

UCH-FC
Doc-BMCN
S 117
C. 2

REGULACIÓN DEL RECEPTOR NMDA SINÁPTICO POR LA NEUROTROFINA BDNF



Tesis

Entregada A La

Universidad De Chile

En Cumplimiento Parcial De Los Requisitos

Para Optar Al Grado De

Doctor en Ciencias con Mención en Biología
Molecular, Celular y Neurociencias

Facultad De Ciencias

por

Rodrigo Andrés Sandoval Guzmán

Abril, 2008

Director de Tesis: Dra. Ursula Wyneken H.

FACULTAD DE CIENCIAS
Las Palmeras 3425 - Cas. 653 - Santiago



ESCUELA DE POSTGRADO
Fonos: 9787203 - 9787209 - Fax: 2712975
e-mail: epocas@uchile.cl

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACION

TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato

RODRIGO ANDRÉS SANDOVAL GUZMÁN

Ha sido aprobado por la comisión de Evaluación de la Tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias con Mención en Biología Molecular, Celular y Neurociencias, en el examen de Defensa de Tesis rendido el día 24 de Septiembre de 2007.

Director de Tesis:

Dra. Ursula Wyneken

Comisión de Evaluación de la Tesis:

Dra. Cecilia Vergara (Presidente)

Dr. Juan Bacigalupo

Dr. Adrián Palacios

Dr. Esteban Aliaga

Dr. Bernardo Morales

Ursula Wyneken
.....
Cecilia Vergara
.....
Juan Bacigalupo
.....
Adrián Palacios
.....
Esteban Aliaga
.....
Bernardo Morales
.....

*para Andrea, mi apoyo incondicional
y mi compañera de toda la vida.....y para
aliencito.....*

BIOGRAFÍA



Nombre Completo: Rodrigo Andrés Sandoval Guzmán.

Fecha de Nacimiento: 1 de diciembre de 1975.

Profesión: Bioquímico

Estudios primarios: Instituto Zambrano (1° a 4° Básico)

Instituto Alonso de Ercilla (5° a 8ª Básico)

Estudios Secundarios: Instituto Alonso de Ercilla (1° a 4° Medio)

Estudios Universitarios: Pregrado: Universidad de Chile (Fac. Ciencias Químicas y Farmacéuticas)

Postgrado: Universidad de Chile (Fac. de Ciencias)

Rodrigo Sandoval nació en Santiago, el 1 de diciembre de 1975, ciudad donde ha residido la mayor parte de su vida.

Parte de su educación primaria y secundaria la realizó en el Instituto Alonso de Ercilla, entre 1986 y 1993. Posteriormente entra a la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile a estudiar Bioquímica, desde donde egresa el año 1999. Realiza su tesis de pregrado en el laboratorio de Neurociencias de la Universidad de los Andes, a cargo de la Dra. Ursula Wyneken y recibe el título de bioquímico el año 2002.

Luego ingresa al Programa de Doctorado en Ciencias con mención en Biología Molecular, Celular y Neurociencias el año 2003, para comenzar así su tesis doctoral el año 2004, nuevamente a cargo de la Dra. Wyneken. Durante el transcurso de su tesis contrae matrimonio con Andrea Pedrero. El año 2007 Rodrigo realiza la defensa privada de su tesis doctoral y luego comienza a trabajar en la Facultad de Medicina de la Universidad Católica del Norte a cargo de la Dra. Floria Pancetti, luego de adjudicarse una posición postdoctoral financiada por el Programa Bicentenario de inserción a la Academia.

Actualmente Rodrigo y Andrea viven en la ciudad de Coquimbo y trabajan haciendo investigación y docencia en la UCN.

AGRADECIMIENTOS

Siempre es difícil dar las gracias a todos los que nos apoyan en determinadas empresas, y más aun recordarlos a todos... trataré de no cometer ese tipo de errores.

Primeramente, quiero agradecer a Andrea, mi esposa, por todo su apoyo y paciencia durante todo el tiempo que duró esta tesis, por acompañarme en todo momento, tanto física como emocionalmente. Este trabajo también es parte tuya. Gracias, esposa mía.

A mis padres Florentino y Matilde, por darme el cariño, los valores y la educación necesaria para poder llegar a esta instancia. Y si bien ya no están para poder ver el fruto de su esfuerzo, siempre estarán vivos en mi corazón.

A Noemí, Carlos, Pamela, Caco, Nicolás, Rodrigo, Cristina y la Mati, por comprender la importancia de este proyecto en mi vida, apoyarlo y respetarlo, sin necesariamente comprender que es lo que estaba yo haciendo. Perdón por todos esos domingos que no estuve durante el almuerzo familiar. Gracias y los quiero mucho.

A la Doctora Ursula Wyneken, por ser más que una directora de tesis. Usted es para mí mi maestra y mi modelo a seguir. Gracias por la paciencia para conmigo, por guiarme cuando estaba perdido y por enseñarme mucho más que ciencias. Gracias por su comprensión, por sus retos y sus consejos. Estos siete años que hemos pasado juntos han valido la pena. Siempre la recordaré.

A la Sole, Mauricio, Pancho, Romina, Estíbaliz, Calderón y los González, por su valiosa ayuda en el laboratorio, por ser compañeros y colegas en los que puedo confiar y sentirme como en familia. Por hacer el trabajo de laboratorio (a veces tedioso) más ameno y llevadero. Siempre los recordaré.

Al Doctor Fernando Orrego, por su preocupación más allá del ámbito de la ciencia, por ser generoso al momento de brindar un consejo, una palabra, o simplemente un saludo por la mañana (siempre acompañado de un rico Bon-o-Bon). Muchas gracias.

A la Doctora Gloria Riquelme, por ser una de las personas más íntegras que conozco. Porque el tiempo que estuve en su laboratorio me hizo sentir como si fuera parte de su grupo. Me entregó confianza, me enseñó no sólo electrofisiología, sino también como integrar la vida del laboratorio a la vida familiar y viceversa. Siempre fue como una mamá para todos los que trabajamos con ella, y realmente a veces nos hacía sentir como sus hijos. Gracias Doctora. Extiendo este agradecimiento al Mauri, la Pao, la Paulita, la Cata, la Vale y la Bernucci, todos partes de esa gran familia que es el LEM.

Y por último, pero no menos importante, quiero agradecer al Programa de Doctorado en Ciencias con mención en Biología Molecular, Celular y Neurociencias, por la confianza que han depositado en mí y por todos los conocimientos que me entregaron para formarme como científico. Gracias a los integrantes de la comisión, a los Doctores Cecilia Vergara, Bernardo Morales, Adrián Palacios, Esteban Aliaga y Juan Bacigalupo, por sus críticas y comentarios para que esta tesis resultara de la mejor forma.

Gracias a todos.

La presente tesis fue financiada por:
Proyecto MECESUP UCH0012
Proyecto MECESUP UCH0409
FARMACIAS CRUZ VERDE
Proyecto Fondecyt 1020258
Proyecto Anillo ACT09-2006
Proyecto Vicerrectoría de Apoyo de Tesis
Doctoral (Universidad de Chile) N° 31

Parte de estos resultados forman parte del manuscrito Sandoval M, Sandoval R, Thomas U, Spilker C, Smalla K-H, Falcón R, Marengo JJ, Calderón R, Saavedra V, Heumann R, Bronfman F, Garner C, Gundelfinger ED y Wyneken U, "Antagonistic effects of TrkB and p75NTR on NMDA receptor currents in postsynaptic densities transplanted into *Xenopus* oocytes" (2007) *J Neurochem* **101**: 1672-84.

*Sandoval M y Sandoval R contribuyeron de igual forma.

INDICE DE MATERIAS

INDICE DE MATERIAS.....	vii
INDICE DE FIGURAS	x
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xii
RESUMEN	1
SUMMARY	4
INTRODUCCIÓN	7
1. NEUROTROFINAS Y SUS RECEPTORES.....	7
1.1.1 VÍAS DE TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES ACTIVADAS POR BDNF	9
1.1.1.1 MEDIADAS POR TrkB.....	9
1.1.1.2 MEDIADAS POR p75 ^{NTR}	10
2. LA SINÁPSIS QUÍMICA EXCITADORA.....	11
2.1. LAS SINAPSIS QUÍMICAS EXCITADORAS.....	11
2.2. PAPEL DE LAS NEUROTROFINAS EN LA TRANSMISIÓN SINÁPTICA EXCITADORA.....	14
3. FISIOPATOLOGÍA DE LA EPILEPSIA.....	15
3.1. EPILEPSIAS IDIOPÁTICAS Y EPILEPSIAS ADQUIRIDAS.....	15
3.2. EPILEPTOGÉNESIS EN LA EPILEPSIA DEL LÓBULO TEMPORAL.....	16
4. PAPEL DE BDNF Y TRKB EN LA FISIOPATOLOGÍA DE LA EPILEPSIA	17
HIPOTESIS.....	19
OBJETIVO GENERAL.....	19
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19

MATERIALES Y MÉTODOS	20
1. PREPARACIÓN DE DPSs	20
2. INDUCCIÓN DE CONVULSIONES CON ÁCIDO KAÍNICO (STATUS EPILEPTICO O SE).....	23
3. COINMUNOPRECIPITACIÓN DE TRKB DESDE FRACCIONES SINÁPTICAS.	23
4. ELECTROFORESIS EN CONDICIONES DENATURANTES Y DETECCIÓN DE PROTEÍNAS DE LA DPS POR TÉCNICAS DE “WESTERN BLOT”	24
5. EXTRACCIÓN DE OVOCITOS DE <i>Xenopus laevis</i>.....	25
6. MICROINYECCIÓN DE DPSs EN OVOCITOS DE <i>Xenopus laevis</i>	25
7. ESTUDIOS DE FIJACIÓN DE POTENCIAL	26
8. ANÁLISIS DE DATOS ELECTROFISIOLÓGICOS	27
RESULTADOS	29
1. NMDA ACTIVA CORRIENTES EN OVOCITOS INYECTADOS CON DPSs.	29
2. BDNF MODULA LAS CORRIENTES ACTIVADAS POR NMDA.....	30
3. TRKB PARTICIPA EN LA POTENCIACIÓN PERO NO EN LA INHIBICIÓN DEL R-NMDA POR BDNF.....	33
4. EL EFECTO POTENCIADOR DE LOS R-NMDA POR BDNF ESTÁ MEDIADO POR PI3K Y ERK1/2.....	34
5. p75^{NTR} ESTÁ PRESENTE EN LA DPS Y PARTICIPA EN LA INHIBICIÓN DEL R-NMDA POR BDNF.....	36
6. EFECTO DE BDNF SOBRE LAS CORRIENTES ACTIVADAS POR NMDA EN DPS DE RATAS SOMETIDAS A STATUS EPILEPTICO (DPS-SE) 41	
7. EFECTO DE BDNF SOBRE DPS-SE AISLADAS EN FORMA SEPARADA DE CORTEZA E HIPOCAMPO.	49

DISCUSIÓN	53
1. REGISTRO DEL R-NMDA EN OVOCITOS INYECTADOS CON DENSIDADES POSTSINÁPTICAS.....	53
2. EFECTOS ANTAGÓNICOS DE TRKB Y p75^{NTR} SOBRE EL R-NMDA EN DPS CONTROL	56
3. EFECTO DE BDNF SOBRE LOS R-NMDA EN DPS-SE.....	59
4. PARTICIPACIÓN DE TRKB EN LA EPILEPTOGÉNESIS VERSUS PLASTICIDAD HOMEOSTÁTICA.....	61
BIBLIOGRAFÍA.....	64

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de purificación de DPS.	22
Figura 2. Representación gráfica del cálculo de $t_{0.5}$ en las corrientes activadas por NMDA.	27
Figura 3. NMDA activa corrientes específicas en ovocitos inyectados con DPSs.	30
Figura 4. BDNF potencia e inhibe las corrientes R-NMDA.	31
Figura 5. Efecto de BDNF sobre el $t_{0.5}$ e I_{peak} en ovocitos inhibidos y potenciados por BDNF.	32
Figura 6. El efecto potenciador de BDNF sobre el R-NMDA, pero no el inhibidor, es dependiente de TrkB.	34
Figura 7. PI3K y Erk1/2 participan en la potenciación de los R-NMDA.	35
Figura 8. $p75^{NTR}$ está presente y enriquecido en DPSs.	36
Figura 9. proNGF inhibe las corrientes mediadas por el R-NMDA.	38
Figura 10. La inhibición del R-NMDA por proNGF está mediada por $p75^{NTR}$	39
Figura 11. Efecto dual de BDNF sobre las corrientes R-NMDA.	41
Figura 12. Diferencias en el contenido de TrkB y su estado de fosforilación en DPSs luego de SE.	43
Figura 13. El nivel de fosforilación de TrkB está disminuido en telencéfalo después de SE.	44
Figura 14. El contenido de las subunidades NR2 del R-NMDA disminuye en DPS después de SE.	44
Figura 15. El contenido de $p75^{NTR}$ en DPS disminuye después de SE.	46
Figura 16. BDNF inhibe al R-NMDA en ovocitos inyectados con DPS-SE.	47
Figura 17. Dosis dependencia de la inhibición de los R-NMDA por BDNF después de SE.	48
Figura 18. proNGF no inhibe al R-NMDA y anti-TrkB revierte la inhibición de las corrientes R-NMDA por BDNF en DPS-SE.	49

Figura 19. Efecto de los inhibidores de la fosforilación de TrkB, PI3K y de Erk1/2 sobre la inhibición del R-NMDA por BDNF.	49
Figura 20. BDNF inhibe las corrientes R-NMDA en DPS-SE corticales pero no hipocampales.....	50
Figura 21. TrkB interactúa con PSD95 y nNOS en DPS de corteza y el inhibidor L-NNA para nNOS revierte la inhibición por BDNF luego de SE.	52
Figura 22. Modelo propuesto de la modulación por BDNF de los R-NMDA en DPS-C58	
Figura 23. Modelo propuesto de la modulación por BDNF de los R-NMDA en DPS-SE	61

LISTA DE ABREVIATURAS

AMPA: Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propiónico.

APV: Ácido 2-amino-5-fosfonoaléxico.

BDNF: Brain-derived Neurotrophic Factor. Factor Neurotrófico Derivado de Cerebro.

cAMP: cyclic Adenosin MonoPhosphate. Adenosin monofosfato cíclico.

CREB: cAMP Response Element-Binding protein. Proteína que se une al elemento de Respuesta activado por cAMP.

DAG: Diacil Glicerol.

DPS: Densidad Postsináptica.

DPS-C: DPS control.

DPS-SE: DPS luego de SE.

EGTA: Ácido glicol-bis (2-aminoetil eter)-N,N,N',N' tetraacético.

EPSP: Excitatory Post Synaptic Potential. Potencial Postsináptico Excitador.

Erk: Extracellular related kinase. Quinasa relacionada al medio Extracelular.

g: aceleración de gravedad.

HEPES: Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazin-etanosulfónico.

IgG: Inmunoglobulina tipo G.

kDa= KiloDalton.

K_i: Constante de Inhibición.

L-glu: L-glutamato.

L-NNA: N_o-Nitro-L-Arginina.

LTD: Long-term Depression. Depresión de larga duración.

LTP: Long-Term Potentiation. Potenciación de larga duración.

MAP: Mitogen-Activated Protein. Proteína activada por Mitógeno.

mRNA: messenger Ribonucleic Acid. Ácido Ribonucleico mensajero.

NGF: Nerve Growth factor. Factor de Crecimiento Nervioso.

NMDA: N-metil-D-aspartato.

nNOS: Óxido Nítrico Sintasa neuronal.

NR1: NMDA Receptor subunit 1. Subunidad 1 del Receptor de NMDA.

NR2: NMDA Receptor subunit 2. Subunidad 2 del Receptor de NMDA.

NR3: NMDA Receptor subunit 3. Subunidad 3 del Receptor de NMDA.

NTR: Neurotrophic Receptor. Receptor neurotrófico.

PBS: Phosphate Buffer Saline. Tampón Fosfato Salino.

PI3K: Phosphatidylinositol-3-Kinase. Fosfatidilinositol 3 quinasa.

PKC. Protein Kinase C. Proteína Quinasa C.

PLC γ : Phospholipase C gamma. Fosfolipasa C gama.

proBDNF: pro Brain-derived Neurotrophic Factor. Precursor del Factor Neurotrófico Derivado de Cerebro.

proNGF: pro Nerve Growth factor. Precursor del Factor de Crecimiento Nervioso.

pS: picoSiemens

PSD-95: Postsynaptic Density protein of 95 kDa. Proteína de la Densidad postsináptica de 95 kDa.

pTyr: tirosina fosforilada.

R-AMPA: Receptor para L-glutamato sensible a AMPA.

R-KA: Receptor para L-glutamato sensible a KA.

R-NMDA: Receptor para L-glutamato sensible a NMDA.

SDS-PAGE: Sodium Dodecyl Sulphate- Poliacrylamide Gel Electrophoresis.

Electroforesis de Proteínas en Gel de Poliacrilamida con Dodecil Sulfato de Sodio.

SE: Status Epilepticus.

SNC: Sistema Nervioso Central.

TLE: Temporal Lobe Epilepsy. Epilepsia de Lóbulo Temporal.

Tris: Tris-hidroximetil-amino-metano.

TrkB: Tropomyosin-Related Kinase B. Quinasa Relacionada a Tropomiosina B.

TRP: Transient Receptor Potencial. Potencial de Receptor Transitorio.

RESUMEN

La neurotrofina BDNF cumple un papel esencial en fenómenos que van desde plasticidad sináptica implicada en memoria y aprendizaje hasta epilepsia. El exceso de BDNF subyace a la fisiopatología de la epilepsia del lóbulo temporal (TLE). La TLE se adquiere en el adulto después de un insulto inicial, como lo es una convulsión continua (Status Epilepticus o SE). El SE induce una reorganización de circuitos neuronales hipocámpales durante el período de epileptogénesis, que depende de BDNF y su receptor, TrkB. TrkB es una tirosina quinasa transmembrana que al unir a la neurotrofina se autofosforila, lo que activa tres vías de señalización: MAP quinasas Erk1/2, fosfatidilinositol 3 quinasa (PI3K) y fosfolipasa C- γ (PLC- γ). BDNF y su precursor proBDNF, también activan a un receptor estructuralmente no relacionado, el receptor para todas las neurotrofinas p75^{NTR}.

BDNF se libera principalmente en sinapsis excitadoras, donde se encuentran estructuras especializadas en las espinas dendríticas denominadas densidades postsinápticas (DPS). Las DPSs contienen a los receptores para L-glutamato y al receptor TrkB. El receptor ionotrópico para L-glutamato tipo NMDA (R-NMDA) es potenciado por BDNF/TrkB, a través de mecanismos de señalización intracelular, particularmente fosforilación de proteínas. Datos de nuestro laboratorio mostraron que el nivel de TrkB en DPS aumenta en 600% después de SE, lo que permitió plantear la siguiente hipótesis: **La potenciación del R-NMDA por BDNF/TrkB en densidades**

postsinápticas está aumentada después de SE e involucra vías celulares específicas.

Este mecanismo sería pro-epileptogénico.

Para estudiar la regulación propuesta, se aislaron DPSs desde telencéfalo de ratas adultas y se microinyectaron en ovocitos de *Xenopus laevis*, con el fin de registrar las corrientes activadas por NMDA mediante la técnica de fijación de potencial, en presencia y ausencia de BDNF. Por otro lado, se cuantificaron los niveles relativos de proteínas y el nivel de fosforilación (activación) de TrkB mediante Western blots e inmunoprecipitaciones.

En ovocitos inyectados con DPSs control, BDNF indujo dos tipos de modulaciones del R-NMDA: inhibición (50%) o potenciación (30%). Mediante estrategias farmacológicas, se mostró que la potenciación dependía de TrkB, de PI3K y de Erk 1/2. En cambio, la inhibición era TrkB-independiente y dependía del receptor p75^{NTR}

Por otra parte, en el 81% de los ovocitos inyectados con DPS después de SE (DPS-SE), BDNF inhibió al R-NMDA. Esta inhibición fue independiente de p75^{NTR}, pero dependiente de TrkB, PI3K y Erk 1/2. Al aislar DPSs-SE desde corteza e hipocampo separadamente, encontramos que BDNF/TrkB inhibe al R-NMDA en el 100% de DPSs corticales, pero nunca en DPSs hipocampales. En SE- DPSs, el nivel de fosforilación de TrkB se encuentra disminuido, lo que fue corroborado por inmunoprecipitación de TrkB. También encontramos que la óxido nítrico sintasa neuronal (nNOS) interactúa con el receptor en corteza, no así en hipocampo. Resultados preliminares electrofisiológicos sugieren que óxido nítrico es responsable de la inhibición del R-NMDA después de SE.

Conclusiones: 1.- En DPS control, TrkB y p75^{NTR} regulan al R-NMDA en forma antagónica. 2.- Después de SE, TrkB no fosforilado inhibe al R-NMDA en corteza cerebral pero no en hipocampo.

La inhibición del R-NMDA por TrkB después de SE sugiere que BDNF induce una respuesta de tipo homeostática en sinapsis corticales, pero no hipocampales, que contribuiría a inhibir la propagación de descargas neuronales generadas en el foco epiléptico. El presente trabajo permitió avanzar en la comprensión de los mecanismos activados por TrkB en las sinapsis, los que participarían en plasticidad sináptica asociativa y/o homeostática.

SUMMARY

The neurotrophin BDNF plays an essential role in diverse phenomena, ranging from synaptic plasticity implicated in learning and memory to epilepsy. An excess of BDNF underlies the pathophysiology of temporal lobe epilepsy (TLE). TLE is acquired in the adult brain following an insult, like a continuous seizure or Status Epilepticus (SE). SE produces a neuronal and functional reorganization, or epileptogenesis, which depends on BDNF and its receptor, TrkB. TrkB is a transmembrane tyrosine kinase which becomes autophosphorylated following interaction with its ligand. The autophosphorylation, in turn, activates 3 signaling pathways: Erk 1/2 MAP kinases, phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) and phospholipase C- γ (PLC- γ). BDNF and its precursor proBDNF also activate a structural unrelated receptor, the p75^{NTR} neurotrophin receptor.

BDNF is mainly released at excitatory synapses, where specialized structures in the dendritic spine, called postsynaptic densities (PSD), are located. PSDs contain the glutamate and TrkB receptors. BDNF/ TrkB is known to potentiate the NMDA-R. Data from our laboratory show that the level of TrkB in PSDs is increased up to 600% after SE. Therefore, we postulate the following hypothesis: **BDNF/TrkB-dependent NMDA-R potentiation is increased after SE and involves specific cellular pathways.** This mechanism might contribute to epileptogenesis. To study the pathways that mediate the proposed regulation, rat forebrain PSDs were microinjected into *Xenopus laevis* oocytes,

in order to record the NMDA-activated macroscopic currents by voltage clamp techniques, both in the presence and absence of BDNF. In addition, the relative protein levels and of TrkB and phospho-TrkB were quantified by Western Blot and immunoprecipitation techniques. In oocytes injected with control PSDs, BDNF induced two types of NMDA-R modulation: inhibition (50% of the experiments) or potentiation (30% of the experiments). Using pharmacological strategies, it was shown that potentiation depended on TrkB, PI3K and Erk1/2, whereas the inhibition was TrkB-independent and but depended on the p75^{NTR} receptor.

On the other side, in 81% of the oocytes injected with PSDs isolated after SE (SE-PSD), BDNF inhibited the NMDA-R. This inhibition was p75^{NTR}-independent, but TrkB, PI3K and Erk1/2-dependent. When cortical and hippocampal PSDs were isolated separately, we found a 100% inhibition in cortical SE-PSDs, but never in hippocampal SE-PSDs. In SE-PSDs, the phosphorylation level of TrkB was decreased. This was confirmed by immunoprecipitation. In TrkB immunoprecipitates from cortical and hippocampal PSDs, we found that neuronal Nitric Oxide Synthase (nNOS) interacts with the receptor in brain cortex but not hippocampus. Preliminary electrophysiological studies suggest that nitric oxide is responsible for the inhibition of NMDA-Rs after SE.

Conclusions: 1. - In control PSDs, TrkB and p75^{NTR} regulate antagonically the NMDA-R. 2. - After SE, non-phosphorylated TrkB is able to inhibit the NMDA-R in cerebral cortex but not hippocampus.

The TrkB-dependent inhibition of NMDA-R after SE suggests that BDNF induces a homeostatic-type response in cortical, but not hippocampal, synapses, contributing to inhibiting neuronal discharge propagation through the cerebral cortex. The

present work allows a better understanding of the mechanisms activated by synaptic TrkB, which may be involved in associative as well as homeostatic synaptic plasticity.

INTRODUCCIÓN

1. NEUROTROFINAS Y SUS RECEPTORES.

Las neurotrofinas son una familia de proteínas esenciales para el desarrollo del Sistema Nervioso Central (SNC) en vertebrados. En mamíferos, existen 4 neurotrofinas: el factor de crecimiento nervioso (NGF), el factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF), la neurotrofina 3 (NT3) y la neurotrofina 4/5 (NT4/5). Estas proteínas, además, son capaces de regular la morfología y función de las neuronas en el SNC adulto. En particular, BDNF regula el crecimiento axonal y dendrítico, morfología sináptica, liberación de neurotransmisores, potenciación de larga duración (LTP) y otros tipos de plasticidad sináptica (Horch 2004, Huang and Reichardt 2001, McAllister *et al.* 1999, Poo 2001, Tyler *et al.* 2006).

Las neurotrofinas son sintetizadas a partir de sus precursores, las proneurotrofinas, las que son procesadas posteriormente hacia la forma madura de la proteína (Lu 2003, Mowla *et al.* 2001). Se ha descrito recientemente que las proneurotrofinas tienen actividad biológica (Lee *et al.* 2001, Woo *et al.* 2005); por ejemplo, cerca del 50% del BDNF se libera al espacio sináptico como proBDNF donde facilita la depresión de larga duración o LTD (Woo *et al.* 2005).

Existen dos tipos de receptores para neurotrofinas: 1) los receptores de la familia Trk (por Tropomyosin Related Kinase), que son receptores del tipo tirosina quinasa transmembrana, específicos para cada neurotrofina (Dechant *et al.* 1993). Así, NGF se une al receptor TrkA, BDNF y la NT4/5 a TrkB, y NT3 al receptor TrkC. 2) El receptor

p75^{NTR}, que une a cada una de las neurotrofinas mencionadas anteriormente con similar afinidad (Barker 2004, Chao 2003). Este receptor también interactúa con proneurotrofinas como proBDNF y proNGF (Lee *et al.* 2001), y forma complejos heteroméricos con otros receptores como sortilina o el receptor Nogo (Nykjaer *et al.* 2004, Wang *et al.* 2002, Wong *et al.* 2002). De este modo, modula vías de señalización muy diversas, lo que depende tanto del tipo celular como de su localización subcelular.

Aunque ambos tipos de receptores (Trk y p75^{NTR}) presentan afinidad en el rango nanomolar (10^{-9} M) para sus ligandos cuando se estudian en forma separada, se ha mostrado que su afinidad es modulada por interacción entre ambos receptores (Hantzopoulos *et al.* 1994). Así, (Hempstead *et al.* 1991) demostraron, en un sistema heterólogo, que la co-expresión de TrkA y p75^{NTR} lleva a un aumento en la afinidad de NGF por TrkA a rangos sub-nanomolares (10^{-11} M). Ambos receptores formarían un complejo tetramérico Trk-p75^{NTR}. Sin embargo, estudios recientes sugieren que la formación del complejo TrkB-p75^{NTR} es improbable, proponiéndose en forma alternativa, que el “sitio de alta afinidad” (medido por su respuesta biológica) es el resultado de la convergencia de cascadas de transducción activadas por ambos receptores sobre blancos intracelulares comunes. Otra posibilidad planteada es una interacción a través de proteínas adaptadoras (Wehrman *et al.* 2007).

En general, se ha visto que la afinidad de p75^{NTR} por sus ligandos es modulada por la presencia de co-receptores que están presentes en compartimientos subcelulares específicos. Es el caso de Sortilina, que al co-expresarse con este receptor aumenta la afinidad por proNGF desde el rango nanomolar (10^{-9} M) a rangos sub-nanomolares (4.2×10^{-10} M (Teng *et al.* 2005).

La regulación de la afinidad de las neurotrofinas por sus receptores tiene como consecuencia que el efecto biológico depende de la neurotrofina liberada, su concentración en el lugar de acción, del receptor y/o co-receptor presente.

1.1.1 VÍAS DE TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES ACTIVADAS POR BDNF

1.1.1.1 MEDIADAS POR TrkB.

BDNF se une como dímero al receptor TrkB, induciendo a su vez su dimerización y la trans-autofosforilación en residuos de tirosina. Como consecuencia, se activan diferentes cascadas de señalización intracelulares.

La asociación de la proteína adaptadora Shc a su residuo de tirosina 504 fosforilado (pTyr504), activa la vía de la fosfatidil-inositol-3 quinasa (PI3K)- Akt (también conocida como proteína quinasa B o PKB), promoviendo la supervivencia neuronal (Jaboin *et al.* 2002, McKenzie *et al.* 2006). Por otro lado, pTyr504 activa a la vía de las MAP quinasas Erk 1/2, que a su vez activan al factor de transcripción CREB, lo que se asocia a la regulación del ciclo celular, elongación axonal, crecimiento y diferenciación de neuritas y plasticidad sináptica (Chen *et al.* 2007, Gooney and Lynch 2001, Tong *et al.* 2004).

La tirosina 805 fosforilada (pTyr805) activa, por unión directa, a la fosfolipasa C γ (PLC γ), lo que induce la síntesis de diacil glicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP3) y, en consecuencia, lleva a aumentos de Ca²⁺ intracelular. DAG a su vez activa la proteína quinasa C (PKC). Este mecanismo participaría en fenómenos de plasticidad sináptica como potenciación de larga duración (LTP) y en procesos de aprendizaje y memoria (Matsumoto *et al.* 2001, Minichiello *et al.* 2002).

BDNF modifica la excitabilidad neuronal a través de la regulación de distintos tipos de canales iónicos. TrkB inhibe al canal de K^+ $K_v1.3$ en neuronas de bulbo olfatorio (Tucker and Fadool 2002); activa corrientes de Na^+ mediadas por el canal $Na_v1.9$ (Blum *et al.* 2002) y activa canales catiónicos de la familia TRP (Jia *et al.* 2007, Li *et al.* 1999). En estudios de canal único, TrkB aumenta la probabilidad de estado abierto de los R-NMDA en neuronas de hipocampo (Levine and Kolb 2000) y aumenta las corrientes totales mediadas por este receptor en células ganglionares de retina (Kim *et al.* 2006).

La regulación de los canales iónicos anteriormente descritos involucraría la activación de proteína quinasas río abajo de TrkB. Sin embargo, se desconocen las cascadas celulares específicas implicadas. Una excepción es la potenciación del canal $Na_v1.9$, la que ocurre con un curso temporal de milisegundos, incompatible con eventos de fosforilación *de novo* (Blum *et al.* 2002).

1.1.1.2 MEDIADAS POR $p75^{NTR}$

El receptor $p75^{NTR}$ activa cascadas de señalización intracelulares mediante interacciones proteína-proteína. Se han identificado numerosas proteínas adaptadoras que se unen a este receptor, como por ejemplo el Factor de Interacción con Receptores para Neurotrofinas (NRIF), el Ejecutor de Muerte Celular Asociado a $p75^{NTR}$ (NADE) y el Antígeno Homólogo Asociado al Melanoma que Interactúa con Receptores para Neurotrofinas (NRAGE), los cuales se unen a distintas regiones de su dominio citoplasmático (Hempstead 2002). A través de estos adaptadores, $p75^{NTR}$ puede activar a la proteína quinasa N-terminal de Jun (JNK), el factor transcripcional $NF\kappa B$ y la vía de

las ceramidas (Roux and Barker 2002). Una de las funciones que cumple este receptor durante el desarrollo del SNC es promover la muerte celular. (Majdan and Miller 1999).

Como los mecanismos activados por BDNF en las sinapsis tienen una relevancia en relación a diversos tipos de plasticidad sináptica, en esta tesis se propone estudiar los mecanismos mediante los cuales BDNF es capaz de regular al R-NMDA, uno de los receptores postsinápticos en las sinapsis excitadoras.

2. LA SINÁPSIS QUÍMICA EXCITADORA.

2.1. LAS SINAPSIS QUÍMICAS EXCITADORAS.

En las sinapsis excitadoras en el SNC, donde la transferencia de la señal sináptica se produce por liberación del neurotransmisor L-glutamato (L-glu) (Kandel *et al.* 2000), los terminales axónicos contactan espinas dendríticas, pequeñas estructuras de alrededor de $1 \mu\text{m}^3$ que sobresalen desde las dendritas.

La membrana postsináptica de las espinas dendríticas presenta un engrosamiento visible al microscopio electrónico, denominada densidad postsináptica (DPS). Esta estructura es una especialización del citoesqueleto, al que están anclados los elementos moleculares involucrados en la transducción de la señal sináptica y generación del potencial postsináptico excitador (EPSP) (Kennedy 1993, Ziff 1997).

Las DPSs contienen diversos tipos de proteínas: receptores para neurotransmisores, proteínas de adhesión, proteínas andamio, proteínas involucradas en transducción de señales y componentes del citoesqueleto (Kennedy 2000). También contienen al receptor TrkB (Wu *et al.* 1996). Estos distintos tipos de proteínas presentes en la DPS forman complejos macromoleculares, los que permiten una adecuada

compartimentalización de la respuesta, característica que confiere especificidad temporal y espacial a la transducción de la señal sináptica.

En las sinapsis excitadoras existen dos tipos de receptores para L-glu: 1) receptores ionotrópicos, que son canales iónicos activados por ligando (Madden 2002), y 2) receptores metabotrópicos, acoplados a proteína G (Coutinho and Knopfel 2002).

Los receptores ionotrópicos se clasifican, mediante herramientas farmacológicas, en receptores tipo NMDA, AMPA y kaínico. El receptor de tipo NMDA (R-NMDA) se activa por ácido N-metil D-aspartico y juega un papel central en procesos como plasticidad sináptica, memoria, aprendizaje y formación de redes neuronales durante el desarrollo (du Bois and Huang 2007, Fox *et al.* 1992, Massey *et al.* 2004). Los receptores de tipo AMPA (R-AMPA) son sensibles al ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propiónico (AMPA), mientras los receptores de tipo kainato (R-KA) son sensibles a ácido kaínico. Describiremos con mayor detalle las características del R-NMDA, cuya regulación fue estudiada en la presente tesis.

Los R-NMDA son heterotetrameros formados por 2 subunidades NR1 y 2 subunidades NR2 que es activado por dos agonistas endógenos, L-glu más D-serina, necesarios para la apertura del canal iónico (Mothet *et al.* 2000). Las 8 isoformas descritas de la subunidad NR1 provienen de un gen, mientras que las subunidades NR2 provienen de cuatro genes diferentes (NR2A, B, C o D) siendo las más abundantes en el SNC adulto NR2A y NR2B. Existe una tercera subunidad, NR3 (NR3 A y B) que es poco abundante y cuya función aún está poco clara. La subunidad NR2 contiene el sitio

de unión para L-glu mientras la subunidad NR1 contiene el sitio de unión para D-serina (Haradahira *et al.* 2003, Madden 2002).

Los R-NMDA son canales catiónicos no selectivos, permeables a Na^+ , K^+ y Ca^{2+} y se caracterizan por ser bloqueados en forma dependiente de potencial por Mg^{2+} extracelular (Cull-Candy and Leszkiewicz 2004).

La actividad de los R-NMDA está modulada por fosforilación de sus subunidades por diferentes proteínas quinasas. Se sabe que la proteína quinasa A (PKA) y PKC fosforilan las subunidades NR1, NR2A y NR2B (Leonard and Hell 1997, Ehlers *et al.* 1995) y que la proteína quinasa dependiente de Ca^{2+} /Calmodulina de tipo II (CaMKII) fosforila a las subunidades NR2A y NR2B (Omkumar *et al.* 1996). La proteína quinasa Fyn, de la familia Src, fosforila a la subunidad NR2B, lo que depende de BDNF (Xu *et al.* 2006) y estudios recientes demostraron que la quinasa Akt fosforila la subunidad NR1 (Sanchez-Perez *et al.* 2006).

Funcionalmente, los R-NMDA presentan propiedades biofísicas distintas dependiendo del tipo de subunidad NR2 presente. Receptores heterodiméricos formados por NR1/NR2A desensibilizan más rápidamente (constante de tiempo de inactivación de ~100 ms) que los receptores heterodiméricos NR1/NR2B (~250 ms) (Cull-Candy and Leszkiewicz 2004).

Las subunidades NR2A y NR2B poseen dominios citoplasmáticos que interactúan diferencialmente con proteínas de la DPS. Por ejemplo, NR2A interactúa con PSD-95 mientras NR2B interactúa preferentemente con SAP102 (Cull-Candy and Leszkiewicz 2004). Ambas proteínas andamio interactúan a su vez con una gran



diversidad de proteínas, por ejemplo, PSD-95 se une a la Óxido Nítrico Sintasa Neuronal (nNOS), enzima que está involucrada en la transducción de la señal sináptica.

2.2. PAPEL DE LAS NEUROTROFINAS EN LA TRANSMISIÓN SINÁPTICA EXCITADORA.

Un gran número de evidencias indican que BDNF regula la liberación de L-glu (Tyler *et al.* 2006) y potencia la respuesta postsináptica (Levine *et al.* 1998, Lohof *et al.* 1993). La potenciación del R-NMDA postsináptico por BDNF sería clave para explicar aumentos en la respuesta sináptica inducidos por esta neurotrofina (Poo 2001). A su vez, nosotros pensamos que la regulación del R-NMDA por BDNF sería una especie de “indicador” de eventos postsinápticos posteriores (por ejemplo, una regulación positiva contribuiría a potenciación sináptica). Sorprendentemente, (Woo *et al.* 2005) mostraron que BDNF en su forma inmadura (proBDNF) facilita la depresión de larga duración a través de interacción con $p75^{\text{NTR}}$, mientras que BDNF a través de TrkB facilita la LTP. Esto sugiere que las sinapsis y por ende, el R-NMDA, podrían ser regulados en forma bidireccional por ambas formas de neurotrofinas.

Efectos antagónicos de TrkB y $p75^{\text{NTR}}$ también han sido descritos en otros sistemas experimentales. Por ejemplo, la densidad y complejidad de dendritas estaría modulada positivamente por TrkB y negativamente por $p75^{\text{NTR}}$ (Zagrebelsky *et al.* 2005). Sin embargo, aunque la presencia de $p75^{\text{NTR}}$ se ha evidenciado en dendritas de hipocampo (Woo *et al.* 2005), no se conoce efecto alguno de este receptor sobre canales iónicos.

En esta tesis se propuso estudiar la regulación del R-NMDA por BDNF en DPS aisladas desde telencéfalo de rata, estudio que resulta novedoso ya que la señalización

activada por neurotrofinas depende de la localización subcelular de sus receptores (Heerssen and Segal 2002, Segal 2003). Además, datos de nuestro laboratorio indican que en un modelo de epilepsia del lóbulo temporal, TrkB aumenta en DPSs. De hecho, se ha propuesto que TrkB contribuye muy importantemente a la hiperexcitabilidad neuronal que se observa en la epilepsia (Scharfman *et al.* 1999, Scharfman *et al.* 2002). Sin embargo, se desconoce cuál es el efecto sináptico de BDNF en esta patología.

3. FISIOPATOLOGÍA DE LA EPILEPSIA.

La epilepsia es un desorden neurológico, que se caracteriza por la presencia de descargas neuronales espontáneas y recurrentes (McNamara 1999). Estas descargas neuronales se pueden manifestar como convulsiones. La epilepsia afecta al 1-2% de la población mundial y los costos monetarios para su tratamiento son altos. El 30- 50% de la población es refractaria a los tratamientos farmacológicos, dejando como única opción la remoción quirúrgica del foco epiléptico. Las epilepsias están asociadas a un deterioro cognitivo importante de los pacientes, lo que disminuye su calidad de vida (DeLorenzo *et al.* 2005). Por lo tanto, es de gran importancia el estudio de las causas y procesos que llevan a la generación de la epilepsia.

3.1. EPILEPSIAS IDIOPÁTICAS Y EPILEPSIAS ADQUIRIDAS.

Las epilepsias idiopáticas no tienen una causa conocida (DeLorenzo 1991) y corresponden a alrededor del 50% de las epilepsias. Sin embargo, con el avance de la genética se ha demostrado que la mayoría de estas epilepsias se deben a mutaciones en diversos genes, los que en su gran mayoría codifican para canales iónicos (Bertrand *et al.* 1998, Biervert *et al.* 1998).

Por otra parte, el 50% restante de las epilepsias son consecuencia de una injuria cerebral (como un tumor, traumatismo o convulsión continua o status epilepticus, SE), que induce una reorganización de circuitos neuronales cerebrales. Estas epilepsias son denominadas epilepsias adquiridas, la mayoría de las cuales son Epilepsias del Lóbulo Temporal (TLE), ya que el hipocampo y estructuras temporales adyacentes se convierten en el foco epiléptico.

3.2. EPILEPTOGÉNESIS EN LA EPILEPSIA DEL LÓBULO TEMPORAL.

Un insulto cerebral, como un SE, induce una reorganización de circuitos neuronales hipocampales, proceso llamado epileptogénesis. En un hipocampo normal existe un adecuado balance entre excitación e inhibición. Durante la epileptogénesis se pierde este balance, ya que aumentan las conexiones sinápticas excitadoras, mientras que las inhibitoras disminuyen. La epilepsia se establece una vez que se generan descargas espontáneas, (DeLorenzo 2004, McNamara 1999).

Los mecanismos involucrados en la epileptogénesis han sido motivo de muchos estudios, ya que se piensa que este proceso podría ser intervenido con fines preventivos y terapéuticos. Durante la epileptogénesis ocurre crecimiento de axones recurrentes en el giro dentado del hipocampo (Siddiqui and Joseph 2005), cambios en la morfología de las espinas dendríticas (Dashtipour *et al.* 2002, Wong 2005); aumento de la concentración de glutamato extracelular (Liu *et al.* 1997, Ueda *et al.* 2002) y aumentos en la $[Ca^{2+}]_i$ neuronal (DeLorenzo *et al.* 2005). En forma concomitante, ocurre muerte neuronal por sobre-estimulación glutamatérgica (o excitotoxicidad), pero también gliosis y neurogénesis. (Ebert *et al.* 2002, Meldrum 1997)

Existen diferentes modelos para el estudio de TLE. En nuestro laboratorio, usamos la inyección intraperitoneal de ácido kaínico como inductor de SE, lo que lleva al desarrollo de TLE después de un período de epileptogénesis que dura entre 3 y 5 semanas. (Brandt *et al.* 2003, Sperk 1994, Wyneken *et al.* 2001)

4. PAPEL DE BDNF Y TRKB EN LA FISIOPATOLOGÍA DE LA EPILEPSIA

Una serie de estudios indican que BDNF sería responsable de gran parte de los cambios estructurales y funcionales observados en la TLE (Scharfman 2005). Tanto el mRNA como el contenido proteico de esta neurotrofina aumentan en el hipocampo, luego de la administración sistémica de ácido kaínico (Tongiorgi *et al.* 2004, Kato-Semba *et al.* 1999). También aumenta el mRNA y la proteína TrkB, así como su estado de activación (o fosforilación) (Danzer *et al.* 2004, Koyama and Ikegaya 2005).

Tan importantes como los mecanismos que participan en la epileptogénesis son los mecanismos adaptativos que permiten la sobrevivencia de circuitos neuronales después de SE en modelos animales o en sujetos epilépticos. En un cerebro normal, mecanismos homeostáticos regulan el balance entre excitación e inhibición manteniendo la actividad neuronal en un rango fisiológico. Estos mecanismos previenen incrementos o disminuciones descontrolados en la actividad (Davis 2006). Datos recientes de nuestro laboratorio muestran que TrkB disminuye en regiones específicas de la corteza cerebral después de un SE, disminución que se correlaciona con retracción dendrítica (Ampuero *et al.* 2007). Este hallazgo se contrapone a lo descrito en el hipocampo, donde el aumento y activación de TrkB después de SE induce plasticidad pro-epileptogénica, esto es, crecimiento aberrante de axones y dendritas.

En aparente conflicto con la proposición de un papel diferencial de TrkB en hipocampo comparado con corteza está el hallazgo de nuestro propio laboratorio de que TrkB aumenta en un 600% en DPS aisladas desde corteza e hipocampo (Wyneken *et al.* 2003). Por ello, nos propusimos estudiar la regulación del R-NMDA por BDNF en DPS aisladas tanto desde el hipocampo como la corteza de animales control y de animales que habían sufrido SE.

HIPOTESIS

La potenciación del R-NMDA por BDNF/TrkB en densidades postsinápticas está aumentada después de SE e involucra vías celulares específicas.

OBJETIVO GENERAL

- Determinar los mecanismos involucrados en la regulación del receptor de NMDA por BDNF en DPS control (DPS-C) y en DPS después de SE (DPS-SE).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estudiar mediante técnicas de fijación de potencial, el efecto de BDNF sobre las corrientes activadas por NMDA en ovocitos de *Xenopus laevis* inyectados con DPS-C y DPS-SE.
- Evaluar, usando inhibidores y anticuerpos que llevan a pérdida de función, la participación de TrkB en tales efectos.
- Identificar, usando inhibidores farmacológicos, cascadas de transducción dependientes de TrkB que regulan a los R-NMDA.
- Identificar, usando métodos de co-inmunoprecipitación, los complejos proteicos asociados a TrkB en DPS control y DPS-SE.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. PREPARACIÓN DE DPSs

Las Densidades Postsinápticas (DPSs) fueron preparadas según el método descrito por (Carlin *et al.* 1980) modificado según (Wyneken *et al.* 2001). Para cada preparación, se aislaron los telencéfalos o, en los casos que se indiquen, las cortezas e hipocampos separados de 12 ratas, y se colocaron inmediatamente en 6 ml/gth (gramo de tejido húmedo) de tampón de homogenización (Sacarosa 0.32 M, EGTA 0.5 mM, Tris-Cl 5 mM pH 7.4 suplementado con una mezcla de inhibidores de proteasas (Complete, Protease Inhibitor Cocktail Tablets, Boehringer Mannheim). Toda la preparación se realizó en frío, entre 0 y 4°C. Los telencéfalos (o cortezas e hipocampos) se picaron con tijeras de acero inoxidable y se homogenizaron en un homogenizador vidrio-teflón (doce golpes).

El homogenizado se centrifugó a 1.000 x g por 10 minutos, se lavó el sedimento (P1) en tampón de homogenización y se volvió a centrifugar a 1000 x g por 5 minutos. Se recuperaron los sobrenadantes (S₁), que se centrifugaron a 12.000 x g por 20 min.

La porción sedimentada (P₂) se resuspendió en un volumen final de 1 ml/gth de sacarosa 0.32 M, EGTA 0.5 mM, Tris-Cl 5 mM pH 8.1, se homogenizó en homogenizador vidrio-teflón, y se cargó sobre una gradiente discontinua de sacarosa 1 M/1.2 M en Tris-Cl 5 mM pH 8.1 (4.5 ml por fase), con el fin de separar el material por sedimentación a equilibrio en una gradiente de densidad. La gradiente se centrifugó a 250.000 x g por 60 minutos. Después de la centrifugación se descartó el sedimento,

compuesto principalmente por mitocondrias, y la interfase 0.32/1 M de sacarosa, compuesta principalmente por mielina, y se recolectó la interfase 1.0/1.2 M sacarosa, fracción que corresponde a los botones sinaptosomales resellados y unidos a membranas postsinápticas o sinaptosomas. Éstos se sometieron a shock hipo-osmótico, agregando a la interfase colectada 10 volúmenes de EGTA 0.5 mM, Tris-Cl 5 mM pH 8.1 e incubándola durante 30 minutos a 0°C, con agitación suave.

Posteriormente, el material se centrifugó a 33.000 x g por 30 minutos, y el precipitado resultante se resuspendió nuevamente en un volumen final de 1 ml/gth de sacarosa 0.32 M, EGTA 0.5 mM, Tris-Cl 5 mM pH 8.1. Éste se homogenizó en homogenizador vidrio-teflón, y se cargó sobre una gradiente de sacarosa discontinua idéntica a la anterior, que se centrifugó a 250.000 x g por 60 minutos para luego recuperar el material presente en la interfase 1.0-1.2 M, correspondiente a membranas sinápticas. Éstas se sometieron a extracción con detergente (delipidación) diluyendo la fracción hasta 6 ml/gth con sacarosa 0.32 M, Tris-Cl 5 mM pH 8.1, para luego agregar un volumen igual de sacarosa 0.32 M, CaCl₂ 0.025 mM, Tritón X-100^{M.R.} 1%, DTT 2 mM, Tris-Cl 5 mM pH 8.1. Después de centrifugar a 33.000 x g por 30 min, el sedimento se lavó con HEPES-Na 50 mM pH 7.4 y se centrifugó a 250.000 x g por 10 min.

El precipitado final corresponde a DPSs y fue resuspendido en 0.2 ml/gth de HEPES 50 mM pH 7.4. El material se fraccionó en alícuotas de 100 µg para ser usado en experimentos de Western blots e inmunoprecipitación, y en alícuotas de 30 µg para

ser usadas en experimentos electrofisiológicos. Estas fracciones se congelaron rápidamente en un baño de N₂ líquido y se almacenaron a -80°C hasta su uso (Figura 1).

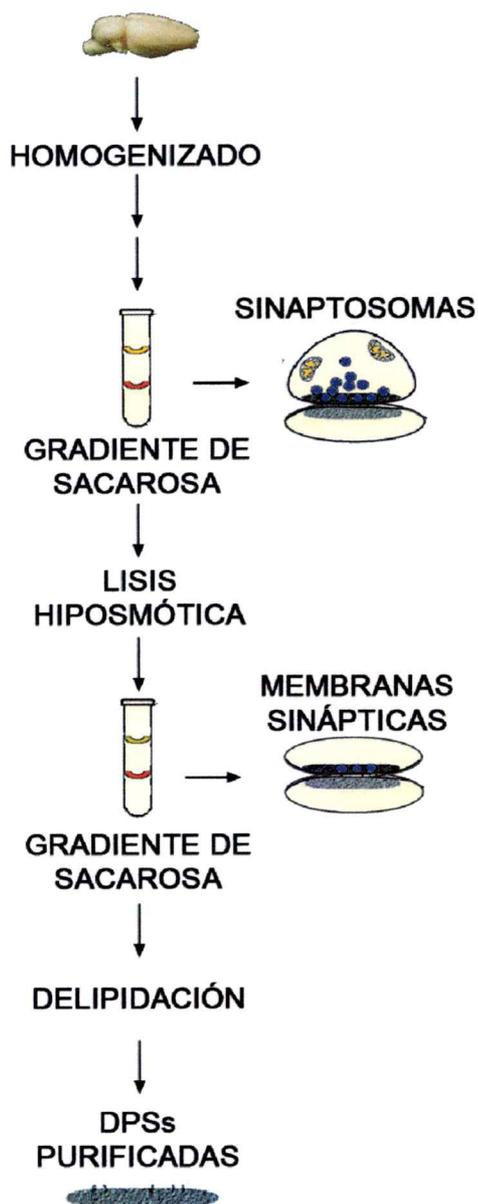


Figura 1. Esquema de purificación de DPS.

2. INDUCCIÓN DE CONVULSIONES CON ÁCIDO KAÍNICO (STATUS EPILEPTICO O SE)

Ratas Sprague Dawley de 12 semanas (250-300 g) fueron inyectadas por vía intraperitoneal con solución salina o con ácido kaínico disuelto en solución salina (10 mg/kg de rata). La severidad de las convulsiones fue determinada de acuerdo con (Zhang *et al.* 1997). Se seleccionaron solamente las ratas que presentaron convulsiones severas (grupos 5 y 6), las que se sacrificaron a las 24, 72 horas y una semana post-inyección. De estas ratas se extrajeron los telencéfalos, o también cortezas e hipocampos por separado, y se aislaron las DPS-SE según el protocolo descrito en el punto anterior.

3. COINMUNOPRECIPITACIÓN DE TRKB DESDE FRACCIONES SINÁPTICAS.

Para los estudios de co-inmunoprecipitación, se solubilizaron homogenizados y DPSs de ratas control y SE en un tampón que contiene Tris-HCl 50 mM pH 9.0, desoxicolato de Na 1%, ortovanadato de Na 1 mM e inhibidores de proteasas (tampón de incubación), durante 2 horas a 4°C. Luego de centrifugación para descartar el material insoluble, las fracciones solubilizadas se incubaron a 4°C durante la noche, con un anticuerpo específico contra TrkB (Upstate) o con IgG normal (Santa Cruz) como control negativo. Posteriormente, se incubaron con 100 µl de proteína G sepharosa (Amersham) bloqueada previamente con BSA 0.1% en tampón de incubación y, una vez lavados con el mismo tampón de solubilización, los inmunoprecipitados se eluyeron con 60 µl de tampón de carga de electroforesis, se sometieron a electroforesis en condiciones

denaturantes y se detectaron las proteínas co-inmunoprecipitadas por técnicas de Western Blot.

4. ELECTROFORESIS EN CONDICIONES DENATURANTES Y DETECCIÓN DE PROTEÍNAS DE LA DPS POR TÉCNICAS DE “WESTERN BLOT”

Las DPSs-C y -SE se sometieron a electroforesis en condiciones denaturantes (SDS-PAGE). Se cargaron cantidades iguales por carril y se realizaron las electroforesis a 10 mA por gel durante 45 minutos, aumentando luego a 15 mA por gel hasta la caída del frente de corrida. Las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa por 90 minutos a 350 mA.

Los estudios de inmunodetección en membranas de nitrocelulosa de diferentes proteínas presentes en las DPSs se realizaron incubando las membranas, bloqueadas previamente con leche al 5% en PBS, con anticuerpo primario. Se inmunodetectaron las siguientes proteínas usando anticuerpos de la procedencia que se indica: TrkB, NR2B y PSD95 (BD Biosciences), fosfo-Trk tirosina 490 (pTrk490, correspondiente a pTyr504 de TrkB, Cell Signalling), fosfo-Trk tirosina 680 (pTrk680, correspondiente a pTyr805 de TrkB Santa Cruz), NR2A y p75^{NTR} (Upstate), nNOS (Sigma). La presencia de marca fue revelada por quimioluminiscencia (Amersham) utilizando anticuerpos secundarios acoplados a peroxidasa de rabanito.

El análisis de los cambios en las proteínas presentes en la DPS luego de SE y en los inmunoprecipitados se realizaron cuantificando la luminosidad relativa (LR) de las bandas correspondientes usando el programa Photoshop CS (Adobe) y se calculó la

razón de cambio $RC = \frac{LR_DPS_{SE}}{LR_DPS_{CONTROL}}$ en cada uno de los experimentos, para luego

calcular los promedios \pm error estándar. La significancia estadística se calculó usando el test de t de student mediante el programa GraphPad InStat (GraphPad Software Inc.). Para las comparaciones entre diferentes grupos se usó el test de ANOVA.

5. EXTRACCIÓN DE OVOCITOS DE *Xenopus laevis*

Hembras maduras *Xenopus laevis* fueron anestesiadas de manera de extraer pequeñas porciones de ovario, los que fueron tratados con colagenasa 0.5 mg/mL en solución OR-2 (NaCl 82 mM, KCl 2.5 mM, MgCl₂ 1 mM, HEPES 5 mM) por 2 horas a temperatura ambiente, con el objeto de separar los ovocitos del ovario. Los ovocitos aislados, en estadios V y VI, fueron lavados, seleccionados y mantenidos en solución Barth (NaCl 88 mM, KCl 1 mM, Ca(NO₃)₂ 0.33 mM, MgSO₄ 0.82 mM, NaHCO₃ 2.4 mM, HEPES 10 mM pH 7.4) suplementada con penicilina 100 U/mL y estreptomicina 0.1 mg/mL) hasta su posterior microinyección.

6. MICROINYECCIÓN DE DPSs EN OVOCITOS DE *Xenopus laevis*

Los ovocitos seleccionados fueron microinyectados con 150-200 ng de DPSs-C o -SE, usando un microinyector electrónico (World Precision Instruments, WPI) y mantenidos en solución Barth a 17° C por 12 a 16 horas, después de lo cual expresaban corrientes mediadas por el R-NMDA en su superficie. En los casos en que se indican, DPS control fueron incubadas con un anticuerpo de pérdida de función anti-p75^{NTR} denominado REX (este anticuerpo fue generado contra el dominio extracelular de p75^{NTR}, usado a una concentración final de 0.05 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), o con IgG control (0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) por 1 hora a 4°C antes de la microinyección en ovocitos. De la misma forma, DPS-SE

fueron incubadas con un anticuerpo contra el dominio extracelular de TrkB (0.5 $\mu\text{g/ml}$) para su posterior microinyección.

7. ESTUDIOS DE FIJACIÓN DE POTENCIAL

Las corrientes totales de membrana fueron registradas a temperatura ambiente, 12 a 16 horas post-inyección como se describe en (Aleu *et al.* 1999). Los ovocitos, depositados en una cámara perfundida con solución Ringer (NaCl 115 mM, KCl 2 mM, BaCl₂ 1.8 mM, HEPES-Na 5 mM pH 7.4), fueron registrados usando la técnica de fijación de potencial de 2 electrodos, usando un amplificador OOCYTE CLAMP OC-725C (Warner Instrument).

Las corrientes activadas por NMDA 100 μM (Tocris) en presencia y ausencia de BDNF (Calbiochem), fueron digitalizadas usando una interfase análogo-digital Powerlab 4/25T (ADInstruments Pty Ltd), visualizadas y almacenadas en un computador mediante el programa SCOPE (ADInstruments Pty Ltd).

Los fármacos permeables LY-294002 (inhibidor de PI3K, 20 μM , Calbiochem), Inhibidor de Akt III (10 μM , Calbiochem), U0126 (inhibidor de la fosforilación de Erk 1/2, 10 μM , Calbiochem), U-73122 (inhibidor general de PLC, 25 μM , Calbiochem) y N_ω-Nitro-L-Arginina (L-NNA, inhibidor general de NOS, 1 μM) fueron administrados al baño 2 minutos antes de la incubación con BDNF. K252a (inhibidor permeable de la actividad catalítica de TrkB, 100 ng/ml, Calbiochem) fue agregado al baño 1 minuto antes de la incubación con BDNF. El inhibidor competitivo de los R-NMDA, APV (200 μM , Tocris) fue preincubado 1 minuto antes de la aplicación del agonista.

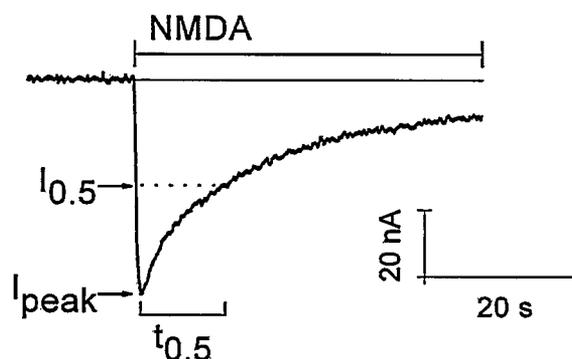


Figura 2. Representación gráfica del cálculo de $t_{0.5}$ en las corrientes activadas por NMDA.

8. ANÁLISIS DE DATOS ELECTROFISIOLÓGICOS

Las corrientes totales de membrana activadas por NMDA en presencia y ausencia de los distintos fármacos y proteínas, fueron analizadas utilizando el programa Origin (OriginLab Corporation). Se calcularon los siguientes parámetros: la constante de activación τ , que se obtiene ajustando la fase de activación de la curva de corriente a una función de Boltzmann del tipo $y = \frac{A_1 - A_2}{1 + e^{(x-x_0)/\tau}} + A_2$, donde A_1 es el valor de la corriente basal (antes del estímulo) y A_2 es el valor de la corriente máxima. Al restar ambos valores, se obtuvo el peak de corriente $I_{\text{peak}} = A_1 - A_2$. El valor τ corresponde al tiempo en el cual se obtiene un 67% de la corriente máxima. Para evaluar el tiempo de inactivación de la corriente, se calculó el tiempo entre I_{peak} y la mitad de I_{peak} , parámetro que se denominó $t_{0.5}$ (Figura 2). También se calculó el área bajo la curva o integral de corriente I desde la aplicación del agonista hasta el final del registro.

En los experimentos de dosis respuesta para proNGF (concentraciones de 0.5, 1, 10, 50, 100, 150 y 200 ng/ml) y BDNF (concentraciones de 1, 10, 50, 100, 150, 200,

300, y 400 ng/ml), las razones de cambio de corriente se ajustaron a la función

$I = [I_0 + (1 - I_0)] \times \frac{K_i}{[NF] + K_i}$, donde I es la razón de cambio, I_0 es la razón de cambio en

ausencia de la neurotrofina, K_i es la constante de inhibición aparente en ng/mL y [NF] es

la concentración de la neurotrofina aplicada. En todos los experimentos se

calcularon los promedios y los datos se presentaron como media \pm error estándar. La

significancia estadística se calculó usando el test de t de student mediante el programa

GraphPad InStat (GraphPad Software Inc.). Se consideró como no significativo un valor

de $p > 0.05$.

RESULTADOS

1. NMDA ACTIVA CORRIENTES EN OVOCITOS INYECTADOS CON DPSs.

En ovocitos inyectados con DPSs-C (ovocitos-DPS-C), la aplicación de NMDA 100 μ M al baño induce una corriente de entrada, que es reproducible en el tiempo cuando se aplica consecutivamente y luego de lavar por 10 minutos entre las aplicaciones (Figura 3 A). Esta corriente está mediada por el R-NMDA ya que al preincubar por un minuto estos ovocitos con APV 200 μ M, inhibidor competitivo para los R-NMDA, se observa una inhibición de la respuesta. Esta inhibición es reversible, ya que luego de eliminar el inhibidor de la solución extracelular mediante perfusión con solución control se recupera la corriente en respuesta a NMDA (Figura 3 B).

2. BDNF MODULA LAS CORRIENTES ACTIVADAS POR NMDA.

La incubación de ovocitos-DPS-C con BDNF 100 ng/ml por un minuto, indujo dos efectos sobre las corrientes activadas por NMDA: 1) una inhibición (Figura 4 A) y 2) una potenciación (Figura 4 B) de la respuesta.

Para calcular el porcentaje de ovocitos-DPS-C que fueron inhibidos y potenciados por BDNF, se calcularon las integrales de corriente (I) de 98 ovocitos en presencia y ausencia de BDNF y se calculó la razón de cambio $\frac{I_{BDNF}}{I_{CONTROL}}$, donde $I_{CONTROL}$

corresponde a la situación en ausencia de BDNF. Se observó que un 50% de los experimentos correspondían a corrientes R-NMDA que fueron claramente inhibidas (se

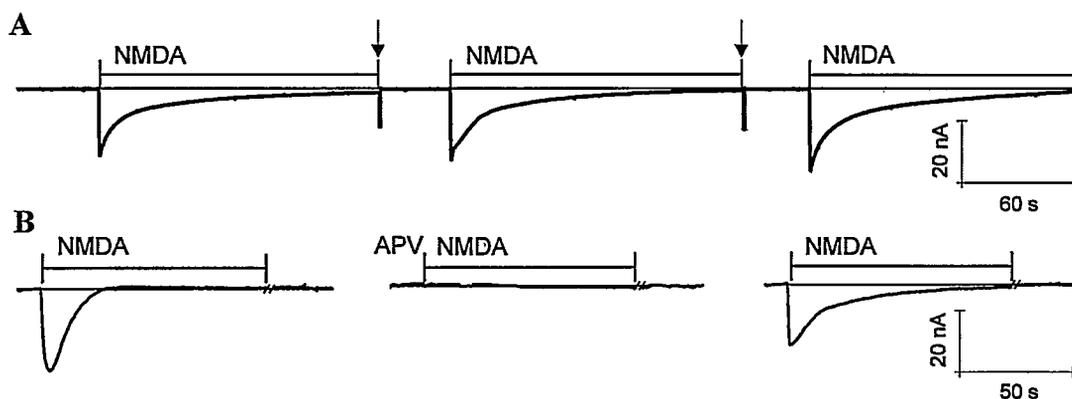
Sandoval *et al.* 2007

Figura 3. NMDA activa corrientes específicas en ovocitos inyectados con DPSs. A. Trazo de corriente que muestra 3 respuestas consecutivas a NMDA 100 μM en un mismo ovocito-DPS-C. Las flechas indican lavados con 10 volúmenes de solución de registro entre cada aplicación, durante las cuales se detuvo la adquisición de datos. B. Trazos representativos de corrientes de un ovocito-DPS-C en ausencia (trazo izquierdo) y presencia del inhibidor competitivo APV (200 μM) para R-NMDA (trazo central). El trazo derecho corresponde a la corriente luego de eliminar el inhibidor por lavados con solución de registro. En estos registros y los posteriores, se muestran 100 s luego de la aplicación del agonista. Los cortes indican que el registro continúa por otros 200 s, y luego el o los agonistas fueron lavados con solución de registro.

definió inhibición como $\frac{I_{BDNF}}{I_{CONTROL}} < 0.7$, mientras que un 30% fueron potenciadas

($\frac{I_{BDNF}}{I_{CONTROL}} > 1.5$, Figura 4 C). El 20% restante ($0.7 < \frac{I_{BDNF}}{I_{CONTROL}} < 1.5$) se consideraron como

sin cambios. Esta “clasificación” se realizó con el fin de analizar y comparar los parámetros cinéticos de ambas poblaciones de ovocitos.

Se calculó el valor de $t_{0.5}$, que refleja la inactivación del R-NMDA, para ambas poblaciones de ovocitos. (Figura 5 A). Se encontró que en ovocitos control (en ausencia de BDNF), los R-NMDA que posteriormente fueron inhibidos por BDNF tienen mayor $t_{0.5}$ que los R-NMDA que posteriormente fueron potenciados por BDNF (Figura 5 A). Además, el $t_{0.5}$ de los R-NMDA inhibidos por BDNF no varía cuando se compara este

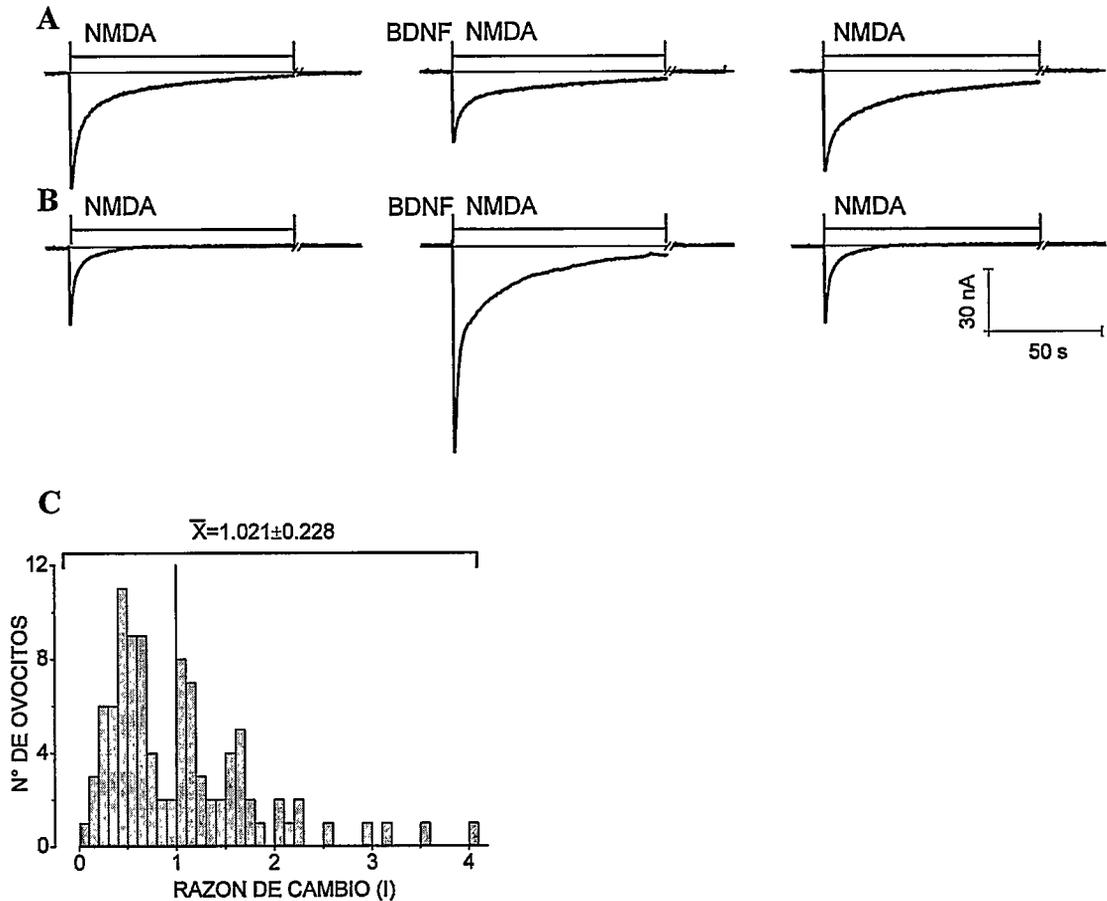
Sandoval *et al.* 2007

Figura 4. BDNF potencia e inhibe las corrientes R-NMDA A, B. Trazos representativos de corrientes mediadas por el R-NMDA en ovocitos-DPS-C en ausencia (trazo a la izquierda) y presencia (trazo central) de BDNF 100 ng/ml. A. Efecto inhibitorio de BDNF. B. Efecto potenciador de BDNF. Los trazos a la derecha corresponden a la recuperación de la respuesta basal luego de eliminar la neurotrofina del baño de registro C. Histograma de razones de cambio de las Integrales (I) de corriente en 98 ovocitos-DPS-C después de aplicar BDNF.

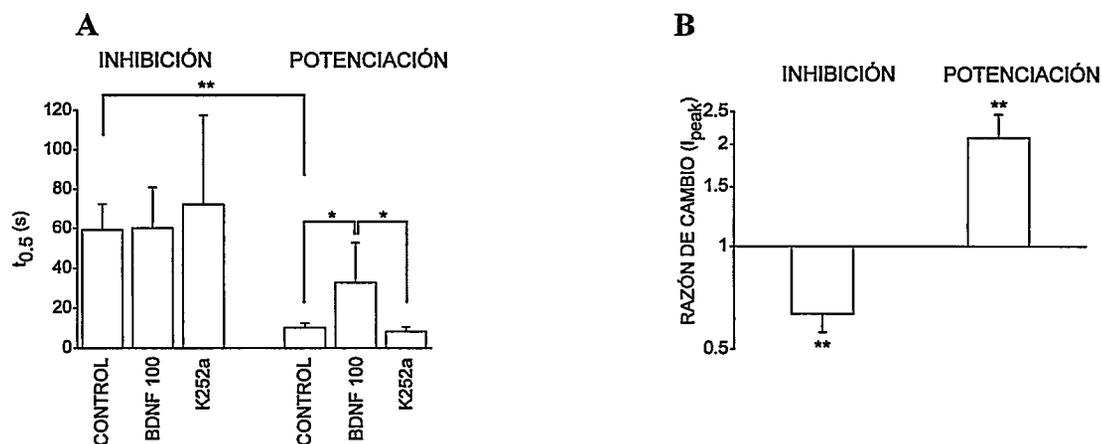
Sandoval *et al.* 2007

Figura 5. Efecto de BDNF sobre el $t_{0.5}$ e I_{peak} en ovocitos inhibidos y potenciados por BDNF. A. Gráfico que representa los promedios de $t_{0.5}$ de los ovocitos en que los R-NMDA fueron inhibidos o potenciados en ausencia (control), presencia de BDNF 100 ng/ml y en presencia del inhibidor para el receptor TrkB, K252a 100 ng/ml. B. Promedios de razones de cambio de I_{peak} en los grupos de ovocitos en que los R-NMDA fueron inhibidos o potenciados por BDNF 100 ng/ml. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

valor antes y durante la aplicación de BDNF (59.1 ± 13.3 s en ausencia de BDNF, contra 60.1 ± 20.1 s en presencia de BDNF, $n=26$ ovocitos). En contraste, el valor de $t_{0.5}$ de las respuestas a NMDA que se potenciaron con BDNF aumentó significativamente (10.3 ± 2.2 s en ausencia de BDNF, contra 32.9 ± 19.8 s en presencia de BDNF, $n=15$, Figura 5

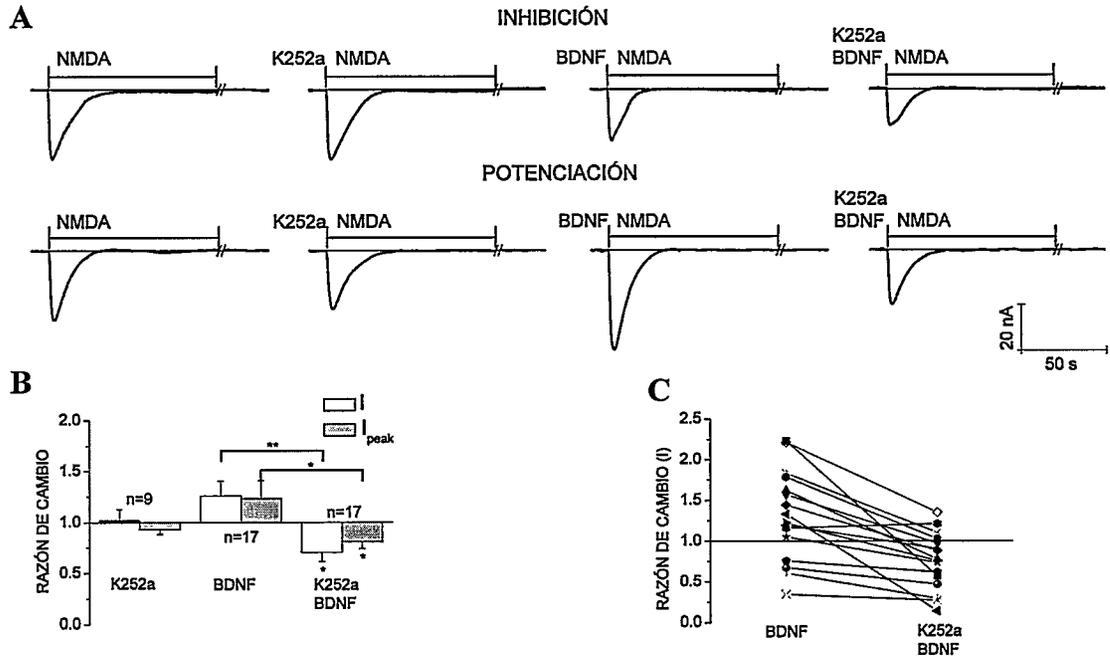
A). Al estudiar la razón de cambio de amplitudes $\frac{I_{peakBDNF}}{I_{peakCONTROL}}$ en los grupos de R-

NMDA potenciados e inhibidos, se encontraron diferencias significativas, similares a las encontradas al analizar la integral de corriente (I) (Figura 5 B). En los R-NMDA inhibidos por BDNF, I_{peak} disminuyó en un 37% (razón de cambio $I_{peak} = 0.63 \pm 0.07$) respecto al control, mientras que en los R-NMDA potenciados I_{peak} aumentó en un 209% (razón de cambio = 2.09 ± 0.36).

Todos estos resultados muestran que BDNF tiene un efecto dual sobre los R-NMDA: una clara inhibición en el 50% de los ovocitos, una potenciación en el 30% y ningún efecto neto en el 20% restante.

3. TRKB PARTICIPA EN LA POTENCIACIÓN PERO NO EN LA INHIBICIÓN DEL R-NMDA POR BDNF.

Para evidenciar la participación del receptor TrkB en la modulación del R-NMDA, los ovocitos-DPS-C se incubaron con BDNF en presencia o ausencia del inhibidor del receptor TrkB, K252a 100 ng/ml. Este inhibidor por sí solo no produjo cambios en la magnitud de las corrientes activadas por NMDA (Figura 6). Sin embargo, la aplicación de este fármaco en ovocitos cuyos R-NMDA fueron inhibidos por BDNF, no revirtió la inhibición, sino que produjo una inhibición aún mayor (Figura 6 A). En cambio, K252a revirtió la potenciación del R-NMDA por BDNF hasta niveles cercanos al control (Figura 6 A). El promedio de las razones de cambio tanto de I como de I_{peak} , en 17 experimentos en que ovocitos fueron pre-incubados con K252a, fueron de 1.25 ± 0.14 , y 1.23 ± 0.18 , respectivamente. Sin embargo, la presencia conjunta de K252a y BDNF produjo una inhibición, obteniéndose razones de cambio de I e I_{peak} de 0.7 ± 0.09 ($p < 0.05$) y 0.81 ± 0.07 ($p < 0.05$), respectivamente (Figura 6 B, C). Se calculó $t_{0.5}$ en los registros obtenidos por incubación con BDNF y BDNF+K252a. Cuando los R-NMDA fueron inhibidos por BDNF, $t_{0.5}$ no varió (60.1 ± 20.8 para BDNF v/s 72.3 ± 45.2 s para BDNF+K252a, Figura 5 A), sin embargo cuando los R-NMDA fueron potenciados, $t_{0.5}$ retornó a valores cercanos al control en presencia de K252a (32.9 ± 19.8 s para BDNF v/s 8.4 ± 2.2 s para BDNF+K252a, Figura 5 A). Estos cambios apoyan la idea de que TrkB participa en el efecto potenciador, pero no en el efecto inhibidor de BDNF.



Sandoval *et al.* 2007

Figura 6. El efecto potenciador de BDNF sobre el R-NMDA, pero no el inhibitor, es dependiente de TrkB. A. Trazos representativos de corrientes que muestran el efecto de K252a 100 ng/ml sobre los grupos de ovocitos-DPS-C en que la respuesta a NMDA fue inhibida (panel superior, INHIBICIÓN) y potenciada (panel inferior, POTENCIACIÓN) por BDNF. B. Gráfico que presenta los promedios de las razones de cambio de 17 experimentos independientes, en presencia de BDNF 100 ng/ml o K252a 100 ng/ml + BDNF 100 ng/ml. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. C. Gráfico de datos pareados que muestra las razones de cambio de I, en los 17 experimentos graficados en B.

4. EL EFECTO POTENCIADOR DE LOS R-NMDA POR BDNF ESTÁ MEDIADO POR PI3K Y ERK1/2

Para estudiar cuáles de las cascadas de señalización río abajo de TrkB están mediando la potenciación de los R-NMDA, se incubaron ovocitos-DPS-C con BDNF en presencia de inhibidores farmacológicos para PI3K, PLC y Erk 1/2. Al analizar la integral de corriente I se encontró que los inhibidores de PI3K (LY294002, 20 μ M) y de Erk 1/2 (U0126, 10 μ M) inhibieron completamente la potenciación del R-NMDA por

BDNF, mientras que el inhibidor de PLC (U73122, 25 μ M) no tuvo efecto sobre la potenciación de este receptor (Figura 7 A, B). Estos resultados sugieren que el efecto potenciador de BDNF está mediado por PI3K y Erk 1/2.

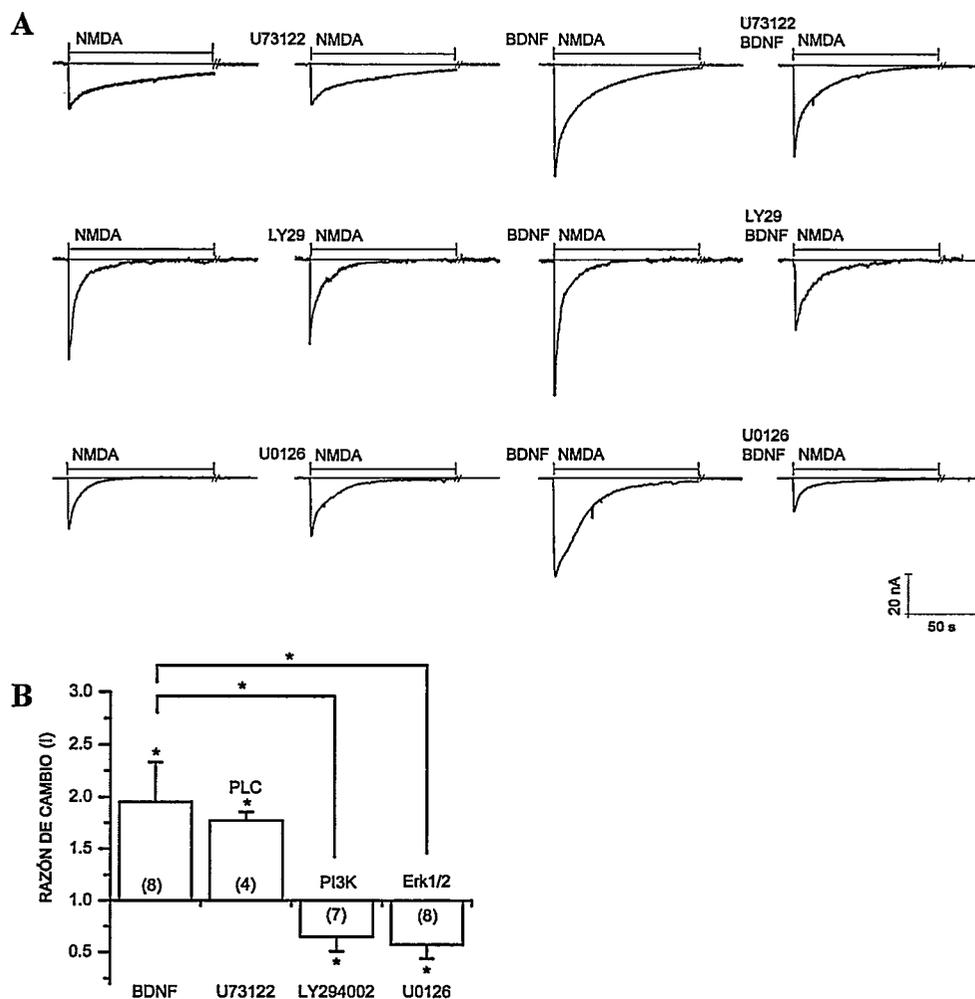
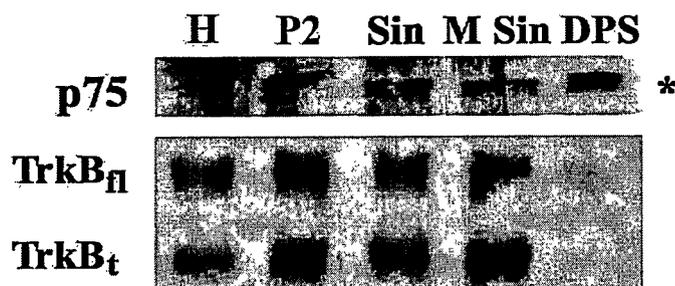


Figura 7. PI3K y Erk1/2 participan en la potenciación de los R-NMDA. A. Trazos representativos de corrientes que muestran el efecto de distintos inhibidores de enzimas que son activadas por el receptor TrkB (U73122: Inhibidor de PLC, 25 μ M; LY294002: Inhibidor de PI3K, 20 μ M; U0126: Inhibidor de Erk1/2, 10 μ M). B. Gráfico de barras que representa los promedios de las razones de cambio de I en presencia de BDNF 100 ng/ml más los inhibidores LY294002, U73122 y U0126. Los asteriscos sobre las barras representan la significancia relativa al control, mientras que los asteriscos sobre los corchetes representan la significancia entre las barras. * $p < 0.05$. Los números entre paréntesis representan el número de experimentos independientes.

5. $p75^{NTR}$ ESTÁ PRESENTE EN LA DPS Y PARTICIPA EN LA INHIBICIÓN DEL R-NMDA POR BDNF.

Recientemente, se postuló que $p75^{NTR}$ y TrkB tendrían efectos antagónicos sobre la potenciación y depresión sináptica de larga duración en el hipocampo (Woo *et al.* 2005). Para determinar si $p75^{NTR}$ es capaz de inhibir al R-NMDA, primeramente se evaluó la presencia de este receptor por Western Blot en DPS y en las fracciones subcelulares que se obtienen durante la purificación de DPS. Se encontró que $p75^{NTR}$ se encuentra presente y enriquecido en DPSs cuando se compara con el homogenizado (Figura 8) en un $192 \pm 24\%$ ($p < 0.01$).



Sandoval *et al.* 2007

Figura 8. $p75^{NTR}$ está presente y enriquecido en DPSs. Western Blot representativo que muestra la inmunodetección de $p75^{NTR}$, TrkB de largo completo (TrkB_{fl}) y la isoforma de TrkB truncada (TrkB_t) en homogenizado de telencéfalo (H), fracción de membranas cruda (P2), Sinaptosomas (Sin), Membranas sinápticas (M Sin) y Densidades Postsinápticas (DPS). En el carril DPS* se cargó $\frac{1}{4}$ de la cantidad de proteínas en comparación con el homogenizado

En base a este hallazgo pensamos que el efecto dual encontrado en respuesta a BDNF se podría deber a la activación de $p75^{NTR}$.

A diferencia de TrkB, que interactúa con BDNF, p75^{NTR} interactúa con todas las proneurotrofinas por igual. Por ello, utilizamos proNGF (en vez de proBDNF) como agonista ya que permitiría activar p75^{NTR}, pero en ningún caso TrkB. Por otro lado, TrkA (que podría interactuar con proNGF) fue indetectable por ensayos de Western blot de DPSs (datos no mostrados).

La incubación de ovocitos con proNGF 150 ng/mL por 1 minuto produjo un efecto inhibitorio reversible sobre el R-NMDA (Figura 9 A), efecto que fue observado en 27 experimentos independientes. El efecto fue dosis-dependiente, con una inhibición máxima de 72% y una constante de inhibición aparente (K_i) de 11.8 ng/ml (0.36 nM, Figura 9 B).

Al estudiar el efecto de proNGF sobre $t_{0.5}$, se observa una disminución significativa de este parámetro con respecto al control ($t_{0.5}$ control= 167.8 ± 16.8 s, $t_{0.5}$ proNGF= 63.4 ± 16.6 s, Figura 9 C). Al comparar $t_{0.5}$ en los registros controles, que posteriormente dieron origen a los 3 grupos experimentales (R-NMDA potenciados por BDNF, inhibidos por BDNF e inhibidos por proNGF), se observa que el primer grupo (Figura 9 D, barras negras) presenta valores de inactivación cortos (menos de 50 s), mientras que los otros dos grupos (Figura 9 D, barras grises para inhibidos por BDNF y barras blancas para inhibidos por proNGF) se distribuyen con $t_{0.5}$ en todos los rangos. Este resultado sugiere que es posible predecir que los R-NMDA con $t_{0.5}$ mayores a 50 s serán inhibidos por BDNF.

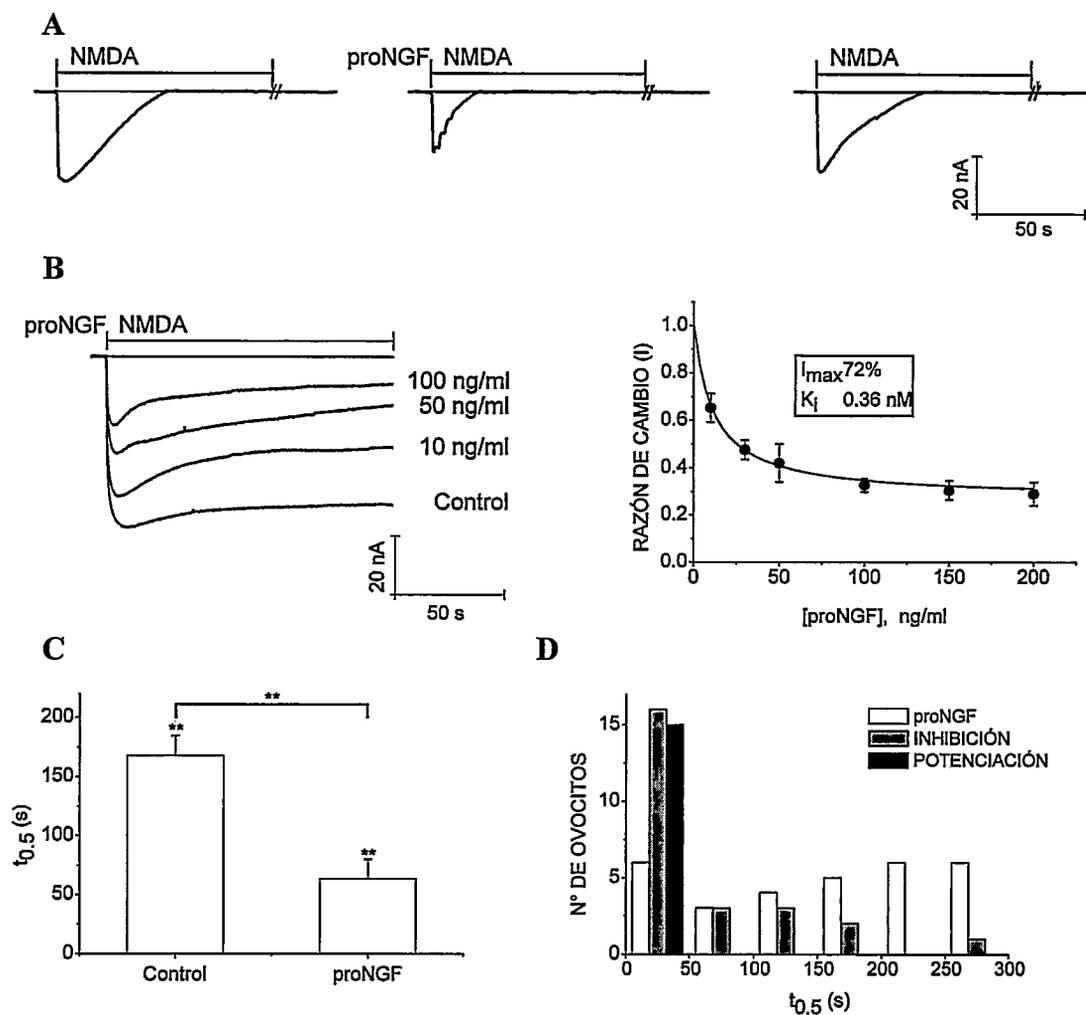
Sandoval *et al.* 2007

Figura 9. proNGF inhibe las corrientes mediadas por el R-NMDA. A. Trazos representativos de corrientes activadas por NMDA en un ovocito-DPS-C en ausencia (panel izquierdo) y presencia (panel central) de proNGF 150 ng/ml. El panel derecho representa la recuperación de la respuesta luego de lavados exhaustivos con solución de registro. B. panel izquierdo. Trazos representativos de corrientes mediadas por el R-NMDA en presencia de diferentes concentraciones de proNGF. Se muestran los primeros 50 s de registro. Panel derecho. Curva promedio de dosis-dependencia, de la inhibición por proNGF de las corrientes R-NMDA. Ajustando la serie de puntos a una ecuación del tipo $I = I_0 + (1 - I_0) \times [K_i / (proNGF + K_i)]$ se calculó la constante de inhibición aparente ($K_i = 0.36$ nM para el monómero) C. Efecto de proNGF sobre el $t_{0.5}$ promedio de 27 experimentos independientes. ** $p < 0.01$. D. Histograma comparativo de los tiempos de inactivación ($t_{0.5}$) de las corrientes mediadas por el R-NMDA, en ausencia de neurotrofinas, que serán inhibidas por proNGF (barras blancas), inhibidas por BDNF (barras grises) o potenciadas por BDNF (barras negras).

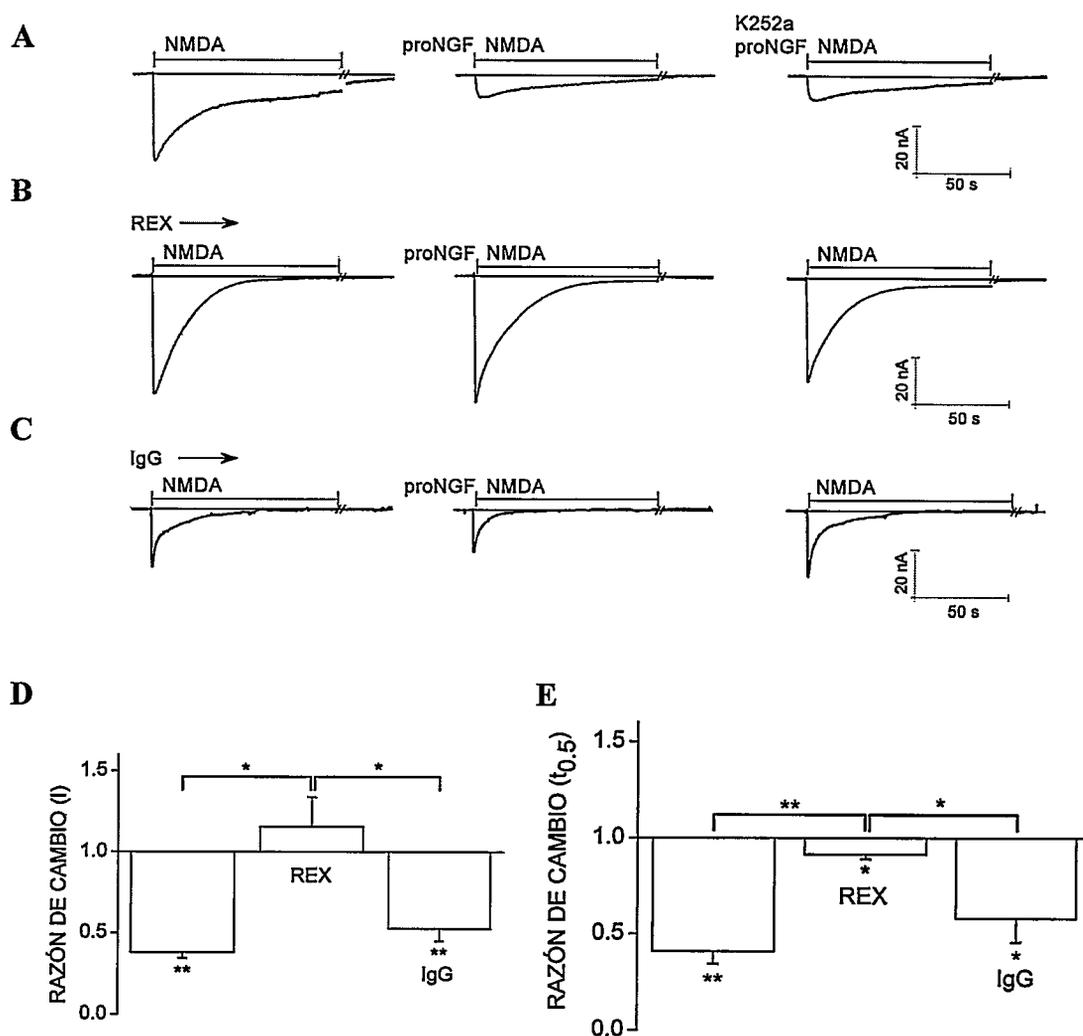
Sandoval *et al.* 2007

Figura 10. La inhibición del R-NMDA por proNGF está mediada por p75^{NTR} A. Trazos representativos de corrientes activadas por NMDA (panel izquierdo), en presencia de proNGF 150 ng/mL (panel central) y en presencia de proNGF más el inhibidor para el receptor TrkB, K252a. B, C. Trazos representativos de corrientes activadas por NMDA en ovocitos inyectados con DPS incubadas con REX anti-p75^{NTR} (0.05 μg/ml, B) o IgG pre-inmune (0.5 μg/ml, C, paneles izquierdos) en presencia de proNGF 100 ng/ml (paneles centrales) y luego de lavado exhaustivo para retirar la neurotrofina con solución de registro (paneles derechos). La flecha representa la presencia del anticuerpo REX o IgG pre-inmune durante todo el experimento. D. Gráfico que representa los promedios de razones de cambio de I para proNGF en ovocitos-DPS-C, ovocitos-DPS-REX y ovocitos-DPS-IgG. E. Gráfico que representa los promedios de razones de cambio de t_{0.5} para proNGF en ovocitos-DPS-C, ovocitos-DPS-REX y ovocitos-DPS-IgG. *p<0.05, **p<0.01.

Al incubar ovocitos-DPSs-C con proNGF en presencia del inhibidor para el receptor TrkB K252a, no se produjo una reversión de la inhibición, confirmando que el efecto es independiente de TrkB (Figura 10 A). Para estudiar si proNGF actúa vía $p75^{\text{NTR}}$, se incubaron DPSs-C con un anticuerpo contra $p75^{\text{NTR}}$, denominado REX, que inhibe la función de éste (Woo *et al.* 2005). Las DPSs preincubadas con REX se inyectaron en ovocitos (ovocitos-REX) y, como control, se inyectaron ovocitos con DPSs incubadas con una IgG control (ovocitos-DPS-IgG). En ovocitos-REX, se observó un nulo efecto de proNGF sobre la integral de las corrientes, I (n=12, Figura 10 B, 10 D) y un efecto mínimo sobre el $t_{0.5}$ (0.91 ± 0.02 , $p < 0.05$, Figura 10 E), mientras que la incubación de DPSs con IgG no previno la inhibición de proNGF sobre I ($p < 0.01$, n=5, Figura 10 C-E) y $t_{0.5}$ (n=5, $p < 0.05$). Por lo tanto, el efecto dual del BDNF sobre el R-NMDA estaría mediado por una parte por $p75^{\text{NTR}}$, que lo inhibiría, y por otra por TrkB, que lo potenciaría.

Para estudiar la posibilidad de que ambos receptores interactuaran con BDNF con afinidades diferenciales, se realizó una curva dosis-respuesta de BDNF en aquellos ovocitos en que BDNF 100 ng/ml inhibió al R-NMDA. (Figura 11 A y B). A concentraciones bajas de esta neurotrofina (1 y 10 ng/ml) se hace evidente una potenciación de los R-NMDA, mientras que concentraciones mayores de BDNF (100 hasta 300 ng/ml), se hace evidente la inhibición (Figura 11 A y B). En cambio, al incubar ovocitos-DPS-REX con BDNF a distintas concentraciones, el efecto inhibitorio a concentraciones altas desaparece (Figura 11 C). Ello sugiere que en nuestro sistema experimental, la afinidad de BDNF por $p75^{\text{NTR}}$ es menor que la afinidad por TrkB.

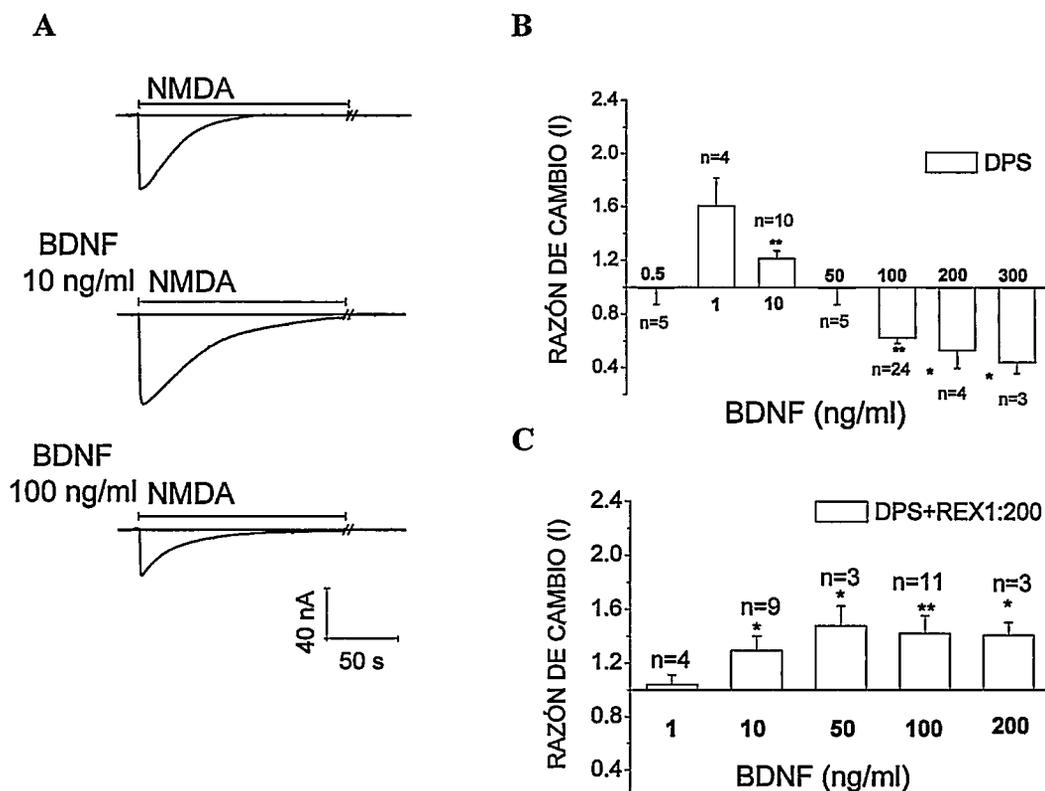
Sandoval *et al.* 2007

Figura 11. Efecto dual de BDNF sobre las corrientes R-NMDA. A. Trazos representativos de corrientes R-NMDA en ovocitos-DPS-C incubados con BDNF a 10 y 100 ng/ml. B. Gráfico de las razones de cambio de I a distintas dosis de BDNF (0.5, 1, 10, 50, 100, 150 y 200 ng/ml) en ovocitos-DPS-C. C. Gráfico de las razones de cambio de I a distintas dosis de BDNF (1, 10, 50, 100 y 200 ng/ml) en ovocitos-DPS-REX. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

6. EFECTO DE BDNF SOBRE LAS CORRIENTES ACTIVADAS POR NMDA EN DPS DE RATAS SOMETIDAS A STATUS EPILÉPTICO (DPS-SE)

Resultados previos de nuestro laboratorio demostraron que el contenido relativo de TrkB en DPS aumenta en 600% después de SE (Wyneken *et al.* 2003, Wyneken *et al.* 2001). Para caracterizar el curso temporal de este fenómeno, se indujo SE en ratas por inyección intraperitoneal de ácido kaínico. Las DPS se aislaron 24, 72 horas y 1 semana después de SE, (DPSs-SE 24, 72, 1 sem) y se estudió el contenido de TrkB, pTrk504 y

pTrk805. Se observó que el contenido de TrkB, a las 24 horas, se encuentra aumentado en un 575% (razón de cambio DPS-SE24/DPS-C= 5.75 ± 0.76 , $p < 0.01$, $n=4$ Figura 12), lo que se mantuvo a las 72 horas y 1 semana después del SE (razón de cambio DPS-SE72/DPS-C= 3.77 ± 0.61 , $p < 0.01$ $n=3$, razón de cambio DPS-SE 1sem/DPS-C= 3.9 ± 0.71 , $p < 0.01$ $n=5$, Figura 12).

Por otra parte, PTyr504 se encuentra disminuido a las 24 horas post inducción de SE en un 33% (razón de cambio DPS-SE24/DPS-C= 0.67 ± 0.09 , Figura 12). Esta disminución se mantiene a las 72 horas (razón de cambio DPS-SE72/DPS-C= 0.64 ± 0.09) y tiende a recuperarse luego de 1 semana (razón de cambio DPS-SE 1sem/DPS-C= 0.87 ± 0.17). Resultados similares se observaron cuando se estudió el contenido de PTyr805 (Figura 12). Al normalizar el grado de fosforilación con el contenido total de TrkB después de SE estimamos que el 90% de este receptor se encuentra desfosforilado, en comparación con DPSs-C. Como los anticuerpos anti-pTrk son capaces de detectar las tirosinas fosforiladas de las 3 proteínas de la familia Trk, se confirmó este resultado inmunoprecipitando TrkB desde homogenizados con un anticuerpo específico para esta proteína. El contenido de fosfo-tirosina en TrkB se encuentra efectivamente disminuido en un 52% (razón de cambio H-SE24/HC= 0.48 ± 0.08 , $n=3$, Figura 13).

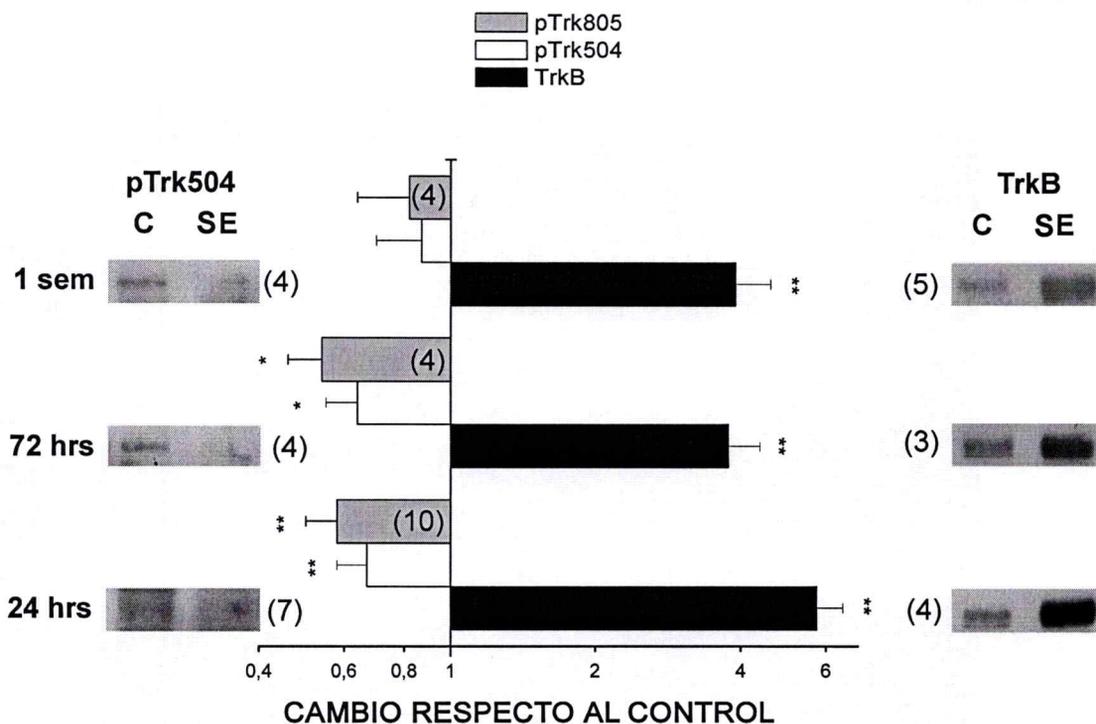


Figura 12. Diferencias en el contenido de TrkB y su estado de fosforilación en DPSs luego de SE. Western Blots representativos de TrkB y pTrk504 en DPS-SE a 24, 72 horas y 1 semana. El gráfico muestra los promedios de las razones de cambio respecto al control. Los números en paréntesis representan el número de preparaciones independientes para cada inmunodetección. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

También se estudió el contenido de las subunidades NR2A y NR2B del R-NMDA. A las 24 horas post inducción de SE, se observó que las subunidades NR2A y NR2B se encuentran disminuidas en un 35% y 40% respectivamente ($p < 0.01$, $n=8$ y $n=7$, Figura 14). La disminución de NR2A se mantiene, mientras que la de NR2B vuelve a valores cercanos al control luego de 1 semana.



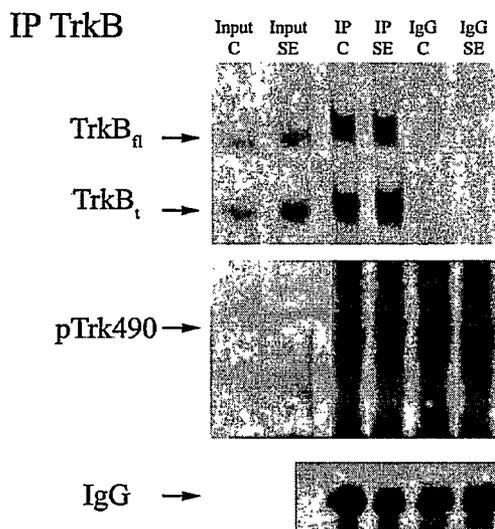


Figura 13. El nivel de fosforilación de TrkB está disminuido en telencéfalo después de SE. Western blots representativos de TrkB y pTrk, en experimentos de inmunoprecipitación de TrkB desde homogenizados de telencéfalos de ratas -C y -SE24.

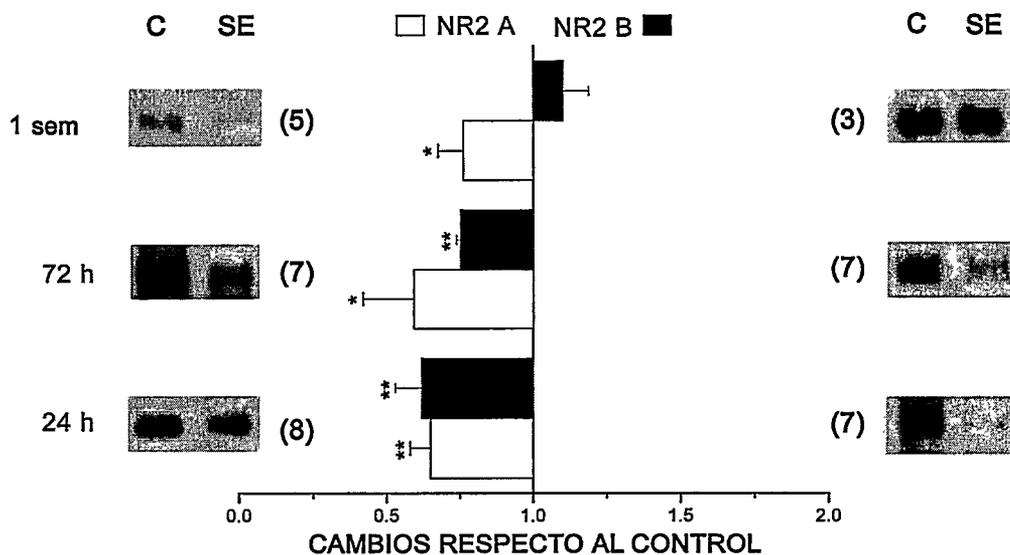


Figura 14. El contenido de las subunidades NR2 del R-NMDA disminuye en DPS después de SE. Western Blots representativos de las subunidades de R-NMDA NR2A y NR2B en DPS-SE a 24, 72 horas y 1 semana. El gráfico muestra los promedios de las razones de cambio respecto al control. Los números en paréntesis representan el número de preparaciones independientes para cada inmunodetección. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

El contenido de p75^{NTR} en estas preparaciones, a las 24 horas post inducción de SE disminuyó en un 31% (razón de cambio DPS-SE24/DPS-C=0.69 ± 0.08, Figura 15), lo que se mantiene hasta 1 semana después de SE (razón de cambio DPS-SE72/DPS-C=0.46 ± 0.08, razón de cambio DPS-SE 1sem/DPS-C=0.62 ± 0.11, Figura 15). En conclusión, después de SE hay un cambio en los niveles relativos de los receptores que median el efecto de BDNF sobre el R NMDA: mientras TrkB aumenta, p75^{NTR} disminuye. Sorprendentemente, el grado de fosforilación de TrkB, reflejo de su actividad catalítica, disminuye.

Al estudiar el efecto funcional de BDNF sobre el R-NMDA en DPS-SE, encontramos que esta neurotrofina inhibe al R-NMDA en el 81% de los casos ($\frac{I_{BDNF}}{I_{CONTROL}} < 0.7$, Figura 16 A y B). El 19% restante de los R-NMDA nunca fueron potenciados en magnitudes similares a las observadas en DPS-C (> 1.5 veces) (Figura 4 C comparada con Figura 16 B).

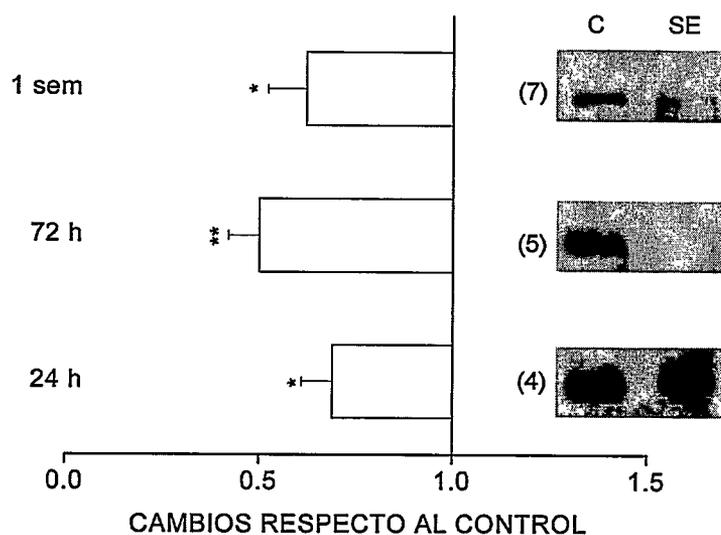


Figura 15. El contenido de p75^{NTR} en DPS disminuye después de SE. Western Blots representativos del contenido proteico del receptor p75^{NTR} en DPS-SE a 24, 72 horas y 1 semana. El gráfico muestra los promedios de las razones de cambio respecto al control. Los números en paréntesis representan el número de preparaciones independientes para cada inmunodetección. * p<0.05, ** p<0.01.

Experimentos de incubación con diferentes concentraciones de BDNF (1, 10, 50, 100, 150, 200, 300 y 400 ng/ml), demuestran que el efecto de esta neurotrofina es dosis-dependiente (Figura 17 A), con una inhibición máxima de 79% y una K_i de 5.39 nM. El efecto inhibitorio de BDNF se refleja similarmente en las mediciones de I e I_{peak} (Figura 17 B). Al estudiar el efecto inhibitorio de BDNF 150 ng/ml sobre el $t_{0.5}$, encontramos que ésta disminuye en un 36% (razón de cambio $t_{0.5}=0.65 \pm 0.07$, Figura 17 c), efecto que se mantiene a concentraciones mayores. Estos experimentos sugieren que BDNF inhibe al R-NMDA en DPS-SE disminuyendo I_{peak} y acelerando la inactivación.

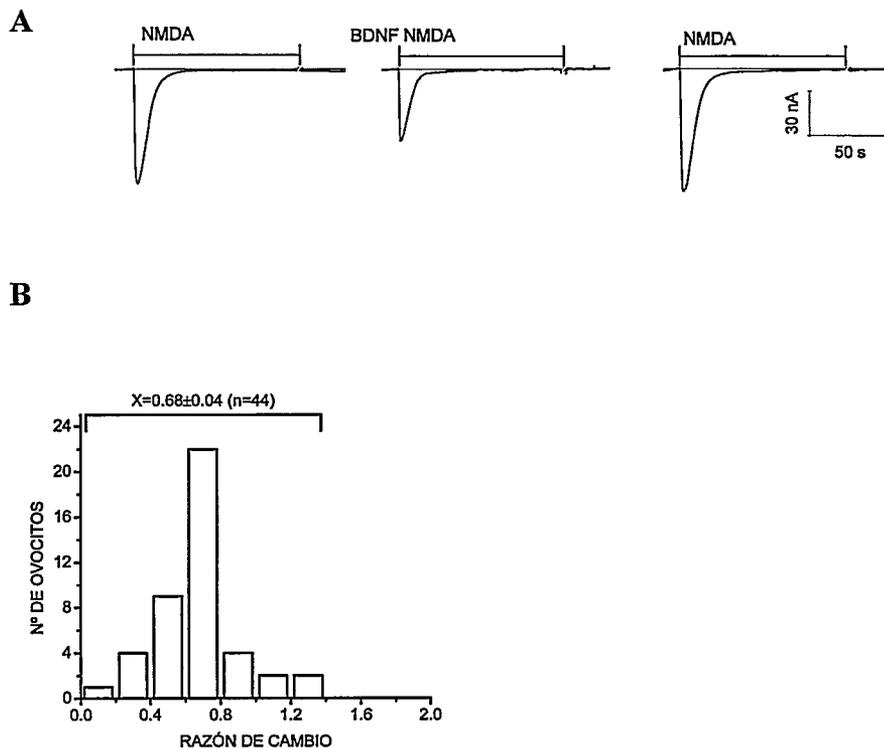


Figura 16. BDNF inhibe al R-NMDA en ovocitos inyectados con DPS-SE. A. Trazos representativos de corrientes R-NMDA en ovocitos-SE (panel izquierdo), en presencia de BDNF 100 ng/ml (panel central) y luego de lavado con solución de registro para retirar la neurotrofina del medio (panel derecho). B. Histograma de razones de cambio de Integrales (I) en 44 ovocitos-SE diferentes.

Para evaluar la participación de TrkB en la inhibición, se preincubaron DPS con un anticuerpo contra el dominio extracelular de TrkB (ovocitos-TrkB). En estos experimentos, BDNF no fue capaz de inhibir al R-NMDA ($n=8$, Figura 18). Sin embargo, al incubar ovocitos-SE con K252a 100 ng/ml y BDNF, no se revirtió la inhibición (Figura 19), sugiriendo que ésta es independiente de la actividad tirosina quinasa de TrkB. Ovocitos-SE incubados con proNGF no indujeron cambios significativos en la magnitud de las corrientes activadas por NMDA, lo que a su vez

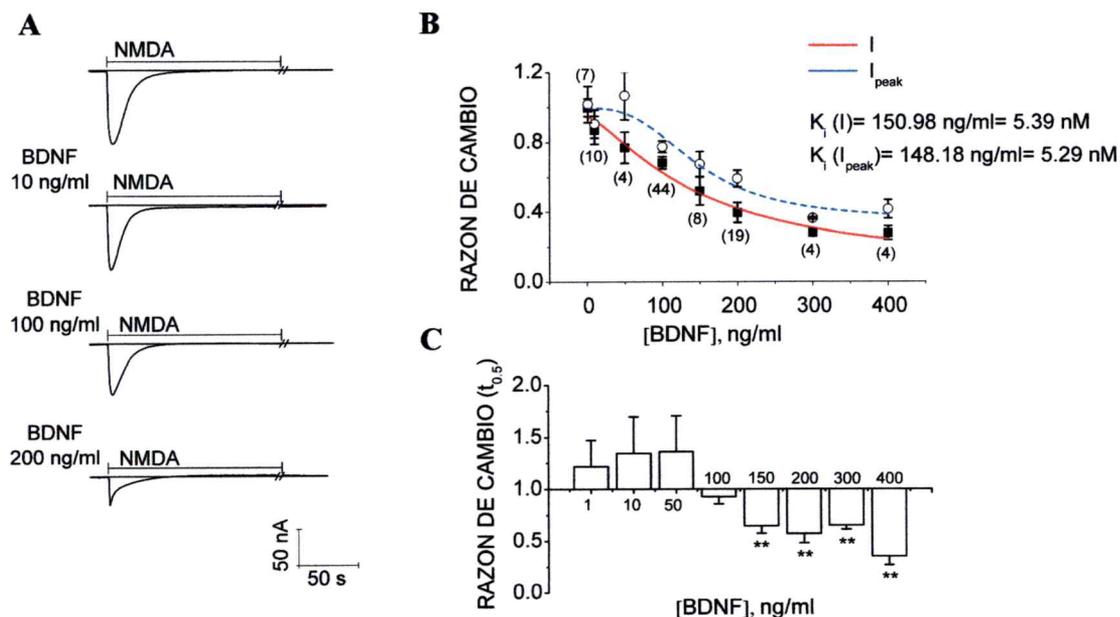


Figura 17. Dosis dependencia de la inhibición de los R-NMDA por BDNF después de SE. A. Trazos representativos de corrientes mediadas por el R-NMDA de un ovocito-SE en presencia de distintas concentraciones de BDNF (10, 100 y 200 ng/ml). B. Curva promedio de dosis-dependencia, de la inhibición de BDNF a distintas concentraciones (1, 10, 50, 100, 150, 200, 300 y 400 ng/ml) sobre los parámetros I (■) e I_{peak} (○). Los valores entre paréntesis representan el número de experimentos realizados para cada caso. C. Efecto de las mismas concentraciones de BDNF usadas en B sobre el $t_{0.5}$. ** $p < 0.01$.

sugiere que este efecto es independiente de $p75^{\text{NTR}}$ ($n=6$, Figura 18). Experimentos usando el inhibidor de PI3K y el inhibidor de Akt III, indican que la inhibición por BDNF está mediada por PI3K, mientras que experimentos con U0126 indican la participación de Erk1/2 (Figura 19).

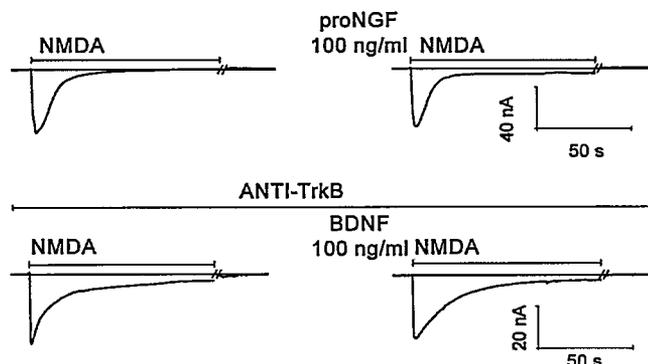


Figura 18. proNGF no inhibe al R-NMDA y anti-TrkB revierte la inhibición de las corrientes R-NMDA por BDNF en DPS-SE. Efecto de proNGF (panel superior) en ovocitos-DPS-SE y de BDNF (panel inferior) en ovocitos inyectados con DPS-SE incubadas con anti-TrkB.

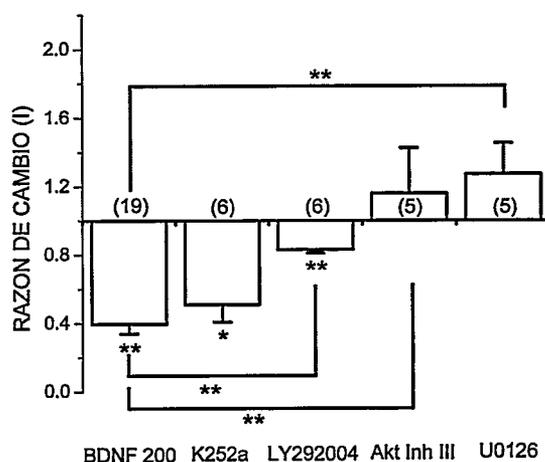


Figura 19. Efecto de los inhibidores de la fosforilación de TrkB, PI3K y de Erk1/2 sobre la inhibición del R-NMDA por BDNF. Los números entre paréntesis representan el número de experimentos independientes para cada condición. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

7. EFECTO DE BDNF SOBRE DPS-SE AISLADAS EN FORMA SEPARADA DE CORTEZA E HIPOCAMPO.

Con el objeto de estudiar si la inhibición por BDNF ocurre a nivel de la corteza, hipocampo o en ambas estructuras por igual, se purificaron separadamente DPSs desde

corteza e hipocampo de ratas SE y se microinyectaron en ovocitos. Al igual que en DPS-SE de telencéfalo, BDNF 100 ng/ml inhibe los R-NMDA en DPS-SE corticales en el 100% de los casos (razón de cambio $I=0.64 \pm 0.08$, $n=25$, 4 preparaciones independientes, Figura 20 A, B), pero no en DPS-SE hipocampales (razón de cambio $I=1.39 \pm 0.07$, $n=9$, 3 preparaciones independientes, Figura 20 A, B)

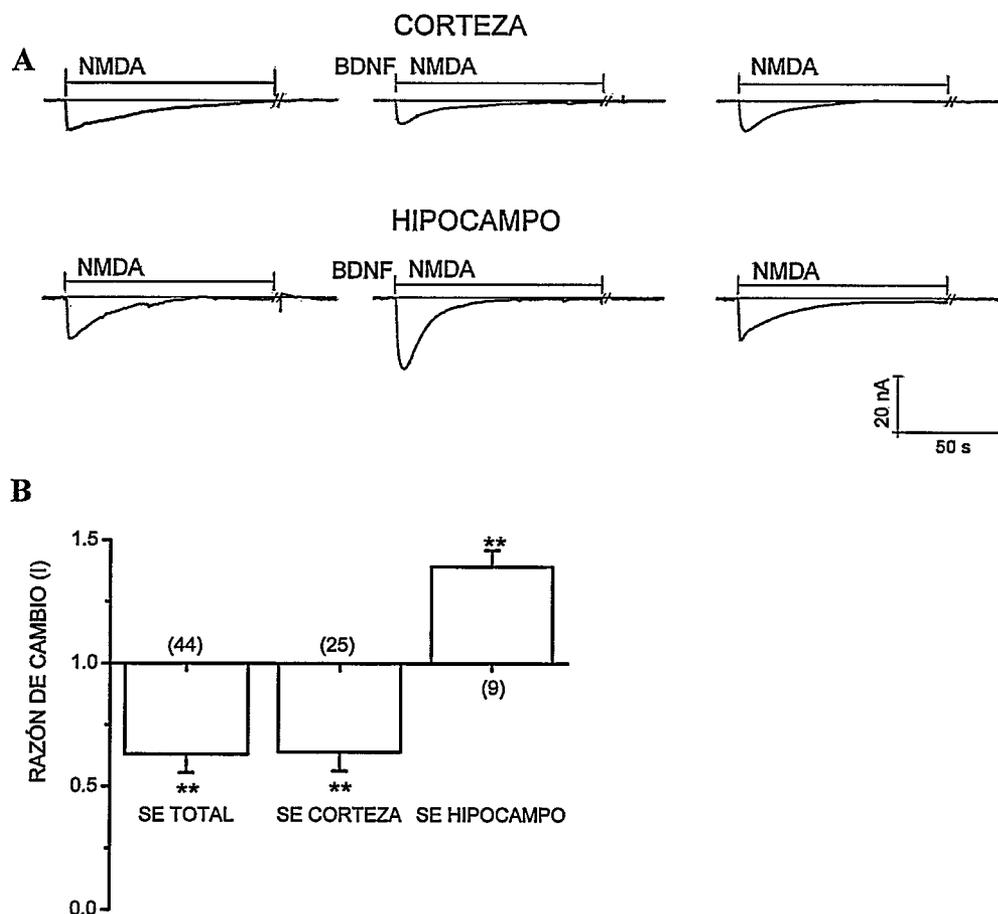


Figura 20. BDNF inhibe las corrientes R-NMDA en DPS-SE corticales pero no hipocampales. A. Trazos representativos de corrientes R-NMDA de un ovocito inyectado con DPS-SE cortical (panel superior) y otro inyectado con DPS-SE hipocampal (panel inferior) antes, durante y luego de la aplicación de BDNF 100 ng/ml. B. Cuantificación de las razones de cambio I en ovocitos inyectados con DPSs-SE extraídas desde telencéfalo (SE TOTAL), corteza (SE CORTEZA) e hipocampo (SE HIPOCAMPO). Los números entre paréntesis indican el número de ovocitos utilizados en cada experimento. ** $p < 0.01$

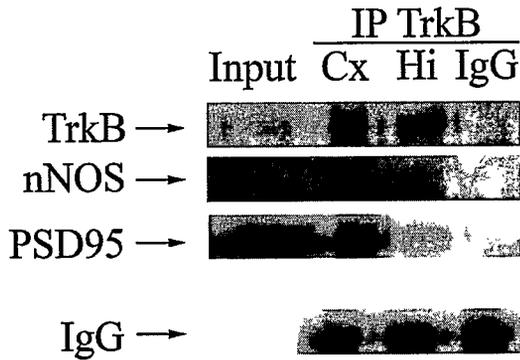
Estos resultados sugieren que BDNF modularía diferencialmente al R-NMDA en DPS corticales e hipocampales después de SE. Esta modulación se podría deber a diferencias en los complejos multiproteicos asociados a TrkB en ambas estructuras, y por ende, a diferencias en su señalización.

Se ha descrito en la literatura que los R-NMDA son inhibidos por oxidación de sus subunidades. Por ejemplo, la nitrosilación producto de actividad de Óxido Nítrico Sintetas (NOS), inhibe al R-NMDA (Choi *et al.* 2000, Takahashi *et al.* 2007) La producción de óxido nítrico depende de actividad sináptica, por lo que podría ser sintetizado durante el SE. La interacción TrkB-nNOS se evaluó mediante dos estrategias: Estudiando la asociación física entre ambas proteínas mediante co-inmunoprecipitación y mediante experimentos electrofisiológicos en que se empleó un inhibidor de la NOS.

En inmunoprecipitados de TrkB obtenidos desde DPSs de corteza e hipocampo control, (Figura 21 A) encontramos que la asociación de nNOS a TrkB en DPSs corticales es mayor cuando se compara con DPSs hipocampales. Para estudiar si la actividad de nNOS participa en la inhibición del R-NMDA luego de SE, incubamos ovocitos microinyectados con DPS-SE24 aislados de corteza con el inhibidor de nNOS N_{ω} -Nitro-L-Arginina (L-NNA, 1 μ M), el cual revirtió completamente la inhibición mediada por BDNF (Figura 21 B, n=2). Este resultado sugiere que los módulos de señalización asociados a TrkB son diferentes en DPSs obtenidas de ambas estructuras.

Además sugieren que, luego de SE, nNOS participa en la inhibición del R-NMDA por BDNF.

A



B

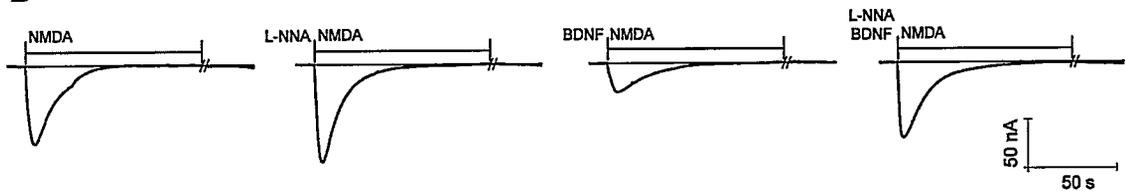


Figura 21. TrkB interactúa con PSD95 y nNOS en DPS de corteza y el inhibidor L-NNA para nNOS revierte la inhibición por BDNF luego de SE. A. Immunoprecipitación de TrkB desde DPSs de corteza e hipocampo.: Western blots representativos de PSD95 y nNOS, que son co-immunoprecipitados junto a TrkB Cx: corteza. Hi: hipocampo. B. Trazos de corrientes R-NMDA de un ovocito inyectado con DPS-SE cortical que muestran el efecto del inhibidor de nNOS, L-NNA 1 μ M, en presencia de BDNF 100 ng/mL (n=2).

DISCUSIÓN

En esta tesis, logramos implementar un nuevo método de registro de DPS aisladas en un sistema reconstituido que permite el acceso del experimentador a la cara extracelular de la DPS. Mediante esta metodología pudimos establecer que, en DPS-C, el R-NMDA es modulado en forma antagónica por ambos receptores para BDNF, TrkB y p75^{NTR}. Por otro lado, después de SE encontramos que en DPS corticales, pero no hipocampales, el R-NMDA es inhibido por TrkB no fosforilado.

1. REGISTRO DEL R-NMDA EN OVOCITOS INYECTADOS CON DENSIDADES POSTSINÁPTICAS.

Las corrientes totales de membrana activadas por NMDA han sido ampliamente estudiadas tanto en neuronas como en sistemas heterólogos, como por ejemplo, en ovocitos de *Xenopus laevis* microinyectadas con mRNA de las diferentes subunidades de R-NMDA (Levine and Kolb 2000, Yamada *et al.* 1999). Sin embargo, es importante estudiar la función de estos canales en su microambiente proteico nativo, especialmente cuando no se conoce el tipo de interacción entre los diferentes componentes, por ejemplo entre TrkB y el R-NMDA en la DPS.

La obtención de corrientes activadas por NMDA en ovocitos microinyectados con DPS, implementada y utilizada durante el curso de esta tesis, nos permitió estudiar la función de los R-NMDA en un ambiente donde la maquinaria postsináptica está claramente aislada de la maquinaria presináptica, y donde la composición del medio extracelular está controlada, en particular, la concentración de neurotrofinas, las que en

otros sistemas experimentales, como cultivos de neuronas, son secretadas permanentemente hacia el medio extracelular.

En el SNC, las sinapsis excitadoras y en consecuencia, las DPSs, son heterogéneas en cuanto a su composición y sus propiedades, lo cual está ampliamente documentado en la literatura (Harms *et al.* 2005, Lujan *et al.* 1997, Shostak *et al.* 2003).

La variabilidad de las propiedades funcionales de diferentes sinapsis glutamatérgicas se refleja, por ejemplo, en los mecanismos subyacentes a la potenciación de larga duración (LTP) de las sinapsis glutamatérgicas. En la capa CA1 del hipocampo, ésta depende de la activación del R-NMDA (como en la mayoría de las sinapsis corticales), mientras que en la capa CA3 la LTP es independiente del R-NMDA (Malenka and Nicoll 1999). Por lo tanto, el sistema de estudio aquí utilizado tiene la desventaja de que no permite estudiar mecanismos que son sinapsis-específicos, sino que refleja cambios “masivos” que ocurren en una gran proporción de sinapsis. Es por ello que resulta un sistema particularmente útil para estudiar plasticidad homeostática. La plasticidad homeostática no es sinapsis-específica, sino que afecta todas las sinapsis de un circuito neuronal sometido a un nivel de actividad dado de manera proporcional, adecuando la magnitud del EPSP a la tasa de actividad “histórica” (Wierenga *et al.* 2005, Wierenga *et al.* 2006).

El hecho de encontrar potenciación del R-NMDA en el 30% de los ovocitos e inhibición en el 50% de ellos refleja también la heterogeneidad de nuestra preparación. Nosotros suponemos que ambos mecanismos están presentes en la mayoría de las DPS. Sin embargo, puede haber DPS que sólo contengan TrkB o sólo p75^{NTR}; o que la inhibición por p75^{NTR} sea más potente que el efecto dependiente de TrkB en una

proporción alta de DPS. Otro factor que puede haber influido en nuestro resultado es el hecho de que, en DPSs, p75^{NTR} está anclado al componente central de esta estructura (el complejo-receptor NMDA), mientras que la interacción con TrkB parece ser más débil y mediada por proteínas aún desconocidas. En consecuencia, el alto porcentaje de ovocitos en que el R-NMDA es inhibido puede deberse a que parte del TrkB asociado a DPS se pierde durante el proceso de fraccionamiento subcelular.

Un punto interesante de discusión es el número de DPSs que se insertan en un ovocito. Este cálculo se puede extraer, en forma aproximada, desde los mismos valores de corriente de estos ovocitos. Se sabe que la corriente de peak promedio en respuesta a NMDA en 98 ovocitos fue de -22 nA (Sandoval *et al.* 2007). Estudios realizados por Mary Kennedy (Kennedy 2000) postularon que una DPS contiene alrededor de 50 receptores de tipo NMDA. Si un receptor tiene una conductancia promedio de 50 pS, a la corriente a la cual registramos (-60 mV) tenemos una corriente unitaria aproximada de 3 pA. Por lo tanto, en promedio tenemos $22 \times 10^3 \div 3 = 7333$ canales abiertos. Con este dato, podríamos inferir que se habrían incorporado alrededor de 146 DPS por ovocito. Sin embargo, este cálculo se realizó asumiendo las condiciones más favorables, como una probabilidad de apertura (P_o) de 1 en el peak de corriente y sin considerar los estados de subconductancias que se han descrito en la literatura. Si asumimos una P_o más cercana a la realidad, alrededor de 0.1 (Nowak and Wright 1992) este valor aumenta en un orden de magnitud, con lo que tendríamos alrededor de 1460 DPS incorporadas en el ovocito. Recientemente, se ha estimado con mayor precisión que una DPS contiene, en promedio, 0.24 pmoles de subunidad NR1 (Cheng *et al.* 2006). Al realizar el cálculo por DPS, que tiene un peso estimado de 1.1 GDa (Cheng *et al.* 2006), se concluye que

hay al menos 140 receptores en una de ellas. Por otro lado, al inyectar 200 ng de proteína de DPS por ovocito, considerando el peso molecular promedio de una DPS, se están inyectando 110 millones de DPS (Chen *et al.* 2005). Esto significa que de las DPS inyectadas, sólo el 0.001% se incorpora a la membrana plasmática.

2. EFECTOS ANTAGÓNICOS DE TRKB Y p75^{NTR} SOBRE EL R-NMDA EN DPS CONTROL

En esta tesis se estudió el efecto agudo de las neurotrofinas BDNF y proNGF sobre los R-NMDA. BDNF potencia estas corrientes en forma dependiente de TrkB, efecto ya descrito por diversos autores (Kolb *et al.* 2005, Levine *et al.* 1998, Yamada and Nabeshima 2003). Este hecho dio validez a la técnica empleada por nosotros. Además, los resultados con los inhibidores de las distintas vías de transducción asociadas a TrkB sugieren que el esta potenciación involucra la activación de PI3K y Erk 1/2, y no PLC γ .

Existen evidencias en la literatura, que ilustran acerca de los mecanismos por los cuales TrkB modula la actividad sináptica excitadora, tanto a nivel presináptico (Kelly and Lynch 2000) como postsináptico (Mohajerani *et al.* 2007, Slack *et al.* 2004). La ventaja de nuestro modelo de estudio es que pudimos diseccionar los mecanismos postsinápticos agudos, eliminando la participación presináptica y los efectos genómicos, esto último, por el curso temporal de los experimentos. En el 50% de los ovocitos, BDNF fue capaz de inhibir agudamente al R-NMDA en forma independiente de TrkB. Los experimentos realizados con proNGF en presencia del anticuerpo de pérdida de

función para p75^{NTR} (REX), demostraron que esta inhibición depende de p75^{NTR}, el cual está enriquecido en las DPS (Figura 22). Esta es la primera vez que se describe la presencia de este receptor en la DPS aislada y la modulación de una conductancia iónica en forma aguda por el receptor p75^{NTR}, hecho que abre un nuevo campo de estudio en el tema de la transducción de señales activadas por neurotrofinas en DPSs.

La inhibición del R-NMDA podría estar implicado en el papel de p75^{NTR} en la depresión de larga duración (LTD) que ha sido reportada recientemente (Rosch *et al.* 2005, Woo *et al.* 2005). Resultados adicionales de nuestro laboratorio que no forman parte de esta tesis muestran que p75^{NTR} está anclado al complejo R-NMDA mediante interacción directa con la proteína andamio PSD-95 (Sandoval *et al.* 2007) creándose así una cercanía física entre p75^{NTR} y el R-NMDA.

Al analizar el efecto de los diferentes inhibidores de TrkB y de las cascadas de transducción asociadas, se observa que estos fármacos (K252a, LY294002 y U0126) no sólo revierten la potenciación sino que “desenmascaran” una inhibición del R-NMDA. Contrariamente, al inhibir la actividad de p75^{NTR} mediante la incubación con el anticuerpo anti-p75^{NTR}, no se observó nunca una inhibición, sino solamente potenciación a diferentes concentraciones de BDNF.

En nuestro sistema experimental, la afinidad de BDNF por p75^{NTR} es menor que la afinidad por TrkB. Se ha visto que, en sistemas heterólogos, la co-expresión de TrkA y p75^{NTR} aumenta la afinidad de TrkA por NGF (Hantzopoulos *et al.* 1994, Hempstead *et al.* 1991). En el mismo sentido, p75^{NTR} potencia las respuestas mediadas por receptores Trk (A, B y C) (Hantzopoulos *et al.* 1994). En DPS co-localizan TrkB y p75^{NTR}, lo que permitiría modular la afinidad de TrkB por BDNF en una forma

dependiente de $p75^{\text{NTR}}$, produciéndose así una potenciación del R-NMDA a concentraciones menores de neurotrofina. La diferencia de afinidades permitiría regular finamente el efecto de la neurotrofina sobre la actividad del R-NMDA. A concentraciones bajas de la neurotrofina, se estaría favoreciendo la potenciación del R-NMDA mientras a concentraciones mayores, se favorecería su inhibición. Por otro lado, desconocemos las afinidades relativas de ambos receptores por proBDNF; tampoco sabemos si la secreción de ambas neurotrofinas, BDNF y proBDNF, está regulada diferencialmente por los niveles de actividad, factores que a su vez determinarían el signo de la regulación del R-NMDA en una situación fisiológica.

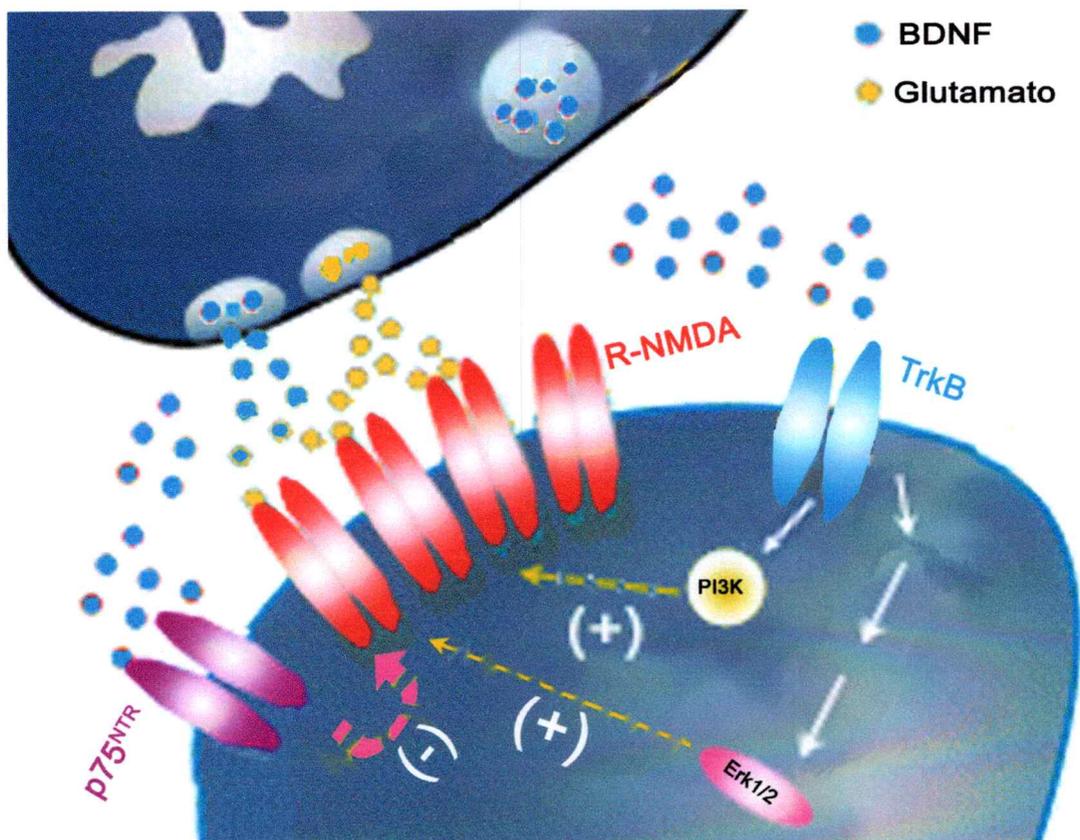


Figura 22. Modelo propuesto de la modulación por BDNF de los R-NMDA en DPS-C

3. EFECTO DE BDNF SOBRE LOS R-NMDA EN DPS-SE.

Nuestro laboratorio describió que la inducción de SE por ácido kaínico, como modelo de Epilepsia de Lóbulo Temporal (TLE), produce un aumento del contenido de TrkB en DPSs a partir de las 2 horas post inyección de ácido kaínico (Wyneken *et al.* 2003, Wyneken *et al.* 2001). El aumento de TrkB, el cual en DPS-C potencia al R-NMDA, permitió plantear la hipótesis de que el efecto potenciador podría estar exacerbado en DPS-SE. Sin embargo, para nuestra sorpresa BDNF indujo una inhibición dosis dependiente de las corrientes activadas por NMDA en DPS-SE. Los estudios con proNGF en este sistema sugieren que el receptor $p75^{\text{NTR}}$ no estaría participando en esta inhibición.

Cuando se estudió la participación de TrkB en la inhibición, encontramos que la inhibición era independiente de la actividad catalítica de TrkB pero dependiente del receptor y de PI3K y Erk1/2. (Figura 23). Todos los mecanismos de señalización de TrkB hasta ahora conocidos dependen de su actividad tirosina quinasa y de la fosforilación de los residuos Y504 y Y805 (Chao 2003). Sin embargo, en este caso, la ausencia de estos residuos fosforilados luego de SE, apoyan la interpretación de que la inhibición del R-NMDA en DPS-SE sería independiente de la actividad tirosina quinasa de TrkB.

Aún no tenemos explicación para el hecho de que las mismas enzimas involucradas en la inhibición después de SE (PI3K y Erk 1/2), son las responsables de la potenciación de R-NMDA en DPSs controles. Recientemente, se han descrito mecanismos de señalización activados por TrkB independientes de su actividad catalítica. Estudios en esta dirección proponen que LAR, una proteína tirosina fosfatasa,

que interactúa con TrkB, activa a la tirosina quinasa Src, la cual a su vez transactiva a TrkB y por lo tanto, cascadas de transducción de señales asociadas a este receptor (Yang *et al.* 2006). Otro ejemplo es la proteína ARMS/Kidins220, una proteína de membrana que co-localiza con receptores Trk (Kong *et al.* 2001). TrkB es capaz de señalizar vía ARMS de una manera independiente de autofosforilación en sus residuos de tirosina Y504 y Y805 (Arevalo *et al.* 2006). En nuestro modelo experimental, mecanismos similares podrían estar implicados en la inhibición del R-NMDA por TrkB no fosforilado. Queda por establecer cuáles son las fosfatasa de proteínas que participan en la desfosforilación de los residuos de tirosina de TrkB.

Por otra parte, la asociación de nNOS a TrkB observada fundamentalmente por nosotros en corteza sugiere un posible papel en la regulación de los R-NMDA en esta estructura cerebral. Está descrito que diversos residuos de cisteína y tirosina, tanto en dominios transmembrana como extracelulares, de las subunidades NR1 y NR2A son susceptibles de ser nitrosilados, y que la S-nitrosilación en cisteína inhibe la actividad de los R-NMDA (Choi *et al.* 2000, Takahashi *et al.* 2007). Sin embargo, es necesario realizar más experimentos para obtener una clara idea acerca de las proteínas asociadas diferencialmente a TrkB en corteza e hipocampo. También se podría medir la síntesis de óxido nítrico en sinaptosomas después de SE, o medir el nivel de nitrosilación de los R-NMDA.

Es posible que en DPS-SE, PI3K y/o Erk 1/2 podrían activar a NOS, como se ha reportado en la literatura (Cauwels *et al.* 2006, Hashimoto *et al.* 2006, Huang *et al.* 2004). Si bien en esta tesis se demostró que TrkB catalíticamente inactivo es capaz de inhibir la actividad del R-NMDA, aún no se puede descartar completamente la

participación de $p75^{\text{NTR}}$ en este efecto, ya que puede estar actuando como co-receptor de TrkB.

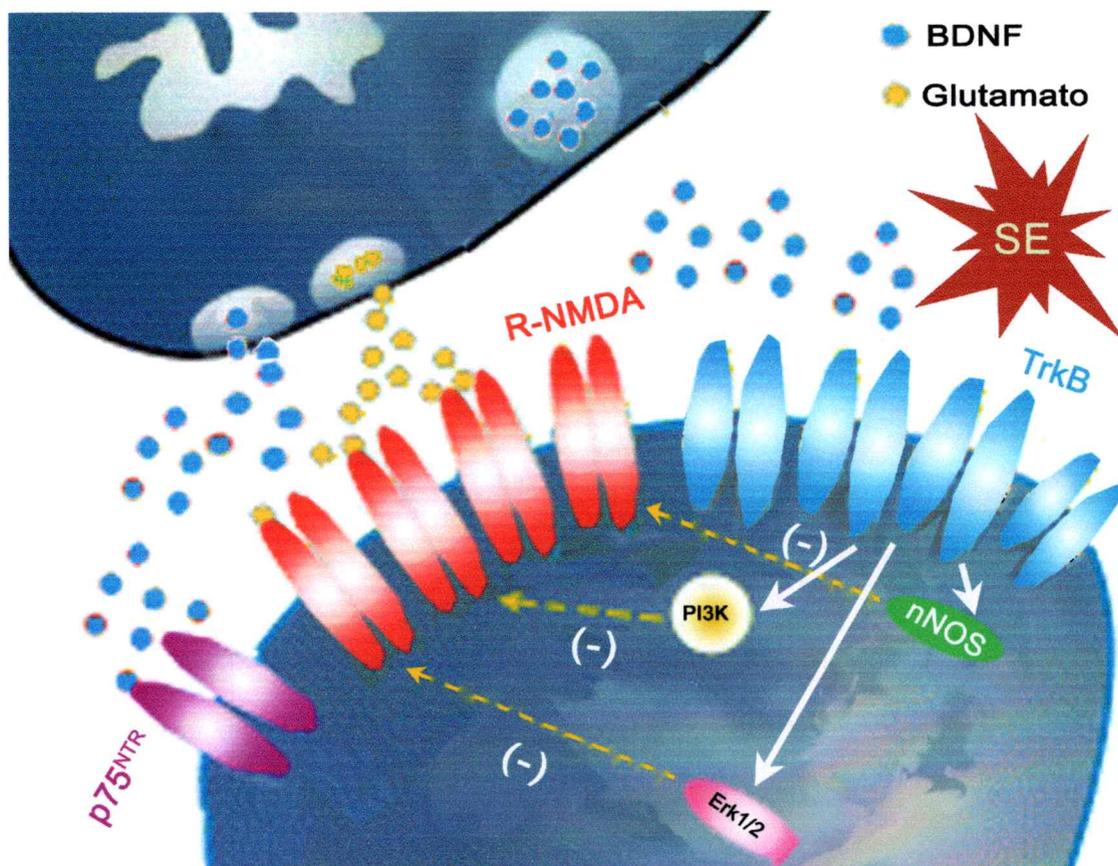


Figura 23. Modelo propuesto de la modulación por BDNF de los R-NMDA en DPS-SE

4. PARTICIPACIÓN DE TRKB EN LA EPILEPTOGÉNESIS VERSUS PLASTICIDAD HOMEOSTÁTICA.

Los mecanismos homeostáticos permiten que la actividad neuronal se mantenga dentro de rangos fisiológicos (Perez-Otano and Ehlers 2005, Wierenga *et al.* 2006, Williams and Noble 2007). El signo de la plasticidad homeostática es opuesto al signo del estímulo inductor: después de períodos de actividad aumentada, la magnitud

del EPSP disminuye mientras que después de bloqueo de actividad neuronal, la magnitud del EPSP aumenta (Turrigiano 2007, Binder *et al.* 1999). Nuestros resultados sugieren que luego de un período de actividad neuronal exagerada (como lo es un SE), TrkB inhibe la respuesta mediada por el R-NMDA en la mayoría de sinapsis corticales. Este mecanismo contribuiría a frenar la propagación de convulsiones y reducir la excitotoxicidad mediada por el R-NMDA después de una descarga epiléptica.

Se acepta que en hipocampo, después de SE ocurre una reorganización anti-homeostática o pro-epileptogénica (Binder *et al.* 1999). Es necesario realizar estudios adicionales para evaluar la importancia fisiológica de plasticidad homeostática en corteza después de SE, y la posibilidad de potenciar estos mecanismos con fines terapéuticos. Estos estudios deberían realizarse en otros sistemas experimentales, como en tajadas de corteza cerebral o incluso mediante registros neuronales en el animal entero.

Por el contrario, la inhibición observada en la corteza no se manifiesta en hipocampo, donde se observa incluso una leve pero significativa potenciación de la actividad de los R-NMDA.

Se ha visto que los efectos biológicos de las neurotrofinas y de BDNF en particular, son muy diversos. Esto se debe en parte a los múltiples mecanismos de señalización que es capaz de activar. A través de un estudio en DPS aisladas pudimos disectar diferentes mecanismos mediante los cuales BDNF regula al R-NMDA en las sinapsis excitadoras. Éstos posiblemente tienen relevancia en relación a la plasticidad sináptica asociativa (LTP versus LTD) como también en relación a plasticidad homeostática. A su vez, la mejor comprensión de mecanismos homeostáticos podría

ayudar a desarrollar estrategias tendientes a prevenir la epileptogénesis en las epilepsias adquiridas.

BIBLIOGRAFÍA

- Aleu, J., Barat, A., Burgos, J. S., Solsona, C., Marsal, J. and Ramirez, G. (1999) Guanine Nucleotides, Including GMP, Antagonize Kainate Responses in *Xenopus* Oocytes Injected with Chick Cerebellar Membranes. *Journal of Neurochemistry*, **72**, 2170-2176.
- Ampuero, E., Dagnino-Subiabre, A., Sandoval, R., Zepeda-Carreno, R., Sandoval, S., Viedma, A., Aboitiz, F., Orrego, F. and Wyneken, U. (2007) Status epilepticus induces region-specific changes in dendritic spines, dendritic length and TrkB protein content of rat brain cortex. *Brain Res*, **1150**, 225-238.
- Arevalo, J. C., Pereira, D. B., Yano, H., Teng, K. K. and Chao, M. V. (2006) Identification of a switch in neurotrophin signaling by selective tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem*, **281**, 1001-1007.
- Barker, P. A. (2004) p75NTR is positively promiscuous: novel partners and new insights. *Neuron*, **42**, 529-533.
- Bertrand, S., Weiland, S., Berkovic, S. F., Steinlein, O. K. and Bertrand, D. (1998) Properties of neuronal nicotinic acetylcholine receptor mutants from humans suffering from autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy. *Br J Pharmacol*, **125**, 751-760.
- Biervert, C., Schroeder, B. C., Kubisch, C., Berkovic, S. F., Propping, P., Jentsch, T. J. and al., e. (1998) A potassium channel mutation in neonatal human epilepsy. *Science*, **279**, 403-406.
- Binder, D. K., Routbort, M. J. and McNamara, J. O. (1999) Immunohistochemical evidence of seizure-induced activation of trk receptors in the mossy fiber pathway of adult rat hippocampus. *J Neurosci*, **19**, 4616-4626.
- Blum, R., Kafitz, K. W. and Konnerth, A. (2002) Neurotrophin-evoked depolarization requires the sodium channel Na(V)1.9. *Nature*, **419**, 687-693.

- Brandt, C., Potschka, H., Loscher, W. and Ebert, U. (2003) N-methyl-D-aspartate receptor blockade after status epilepticus protects against limbic brain damage but not against epilepsy in the kainate model of temporal lobe epilepsy. *Neuroscience*, **118**, 727-740.
- Carlin, R. K., Grab, D. J., Cohen, R. S. and Siekevitz, P. (1980) Isolation and characterization of postsynaptic densities from various brain regions: enrichment of different types of postsynaptic densities. *J Cell Biol*, **86**, 831-845.
- Cauwels, A., Janssen, B., Buys, E., Sips, P. and Brouckaert, P. (2006) Anaphylactic shock depends on PI3K and eNOS-derived NO. *J Clin Invest*, **116**, 2244-2251.
- Coutinho, V. and Knopfel, T. (2002) Metabotropic glutamate receptors: electrical and chemical signaling properties. *Neuroscientist*, **8**, 551-561.
- Cull-Candy, S. G. and Leszkiewicz, D. N. (2004) Role of distinct NMDA receptor subtypes at central synapses. *Sci STKE*, **2004**, re16.
- Chao, M. V. (2003) Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways. *Nat Rev Neurosci*, **4**, 299-309.
- Chen, M. J., Nguyen, T. V., Pike, C. J. and Russo-Neustadt, A. A. (2007) Norepinephrine induces BDNF and activates the PI-3K and MAPK cascades in embryonic hippocampal neurons. *Cell Signal*, **19**, 114-128.
- Chen, X., Vinade, L., Leapman, R. D., Petersen, J. D., Nakagawa, T., Phillips, T. M., Sheng, M. and Reese, T. S. (2005) Mass of the postsynaptic density and enumeration of three key molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 11551-11556.
- Cheng, D., Hoogenraad, C. C., Rush, J. *et al.* (2006) Relative and absolute quantification of postsynaptic density proteome isolated from rat forebrain and cerebellum. *Mol Cell Proteomics*, **5**, 1158-1170.
- Choi, Y. B., Tenneti, L., Le, D. A., Ortiz, J., Bai, G., Chen, H. V. and Lipton, S. A. (2000) Molecular basis of NMDA receptor-coupled ion channel modulation by S-nitrosylation. *Nat Neurosci*, **3**, 15-21.

- Danzer, S. C., He, X. and McNamara, J. O. (2004) Ontogeny of seizure-induced increases in BDNF immunoreactivity and TrkB receptor activation in rat hippocampus. *Hippocampus*, **14**, 345-355.
- Dashtipour, K., Yan, X. X., Dinh, T. T., Okazaki, M. M., Nadler, J. V. and Ribak, C. E. (2002) Quantitative and morphological analysis of dentate granule cells with recurrent basal dendrites from normal and epileptic rats. *Hippocampus*, **12**, 235-244.
- Davis, G. W. (2006) Homeostatic Control of Neural Activity: From Phenomenology to Molecular Design. *Annu Rev Neurosci*.
- Dechant, G., Biffo, S., Okazawa, H., Kolbeck, R., Pottgiesser, J. and Barde, Y. A. (1993) Expression and binding characteristics of the BDNF receptor chick trkB. *Development*, **119**, 545-558.
- DeLorenzo, R. J. (1991) The challenging genetics of epilepsy. *Epilepsy Res Suppl*, **4**, 3-17.
- DeLorenzo, R. J. (2004) New drugs for the prevention of epilepsy and how they work: the role of calcium in epileptogenesis. *Epilepsy Res*.
- Delorenzo, R. J., Sun, D. A. and Deshpande, L. S. (2005) Cellular mechanisms underlying acquired epilepsy: the calcium hypothesis of the induction and maintenance of epilepsy. *Pharmacol Ther*, **105**, 229-266.
- du Bois, T. M. and Huang, X. F. (2007) Early brain development disruption from NMDA receptor hypofunction: relevance to schizophrenia. *Brain Res Rev*, **53**, 260-270.
- Ebert, U., Brandt, C. and Loscher, W. (2002) Delayed sclerosis, neuroprotection, and limbic epileptogenesis after status epilepticus in the rat. *Epilepsia*, **43 Suppl 5**, 86-95.
- Ehlers, M. D., Tingley, W. G. and Huganir, R. L. (1995) Regulated subcellular distribution of the NR1 subunit of the NMDA receptor. *Science*, **269**, 1734-1737.

- Fox, K., Daw, N., Sato, H. and Czepita, D. (1992) The effect of visual experience on development of NMDA receptor synaptic transmission in kitten visual cortex. *J Neurosci*, **12**, 2672-2684.
- Gooney, M. and Lynch, M. A. (2001) Long-term potentiation in the dentate gyrus of the rat hippocampus is accompanied by brain-derived neurotrophic factor-induced activation of TrkB. *J Neurochem*, **77**, 1198-1207.
- Hantzopoulos, P. A., Suri, C., Glass, D. J., Goldfarb, M. P. and Yancopoulos, G. D. (1994) The low affinity NGF receptor, p75, can collaborate with each of the Trks to potentiate functional responses to the neurotrophins. *Neuron*, **13**, 187-201.
- Haradahira, T., Okauchi, T., Maeda, J., Zhang, M. R., Nishikawa, T., Konno, R., Suzuki, K. and Sahara, T. (2003) Effects of endogenous agonists, glycine and D-serine, on in vivo specific binding of [¹¹C]L-703,717, a PET radioligand for the glycine-binding site of NMDA receptors. *Synapse*, **50**, 130-136.
- Harms, K. J., Tovar, K. R. and Craig, A. M. (2005) Synapse-specific regulation of AMPA receptor subunit composition by activity. *J Neurosci*, **25**, 6379-6388.
- Hashimoto, A., Miyakoda, G., Hirose, Y. and Mori, T. (2006) Activation of endothelial nitric oxide synthase by cilostazol via a cAMP/protein kinase A- and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent mechanism. *Atherosclerosis*, **189**, 350-357.
- Heerssen, H. M. and Segal, R. A. (2002) Location, location, location: a spatial view of neurotrophin signal transduction. *Trends in Neurosciences*, **25**, 160-165.
- Hempstead, B. L. (2002) The many faces of p75^{NTR}. *Curr Opin Neurobiol*, **12**, 260-267.
- Hempstead, B. L., Martin-Zanca, D., Kaplan, D. R., Parada, L. F. and Chao, M. V. (1991) High-affinity NGF binding requires coexpression of the trk proto-oncogene and the low-affinity NGF receptor. *Nature*, **350**, 678-683.
- Horch, H. W. (2004) Local effects of BDNF on dendritic growth. *Rev Neurosci*, **15**, 117-129.

- Huang, E. J. and Reichardt, L. F. (2001) Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu Rev Neurosci*, **24**, 677-736.
- Huang, H. N., Lu, P. J., Lo, W. C., Lin, C. H., Hsiao, M. and Tseng, C. J. (2004) In situ Akt phosphorylation in the nucleus tractus solitarii is involved in central control of blood pressure and heart rate. *Circulation*, **110**, 2476-2483.
- Jaboin, J., Kim, C. J., Kaplan, D. R. and Thiele, C. J. (2002) Brain-derived neurotrophic factor activation of TrkB protects neuroblastoma cells from chemotherapy-induced apoptosis via phosphatidylinositol 3'-kinase pathway. *Cancer Res*, **62**, 6756-6763.
- Jia, Y., Zhou, J., Tai, Y. and Wang, Y. (2007) TRPC channels promote cerebellar granule neuron survival. *Nat Neurosci*, **10**, 559-567.
- Kandel, E. R., Schwartz, J. H. and Jessell, T. M. (2000) *Principles of Neural Science*. McGraw-Hill.
- Katoh-Semba, R., Takeuchi, I. K., Inaguma, Y., Ito, H. and Kato, K. (1999) Brain-derived neurotrophic factor, nerve growth and neurotrophin-3 selected regions of the rat brain following kainic acid-induced seizure activity. *Neurosci Res*, **35**, 19-29.
- Kelly, A. and Lynch, M. A. (2000) Long-term potentiation in dentate gyrus of the rat is inhibited by the phosphoinositide 3-kinase inhibitor, wortmannin. *Neuropharmacology*, **39**, 643-651.
- Kennedy, M. B. (1993) The postsynaptic density. *Curr Opin Neurobiol*, **3**, 732-737.
- Kennedy, M. B. (2000) Signal-processing machines at the postsynaptic density. *Science*, **290**, 750-754.
- Kim, Y. I., Choi, H. J. and Colwell, C. S. (2006) Brain-derived neurotrophic factor regulation of N-methyl-D-aspartate receptor-mediated synaptic currents in suprachiasmatic nucleus neurons. *J Neurosci Res*, **84**, 1512-1520.

- Kolb, J. E., Trettel, J. and Levine, E. S. (2005) BDNF enhancement of postsynaptic NMDA receptors is blocked by ethanol. *Synapse*, **55**, 52-57.
- Kong, H., Boulter, J., Weber, J. L., Lai, C. and Chao, M. V. (2001) An evolutionarily conserved transmembrane protein that is a novel downstream target of neurotrophin and ephrin receptors. *J Neurosci*, **21**, 176-185.
- Koyama, R. and Ikegaya, Y. (2005) To BDNF or not to BDNF: that is the epileptic hippocampus. *Neuroscientist*, **11**, 282-287.
- Lee, R., Kermani, P., Teng, K. K. and Hempstead, B. L. (2001) Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. *Science*, **294**, 1945-1948.
- Leonard, A. S. and Hell, J. W. (1997) Cyclic AMP-dependent protein kinase and protein kinase C phosphorylate N-methyl-D-aspartate receptors at different sites. *J Biol Chem*, **272**, 12107-12115.
- Levine, E. S., Crozier, R. A., Black, I. B. and Plummer, M. R. (1998) Brain-derived neurotrophic factor modulates hippocampal synaptic transmission by increasing N-methyl-D-aspartic acid receptor activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 10235-10239.
- Levine, E. S. and Kolb, J. E. (2000) Brain-derived neurotrophic factor increases activity of NR2B-containing N-methyl-D-aspartate receptors in excised patches from hippocampal neurons. *J Neurosci Res*, **62**, 357-362.
- Li, H. S., Xu, X. Z. and Montell, C. (1999) Activation of a TRPC3-dependent cation current through the neurotrophin BDNF. *Neuron*, **24**, 261-273.
- Liu, Z., Stafstrom, C. E., Sarkisian, M. R., Yang, Y., Hori, A., Tandon, P. and Holmes, G. L. (1997) Seizure-induced glutamate release in mature and immature animals: an in vivo microdialysis study. *Neuroreport*, **8**, 2019-2023.
- Lohof, A. M., Ip, N. Y. and Poo, M. M. (1993) Potentiation of developing neuromuscular synapses by the neurotrophins NT-3 and BDNF. *Nature*, **363**, 350-353.

- Lu, B. (2003) Pro-Region of Neurotrophins: Role in Synaptic Modulation. *Neuron*, **39**, 735-738.
- Lujan, R., Roberts, J. D., Shigemoto, R., Ohishi, H. and Somogyi, P. (1997) Differential plasma membrane distribution of metabotropic glutamate receptors mGluR1 alpha, mGluR2 and mGluR5, relative to neurotransmitter release sites. *J Chem Neuroanat*, **13**, 219-241.
- Madden, D. R. (2002) The structure and function of glutamate receptor ion channels. *Nat Rev Neurosci*, **3**, 91-101.
- Majdan, M. and Miller, F. D. (1999) Neuronal life and death decisions functional antagonism between the Trk and p75 neurotrophin receptors. *Int J Dev Neurosci*, **17**, 153-161.
- Malenka, R. C. and Nicoll, R. A. (1999) Long-term potentiation--a decade of progress? *Science*, **285**, 1870-1874.
- Massey, P. V., Johnson, B. E., Moulton, P. R., Auberson, Y. P., Brown, M. W., Molnar, E., Collingridge, G. L. and Bashir, Z. I. (2004) Differential roles of NR2A and NR2B-containing NMDA receptors in cortical long-term potentiation and long-term depression. *J Neurosci*, **24**, 7821-7828.
- Matsumoto, T., Numakawa, T., Adachi, N., Yokomaku, D., Yamagishi, S., Takei, N. and Hatanaka, H. (2001) Brain-derived neurotrophic factor enhances depolarization-evoked glutamate release in cultured cortical neurons. *J Neurochem*, **79**, 522-530.
- McAllister, A. K., Katz, L. C. and Lo, D. C. (1999) Neurotrophins and synaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci*, **22**, 295-318.
- McKenzie, G., Ward, G., Stallwood, Y., Briend, E., Papadia, S., Lennard, A., Turner, M., Champion, B. and Hardingham, G. E. (2006) Cellular Notch responsiveness is defined by phosphoinositide 3-kinase-dependent signals. *BMC Cell Biol*, **7**, 10.
- McNamara, J. O. (1999) Emerging insights into the genesis of epilepsy. *Nature*, **399**, A15-22.

- Meldrum, B. S. (1997) First Alfred Meyer Memorial Lecture. Epileptic brain damage: a consequence and a cause of seizures. *Neuropathol Appl Neurobiol*, **23**, 185-201; discussion 201-182.
- Minichiello, L., Calella, A. M., Medina, D. L., Bonhoeffer, T., Klein, R. and Korte, M. (2002) Mechanism of TrkB-mediated hippocampal long-term potentiation. *Neuron*, **36**, 121-137.
- Mohajerani, M. H., Sivakumaran, S., Zacchi, P., Aguilera, P. and Cherubini, E. (2007) Correlated network activity enhances synaptic efficacy via BDNF and the ERK pathway at immature CA3 CA1 connections in the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A*.
- Mothet, J. P., Parent, A. T., Wolosker, H., Brady, R. O., Jr., Linden, D. J., Ferris, C. D., Rogawski, M. A. and Snyder, S. H. (2000) D-serine is an endogenous ligand for the glycine site of the N-methyl-D-aspartate receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 4926-4931.
- Mowla, S. J., Farhadi, H. F., Pareek, S., Atwal, J. K., Morris, S. J., Seidah, N. G. and Murphy, R. A. (2001) Biosynthesis and post-translational processing of the precursor to brain-derived neurotrophic factor. *J Biol Chem*, **276**, 12660-12666.
- Nowak, L. M. and Wright, J. M. (1992) Slow voltage-dependent changes in channel open-state probability underlie hysteresis of NMDA responses in Mg(2+)-free solutions. *Neuron*, **8**, 181-187.
- Nykjaer, A., Lee, R., Teng, K. K. *et al.* (2004) Sortilin is essential for proNGF-induced neuronal cell death. *Nature*, **427**, 843-848.
- Omkumar, R. V., Kiely, M. J., Rosenstein, A. J., Min, K. T. and Kennedy, M. B. (1996) Identification of a phosphorylation site for calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in the NR2B subunit of the N-methyl-D-aspartate receptor. *J Biol Chem*, **271**, 31670-31678.
- Perez-Otano, I. and Ehlers, M. D. (2005) Homeostatic plasticity and NMDA receptor trafficking. *Trends Neurosci*, **28**, 229-238.
- Poo, M. M. (2001) Neurotrophins as synaptic modulators. *Nat Rev Neurosci*, **2**, 24-32.

- Rosch, H., Schweigreiter, R., Bonhoeffer, T., Barde, Y. A. and Korte, M. (2005) The neurotrophin receptor p75NTR modulates long-term depression and regulates the expression of AMPA receptor subunits in the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 7362-7367.
- Roux, P. P. and Barker, P. A. (2002) Neurotrophin signaling through the p75 neurotrophin receptor. *Prog Neurobiol*, **67**, 203-233.
- Sanchez-Perez, A. M., Llansola, M. and Felipo, V. (2006) Modulation of NMDA receptors by AKT kinase. *Neurochem Int*, **49**, 351-358.
- Sandoval, M., Sandoval, R., Thomas, U. *et al.* (2007) Antagonistic effects of TrkB and p75(NTR) on NMDA receptor currents in post-synaptic densities transplanted into *Xenopus* oocytes. *J Neurochem*, **101**, 1672-1684.
- Scharfman, H. E. (2005) Brain-derived Neurotrophic Factor and Epilepsy-A Missing Link? *Epilepsy Curr*, **5**, 83-88.
- Scharfman, H. E., Goodman, J. H. and Sollas, A. L. (1999) Actions of brain-derived neurotrophic factor in slices from rats with spontaneous seizures and mossy fiber sprouting in the dentate gyrus. *J Neurosci*, **19**, 5619-5631.
- Scharfman, H. E., Goodman, J. H., Sollas, A. L. and Croll, S. D. (2002) Spontaneous Limbic Seizures after Intrahippocampal Infusion of Brain-Derived Neurotrophic Factor. *Experimental Neurology*, **174**, 201-214.
- Segal, R. A. (2003) SELECTIVITY IN NEUROTROPHIN SIGNALING: Theme and Variations. *Annual Review of Neuroscience*, **26**, 299-330.
- Shostak, Y., Ding, Y. and Casagrande, V. A. (2003) Neurochemical comparison of synaptic arrangements of parvocellular, magnocellular, and koniocellular geniculate pathways in owl monkey (*Aotus trivirgatus*) visual cortex. *J Comp Neurol*, **456**, 12-28.
- Siddiqui, A. H. and Joseph, S. A. (2005) CA3 axonal sprouting in kainate-induced chronic epilepsy. *Brain Res*, **1066**, 129-146.

- Slack, S. E., Pezet, S., McMahon, S. B., Thompson, S. W. and Malcangio, M. (2004) Brain-derived neurotrophic factor induces NMDA receptor subunit one phosphorylation via ERK and PKC in the rat spinal cord. *Eur J Neurosci*, **20**, 1769-1778.
- Sperk, G. (1994) Kainic acid seizures in the rat. *Prog Neurobiol*, **42**, 1-32.
- Takahashi, H., Shin, Y., Cho, S. J. *et al.* (2007) Hypoxia enhances S-nitrosylation-mediated NMDA receptor inhibition via a thiol oxygen sensor motif. *Neuron*, **53**, 53-64.
- Teng, H. K., Teng, K. K., Lee, R. *et al.* (2005) ProBDNF induces neuronal apoptosis via activation of a receptor complex of p75NTR and sortilin. *J Neurosci*, **25**, 5455-5463.
- Tong, L., Balazs, R., Thornton, P. L. and Cotman, C. W. (2004) Beta-amyloid peptide at sublethal concentrations downregulates brain-derived neurotrophic factor functions in cultured cortical neurons. *J Neurosci*, **24**, 6799-6809.
- Tongiorgi, E., Armellin, M., Giulianini, P. G., Bregola, G., Zucchini, S., Paradiso, B., Steward, O., Cattaneo, A. and Simonato, M. (2004) Brain-derived neurotrophic factor mRNA and protein are targeted to discrete dendritic laminae by events that trigger epileptogenesis. *J Neurosci*, **24**, 6842-6852.
- Tucker, K. and Fadool, D. A. (2002) Neurotrophin modulation of voltage-gated potassium channels in rat through TrkB receptors is time and sensory experience dependent. *J Physiol*, **542**, 413-429.
- Turrigiano, G. (2007) Homeostatic signaling: the positive side of negative feedback. *Curr Opin Neurobiol*, **17**, 318-324.
- Tyler, W. J., Zhang, X. L., Hartman, K., Winterer, J., Muller, W., Stanton, P. K. and Pozzo-Miller, L. (2006) BDNF increases release probability and the size of a rapidly recycling vesicle pool within rat hippocampal excitatory synapses. *J Physiol*, **574**, 787-803.



- Ueda, Y., Yokoyama, H., Nakajima, A., Tokumaru, J., Doi, T. and Mitsuyama, Y. (2002) Glutamate excess and free radical formation during and following kainic acid-induced status epilepticus. *Exp Brain Res*, **147**, 219-226.
- Wang, K. C., Kim, J. A., Sivasankaran, R., Segal, R. and He, Z. (2002) p75 interacts with the Nogo receptor as a co-receptor for Nogo, MAG and OMgp. *Nature*, **420**, 74-78.
- Wehrman, T., He, X., Raab, B., Dukipatti, A., Blau, H. and Garcia, K. C. (2007) Structural and Mechanistic Insights into Nerve Growth Factor Interactions with the TrkA and p75 Receptors. *Neuron*, **53**, 25-38.
- Wierenga, C. J., Ibata, K. and Turrigiano, G. G. (2005) Postsynaptic expression of homeostatic plasticity at neocortical synapses. *J Neurosci*, **25**, 2895-2905.
- Wierenga, C. J., Walsh, M. F. and Turrigiano, G. G. (2006) Temporal regulation of the expression locus of homeostatic plasticity. *J Neurophysiol*, **96**, 2127-2133.
- Williams, H. and Noble, J. (2007) Homeostatic plasticity improves signal propagation in continuous-time recurrent neural networks. *Biosystems*, **87**, 252-259.
- Wong, M. (2005) Modulation of dendritic spines in epilepsy: cellular mechanisms and functional implications. *Epilepsy Behav*, **7**, 569-577.
- Wong, S. T., Henley, J. R., Kanning, K. C., Huang, K.-h., Bothwell, M. and Poo, M.-m. (2002) A p75NTR and Nogo receptor complex mediates repulsive signaling by myelin-associated glycoprotein. *Nat Neurosci*, **5**, 1302-1308.
- Woo, N. H., Teng, H. K., Siao, C. J., Chiaruttini, C., Pang, P. T., Milner, T. A., Hempstead, B. L. and Lu, B. (2005) Activation of p75NTR by proBDNF facilitates hippocampal long-term depression. *Nat Neurosci*, **8**, 1069-1077.
- Wu, K., Xu, J. L., Suen, P. C., Levine, E., Huang, Y. Y., Mount, H. T., Lin, S. Y. and Black, I. B. (1996) Functional trkB neurotrophin receptors are intrinsic components of the adult brain postsynaptic density. *Brain Res Mol Brain Res*, **43**, 286-290.

- Wyneken, U., Marengo, J. J., Villanueva, S., Soto, D., Sandoval, R., Gundelfinger, E. D. and Orrego, F. (2003) Epilepsy-induced changes in signaling systems of human and rat postsynaptic densities. *Epilepsia*, **44**, 243-246.
- Wyneken, U., Smalla, K. H., Marengo, J. J. et al. (2001) Kainate-induced seizures alter protein composition and N-methyl-D-aspartate receptor function of rat forebrain postsynaptic densities. *Neuroscience*, **102**, 65-74.
- Xu, F., Plummer, M. R., Len, G. W., Nakazawa, T., Yamamoto, T., Black, I. B. and Wu, K. (2006) Brain-derived neurotrophic factor rapidly increases NMDA receptor channel activity through Fyn-mediated phosphorylation. *Brain Res*, **1121**, 22-34.
- Yamada, K. and Nabeshima, T. (2003) Brain-derived neurotrophic factor/TrkB signaling in memory processes. *J Pharmacol Sci*, **91**, 267-270.
- Yamada, Y., Chochi, Y., Takamiya, K., Sobue, K. and Inui, M. (1999) Modulation of the channel activity of the epsilon2/zeta1-subtype N-methyl D-aspartate receptor by PSD-95. *J Biol Chem*, **274**, 6647-6652.
- Yang, T., Massa, S. M. and Longo, F. M. (2006) LAR protein tyrosine phosphatase receptor associates with TrkB and modulates neurotrophic signaling pathways. *J Neurobiol*, **66**, 1420-1436.
- Zagrebelsky, M., Holz, A., Dechant, G., Barde, Y. A., Bonhoeffer, T. and Korte, M. (2005) The p75 neurotrophin receptor negatively modulates dendrite complexity and spine density in hippocampal neurons. *J Neurosci*, **25**, 9989-9999.
- Zhang, X., Gelowitz, D. L., Lai, C. T., Boulton, A. A. and Yu, P. H. (1997) Gradation of kainic acid-induced rat limbic seizures and expression of hippocampal heat shock protein-70. *Eur J Neurosci*, **9**, 760-769.
- Ziff, E. B. (1997) Enlightening the postsynaptic density. *Neuron*, **19**, 1163-1174.