediante estudios de microfluorimetría realizados en célula individual la gran variedad de respuestas a nucleótidos. La técnica de microfluorimetría ha sido puesta a punto en nuestro laboratorio para estudios en células y terminales nerviosos individuales (Díaz-Hernández y col., 2001). En este caso las neuronas granulares se incuban con el marcador fluorescente para calcio Fura-2AM (Molecular Probes). Una vez cargadas las células, se lavan y se sitúan en una cámara de perfusión, bajo el microscopio de fluorescencia, dónde son sometidas a la acción de diversos compuestos de modo secuencial. La emisión de fluorescencia a 510 nm, cuando son estimuladas a una longitud de onda de 340 nm y de 380 nm es recogida en una cámara de videoimagen. El cociente de la emisión a cada longitud de onda 340/380, se transforma en concentración de calcio, mediante la ecuación de Grynkiewicz realizando una calibración con un patrón de calcio de

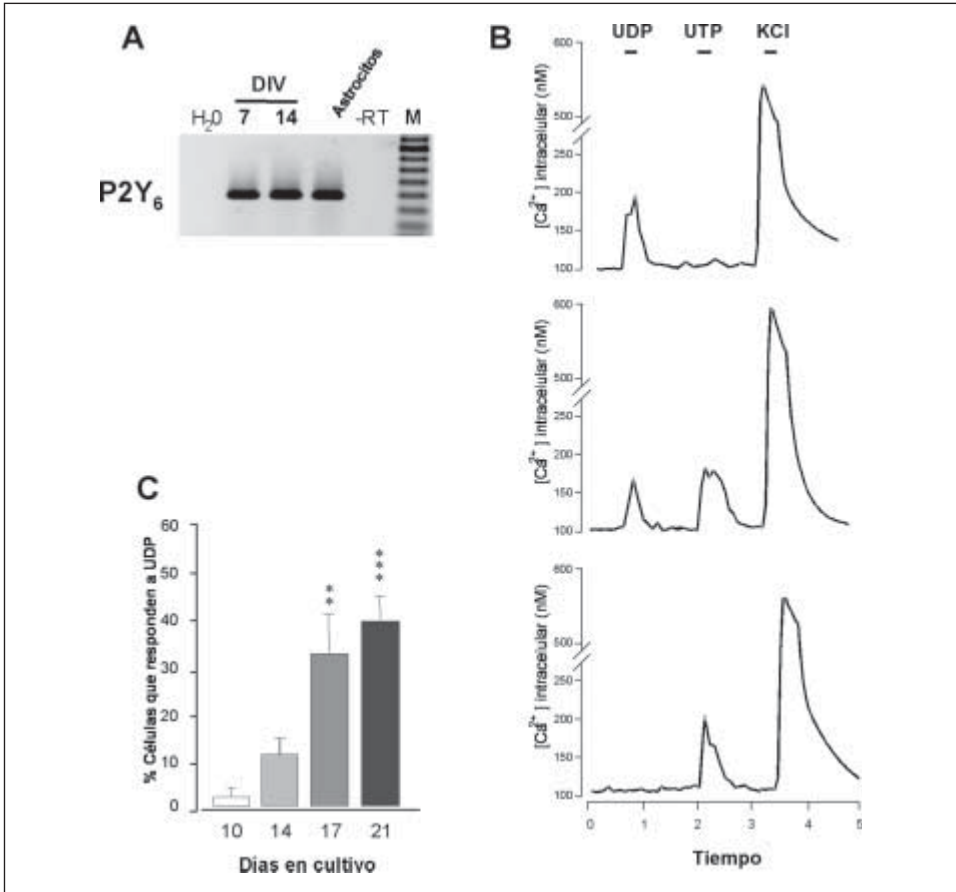


FIGURA 2. (A) Los productos de PCR del receptor P2Y₆ obtenidos a 7 y 14 días de cultivo, se separaron en geles de agarosa al 2 %. Se hicieron controles con agua (H₂O) en lugar de cDNA molde y controles adicionales en ausencia de transcriptasa inversa (-RT). Como control positivo de la expresión de receptores P2Y₆ se emplearon extractos de RNA de cultivos de astrocitos (Ast). M = marcador de 100 pb (n = 3 cultivos diferentes). (B) Las células en cultivo (14 DIV) se cargaron con la sonda Fura-2 y se estimularon con UDP y UTP a 100 μM durante 30 segundos cada uno, dejando 5 minutos de recuperación entre aplicaciones consecutivas. Las células se estimularon al final del experimento con KCl 30 mM para comprobar su estado funcional. Los incrementos de calcio intracelular se calcularon a partir del ratio F₃₄₀/F₃₈₀ con la ecuación de Grynkiewicz. (C) Los diagramas de barras muestran la media ± SEM del porcentaje de células que responden a UDP 100 μM, medidas en los días 10, 14, 17 y 21 de cultivo. Diferencias significativas respecto al control correspondiente al porcentaje de células que responden a cada nucleótido en el día 10 de cultivo: **P<0.01, ***P<0.001. N= 4-6 cultivos; 100-200 células por estadio y cultivo.

concentración conocida. Estos estudios confirman la presencia de múltiples receptores ionotrópicos y metabotrópicos funcionales y la gran diversidad entre células. La presencia del P2Y₆ funcional se observa claramente en la respuesta de calcio a UDP, que no se altera al eliminar el calcio extracelular (resultados no mostrados), indicando que la movilización de este ión procede del retículo. También es de destacar la importancia de los días en cultivo en la aparición de las respuestas y en su magnitud. En la figura 2C, el gráfico de barras muestra la variación obtenida con respecto al tiempo de las células en cultivo y su importancia fisiológica en la maduración.

Una situación de gran complejidad en la respuesta a nucleótidos se produce en los astrocitos de cerebelo, en donde, mediante las técnicas de microfluorimetría y de PCR se ha demostrado la presencia de todos los receptores metabotrópicos P2Y clonados hasta el momento (Jiménez y col., 2000). En estas células los receptores P2Y, incluido el P2Y₆, son capaces de activar las vías de supervivencia y proliferación celular, a través de las cascadas de señalización de ERK. Este receptor está presente en un gran número de tejidos, en los monocitos del sistema inmune induce la producción de interleucina-8 en respuesta al lipopolisacárido y por extensión en situaciones de infección bacteriana. También se expresa en los linfocitos T que se infiltran en el intestino en la enfermedad de Crohn. La presencia del P2Y₆ en las arterias cerebrales se ha tratado de relacionar con la contracción reduciendo el flujo sanguíneo (Malmsjö y col., 2003). Analizado el tejido cerebral en su conjunto el receptor P2Y₆ es una señal de maduración, pero no el único. En este mismo modelo neural se ha descrito la modificación en la expresión de otros receptores metabotrópicos, como los de glutamato y los de adenosina A₁ (Hervás y col., 2003).

En el presente trabajo se añade un dato más a tener en cuenta para los receptores de nucleótidos en general y para el P2Y₆ en particular, y es su capacidad para movilizar la salida de calcio del retículo y consecuentemente activar las cascadas de señalización a través de la CaMKII. En la figura 3 se presenta un esquema de los efectos del UDP activando los receptores P2Y₆, y las cascadas de señalización que implica.

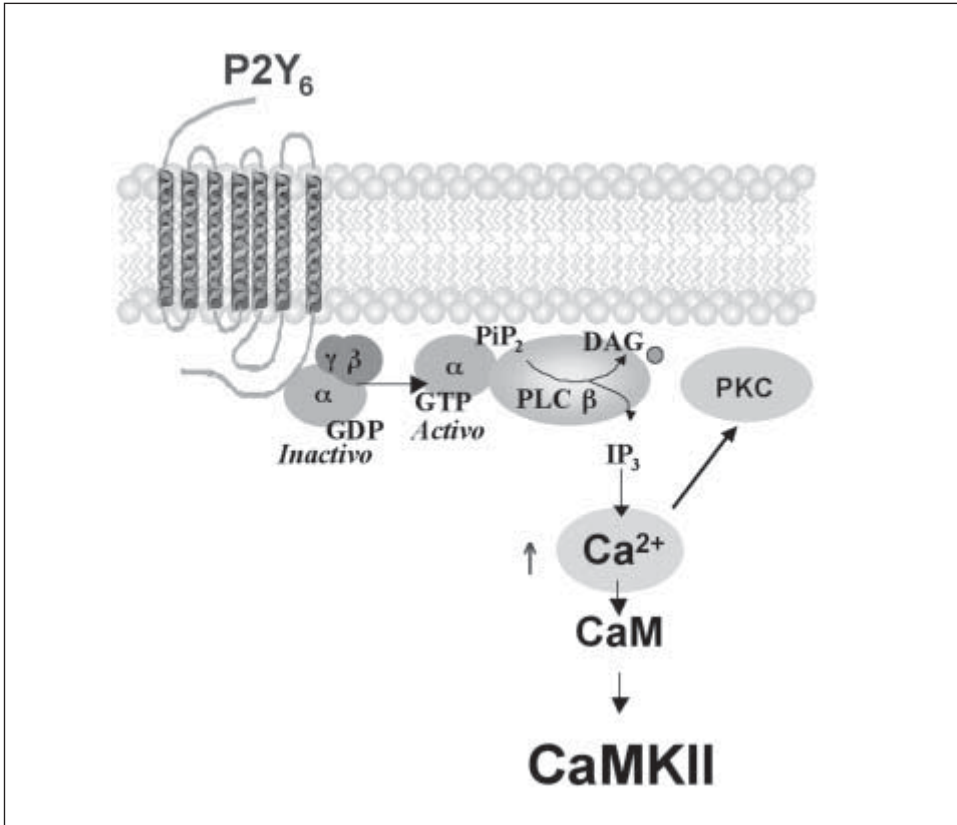


FIGURA 3. Cascada de señalización activada por los receptores P2Y₆. De forma general se considera que los receptores P2Y están acoplados vía proteínas G a la PLC, induciendo la movilización de calcio intracelular y, como consecuencia, la activación de la PKC. De forma secundaria se ponen en marcha mecanismos posteriores de señalización, entre los que se encuentran la activación de la Calmodulina quinasa II.

Actualmente se conoce la existencia de microdominios de membrana, que son lugares de localización preferente de receptores y sistemas de transducción en la membrana plasmática, lo que haría más específicas y restringidas las respuestas. Como hemos señalado en la figura 1D, la forma fosforilada de la CAMKII, después de estimulación con UDP, parece más restringida al soma, o por lo menos más prominente. Esto indica que sus funciones a nivel de las terminales presinápticas, de reorganización del citoesqueleto y aproxima-

ción de nuevas vesículas para sucesivas etapas exocitóticas, serían escasamente reguladas por el receptor metabotrópico P2Y₆. Esto está de acuerdo con datos recientes de Hervás y col. (2004), en donde se describe la importancia de los receptores ionotrópicos de nucleótidos, fundamentalmente P2X3 y P2X7, a nivel presináptico, en la activación de la CaMKII. Este enzima es importante también en el desarrollo donde promueve cambios morfológicos en las espinas dendríticas e induce sinaptogénesis, siendo también capaz de fosforilar receptores ionotrópicos, permitiendo que las membranas sean funcionales y respondan a los diferentes estímulos nerviosos (Muller y col., 1997).

Es necesario incidir en que las neuronas granulares de cerebelo son glutamatérgicas y que en las terminales sinápticas de idéntica naturaleza, aunque de otras zonas cerebrales, se ha descrito la abundante presencia de receptores ionotrópicos para nucleótidos, que son funcionales e inducen la liberación exocitótica de glutamato (Gualix y col., 2003). La implicación de los receptores de glutamato en procesos de excitotoxicidad junto con la excesiva presencia de calcio en el citosol neural son aspectos importantes que necesitan ser controlados para evitar el estrés y muerte celular. Uno de los modos de controlar la entrada de calcio y permitir que solamente actúe en los lugares precisos es el localizar los receptores en lugares definidos de la célula, y en este trabajo hemos querido demostrar que esa es la situación con el receptor metabotrópico de nucleótidos P2Y₆.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) BAYER, K. U.; SCHULMAN, H. (2001): Regulation of signal transduction by protein targeting: the case for CaMKII. *Biochem Biophys Res Commun*; 289 (5): 917-23. Review.
- (2) BURNSTOCK, G. (2005). Purinergic signaling: therapeutic potential. *An. R. Acad. N. Farm.*
- (3) DÍAZ-HERNÁNDEZ, M.; PINTOR, J.; CASTRO, E. AND MIRAS-PORTUGAL, M. T. (2001): Independent receptors for diadenosine pentaphosphate and ATP in rat midbrain single synaptic terminals. *European journal of Neurosciences*, 14, 918-926.

- (4) GUALIX, J.; GÓMEZ-VILLAFUERTE, R.; DÍAZ-HERNÁNDEZ, M. AND MIRAS-PORTUGAL, M. T. (2003): Presence of functional ATP and dinucleotide receptors in glutamatergic synaptic terminals from rat midbrain. *J. Neurochem.* 87, 160-171.
- (5) HERVÁS, C.; PÉREZ-SEN, R. AND MIRAS-PORTUGAL, M. T. (2003): Coexpression of functional P2X and P2Y nucleotide receptors in single cerebellar granule cells. *J. Neuroscience research.* 73, 384-399.
- (6) HERVÁS, C. (2004). Receptores de nucleótidos en neuronas granulares de cerebelo de rata: tipos y señalización. Tesis doctoral, UCM.
- (7) JIMÉNEZ, A. I.; CASTRO, E.; COMMUNI, D.; BOEYNAEMS, J.-M.; DELICADO, E. G. AND MIRAS-PORTUGAL, M. T. (2000): Coexpression of several types of metabotropic nucleotide receptors in single cerebellar astrocytes. *J. Neurochem.* 71, 2071-2079.
- (8) MALMSJO, M.; HOU, M.; PENDERGAST, W.; ERLINGE, D.; EDVINSSON, L. (2003): The stable pyrimidines UDPbetaS and UTPgammaS discriminate between contractile cerebrovascular P2 receptors. *Eur J Pharmacol.* 458 (3): 305-11.
- (9) MATEO, J.; MARTÍNEZ DE LECEA, M.; MIRAS-PORTUGAL, M. T. AND CASTRO, E. (1998): Ca²⁺ signals mediated by P2X-type purinoceptors in cultured cerebellar Purkinje cells. *The Journal of Neuroscience.* 18. 1704-1712.
- (10) MULLER, A.; DERKACH, D.; GRIFFITH, V.; SODERLING, L. C. (1997): Regulatory phosphorylation of AMPA-type glutamate receptors by CaM-KII during long-term potentiation. *Science.* 276 (5321): 2042-5.
- (11) NEARY, J. T.; KANG, Y.; WILLOUGHBY, K. A.; ELLIS, E. F. (2003): Activation of extracellular signal-regulated kinase by stretch-induced injury in astrocytes involves extracellular ATP and P2 purinergic receptors. *J Neurosci.* 23: 2348-56.