



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

**EL RECEPTOR MUSCARÍNICO M1 INHIBE A LOS CANALES
DE CALCIO CAV1, CAV2.1, CAV2.2 A TRAVÉS DE
BIFURCACIONES EN LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN
DESPRENDIDA DE LA PLC EN NEURONAS
NEOSTRIATALES DE PROYECCIÓN.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A:

ROSA AZUCENA PEREZ BURGOS

DIRECTOR DE TESIS: DR. JOSÉ BARGAS DÍAZ

CIUDAD UNIVERSITARIA

2009



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

El presente trabajo se realizó en el departamento de Biofísica del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. José Bargas Díaz.

A lo largo del Doctorado conté con beca del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) y de la Dirección General de Posgrado (DGEP).

Al final del Doctorado conté con beca del programa IMPULSA-UNAM.

El presente proyecto fue financiado por:
El programa IMPULSA-UNAM 03. El Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) con el donativo 49484 asignado al Dr. J. Bargas.

La Dirección General de Asuntos del Personal Académico (UNAM) con el donativo IN201607 asignado al Dr. J. Bargas y IN201507 asignado a la Dra. E. Galarraga.

DEDICATORIA

A mis padres:

Rosa Elena Burgos Alpuche y Miguel Ángel Pérez Novelo

A mi mejor amigo y compañero:

Javier Francisco Alamilla González

A mi hermana:

Mirza Angélica Pérez Burgos

A toda mi familia, en especial a mis tías, sobrinas y abuelos

AGRADECIMIENTOS

A nuestra máxima casa de estudios,
La Universidad Nacional Autónoma de México.

Al Dr. José Bargas Díaz por su invaluable orientación y dirección en la elaboración de esta tesis y en mi formación académica, así como por sus enseñanzas y amistad.

A la Dra. Elvira Galarraga Palacio, quien siempre me apoyó y me brindó valiosos comentarios y críticas que enriquecieron mi proyecto doctoral.

Al Dr. Raúl Aguilar Roblero y el Dr. Stefan Mihailescu, quienes formaron parte de mi comité tutorial, agradezco su disponibilidad y comentarios durante los tutorales.

A los miembros del jurado por el tiempo que dedicaron a la revisión de este trabajo: Dra. Martha Pérez Armendáriz, Dr. José Bargas Díaz, Dr. Jorge Aceves Ruíz, Dra. Magdalena Giordano Noyola y Dr. Juan Carlos Gómora Martínez.

A mis amigos Humberto Salgado Burgos, Tamara Pérez Roselló y Aleph Prieto Moreno por todo el trabajo que realizamos juntos y por copartir conmigo las alegrías y tristezas del registro.

A mis nuevos compañeros Omar Hernández, Teresa Flores Hernández y Jorge Castillo Quan por soportarme en mis últimos momentos del doctorado.

A Edén Flores Barrera por apoyarme con los registros intracelulares.

A mis demás compañeros del laboratorio BL103: Ernesto, Luis, Osvaldo, José de Jesús, Nicolás, Janet, Antonio, Víctor y Pável y a los del BL101: Fatuel, Dagoberto, Bianca, Giselle, Belén y Mario por su amistad durante el tiempo que permanecí en el doctorado.

A Miriam, Juanito, Salus y Conchita por su apoyo.

Índice

Abreviaciones	4
Resumen	5
Summary	7
1. INTRODUCCIÓN	9
1.1 Aspectos básicos de la acetilcolina	9
1.2 Descripción de los receptores muscarínicos	10
1.3 Receptores muscarínicos y proteínas G a las que se acoplan	10
1.4 Farmacología de los receptores muscarínicos	12
1.5 Los Ganglios Basales	14
1.6 Canales de Ca ²⁺	19
1.7 Tipos de modulación de los canales de Ca ²⁺ a través de receptores muscarínicos	23
1.7.1 Modulación delimitada a membrana	23
1.7.2 Modulación mediada por segundos mensajeros	26
1.7.3 Modulación mediada por la hidrólisis de fosfoinosítidos	31
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	34
3. OBJETIVO	36
3.1 Objetivos particulares	36
4. HIPÓTESIS	37
5. MÉTODOS	38
5.1 Obtención de las rebanadas	39
5.2 Obtención de las células dissociadas	39
5.3 Obtención de las corrientes de Ca ²⁺	40

5.4 Registros intracelulares	41
5.5 Fármacos y materiales	42
5.6 Análisis de datos	43
6. RESULTADOS	44
6.1 Los canales Ca_v1 , $Ca_v2.1$ y $Ca_v2.2$ son inhibidos por el receptor muscarínico de tipo M_1 de manera independiente de voltaje	44
6.2 La modulación que ejerce el receptor M_1 sobre los canales de Ca^{2+} Ca_v2 es reversible y llevada a cabo principalmente a través de la vía PLC/ IP_3 -DAG/ Ca^{2+} /PKC	48
6.3 La modulación de los canales de Ca^{2+} Ca_v2 mediada por el receptor M_1 no es debida a la activación de PP-2B	53
6.4 El receptor muscarínico M_1 modula el canal $Ca_v2.2$ pero no $Ca_v2.1$ a través de la vía PLC/ IP_3 -DAG/ Ca^{2+} /PKC	55
6.5 Los canales de Ca^{2+} Ca_v1 son también modulados por la vía PLC/ IP_3 -DAG/ Ca^{2+} /PKC cuando el receptor M_1 es activado	59
6.6 La inhibición de PKC impide la reducción del PPH mediada por la activación del receptor M_1	66
6.7 La regulación muscarínica de la despolarización sostenida se debe a la inhibición de los canales Ca_v1 a través de PKC	68
6.8 La activación del receptor muscarínico M_1 inhibe de manera reversible la corriente mediada por el canal de Ca^{2+} $Ca_v2.1$	70
6.9 La PLC es la proteína involucrada en la modulación muscarínica del canal $Ca_v2.1$	72
6.10 La reversión de la inhibición muscarínica del canal $Ca_v2.1$ requiere de la síntesis de fosfoinosítidos a través de PI-3K y PI-4K	74

6.11 PI(4,5)P ₂ y PI(3,4,5)P ₃ son los principales mediadores de la modulación muscarínica del canal de Ca ²⁺ Ca _v 2.1 en neuronas neostriatales de proyección	78
7. DISCUSIÓN	81
Bibliografía	90
Anexo I	101

Abreviaciones

AA:	Ácido araquidónico
AC:	Adenilato ciclasa
ACh:	Acetilcolina
CaM:	Calmodulina
CaMKII:	Proteína quinasa II regulada por Ca ²⁺ /calmodulina
DA:	Dopamina
DAG:	Diacilglicerol
DAGL:	Lipasa de diacilglicerol
DHP:	Dihidropiridinas
EP:	Enfermedad de Parkinson
GB:	Ganglios basales
GCS:	Ganglio Cervical Superior
HVA:	Activados a voltajes “elevados”
I_M:	Corriente M
IP₃:	Inositol trifosfato
LVA:	Activados a “bajos” voltajes
mACh-R:	Receptores muscarínicos
M₁:	Receptor muscarínico M ₁
M₂:	Receptor muscarínico M ₂
M₃:	Receptor muscarínico M ₃
M₄:	Receptor muscarínico M ₄
M₅:	Receptor muscarínico M ₅
MT-1:	Toxina muscarínica 1
MT-3:	Toxina muscarínica 3
MT-7:	Toxina muscarínica 7
NSt:	Neostriado
NEMs:	Neuronas espinosas medianas
PA:	Potencial de acción
PDZ:	Dominio PSD95, DlgA e zo-1
PICaN:	Péptido inhibidor de PP-2B
PI-3K:	Fosfatidilinositol 3 quinasa
PI-4K:	Fosfatidilinositol 4 quinasa
PI-5K:	Fosfatidilinositol 5 quinasa
PI(3)P:	Fosfatidilinositol (3) monofosfato
PI(4)P:	Fosfatidilinositol (4) monofosfato
PI(4,5)P₂:	Fosfatidilinositol (4,5) bifosfato
PI(3,4,5)P₃:	Fosfatidilinositol (3,4,5) trifosfato
PKA:	Proteína quinasa A
PKC:	Proteína quinasa C
PLA₂:	Fosfolipasa A ₂
PLCβ:	Fosfolipasa Cβ
PP-2B:	Proteína fosfatasa 2B
PPH:	Pospotencial hiperpolarizante
PTX:	<i>Toxina Pertussis</i>
RGS4:	Proteína reguladora de la señalización de la proteína G 4
Snc:	Sustancia negra compacta
SNr:	Sustancia negra reticulada

Resumen

Los receptores colinérgico-muscarínicos son de tipo metabotrópico, por lo que se encuentran acoplados a proteínas G iniciando cascadas intracelulares de señalización que modulan canales iónicos en las células excitables. El neostriado (NSt), es el núcleo cerebral que posee las más altas concentraciones del neurotransmisor acetilcolina (ACh), siendo los canales de Ca^{2+} neuronales activados por voltaje uno de sus blancos moleculares más importantes. En la enfermedad de Parkinson (EP) se produce una pérdida casi total de dopamina en el NSt, debido a la muerte de las células dopaminérgicas que dirigen sus axones a este núcleo. Este proceso conduce a un incremento en la liberación de ACh producida por las interneuronas gigantes colinérgicas presentes en el NSt. De este modo, uno de los tratamientos existentes para esta enfermedad es la administración de drogas anticolinérgicas. No queda claro por qué el resultado de dicho tratamiento es tan variable e ineficaz.

Debido a lo anterior, en esta tesis doctoral nos dimos a la tarea de dilucidar los mecanismos intracelulares de señalización por los cuales los receptores colinérgico-muscarínicos de tipo M_1 , expresados abundantemente en las neuronas de proyección del NSt, modulan los canales Ca_v1 , $Ca_v2.1$ y $Ca_v2.2$, los cuales conforman una pieza importante para el control de su excitabilidad y la liberación de neurotransmisor de sus terminales.

Encontramos que los canales Ca_v1 y $Ca_v2.2$ se inhiben cuando el receptor M_1 es activado. Esta modulación sucede a través de la vía $G_{q/11}/PLC\beta/PI(4,5)P_2/DAG-IP_3/Ca^{2+}/PKC$. La PKC fosforila estos canales y de esta forma regula las propiedades excitables de estas neuronas tales como la generación del pospotencial hiperpolarizante (PPH), la frecuencia y el patrón temporal de disparo y la liberación de GABA. Por su parte, la modulación del canal $Ca_v2.1$ por el mismo receptor es llevada a cabo también a través de las acciones de la PLC; sin embargo, en este caso se debe al proceso mismo de hidrólisis del $PI(4,5)P_2$. Así, la regulación de los canales de Ca^{2+} mediada por el receptor M_1 pertenece a dos ramas distintas de la misma cascada de señalización. Sin embargo, estos mecanismos difieren en temporalidad, lo cual permite una modulación más rápida del canal $Ca_v2.1$ abundantemente

expresado en el animal adulto en donde regula la neurotransmisión. Además, su inhibición por la activación M_1 es indispensable para producir un decremento significativo del PPH, lo que lleva al incremento en la frecuencia de disparo ante los estímulos.

Summary

The cholinergic-muscarinic receptors are metabotropic, that is, they are coupled to G proteins to initiate intracellular signaling cascades that modulate ionic channels in excitable cells. The neostriatum (NSt), is the cerebral nucleus with the highest concentration of the neurotransmitter acetylcholine (ACh). Voltage-activated Ca^{2+} channels expressed by neurons are one of its most important molecular targets. In Parkinson disease (PD) there is depletion of striatal dopamine because dopaminergic neurons innervating the NSt degenerate and die. Somehow this process leads to an increase in the release of ACh, a product of the giant cholinergic interneurons present in the NSt. In this way, one of the existent treatments for this disease is the administration of antimuscarinic drugs. It is not clear why this treatment is so variable and inefficient.

Owing to this antecedents, in the present doctoral dissertation we wanted to elucidate the intracellular signaling mechanisms by which muscarinic receptors of the M_1 class, abundantly expressed in neostriatal projection neurons, modulate Ca^{2+} channels of the types Ca_v1 , $\text{Ca}_v2.1$ y $\text{Ca}_v2.2$, which in these neurons conform an important piece for the control of their excitability and transmitter release from their terminals.

It was found that the channels Ca_v1 and $\text{Ca}_v2.2$ are inhibited when the muscarinic M_1 receptor is activated. This modulation happens via the pathway $G_{q/11}/\text{PLC}\beta/\text{PI}(4,5)\text{P}_2/\text{DAG-IP}_3/\text{Ca}^{2+}/\text{PKC}$. Where PKC phosphorylates the channels and, in this way, regulates the excitable properties of these neurons such as the generation of the afterhyperpolarizing potential (AHP), frequency and firing pattern, and GABA release. On the other hand, the modulation of the channel $\text{Ca}_v2.1$ carried out by the same receptor is also performed by PLC actions; however, in this case it is due to the hydrolysis of $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$. Thus, the regulation of different Ca^{2+} channels brought about by muscarinic M_1 receptors belongs to two different branches of the same signaling cascade. Nevertheless, these mechanisms differ in their time course, allowing a modulation of $\text{Ca}_v2.1$ channels, which are abundantly expressed in the adult animal, and are in charge of neurotransmission. Moreover, their inhibition due to M_1 -receptor activation is

necessary to decrease the AHP leading to an increase in the firing rate in response to stimuli.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Aspectos básicos de la acetilcolina

La ACh fue el primer neurotransmisor descrito como tal (Karczmar, 1996) y ha sido involucrada en casi todos los procesos cognitivos (Felder, 1995; Gu, 2003; Lucas-Meunier et al., 2003), así como en muchas funciones fisiológicas tales como el control de la frecuencia cardiaca, el control motor y sensorial, la respuesta muscular contráctil, el peristaltismo, la secreción exocrina y endocrina, la micción, el control de la luz que llega a la retina, la preparación de los órganos sexuales para la cópula, el control del diámetro bronquial, etc. (Felder, 1995; Bradley, 2000). Los receptores colinérgico-muscarínicos (mACh-R) median la mayor parte de las acciones postsinápticas de la ACh en neuronas del sistema nervioso central y una gran parte de sus acciones en la periferia. La pérdida de la función colinérgica se ha implicado en trastornos patológicos y cognitivos tales como la enfermedad de Parkinson (EP), la enfermedad de Alzheimer y el síndrome de Down (Felder, 1995; Lucas-Meunier et al, 2003). Además, se ha descrito que los receptores muscarínicos modulan (inhibiendo o activando) un gran número de canales iónicos regulados por voltaje, los cuales participan en la generación del potencial de acción de las células excitables y modifican así el patrón temporal y la frecuencia de disparo, así como la liberación de neurotransmisores, entre otros procesos celulares (Suh |y Hille, 2005). Por todo lo anterior, tratar de comprender los mecanismos intracelulares que regulan las acciones colinérgicas-muscarínicas es de gran importancia.

1.2 Descripción de los receptores muscarínicos

Los mACh-R están estructuralmente clasificados como miembros de la

superfamilia de receptores metabotrópicos de siete dominios transmembranales que, cuando son activados por un agonista, ejercen sus efectos promoviendo la separación de la unión de GDP y promoviendo la unión a GTP por las proteínas G triméricas, a las cuales se encuentran acoplados (Caulfield, 1993). Es aceptado que el efecto del ligando sobre el receptor termina cuando la actividad GTPasa de la proteína G hidroliza el GTP unido previamente a GDP (Caulfield, 1993).

Las secuencias de aminoácidos de los mACh-R dan lugar a los siete segmentos transmembranales constituidos por aminoácidos hidrofóbicos, tres lazos intracelulares y tres extracelulares hidrofílicos (Felder, 1995), así como un amino (N-) y un carboxilo (C-terminal) extra e intracelulares, respectivamente (Lucas-Meunier et al, 2003) (ver figura 1).

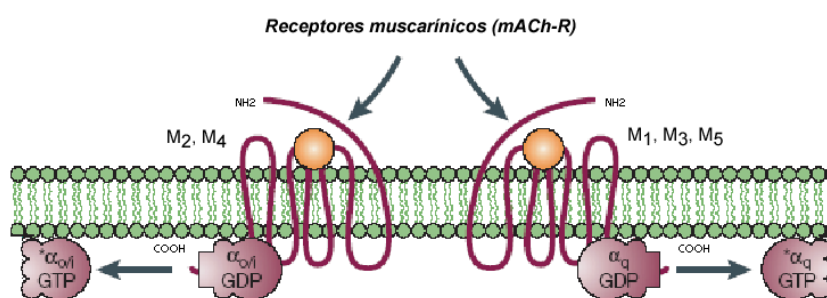


Figura 1. Estructura de los receptores muscarínicos.

Los receptores muscarínicos poseen 7 segmentos transmembranales y se encuentran acoplados a proteínas G_{q/11} ó G_{i/o}, según pertenezcan a la familia de receptores muscarínicos M₁ o M₂, respectivamente. Poseen un segmento NH₂-terminal extracelular y un COOH-terminal intracelular. (Tomada y modificada de Neubig y Siderovski 2002).

1.3 Receptores muscarínicos y proteínas G a las que se acoplan

Hasta el momento han sido clonados cinco tipos de mACh-R (M₁-M₅) (Hulme, 1990; Caulfield, 1993) que han sido agrupados en dos familias o clases denominadas M₁ (con los tipos M₁, M₃ y M₅) y M₂ (con los tipos M₂ y M₄), según la proteína G a la cual se acoplan. Cada uno de los mACh-R es expresado en cantidades diferentes por los diferentes tejidos (Adem y Karlsson, 1997). Los cinco

tipos poseen alrededor de 90% de afinidad en su secuencia de aminoácidos (Felder, 1995) por lo que ha sido difícil encontrar agonistas y antagonistas selectivos.

Los receptores de la familia M_1 se acoplan preferentemente a la estimulación de la fosfolipasa $C\beta$ (PLC β) a través de proteínas $G_{q/11}$ insensibles a la toxina *Pertussis* (PTX), mientras que la familia de los receptores M_2 se acopla preferentemente a la inhibición de la adenilato ciclasa (AC) a través de proteínas G de tipo $G_{i/o}$ sensibles a PTX; disminuyendo la producción de AMPc (Caulfield, 1993; Felder, 1995; Nathanson, 2000; Lucas-Meunier et al., 2003) (ver figura 1).

La activación de la PLC β resulta en la hidrólisis del fosfatidilinositol (4,5) bifosfato o PI(4,5)P $_2$, uno de los fosfolípidos que conforman la membrana plasmática. Esta reacción libera inositol trifosfato (IP $_3$) al citosol, así como diacilglicerol (DAG) que permanece en la membrana (Caulfield, 1993). El IP $_3$ genera la liberación de Ca $^{2+}$ de las pozas intracelulares debido a la activación de los receptores de IP $_3$ en la superficie membranal del retículo endoplásmico. El Ca $^{2+}$, puede activar múltiples proteínas con diversos blancos intracelulares. Por su parte, el DAG activa las isoformas convencionales (α , βI , βII y γ) y novedosas (ϵ , η , δ y θ) de PKC, que deben traslocarse a la membrana para ser activadas (Parker y Murray-Rust, 2004). También, existen reportes de acciones secundarias al incremento de Ca $^{2+}$ generado por la activación de receptores de la familia M_1 , tales como la liberación de ácido araquidónico (AA), y el incremento en los niveles de AMPc y GMPc (Caulfield, 1993). El último de los lazos intracelulares del receptor es el candidato más factible para el acoplamiento con la proteína G (Caulfield, 1993), para los receptores de la familia M_2 , mientras que el segundo lazo es el candidato para los de la familia M_1 (Lucas-Meunier et al., 2003).

1.4 Farmacología de los receptores muscarínicos

Los mACh-R fueron denominados así por su habilidad para unir el alcaloide muscarina obtenido del hongo *Amanita muscaria* (Felder, 1995; Lucas-Meunier et al., 2003). Existe un importante número de antagonistas de bajo peso molecular que se han descrito para diferentes mACh-R. Sin embargo, estos difieren muy poco en la selectividad que poseen para reconocer los diferentes receptores (e.g., si tomamos de ejemplo uno de los “agonistas M₁” más usados, la pirenzepina, descubrimos que existe una significativa superposición entre las afinidades para reconocer los receptores M₁ y M₄, de suerte que es sólo de cinco a seis veces más afín para el receptor M₁ que para el M₄) (Adem and Karlsson, 1997). Lo anterior, ha contribuido a que la descripción de las acciones de cada uno de los receptores en diferentes tejidos se haya visto retrasada e incluso contaminada por información incoherente (Caulfield, 1993; Bradley, 2000). Recientemente se aislaron antagonistas específicos para algunos de los mACh-R, extraídos del veneno de la víbora mamba verde del este (*Dendroaspis angusticeps*) (Adem y Karlsson, 1997; Jerusalinsky et al., 2000; Karlsson et al., 2000). Así, la toxina muscarínica 1 (MT-1) es altamente selectiva para M₁ y M₄ con casi la misma afinidad ($K_D= 22$ nM para M₁ y $K_D= 29$ nM para M₄) (Jerusalinsky et al, 2000). Sin embargo, MT-1 es agonista para el receptor M₁ y antagonista para el receptor M₄ (Harvey et al, 1998). La toxina muscarínica 3 (MT-3) es 214 veces más afín para el receptor M₄ ($K_D = 1.38$ nM) que para el M₁ (Jerusalinsky et al, 2000) y la toxina muscarínica 7 (MT-7) es 10,000 veces más afín para el receptor M₁ ($K_D = 0.1- 0.2$ nM) que para el M₄ (Bradley, 2000; Karlsson et al., 2000). Todas estas toxinas presentan muy baja, o virtualmente nula afinidad para los receptores M₂, M₃ y M₅ (Jerusalinsky et al., 2000). MT-1 y MT-7 se unen irreversiblemente al receptor M₁ (M₁ y M₄ en el caso de MT-1), mientras

que la unión de MT-3 al receptor M₄ es reversible (Bradley, 2000).

Es sabido que la unión de ligandos agonistas y antagonistas involucra ciertos residuos de aminoácidos en la hendidura formada por las secuencias transmembranales del receptor y es probable que la característica catiónica de la mayor parte de estas moléculas (que corresponden al nitrógeno cuaternario en la ACh) formen una unión iónica con el ácido aspártico en la tercera hélice transmembranal conservada en los cinco mACh-R. Sin embargo, diferentes antagonistas pueden unirse a distintas partes del receptor y existe evidencia de sitios de unión alostéricos. Así, los efectos de los antagonistas sobre estos receptores puede ser una mezcla de acciones alostéricas y competitivas (Caulfield, 1993).

Finalmente, la identificación de la selectividad de ligandos muscarínicos ha sido realizada principalmente utilizando poblaciones de receptores puros y homogéneos sobreexpresados en sistemas heterólogos de expresión. Lo anterior, presenta algunos inconvenientes, pues es difícil suponer que un particular tipo de receptor sobreexpresado en líneas celulares tendrá las mismas características que el receptor nativo expresado en tejidos intactos donde además existe el problema de la presencia de varios tipos de receptores simultáneamente formando dímeros y/o heterómeros. Otra dificultad reside en el hecho de que las secuencias de aminoácidos de los mACh-R poseen sitios susceptibles de ser blancos de modificaciones post-traducción. Así, las constantes de disociación de los antagonistas encontradas en estudios de desplazamiento de la unión de radioligandos son útiles, mas sólo deben permanecer como indicaciones provisionales hasta ser confirmadas en experimentos funcionales en tejidos y células que expresen el tipo(s) de receptor(es) de interés (Caulfield, 1993).

Desgraciadamente hay pocas publicaciones de este tipo de experimentos, más aún tratándose de neuronas centrales, donde sólo existe un puñado de trabajos vinculando las cadenas de señalización de receptores identificados con alguna función. No es de extrañar entonces que la terapéutica siga siendo, en su mayor parte, empírica.

1.5 Los Ganglios Basales

Se denominan “ganglios basales” (GB) a un conjunto de núcleos subcorticales altamente interconectados. En la sección dorsal de los GB están incluidos el neostriado (NSt, formado por los núcleos caudado y putamen), el globo pálido (globo pálido externo en los primates, GPe), el núcleo entopeduncular (globo pálido interno en los primates, GPi), el núcleo subtalámico (NST) y la sustancia negra (que comprende las secciones compacta y reticulada, SNc y SNr, respectivamente) (Bolam et al., 2000).

Se ha involucrado a los GB en la regulación de la función motora. Los movimientos voluntarios son iniciados en el circuito motor a nivel cortical, el cual tiene salidas hacia la médula espinal, núcleos del mesencéfalo y varios núcleos subcorticales como el tálamo, el NST y el NSt (Wichmann y DeLong, 2003).

El NSt es el sitio principal de entradas sinápticas a los GB (Wilson, 2004). Las neuronas de proyección de este núcleo son las neuronas espinosas medianas (NEMs) y son también las más abundantes (90-95% de la población neuronal total en roedores) (Nicola et al., 2000; Wichmann y DeLong, 2003). Estas neuronas son de tipo GABAérgico y se caracterizan por un diámetro somático de 10-20 μm (Wilson y Groves, 1980), sus dendritas poseen gran cantidad de espinas y su axón principal deja abundantes colaterales axónicas dentro del NSt previo a su salida

hacia otros núcleos de los GB (Kawaguchi et al., 1990) (ver figura 2).

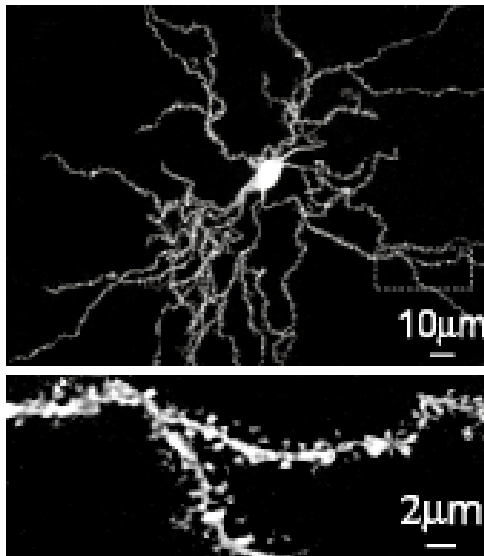


Figura 2. Neurona espinosa mediana (NEM). Neurona de proyección neostriatal identificada. En el panel inferior puede observarse una ampliación de la zona del recuadro marcado en el panel superior, donde la presencia de espinas es evidente. (Tomada y modificada de Flores-Barrera et al., 2009).

Las NEMs se encuentran divididas en dos poblaciones, según los péptidos y el tipo de receptor a dopamina (DA) que expresan. Esta división está también relacionada con los sitios hacia donde estas neuronas dirigen sus axones. Así, se ha denominado neuronas de la “vía directa” (ver figura 3) a las que expresan sustancia P y receptor de dopamina de tipo D_1 y que dirigen sus axones hacia el GPi y la SNr. Mientras que las neuronas de la “vía indirecta” dirigen sus axones hacia el GPe, expresan encefalinas y el receptor de dopamina de tipo D_2 (Gerfen et al., 1990). Se piensa que la activación cortical hacia neuronas del área motora del estriado (NSt) de la vía directa (ver figura 3) lleva a una disminución de la salida inhibitoria de los GB, desinhibiendo a las neuronas tálamo-corticales y facilitando el movimiento. Por lo contrario, la activación de las neuronas de la vía indirecta lleva a un incremento de la salida de los GB suprimiendo así el movimiento (ver figura 3). La mayor parte de las neuronas del GPi (núcleo de salida de los GB) incrementa su actividad cuando se presenta un movimiento, por lo que se ha especulado que el principal papel de los GB es inhibir selectivamente, y estabilizar la actividad de los circuitos

interneurona gigante colinérgica posee un soma que mide de 20 a 50 μm de diámetro y constituye la única fuente de ACh al NSt (Zhou et al., 2002). A pesar de que el estriado no recibe aferencias colinérgicas del núcleo pedúnculo pontino, septum o núcleos basales de Meynert (Bennet y Wilson, 2000), la concentración de ACh en este núcleo, junto con la del estriado ventral, es la más alta del cerebro (Zhou et al., 2002); esto se debe a que el axón de las interneuronas colinérgicas se ramifica profusamente formando una densa arborización (Bennet y Wilson, 2000) (ver figura 4).

La interneurona colinérgica hace contacto con las NEMs así como con las interneuronas que expresan parvalbúmina (Koos y Tepper, 2002). Esta interneurona, presenta un gran pospotencial hiperpolarizante (PPH) debido a conductancias de K^+ activadas por Ca^{2+} y voltaje (Wilson, 2004), también posee un conductancia activada por hiperpolarización (I_h) y una corriente de Na^+ persistente; la combinación de estas conductancias genera disparo espontáneo (5 Hz) en ausencia de entradas sinápticas, presentando, ocasionalmente, ráfagas rítmicas (Bennet y Wilson, 2000). Así, debido a la profusa ramificación de estas células y a su disparo rítmico en ausencia de entradas sinápticas, se genera en el NSt un tono basal de ACh, el cual, medido en rebanada es de 1.5 pM (Galarraga et al., 1999). La liberación de ACh es inhibida a su vez por el autoreceptor muscarínico $M_{2/4}$ presente en las terminales axónicas de estas neuronas, y cuyo papel es inhibir la entrada de Ca^{2+} a través de los canales N y P/Q (Yan y Surmeier, 1996; Ding et al., 2006). La ACh liberada produce efectos excitatorios complejos sobre las neuronas de proyección de este núcleo a través de la modulación de varias conductancias iónicas de K^+ , Ca^{2+} y Na^+ principalmente (Misgeld et al., 1986; Howe y Surmeier, 1995; Pineda et al., 1995; Galarraga et al., 1999; Figueroa et al., 2002; Rakhilin et

al., 2004; Perez-Rosello et al., 2005; Shen et al., 2005, 2007; Carrillo-Reid, en prensa) y que son descritas en otra sección. Estos efectos son de gran importancia, ya que al controlar a las neuronas de proyección de este núcleo se modulan los sitios hacia donde éstas dirigen sus axones, regulando así, la salida de los GB y por lo tanto, la función motora.

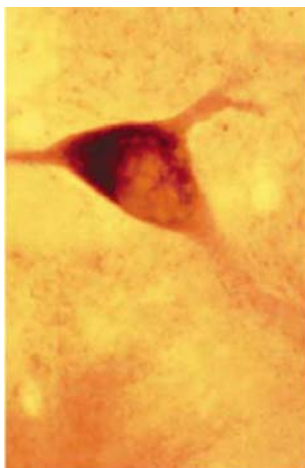


Figura 4. Interneurona gigante colinérgica del NSt.

Reconstrucción de una neurona colinérgica. (Tomada de Tepper y Bolam, 2004).

El NSt también presenta las más altas concentraciones basales de DA de todo el sistema nervioso central. La ausencia de DA colapsa funcionalmente a los GB, induciendo los síntomas de la enfermedad de Parkinson (Albin et al., 1995; Wichmann y DeLong, 2003). Así, se ha propuesto que del balance de los neurotransmisores DA y ACh depende el adecuado funcionamiento de los GB y que estos 2 neurotransmisores deben ejercer poderosos efectos sobre la excitabilidad de las NEMs (Zhou et al., 2002). De este modo, la enfermedad de Parkinson cursa con una disminución importante de los niveles de DA como hemos dicho, pero presenta a su vez un aumento en los niveles colinérgicos (Ince et al., 1997; Wilson, 2004; Ding et al., 2006; Pisani et al., 2007).

1.6 Canales de Ca^{2+}

Los canales de Ca^{2+} activados por voltaje se encuentran en todas las

células excitables. Participan en funciones fisiológicas importantes tales como la excitabilidad, la transcripción de genes y la liberación de neurotransmisores (Inoue y Yoshii, 1992, Catterall, 2000). Cambios en la probabilidad y tiempo de apertura de estos canales pueden resultar en modificaciones importantes de estas funciones, como por ejemplo: cambios en la entrada de Ca^{2+} en la terminal presináptica (dinámica del Ca^{2+}) resultan en cambios en la probabilidad de liberación de neurotransmisor, que a su vez determina la fuerza sináptica (Rosov et al., 2001). Se ha demostrado que los mACh-R tienen como blanco de modulación a los canales de Ca^{2+} (Caulfield, 1993). Por lo tanto, las modificaciones de los procesos fisiológicos pueden ser generadas mediante cambios en los niveles y/o la liberación de ACh.

Los canales de Ca^{2+} , son complejos heteromultiméricos que se encuentran conformados por subunidades $\alpha 1$, β , γ y $\alpha 2\delta$. La subunidad $\alpha 1$ (190-250 kDa) es la que conforma el poro del canal, posee el filtro de selectividad para el Ca^{2+} , el sensor de voltaje y la mayor parte de los sitios conocidos para la regulación por segundos mensajeros, drogas y toxinas (Catterall et al., 2005); está constituida por 4 dominios homólogos cada uno con 6 segmentos transmembranales (S1-S6) (Doering y Zamponi, 2003); el segmento S4 de cada dominio homólogo rota y se desliza bajo la influencia de los campos eléctricos iniciando un cambio conformacional que abre el poro, de modo que funciona como sensor de voltaje; el lazo que une los segmentos S5 y S6 se encuentra asociado a la membrana, conforma la entrada externa del poro y contiene residuos de glutamato en cada dominio que determinan la selectividad al Ca^{2+} (Catterall, 2000). Las otras subunidades regulan las propiedades biofísicas y el tráfico de la subunidad $\alpha 1$ (Arikath y Campbell, 2003). La subunidad β (55 kDa) se encuentra completamente inmersa en el citoplasma, pues no tiene segmentos transmembranales, la subunidad γ (33 kDa) contiene 4 segmentos

transmembranales, la subunidad conformada por el dímero $\alpha 2\delta$ (170 kDa) está constituida por la sección δ que está unida a la membrana a través de un segmento transmembranal, mientras que la sección $\alpha 2$ está localizada del lado extracelular; ambas se encuentran unidas por un puente disulfuro generado por modificaciones post-traduccion (Catterall, 2000) (ver figura 5).

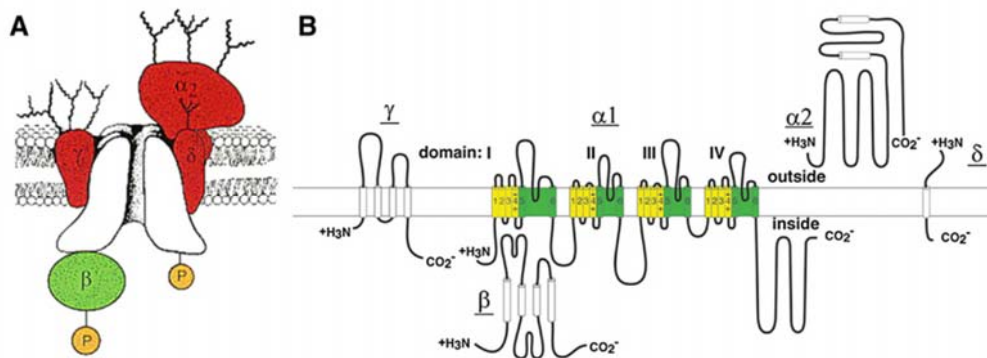


Figura 5. Estructura de los canales de Ca^{2+} activados por voltaje. (Tomado de Catterall y Few, 2008).

Los canales de Ca^{2+} han sido clasificados en los tipos T, L, N, P, Q y R por sus propiedades biofísicas y farmacológicas. Los que son activados a voltajes de alrededor de -50 mV (L, N, P, Q y R) se les conoce como HVA (activados a voltajes “elevados”) y los activados a voltajes de alrededor de -70 mV (T) se les conoce como LVA (activados a “bajos” voltajes). Los distintos canales de Ca^{2+} pueden distinguirse por el tipo de subunidad $\alpha 1$ que expresan. Actualmente, se utiliza una nomenclatura similar a la de otros canales activados por voltaje (Doering y Zamponi, 2003) (ver tabla 1).

Superfamilia	Familia	Subunidad $\alpha 1$	Nombre propuesto	Farmacología
HVA	L	$\alpha 1C$	Ca _v 1.2	Dihidropiridinas (DHP)
		$\alpha 1D$	Ca _v 1.3	
		$\alpha 1F$	Ca _v 1.4	
		$\alpha 1S$	Ca _v 1.1	
	N	$\alpha 1B$	Ca _v 2.2	ω -conotoxina GVIA
	P/Q	$\alpha 1A$	Ca _v 2.1	ω -agatoxina TK ω -agatoxina IVA
	R	$\alpha 1E$	Ca _v 2.3	SNX 482*
LVA	T	$\alpha 1G$	Ca _v 3.1	Kurtoxina*
		$\alpha 1H$	Ca _v 3.2	
		$\alpha 1I$	Ca _v 3.3	

Tabla 1. Estructura general, nomenclatura y farmacología de los canales de Ca²⁺. * No existen bloqueadores específicos reportados en la actualidad. (Modificada de Doering y Zamponi, 2003).

Actualmente existen bloqueadores específicos para las familias de canales L, N y P/Q (ver tabla 1). Las dihidropiridinas (DHPs) son fármacos que bloquean o activan los canales de Ca²⁺ de tipo L actuando alostéricamente para cambiar el canal del estado abierto al cerrado, más que ocluir el poro. La ω -conotoxina GVIA es una toxina obtenida de un caracol marino (*Conus geographus*) que bloquea específicamente el canal de Ca²⁺ de tipo N, mientras que las toxinas ω -agatoxina TK y ω -agatoxina IVA obtenidas del veneno de araña (*Agelenopsis aperta*) bloquean específicamente el canal de Ca²⁺ de tipo P/Q. También, los canales de tipo R son bloqueados por la toxina SNX 482 derivada del veneno de tarántula (*Hysteroocrates gigas*), pero esta toxina no es específica (Catterall, 2000). Finalmente, los canales

tipo T son bloqueados por la toxina kurtoxina obtenida del escorpión (*Parabuthus transvaalicus*) aunque esta toxina tampoco es específica (Doering y Zamponi, 2003).

1.7 Tipos de modulación de los canales de Ca^{2+} a través de receptores muscarínicos

1.7.1 Modulación delimitada a membrana

Los canales iónicos pueden ser modulados directamente por proteínas G ($G_{i/o}$) a través de la liberación de la subunidad $\beta\gamma$; este mecanismo, puede tanto inhibir como activar algunos tipos de canales iónicos (Clapham y Neer, 1997; Nathanson, 2000). Receptores, proteínas G y canales se encuentran unidos a la membrana plasmática. La interacción directa entre el canal y subunidades funcionales de la proteína G es el modo más rápido de regulación de canales y es denominada “modulación delimitada a membrana”, pues no intervienen agentes difusibles en el citosol, sino únicamente los presentes en la membrana (Hille, 2001)(ver figura 6).

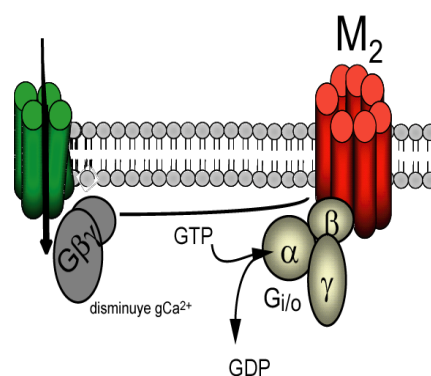


Figura 6. Modulación directa del canal a través de la subunidad $\beta\gamma$. Señalización delimitada a membrana mediada por el receptor muscarínico sobre un canal de Ca^{2+} . En esta modulación, se requieren únicamente 3 moléculas, el receptor, la proteína G y el canal.

La modulación de los canales de Ca^{2+} activados a voltajes elevados o “de alto umbral de activación” por medio de vías delimitadas a membrana se describió hace 30 años al estudiar la activación de receptores adrenérgicos, serotoninérgicos o de tipo GABA_B . Más tarde se encontró que esta modulación se daba básicamente

sobre los canales de tipo N (aunque también se ha descrito para los P/Q) y que podía ser inducida por receptores muscarínicos, somatostatinérgicos y dopaminérgicos. Las propiedades esenciales de esta inhibición son: i) su sensibilidad a PTX, lo cual involucra proteínas G_i y/o G_o , ii) que la reducción de la corriente al pico se presenta de un modo dependiente de voltaje, con una inhibición más evidente a potenciales más hiperpolarizados (Tedford y Zamponi, 2006; Brown y Sihra, 2008). Así, los mACh-R pueden mediar la inhibición de los canales de Ca^{2+} de tipo N y P/Q a través de la actividad de la subunidad $G\beta\gamma$ liberada por las proteínas G_i (Nathanson, 2000). Algunos reportes indican que los canales de Ca^{2+} de tipo R pueden también ser modulados por este mecanismo (Tedford y Zamponi, 2006).

El ganglio cervical superior (GCS) ha sido protagonista para la descripción de un gran número de acciones muscarínicas reportadas sobre los canales iónicos, al grado de que hay quienes tienden a generalizar basados en estos datos. Sin embargo, los resultados obtenidos de células ganglionares se han tanto corroborado como rechazado en otras neuronas. Fue en el ganglio donde se describió, por primera vez, la inhibición de un canal de Ca^{2+} , en este caso de tipo N, a través de la activación de un mACh-R acoplado a proteínas G sensibles a PTX (G_o) (Wanke et al., 1987). Desde un principio se especuló que un componente de la proteína G activada interactuaba directamente con el canal reduciendo su probabilidad de apertura (Hille, 1994). Más adelante, con la llegada de los animales “knockout” para mACh-R se pudo confirmar que los canales de Ca^{2+} de tipo N y P/Q pueden modularse de este modo gracias a la activación de los mACh-R de tipo M_2 (Shapiro et al., 1999). Esta interacción con la proteína G modifica al canal dejándolo en un estado “reacio” donde su apertura se ejecuta con mayor dificultad en presencia de

una despolarización, especialmente si esta ocurre entre -50 y 0 mV, pues a voltajes más despolarizantes el efecto es menor (Clapham y Neer, 1997). Este fenómeno se evidencia y revierte en menos de 1 segundo a temperatura ambiente (Hille, 1994).

En NEMs del NSt se ha descrito que los canales de Ca^{2+} de tipo N y P/Q pueden ser inhibidos a través de mACh-R sensibles a PTX (muy probablemente el receptor es el M_4) de manera rápida, delimitada a membrana y dependiente de voltaje (Howe y Surmeier, 1995). En el mismo núcleo, pero en interneuronas colinérgicas, se encontró también este tipo de inhibición sobre los canales N y P/Q a través de autoreceptores muscarínicos M_4 (Yan y Surmeier, 1996; Dolezal y Tucek, 1999; Ding et al., 2006). Vale la pena notar que esta modulación se ve dañada después de la depleción dopaminérgica debido a la sobre regulación de una proteína que modifica la señalización de proteínas G (RGS4) (Ding et al., 2006). Sin embargo, en estas células los canales de Ca^{2+} pueden sufrir otro tipo de modulación que involucra segundos mensajeros y que será descrita en otra sección.

Finalmente, la inhibición delimitada a membrana de las corrientes de Ca^{2+} y su reversión tiene efectos importantes sobre la liberación presináptica de neurotransmisores (Brown y Sihra, 2008). Así, debido a la dependencia de voltaje, las ráfagas de potenciales de acción de alta frecuencia pueden revertir la inhibición presináptica (Brody et al., 1997).

1.7.2 Modulación mediada por segundos mensajeros

Cuando la ACh actúa a través de mACh-R es capaz de modular una gran cantidad de canales iónicos activados por voltaje. El primer paso es la activación de proteínas G, que activando enzimas de membrana, inducen la generación de segundos mensajeros. Estos a su vez, pueden activar diversas proteínas quinasas y

fosfatasas que regulan a los canales (Caulfield, 1993). Las proteínas quinasas, activan o inactivan otras proteínas a través de la fosforilación; añadiendo grupos cargados negativamente a residuos de serinas y treoninas. Estos residuos están típicamente expuestos en la superficie y/o en la interfase en medio de las subunidades de los dominios reguladores de las proteínas. La fosforilación modifica de manera importante las propiedades de las proteínas blanco. Por su parte, las fosfatasas, son proteínas que defosforilan a las células revirtiendo la acción de las quinasas (Hille, 2001).

Evidencias bioquímicas han ligado las acciones del mACh-R M_1 a la activación de una cadena de señalización que termina en la activación de PKC. Las acciones de la PKC sobre las corrientes de Ca^{2+} son diversas: se han reportado tanto efectos inhibidores (Boland et al., 1991) como activadores (Hall et al., 1995). Sin embargo, en cuanto a modulaciones efectuadas a través de los mACh-R, la PKC no es la única quinasa involucrada, en algunos casos se activan otras proteínas quinasas y fosfatasas que regulan el nivel de fosforilación y la actividad de los canales (Keef et al., 2001). Así, la modulación diferencial de los canales de Ca^{2+} por segundos mensajeros intracelulares constituye un mecanismo de señalización clave para controlar la entrada de Ca^{2+} , la excitabilidad y demás funciones asociadas (Zamponi y Snutch, 1998) (ver en la figura 7 un ejemplo hipotético de este tipo de modulación).

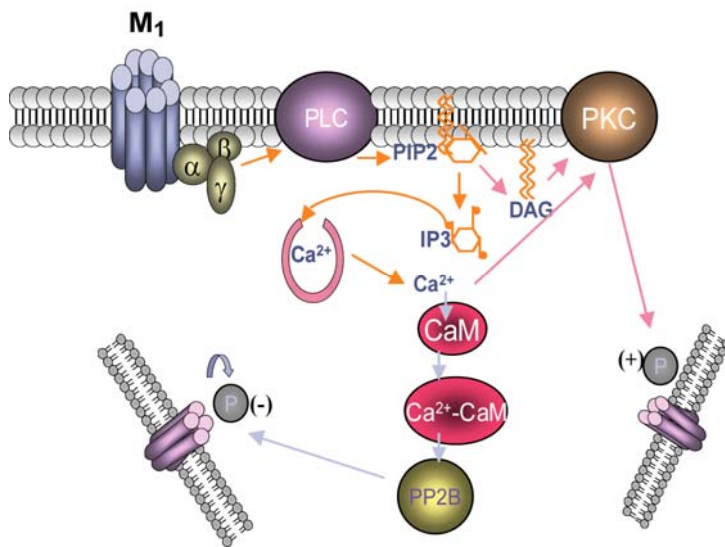


Figura 7. Ejemplo hipotético de la modulación de canales de Ca^{2+} por segundos mensajeros a través de la activación de un receptor muscarínico.

El blanco de la proteína G es una enzima membranal (PLC) que produce segundos mensajeros que a su vez activan proteínas capaces de fosforilar (PKC) o desfosforilar (PP2B) el canal. Esta tesis presenta evidencias a favor de este mecanismo.

Al igual que en la modulación delimitada a membrana, los efectos lentos de los mACh-R en el sistema nervioso sobre canales de Ca^{2+} activados por voltaje han sido descritos primero en neuronas simpáticas del GCS. En este núcleo, la actividad de los mACh-R suprime las corrientes de Ca^{2+} sin incrementos de la concentración de Ca^{2+} intracelular (Beech et al., 1991; Bernheim et al., 1992). La modulación muscarínica de las corrientes de Ca^{2+} se lleva a cabo a través de la activación de diferentes receptores muscarínicos: el M_1 a través de proteínas G_q (subunidad α), activa una vía difusible, lenta e insensible a PTX para modular las corrientes de Ca^{2+} de tipo L y N (Bernheim et al., 1992; Delmas et al., 1998). Mientras que el M_4 , modula la corriente de Ca^{2+} de tipo N a través de una vía rápida, sensible a PTX, activada por la subunidad $\beta\gamma$ de la proteína G y que es dependiente de voltaje (Bernheim et al., 1992; Shapiro et al., 1996; Delmas et al., 1998). Con ratones que han sido genéticamente diseñados para no expresar los mACh-R M_1 , M_2 y M_4 (ratones knockout) se confirmó que la modulación lenta de las corrientes de Ca^{2+} de tipo L y N, así como la modulación de la corriente de K^+ conocida como M es mediada por receptores M_1 ; mientras que la modulación rápida, sensible a PTX y

dependiente de voltaje del canal de Ca^{2+} de tipo N es mediada por receptores M_2 en ratón y M_4 en rata (Shapiro et al., 2001). Es de sorprender que en la rata neonata esta modulación está mediada también por el receptor M_2 (Liu y Rittenhouse, 2003a). Estas diferentes modulaciones se distinguen por el curso temporal: sus constantes de tiempo difieren: la rápida y dependiente de voltaje tiene una $\tau \approx 1$ s, mientras que en la τ lenta, independiente de voltaje, está entre 10 a 100 s (Zhou et al., 1997). No obstante lo anterior, no en todos los tipos neuronales se encuentran superpuestas las modulaciones rápidas (dependientes de voltaje) y las lentas (independientes de voltaje).

En otros tipos neuronales se han encontrado evidencias que reiteran, extienden o se contraponen a lo encontrado en el GCS, lo que demuestra que cada neurona posee su mezcla particular de canales, receptores y vías de señalización. No se puede evitar estudiar a cada una por separado, es erróneo generalizar a partir de un tipo neuronal.

En las neuronas de proyección del NST se ha demostrado que el agonista muscarina deprime las corrientes de Ca^{2+} de tipo L, N y P/Q (Howe y Surmeier, 1995; Perez-Rosello et al, 2005), y en contraste con las neuronas del GCS, este efecto se debe en su mayor parte a la activación de los receptores M_1 (Perez-Rosello et al., 2005; Perez-Burgos et al., 2008). Mediante experimentos indirectos, Rakhilin y cols. (2004), propusieron que la modulación del canal de Ca^{2+} de tipo L a través de la activación del receptor M_1 podría deberse a la activación de PP-2B, en analogía a la modulación del mismo canal por la acción dopaminérgica a través del receptor D_2 . Pero se necesitan experimentos directos para realmente probar esto. Como se verá, los experimentos de esta Tesis no corroboran la hipótesis antes expuesta. Recientemente, se encontró que la activación del receptor muscarínico

M₁, reduce la entrada de Ca²⁺ a través de los canales de tipo L exclusivamente a través de la subunidad Ca_v1.3a que posee un dominio PSD95, DlgA e zo-1 (PDZ) capaz de unirse a una proteína de andamiaje conocida como Shank, la cual a su vez es capaz de unir otras proteínas de andamiaje tales como HOMER que le brindan un acercamiento entre los receptores de IP₃ (situados en la membrana del retículo endoplásmico que libera Ca²⁺ al espacio intracelular) y los canales de Ca²⁺, permitiendo así, que estos se activen rápidamente mediante proteínas reguladas por este ión, tales como la calmodulina (CaM). Las proteínas de andamiaje permiten el ensamble de las todas las proteínas involucradas en la señalización del receptor muscarínico con sus blancos moleculares, entre ellos, el canal de Ca²⁺ Ca_v1.3a (Olson et al., 2005). Finalmente, en las NEM, la activación de mACh-R produce efectos excitatorios pues reduce el pospotencial hiperpolarizante (PPH) debido a que, como ya se mencionó, la inhibición de los canales de Ca²⁺ de tipo N y P/Q son los que en estas células activan a los canales de K⁺ activados por Ca²⁺ (K_{Ca2+}) encargados de generar el pospotencial hiperpolarizante (PPH); así, el efecto de los mACh-R sobre estas corrientes de K⁺ es más bien indirecto (Vilchis et al., 2000; Perez-Garci et al., 2003; Perez-Rosello et al., 2005; Perez-Burgos et al., 2008).

Por otra parte, casi no se ha investigado la modulación de los mACh-R sobre los canales de Ca²⁺ de tipo R. En neuronas piramidales del hipocampo (CA1) se ha encontrado que la activación de receptores M₁/M₃ incrementa una conductancia, que se presume pertenece al canal de Ca²⁺ de tipo R, mediante las acciones de una PKC independiente de Ca²⁺. Al parecer, este efecto puede explicar en parte las oscilaciones a frecuencias en la banda θ inducidas por muscarina en el hipocampo (Tai et al., 2006).

Menos aún ha sido descrita la modulación de los canales T activados por voltajes. Apenas un estudio en células HEK, mostró que la activación del mACh-R de tipo M_1 modula la subunidad $Ca_v3.3$, pero no las $Ca_v3.1$ y $Ca_v3.2$ mediante la activación de $G_{\alpha_q/11}$. Según este estudio ninguna quinasa o fosfatasa, ni las subunidades $\beta\gamma$ de la proteína G intervienen en esta modulación (Hildebrand et al., 2007).

En resumen, a pesar de que desde el punto de vista bioquímico la relación entre los receptores mACh-R y las cadenas de señalización que emergen de la activación de PLC y culminan en la activación de PKC, entre otras, se consideran ya las vías “canónicas” de estos receptores, los estudios que demuestren la relación entre estas cadenas de señalización con la actividad de los canales iónicos y la excitabilidad neuronal son relativamente escasos. Si a esto agregamos que cada neurona posee sus particularidades, y que por razones de costumbre, los investigadores utilizan casi siempre a las mismas preparaciones (GCS, CA1), debemos confesar nuestra ignorancia sobre las acciones moleculares y funcionales de los transmisores moduladores, como la ACh, en la mayor parte del cerebro.

1.7.3 Modulación mediada por la hidrólisis de fosfoinosítidos

Más recientemente se ha descrito un mecanismo de modulación de canales iónicos a través de su separación de los fosfolípidos de membrana a los que están sujetos mediante uniones electrostáticas (Suh y Hille, 2005; Huang, 2007; Suh y Hille, 2008). Al parecer, varios canales iónicos necesitan de la interacción continua con estos fosfolípidos para su adecuado funcionamiento, así que cuando esta interacción se termina, debido por ejemplo a la depleción de estos lípidos en la membrana, los canales cambian su conformación transitando hacia estados con

menor probabilidad de apertura (Suh y Hille, 2008). Una manera de depletar los fosfolípidos de membrana es mediante su hidrólisis, a través de la acción de las fosfolipasas de membrana. Por lo tanto, a la activación de lipasas le sigue la depleción de los niveles de fosfolípidos en la membrana, especialmente del $PI(4,5)P_2$ (Suh y Hille, 2005).

Los fosfolípidos comprenden la clase más abundante de lípidos de membrana. Entre ellos están los fosfoinosítidos, que comprenden el 4-5 % del total y que regulan una gran variedad de funciones y la transducción de señales. Las fosfolipasas que hidrolizan estos fosfolípidos, y entre ellas, la $PLC\beta$ es la más conocida; es activada por la proteína G_q y su principal blanco una vez activa es el $PI(4,5)P_2$. La $PLC\beta$, corta la cabeza de fosfato polar (IP_3) de los fosfolípidos, la cual es liberada al citoplasma dejando una molécula de DAG en la membrana. Ambos, IP_3 y DAG tienen actividad de segundo mensajero (Eyster, 2007). Las células poseen gran variedad de quinasas lipídicas que se encargan de regular los niveles de fosfoinosítidos. Entre las más importantes está la fosfatidilinositol 5-quinasa ($PI-5K$) que es responsable de la fosforilación de su substrato, el fosfatidilinositol (4) fosfato o $PI(4)P$ para generar el producto $PI(4,5)P_2$. Otra es la fosfatidilinositol 3-quinasa, o $PI-3K$, que tiene por substrato al fosfatidilinositol y cuyo producto es el fosfatidilinositol 3 monofosfato o $PI(3)P$. Finalmente está la fosfatidilinositol 4-quinasa, o $PI-4K$, que fosforila el sitio 4 del anillo de inositol generando $PI(4)P$, $PI(4,5)P_2$ o fosfatidilinositol (3,4,5) trifosfato ($PI(3,4,5)P_3$), según sea el fosfoinosítido precursor (Eyster, 2007) (ver figura 8).

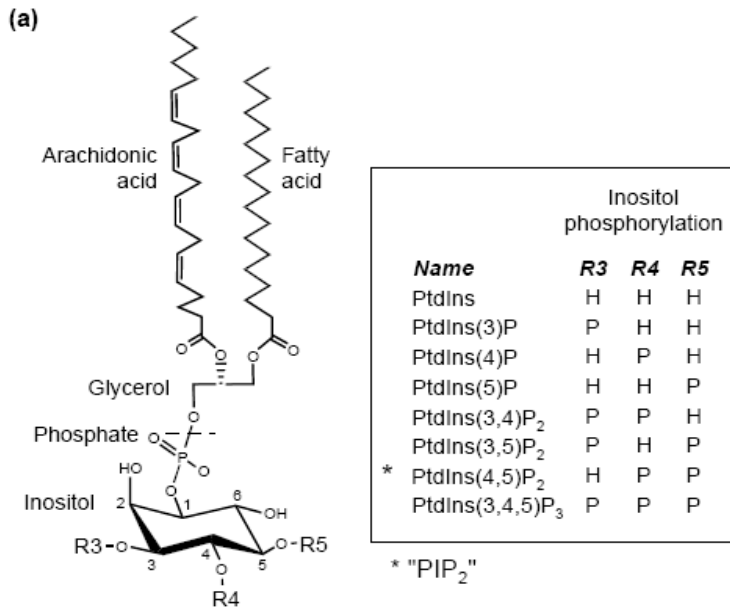
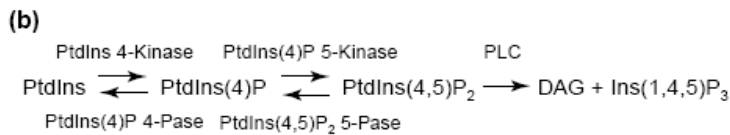


Figura 8. Estructura y metabolismo de los fosfoinosítidos.

a) el anillo de inositol puede ser fosforilado por proteínas quinasas en los sitios hidroxilo 3, 4 y 5 para generar derivados mono, bi y trifosfato. b) vías para la síntesis y metabolismo del PI(4,5)P₂ en células de mamífero. (Tomada de Suh y Hille, 2005).



Este mecanismo de modulación se describió por primera vez para un canal de K⁺ modulado por mACh-R, con gran influencia sobre la excitabilidad: I_M. De nuevo, los estudios se realizaron en GCS, los agonistas deprimen esta corriente de K⁺. El subíndice M se le confirió debido precisamente a las acciones muscarínicas (Caulfield, 1993). Los canales que llevan esta corriente (M o KCNQ) fueron los primeros en los que se encontró la dependencia a los fosfoinosítidos de membrana, pero el mecanismo ya se ha extendido a otros canales de K⁺, Ca²⁺, e inclusive canales no regulados por voltaje tal como el canal de Na⁺ epitelial (ENaC) (Huang, 2007). Así, en la modulación del receptor M₁ sobre los canales KCNQ que subyacen a la I_M se requiere la hidrólisis de PI(4,5)P₂, mientras que la recuperación de la inhibición requiere de re-síntesis de PI(4,5)P₂ mediada por quinasas lipídicas (Suh y Hille, 2002; Zhang et al., 2003; Winks et al., 2005; Brown et al., 2007; Huang et al., 2007; Suh y Hille, 2008).

Ha quedado claro que también algunos de los canales de Ca^{2+} regulados por voltaje usan este mecanismo (ver figura 9) (Wu et al., 2002; Gamper et al., 2004; Huang, 2007; Brown y Sihra, 2008).

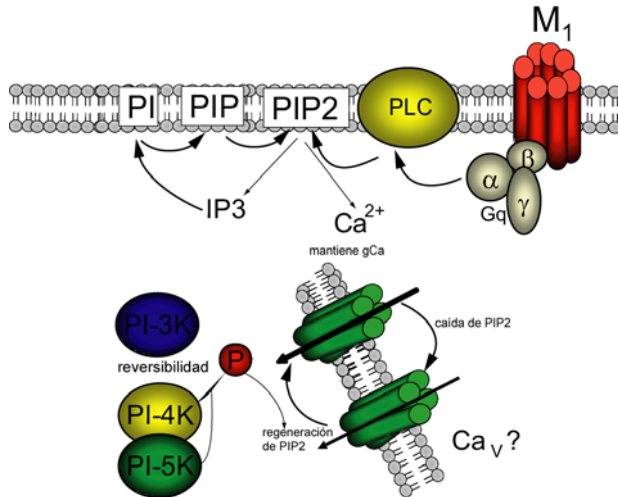


Figura 9. Modelo hipotético que ilustra la modulación de canales de Ca^{2+} a través de la hidrólisis de fosfoinosítidos de membrana.

La conductancia del canal depende del nivel de interacción del mismo con los fosfoinosítidos de la membrana. La conductancia del canal cae si estos se desdoblán al activarse la PLC debido a la activación del receptor muscarínico M_1 .

La recuperación de la conductancia del canal depende de la regeneración de los fosfoinosítidos.

En cuanto a la modulación "lenta" del canal de Ca^{2+} de tipo N a través de la activación del receptor M_1 en el GCS (ver arriba), se ha propuesto que es modulado por la hidrólisis de $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ (Gamper et al., 2004), ó a través de la generación de ácido araquidónico (AA) generado por la actividad de la fosfolipasa A2 (PLA_2) (Liu y Rittenhouse, 2003; Liu et al., 2004). Esta discrepancia se ha explicado por diferencias metodológicas. Más aún, se ha propuesto que estas dos vías pueden actuar en concierto para modular el canal de Ca^{2+} de tipo N, que en estas células, genera casi el 85% de la corriente de Ca^{2+} (Delmas y Brown, 2005). Acerca de la modulación del canal de Ca^{2+} de tipo L a través de esta misma vía, se ha propuesto que tanto la inhibición como la recuperación de la modulación mediada por el mACh-R M_1 se debe a la generación y eliminación del AA respectivamente (Liu et al., 2006). Recientemente, se ha propuesto que para la modulación de ambos canales de Ca^{2+} (L y N) mediada por el receptor M_1 se requiere además de la actividad enzimática de la lipasa de diacilglicerol (DAGL) (Liu et al., 2008). Finalmente, un dato interesante acerca de la modulación por este mecanismo es que la constante

de tiempo para la inhibición inducida por el receptor M_1 y la depleción de $PI(4,5)P_2$, es de 14 s (Beech et al., 1992; Brown y Sihra, 2008); 10 veces mayor que el tiempo requerido para la modulación delimitada a membrana (Brown y Sihra, 2008). Finalmente, hay evidencia de la modulación de canales iónicos por $PI(3,4,5)P_3$, pero este tema es aún incipiente (Le Blanc et al., 2004).

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En los antecedentes se resumieron las evidencias que apoyan el que los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje sean un blanco de la modulación mediada por la activación de los mACh-R. De esta modulación pueden derivarse importantes repercusiones sobre la excitabilidad de la neurona, la liberación de neurotransmisores y otros importantes procesos fisiológicos.

Trabajos previos de nuestro laboratorio demostraron que en las neuronas de proyección del NSt la activación del mACh-R de tipo M_1 genera una reducción de las corrientes de Ca^{2+} mediadas por los canales $\text{Ca}_v1(\text{L})$, $\text{Ca}_v2.1(\text{P/Q})$ y $\text{Ca}_v2.2(\text{N})$. Esta modulación, es responsable del importante incremento en la frecuencia de disparo de estas neuronas (Galarraga et al., 1999; Perez-Rosello et al., 2005), pues gran parte del aumento en la excitabilidad se debe a una reducción en las corrientes de K^+ activadas por Ca^{2+} ($I_{\text{KCa}^{2+}}$) que generan el pospotencial hiperpolarizante (PPH) (Pineda et al., 1995). La activación de las corrientes de K^+ que subyacen el PPH es generada por la entrada conjunta de Ca^{2+} a través de los canales $\text{Ca}_v2.1$ y $\text{Ca}_v2.2$ (Vilchis et al., 2000; Perez-Garci et al., 2003).

Evidentemente, la reducción en la entrada de Ca^{2+} a través de estos canales redundará también en una disminución de la liberación de GABA de las terminales de estas neuronas (Perez-Rosello et al, 2005). Este proyecto continúa estos estudios indagando sobre las vías de señalización que subyacen a la modulación de los canales de Ca^{2+} (Ca_v1 , $\text{Ca}_v2.1$, $\text{Ca}_v2.2$, $\text{Ca}_v2.3$).

Por todo lo anterior, nuestro trabajo de investigación lo iniciamos con las siguientes preguntas:

- ❖ La activación del receptor M_1 ¿Reduce otra(s) corrientes de Ca^{2+} además de las ya descritas: Ca_v1 (L), $Ca_v2.1$ (P/Q), $Ca_v2.2$ (N)?, es decir, ¿Modula también a los canales $Ca_v2.3$ (R)?
- ❖ ¿Hay modulación por parte del receptor M_1 que sea delimitada a membrana y dependiente de voltaje? O bien,
- ❖ ¿Intervienen segundos mensajeros y/o proteínas quinasas y fosfatasas?. Y si esto es así, ¿Cuales son estos agentes intracelulares? es decir, ¿Cuál es la cascada de señalización?, ¿Se utiliza la vía “canónica”?, ¿Es la fosforilación el posible mecanismo de modulación como sucede en otros tipos celulares?, o bien, ¿Es la desfosforilación?
- ❖ ¿Intervendrá en alguno de estos casos la modulación mediada por la hidrólisis de fosfoinosítidos?

3. OBJETIVO

Examinar los mecanismos de señalización intracelular que median la modulación de los canales de Ca^{2+} activados por voltaje debida a la activación del receptor muscarínico M_1 en las neuronas neostriatales de proyección.

3.1 Objetivos particulares

- ❖ Determinar si la activación del receptor muscarínico M_1 modula el canal $\text{Ca}_v2.3$ (R), además de los ya descritos (Ca_v1 , $\text{Ca}_v2.1$, $\text{Ca}_v2.2$).
- ❖ Definir si la modulación muscarínica (M_1) de estos canales es delimitada a membrana y dependiente de voltaje.
- ❖ Establecer si la modulación muscarínica (M_1) de estos canales es mediada por una cascada de señalización y en caso de serlo averiguar cuáles son los segundo mensajeros, las enzimas de membrana, así como las enzimas quinasas o fosfatasas involucradas.
- ❖ Investigar si los agentes que participan en la modulación de estos canales son los mismos en cada clase de canal de Ca^{2+} o si existen diferentes agentes mediadores para regular, particularmente, cada clase de canal de Ca^{2+} .

4. HIPÓTESIS

Hipótesis 1

La activación del receptor muscarínico M_1 no modula el canal $\text{Ca}_v2.3$

Hipótesis 2

La modulación muscarínica de los canales Ca_v1 , $\text{Ca}_v2.1$ y $\text{Ca}_v2.2$ no es delimitada a membrana ni dependiente de voltaje.

Fundamentación de la hipótesis: hemos podido notar que para la modulación de estos canales se requiere de varios segundos, mientras que como vimos en los antecedentes, este tipo de modulación se lleva a cabo en 1 segundo aproximadamente.

Hipótesis 3

Cuando menos uno de estos canales (Ca_v1 , $Ca_v2.1$, $Ca_v2.2$) deberá ser modulado a través de la activación de la proteína quinasa C (PKC) (vía canónica).

Fundamentación de la hipótesis: nos aventuramos a esta hipótesis debido a que en algunos tipos y líneas celulares se ha visto la participación de la proteína quinasa C (PKC) en la modulación de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje.

Hipótesis 4

La modulación de estos canales mediada por el receptor muscarínico M_1 no se deberá, para todos los tipos de canal, a la participación de los mismos agentes intracelulares (segundo mensajero y/o proteína quinasa o fosfatasa).

Fundamentación de la hipótesis: apostamos a esta hipótesis debido a que estos canales presentan localización diferencial, así como diferentes funciones celulares.

Hipótesis 5

Al menos uno de estos canales será modulado por la hidrólisis de fosfoinosítidos de membrana.

Fundamentación de la hipótesis: juzgamos que esta hipótesis era probable debido a que el receptor muscarínico M_1 se encuentra acoplado a una proteína G ($G_{q/11}$) que se caracteriza por la activación de la proteína fosfolipasa $C\beta$ encargada de hidrolizar fosfolípidos de membrana; y como hemos precisado, se han descrito

ya algunos casos de modulación de canales iónicos dependientes de voltaje a través de este mecanismo.

5. MÉTODOS

Los protocolos utilizados se realizaron conforme a las guías para el cuidado y uso de los animales de laboratorio de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) que incluye minimizar el número de animales utilizados hasta alcanzar significancia estadística y evitar el sufrimiento.

5.1 Obtención de las rebanadas de cerebro

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar (100-120 g) del bioterio del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM. Estas, fueron anestesiadas profundamente y su cerebro rápidamente extraído y colocado en una solución (4°C) cuya composición es (en mM): 126 NaCl, 3 KCl, 26 NaHCO₃, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, 11 glucosa, 0.2 tiourea, 0.2 ácido ascórbico (pH 7.4 ajustado con HCl, 300±5 mOsm/l, saturada con 95% O₂ y 5% CO₂). Con ayuda de un vibratomo (Ted Pella, Reading, CA), se obtuvieron rebanadas sagitales de 300 µm de espesor que fueron mantenidas de 1-6 hrs. en la misma solución salina a temperatura ambiente (Bargas et al., 1994; Vilchis et al., 2000).

5.2 Obtención de las células disociadas

A partir de las rebanadas, se disecó el estriado dorsal, que fue incubado en solución salina (con 10 mM de HEPES) y enzimas proteolíticas (1 mg/mL de Pronasa E tipo XIV durante 15-20 minutos a 37°C). Después del periodo de digestión, el tejido fue transferido a una solución baja en Ca²⁺ (0.4 mM) para disociar a las neuronas mecánicamente con pipetas Pasteur pulidas con calor a grosores descendentes. El sobrenadante obtenido fue colocado (1 mL) en cajas de cultivo montadas en la platina de un microscopio invertido. Las células se adhieren

espontáneamente al piso del plato de cultivo (10-15 minutos). Luego son perfundidas con 1 mL de la solución de registro que contiene (en mM): 0.001 tetrodotoxina (TTX), 140 NaCl, 3 KCl, 5 BaCl₂, 2 MgCl₂, 10 HEPES y 10 glucosa (pH 7.4 ajustado con NaOH, 300±5 mOsm/L). Esta misma solución fue usada para perfundir a las células durante el registro con un sistema de microperfusión regulado por miniválvulas automáticas (Vilchis et al., 2000).

5.3 Obtención de las corrientes de Ca²⁺

Las corrientes de Ca²⁺ fueron obtenidas por medio de registros de fijación de voltaje en célula entera en neuronas estriatales de tamaño medio (10-12 μm de diámetro con 5-10 pF de capacitancia, ver Yan y Surmeier, 1996) tratando de que no tuvieran más que unos cuantos troncos dendríticos cortos. Para ello, fueron empleadas pipetas de vidrio de borosilicato (WPI; Sarasota, FL) estiradas y pulidas con ayuda de un estirador de pipetas (Sutter Instruments, Novato, CA) y una miniforja respectivamente (Nikon, Melville, NY, USA). La composición de la solución interna fue (en mM): 180 *N*-methyl-D-glucamina (NMDG), 40 HEPES, 10 EGTA, 4 MgCl₂, 2 ATP, 0.4 GTP y 0.1 leupeptina (pH 7.2 ajustado con H₂SO₄, 280±5 mOsM/L). Los registros de célula entera fueron realizados con técnicas estándar: la resistencia de los electrodos fue de 3-6 MΩ en el baño y el potencial de unión fue corregido (5 mV aprox.). Los registros fueron obtenidos con ayuda de un amplificador (Axopatch 200B; Axon Instruments, Foster City, CA, USA), y controlados y monitoreados con el programa pClamp versión 8.2 (Axon Instruments). Después de la ruptura del sello, la resistencia en serie (≤10 MΩ) fue compensada en un 70-80% y monitoreada periódicamente. Los registros fueron almacenados en una

computadora a través de una tarjeta de adquisición de datos para su posterior análisis (Axon Ins) (Perez-Rosello et al., 2005; Salgado et al., 2005).

La relación corriente-voltaje (curva I-V) obtenida de los registros de corriente pasando por los canales de Ca^{2+} (utilizando Ba^{2+} como acarreador de carga) se tomó antes y después de la aplicación de los distintos fármacos. Estas curvas fueron construidas con comandos de voltaje en forma de pasos (20 ms) de -80 a 50 mV en pasos de 10 mV y con comandos de voltaje en forma de rampa (200 ms; 0.7 mV/ms de -80 a 50 mV). Las curvas I-V obtenidas con ambos métodos coinciden y se superponen señalando que el control temporal y espacial de voltaje es adecuado (Perez-Rosello et al., 2005; Salgado et al., 2005). Sin embargo, por razones de claridad en las figuras, y para su mayor entendimiento, la mayor parte de las mismas muestran los trazos representativos obtenidos con comandos en forma de rampa.

5.4 Registros intracelulares

Para llevar a cabo estos experimentos, las rebanadas cerebrales fueron colocadas en una cámara de registro y bañadas en solución salina (ver arriba) a ~1 mL/min (34-36°C). Los registros intracelulares fueron llenos a cabo con microelectrodos llenados con 3 M de acetato de K^+ (80-120 M Ω de resistencia D.C.) y la ayuda de un amplificador (Neuro Data, Cygnus Tech. Inc., DWG, PA, USA). Los registros fueron digitalizados y almacenados en videos VHS (40 kHz) y analizados posteriormente. Las neuronas aceptadas para los experimentos tuvieron una resistencia de entrada de más de 40 M Ω y potencial de reposo de -80 mV. La estimulación consistió en inyecciones intracelulares de breves pasos de corriente para provocar un pospotencial hiperpolarizante (PPH) posterior a

potenciales de acción (PAs) únicos en respuesta a estímulos supraumbrales (Pineda et al., 1992; Perez-Rosello et al., 2005), o a respuestas despolarizantes lentas sin la presencia de PA posteriores al estímulo supraumbral (Hernandez-Lopez et al., 1997). Estos estímulos breves aplicados en los experimentos de fijación de corriente fueron diseñados para evitar tanto como fuera posible la activación de la corriente M de K^+ acarreada por los canales KCNQ cuya activación toma cientos de milisegundos (McCormic y Prince, 1986). Las neuronas de proyección fueron identificadas por sus propiedades electrofisiológicas (Bargas et al., 1989; Galarraga et al., 1989). Además se llenaron con biocitina para ser posteriormente identificadas con técnicas histoquímicas (Galarraga et al., 1999).

5.5 Fármacos y materiales

Los fármacos fueron aplicados mediante un sistema de microperfusión a base de gravedad y miniválvulas automatizadas controladas por corriente directa. La mayor parte de los fármacos añadidas a la perfusión fueron tomadas de soluciones más concentradas (madre) y disueltas en agua. Algunos fármacos fueron disueltos en DMSO (1%); en cuyo caso la solución control también incluyó DMSO a la concentración final. Las soluciones madre nunca fueron usadas por más de una semana.

La Ω -conotoxina GVIA, TTX, LY294002 y wortmanina fueron adquiridas de los laboratorios Alomone (Jerusalen, Israel). La ω -agatoxina TK y las toxinas muscarínicas MT-3 y MT-7 fueron adquiridas de Peptides International (Louisville, KY, USA). Nitrendipina, muscarina, PKC 19-36 y bisindolilmaleimida V fueron obtenidas de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). FK506 fue adquirida de

A.G. Scientific (San Diego, CA, USA). Bisindolilmaleimida I, U73122, U73343, péptido autoinhibidor de la calcineurina, PMA, BAPTA, LY303511, fosfatidilinositol (4,5) bifosfato y fosfatilinositol (3,4,5) trifosfato fueron adquiridos de Calbiochem (La Jolla, CA, USA).

5.6 Análisis de los datos

Los datos digitalizados fueron analizados y graficados con un programa de cómputo comercial (Origin 7; Microcal, Northampton, MA). Media, mediana y error estándar de la media (E.E.M.) de la modulación de la corriente de Ba^{2+} medida al pico son reportadas. Pruebas estadísticas no paramétricas fueron utilizadas para asignar una significancia estadística: Wilcoxon y U de Mann Whitney (dependiendo de si fueron grupos apareados o no).

6. RESULTADOS

Durante la primera parte de este trabajo experimental corroboramos que los canales de Ca^{2+} Ca_V1 (L), $\text{Ca}_V2.1$ (P/Q), $\text{Ca}_V2.2$ (N), pero no así los $\text{Ca}_V2.3$ (R), todos ellos presentes en las neuronas de proyección del NSt, son modulados por la activación de los receptores mACh-R mediante agonistas muscarínicos específicos. Encontramos que esta modulación es mediada, principalmente, por el receptor muscarínico de tipo M_1 y encontramos también que no se trata de una modulación delimitada a membrana ni dependiente de voltaje para ninguno de los canales estudiados. Posterior a estos experimentos encontramos que los canales Ca_V1 y $\text{Ca}_V2.2$, pero no así los $\text{Ca}_V2.1$ son modulados a través de la activación de la cascada “canónica” de señalización: $\text{PLC}\beta/\text{DAG-IP}_3/\text{Ca}^{2+}/\text{PKC}$ iniciada por la activación del receptor muscarínico M_1 . En el caso del canal $\text{Ca}_V2.1$, la modulación no se da a través de la intervención de una vía mediada por PKC y este mecanismo se describirá posteriormente.

Los resultados de la primera parte del proyecto fueron publicados en la revista *Neuroscience*. Una copia del reimpreso de este documento ha sido añadida en el **Anexo I**.

6.1 Los canales Ca_V1 , $\text{Ca}_V2.1$ y $\text{Ca}_V2.2$ son inhibidos por el receptor muscarínico de tipo M_1 de manera independiente de voltaje.

Experimentos previos del laboratorio demostraron que los canales Ca_V1 , $\text{Ca}_V2.1$ y $\text{Ca}_V2.2$ son modulados por el receptor muscarínico M_1 (Perez-Rosello et al., 2005). Nosotros corroboramos estos datos, además evaluamos la reversibilidad de esta modulación, y por último, buscamos modulación muscarínica de la corriente

residual que es mediada por los canales $Ca_v2.3$ (Bargas et al., 1994) (fig. 1 de Resultados).

Para llevar a cabo lo anterior, obtuvimos familias de corrientes de Ba^{2+} mediante la estimulación de las NEMs con pulsos de voltaje de duración igual a 20 ms para llevar el potencial de membrana de estas células de -80 a 50 mV, en pasos de 10 mV (fig. 1A), o bien, utilizamos rampas comando de voltaje con duración de 180 ms conduciendo el potencial de la célula de -80 a 50 mV (fig.1B). Como puede observarse en la figura 1C, ambos protocolos generan relaciones corriente-voltaje (I-V) muy similares, de hecho estas se sobreponen, de suerte que el trazo provocado por la rampa asemeja un ajuste numérico sobre los puntos obtenidos con los comandos rectangulares. Debido a que estos experimentos sugieren un buen control espacial del voltaje; en las figuras que siguen, en su mayor parte sólo se ilustrarán las curvas I-V obtenidas con el comando en forma de rampa.

Utilizando como agonista a la misma muscarina ($1\mu M$), observamos que la modulación muscarínica total fue prácticamente la misma antes y después de un pre-pulso a +80 mV, lo cual sugiere que la modulación no es mediada por un mecanismo delimitado a membrana dependiente de voltaje: La modulación antes del pre-pulso fue de $42 \pm 9\%$ (mediana= 42%) y después del pre-pulso fue de $44 \pm 9\%$ (mediana= 44%, $n = 7$; NS, Wilcoxon, ver fig. 1D). Estos experimentos se realizaron en presencia del antagonista de los receptores M_4 (20 nM MT-3).

Para corroborar que las NEMs sólo expresan receptores M_1 y M_4 , agregamos muscarina en presencia de los antagonistas específicos de ambos receptores (50 nM MT-7 y 20 nM MT-3, respectivamente) a concentraciones saturantes (fig. 1E). Se muestra que en estas condiciones ya no hay modulación (n

= 4), y los escasos cambios no son significativamente diferentes al decaimiento (“rundown”) control (ver Perez-Rosello et al., 2005).

Posteriormente, se aplicó una mezcla de bloqueadores de los canales de Ca^{2+} Ca_v1 , $\text{Ca}_v2.1$ y $\text{Ca}_v2.2$ (10 μM nitrendipina, 400 nM ω -agatoxina-TK y 1 μM ω -conotoxina-GVIA), para dejar solamente la corriente de Ca^{2+} acarreada por los canales $\text{Ca}_v2.3$ (R) (fig. 1F). En este caso, la muscarina no tuvo ningún efecto ($n = 4$), lo que confirma que la modulación mediada por el receptor M_1 es sobre los canales Ca_v1 , $\text{Ca}_v2.1$ y $\text{Ca}_v2.2$, mientras que el canal $\text{Ca}_v2.3$ no se ve afectado por la activación de este receptor muscarínico (ver figura 1F).

En resumen, los canales modulados por el receptor M_1 son: Ca_v1 , $\text{Ca}_v2.1$ y $\text{Ca}_v2.2$, como ya se había demostrado antes (Perez-Rosello et al., 2005).

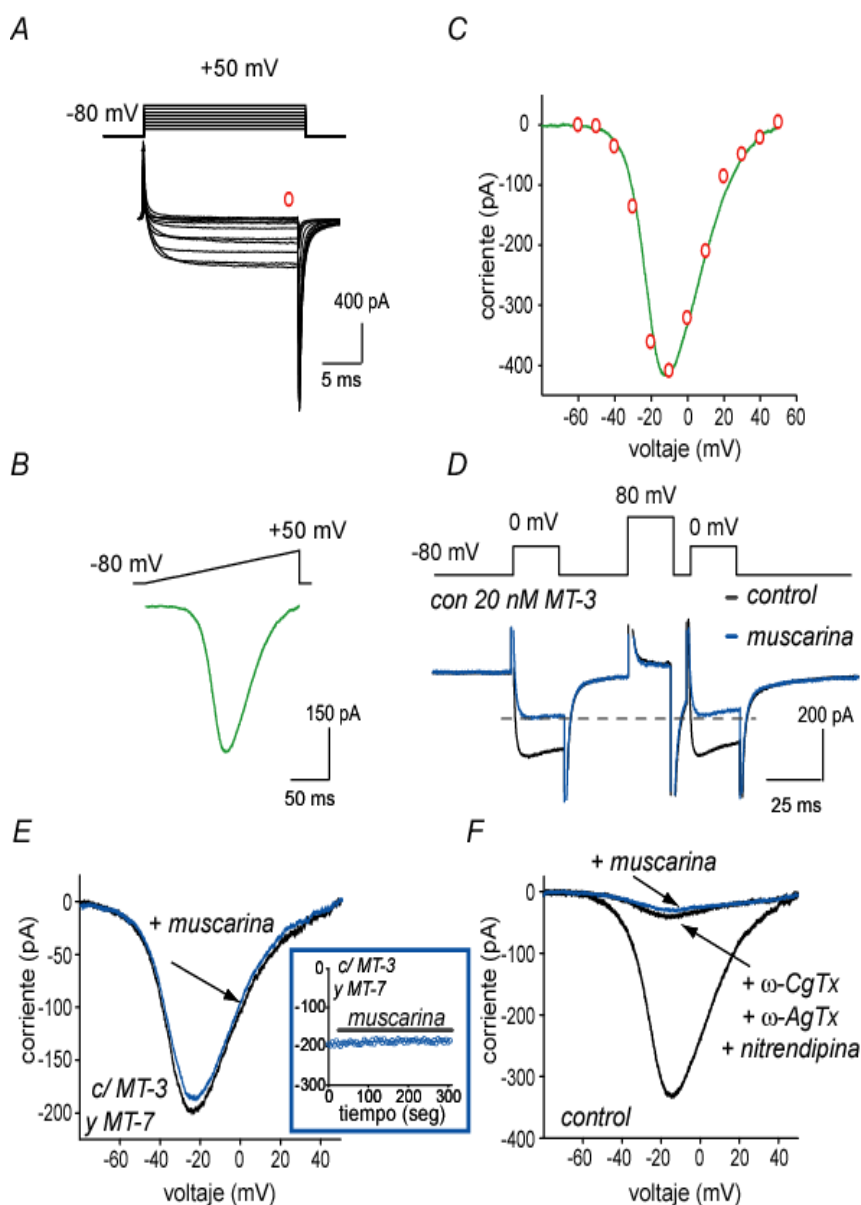


Figura 1. La modulación muscarínica de los canales L, N y P/Q es mediada por la activación del receptor M_1 de manera independiente de voltaje.

A) Corrientes de Ba^{2+} generadas por comandos despolarizantes de -80 a 50 mV en pasos de 10 mV con duración de 20 ms. B) Corrientes de Ba^{2+} generadas por comandos de voltaje en forma de rampa de 180 ms de duración (0.7mV/ms). C) Relaciones I-V construidas con las mediciones de ambos protocolos. Note la superposición (círculos: comandos rectangulares; línea continua: comandos en rampa). D) 1 μ M de muscarina en presencia de 20 nM de MT-3 (para antagonizar a los receptores muscarínicos de tipo M_4) reduce la amplitud de las corrientes provocadas a 0 mV. El porcentaje de reducción es el mismo antes y después de un pre-pulso a 80 mV sugiriendo una modulación independiente de voltaje. E) En presencia de los péptidos MT-3 y MT-7 (bloqueo de los receptores M_1 y M_4) se pierde la modulación. El inserto muestra el curso temporal del experimento revelando poco *rundown*. F) La muscarina no modula la corriente R (después del bloqueo de los canales de Ca^{2+} de los tipos L, N y P/Q).

6.2 La modulación que ejerce el receptor M_1 sobre los canales Ca_v2 es reversible y en parte mediada por la vía PLC/IP₃-DAG/ Ca^{2+} /PKC.

En los siguientes experimentos se utilizó nitrendipina (10 μ M) y MT-3 (20 nM) para bloquear los canales de Ca^{2+} de tipo Ca_v1 y los receptores muscarínicos M_4 , respectivamente. En estas condiciones, la muscarina (1 μ M) reduce gran parte de la corriente residual mediada por los canales $Ca_v2.1$ y $Ca_v2.2$: $23 \pm 2\%$, (fig. 2A; mediana = 24%, $n = 10$; $P < 0.001$, Wilcoxon). Estos experimentos demuestran que el receptor M_1 modula los canales $Ca_v2.1$ y $Ca_v2.2$. Para saber si en esta modulación participaba la PLC aplicamos muscarina en presencia del inhibidor selectivo de la PLC: U73122 (10 μ M). Con la PLC bloqueada la modulación muscarínica se redujo al $13 \pm 2\%$ (fig. 2B; mediana = 13%, $n = 8$; $P < 0.05$, U de Mann-Whitney). El efecto selectivo del inhibidor se corroboró con el uso del análogo inactivo U73343 (10 μ M) como control negativo. En cuyo caso la modulación de la corriente no fue significativamente diferente al control (fig. 2C; $25 \pm 2\%$, mediana = 24%, $n = 3$, NS). Por lo que concluimos que el receptor M_1 necesita activar a la PLC para modular a las corrientes Ca_v2 . La fig. 2C ilustra la reversibilidad de las acciones muscarínicas sobre los canales Ca_v2 (lo que también puede observarse en las figuras 3C, 7C y 8C).

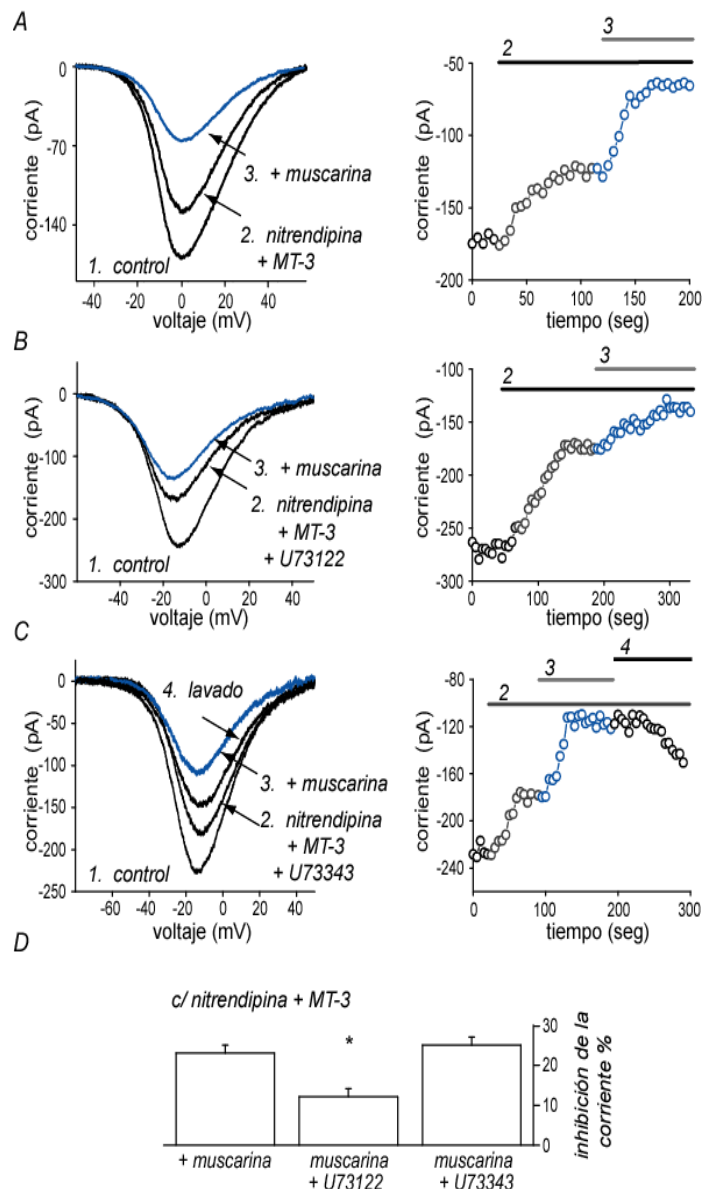


Figura 2. La modulación muscarínica de los canales Ca_v2 se debe en gran medida a la activación de la PLC.

En estos experimentos se usó nitrendipina ($10 \mu\text{M}$) y MT-3 (20 nM) para bloquear a los canales de Ca^{2+} Ca_v1 y al receptor M_4 , respectivamente. A) La muscarina reduce de manera sustancial la corriente mediada por Ca_v2 ($P < 0.001$). B) La aplicación del inhibidor de PLC U73122 ($10 \mu\text{M}$) inhibe la modulación muscarínica de la corriente. C) El análogo inactivo de U73122 (U73343 $10 \mu\text{M}$) no previene la modulación. D) El histograma resume los resultados en las muestras experimentales (media \pm E.E.M - en esta y las siguientes figuras). A la derecha pueden observarse los cursos temporales de los experimentos descritos aquí y en las siguientes figuras.

A continuación, exploramos el otro extremo de la cascada de señalización asociada a estos receptores: la PKC. Para lo cual utilizamos dos diferentes inhibidores de la PKC: la PKC 19-36 ($50 \mu\text{M}$, aplicada intracelularmente por medio de

la pipeta de registro) y la bisindolilmaleimida I (BIS I, 200 nM, aplicada en la perfusión). En ambos casos la modulación muscarínica se redujo en porcentajes similares: $14 \pm 2\%$ (fig. 3A; mediana= 13%, $n=7$; $P<0.05$) y $14 \pm 2\%$ (fig. 3B; mediana= 12%, $n=6$, $P<0.05$) para PKC 19–36 and BIS I, respectivamente (U de Mann-Whitney). En este caso el control negativo se realizó con el análogo inactivo bisindolilmaleimida V (BIS V, 200 nM). Esta droga no inhibió la modulación: $23 \pm 5\%$ (fig. 3C; mediana= 24%, $n=8$; NS).

El control positivo de estos experimentos consistió en investigar si un activador exógeno de la PKC podía mimetizar los efectos producidos por la muscarina. De acuerdo con esto, observamos que PMA (500 nM) pudo mimetizar y también ocluir la modulación muscarínica de Ca_v2 (fig. 4). PMA por sí solo, redujo la corriente de Ca^{2+} en $35 \pm 5\%$ (fig. 4A; mediana= 32%, $n=7$; $P<0.05$). Su presencia ocluyó las acciones muscarínicas reduciéndolas al $14 \pm 2\%$ (fig. 4A; mediana= 13%, $n=8$). Así, con ambos extremos de la cascada canónica investigados (PLC y PKC), la evidencia apoya fuertemente, el que la modulación de los canales Ca_v2 , mediada por el receptor M_1 , es a través de esta cascada (PLC/IP₃-DAG/ Ca^{2+} /PKC).

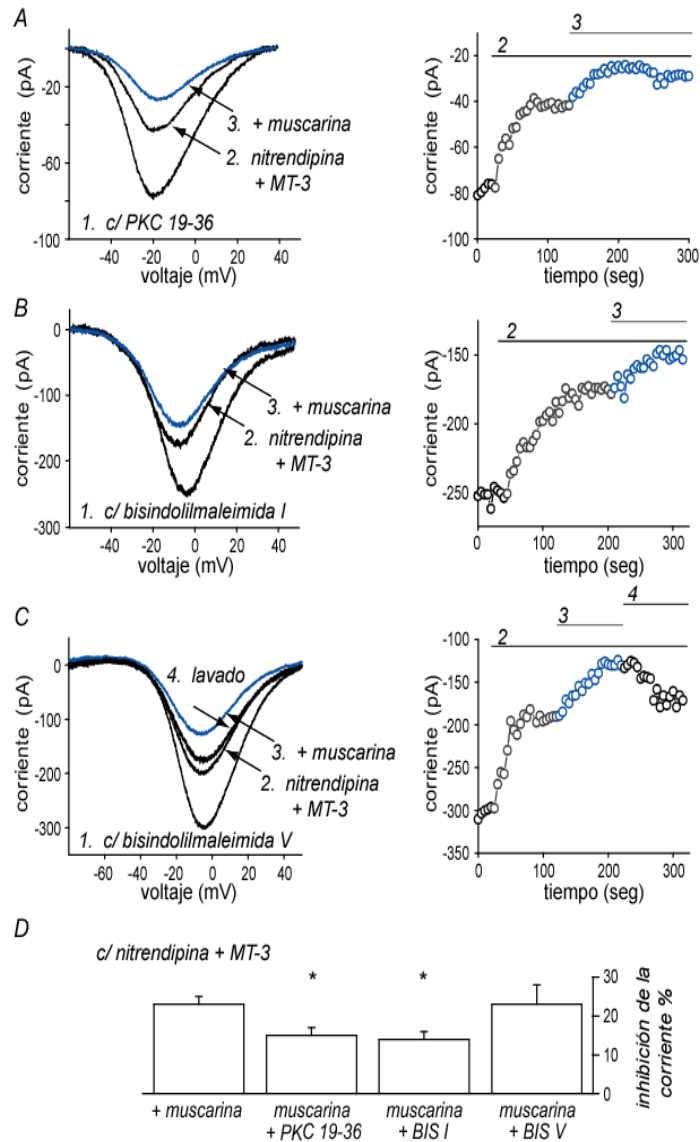


Figura 3. La modulación M_1 de los canales Ca_v2 es en parte mediada por PKC.

A) La modulación muscarínica fue reducida con respecto del control después de la aplicación intracelular de PKC 19-36 (50 μ M). B) El mismo efecto es producido por BIS I (otro inhibidor de PKC). C) Por su parte, BIS V (200 nM) el análogo inactivo de BIS I no evita la modulación muscarínica de estos canales de Ca^{2+} . D) El histograma muestra un resumen de los resultados encontrados en estas muestras experimentales. Diferencias significativas fueron encontradas entre el porcentaje de modulación obtenido en condiciones control y el obtenido con PKC 19-36 y BIS I ($P < 0.05$).

Pero faltaba el paso intermedio de la cascada canónica. Para investigarlo recurrimos al siguiente expediente: sabemos que las PKC típicas son dependientes de Ca^{2+} , y que ambos, el Ca^{2+} intracelular liberado por el IP_3 y el DAG son necesarios para activarlas. PKC y la liberación de Ca^{2+} (mediado por IP_3) son considerados los mayores efectores de la señalización

de proteínas G_q ; además, las isoformas típicas (dependientes de Ca^{2+} y DAG) y novedosas (dependientes de DAG pero no de Ca^{2+}) de PKC son activadas por receptores de membrana acoplados a PLC a través de proteínas G heterotriméricas tipo $G_{q/11}$ (Dorn y Force, 2005), por lo que decidimos quelar el Ca^{2+} intracelular para ver si así se interrumpía la modulación. Para lo cual utilizamos BAPTA (15 mM), adicionado intracelularmente mediante la pipeta de registro. Este procedimiento redujo la inhibición muscarínica a $13 \pm 2\%$ (fig. 4B; mediana= 15%, $n=8$, $P<0.05$). Con lo anterior, queda demostrado que la inhibición de cada paso de la cascada canónica PLC/IP₃-DAG/ Ca^{2+} /PKC era capaz de deprimir la modulación muscarínica de manera significativa. El histograma en la fig. 4C resume estos resultados.

Note sin embargo que una parte de la modulación (>10%) fue refractaria a estas maniobras experimentales (ver abajo).

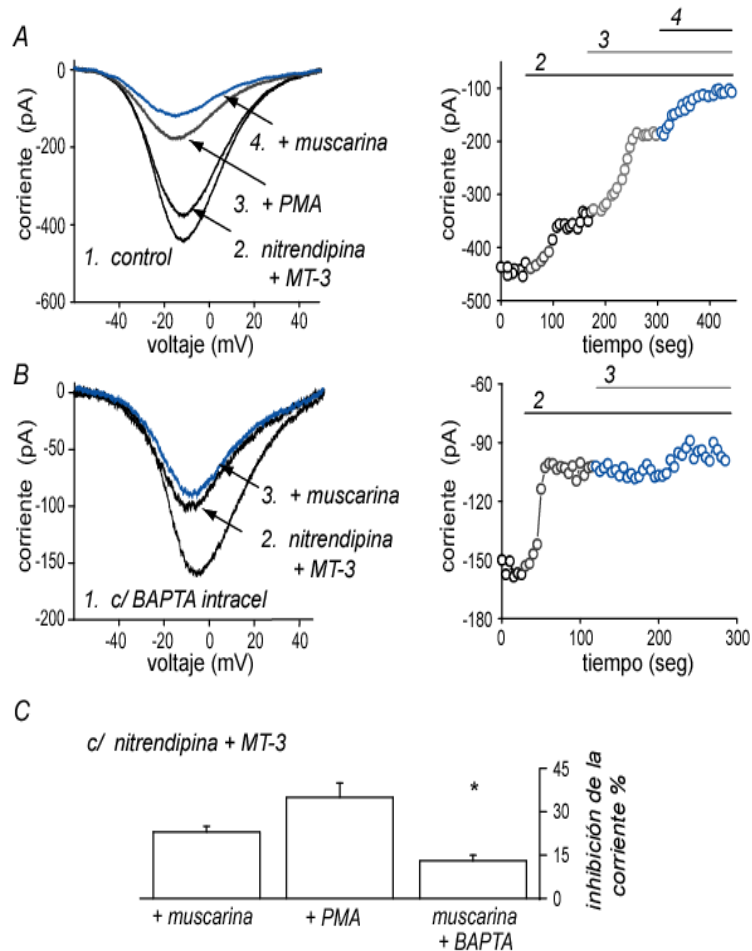


Figura 4. Las acciones muscarínicas sobre los canales Ca_v2 requieren de la activación de una PKC dependiente de Ca^{2+} .

A) La activación de PKC mediante PMA (500 nM) mimetiza y ocluye las acciones muscarínicas sobre los canales de Ca^{2+} Ca_v2 . B) La aplicación intracelular de BAPTA (15 mM) reduce en gran medida la modulación muscarínica. C) El histograma muestra un resumen de los resultados encontrados en estas muestras experimentales.

6.3 La modulación de los canales Ca_v2 mediada por el receptor M_1 no es debida a la activación de PP-2B.

Como se mencionó, la activación de la PLC puede conducir a la activación de PKC. Sin embargo, la actividad de la PLC puede inducir la generación de otras ramas en esta cascada de señalización, e inclusive, la activación de otras proteínas que para su activación requieren Ca^{2+} intracelular. Así, recientemente se propuso que el receptor muscarínico M_1 puede inhibir la corriente de Ca^{2+} mediada por Ca_v1 a través de la activación de PP-2B (calcineurina). Sin embargo, esta proposición

está basada en resultados indirectos no concluyentes (Howe y Surmeier, 1995; Rakhilin et al., 2004). Por lo anterior, decidimos retomar el problema, sobre todo para saber si el porcentaje remanente de modulación se debía a este proceso.

Para lo cual realizamos experimentos con dos diferentes fármacos inhibidores de PP-2B a concentraciones saturantes: el péptido inhibidor de la PP-2B (PICaN, 25 μ M) y el inhibidor selectivo FK506 (1 μ M). La aplicación intracelular de PICaN a través de la pipeta de registro fue incapaz de bloquear la modulación muscarínica de estos canales. El mismo resultado se obtuvo con la aplicación de FK506 a través de la perfusión. La modulación muscarínica de Ca_v2 fue de $30 \pm 3\%$ (fig. 5A; mediana= 32%, $n=7$) en presencia de PICaN, mientras que con FK506 fue de $31 \pm 5\%$ (fig. 5B; mediana= 29%, $n=7$). El histograma de la figura 5C resume los datos encontrados en estas muestras experimentales. Sin embargo, las neuronas poseen PP-2B funcional, pues cuando se prueba la modulación dopaminérgica de tipo D_2 (en las mismas condiciones) que se sabe que actúa a través de esta proteína, la acción de los agonistas dopaminérgicos sí se ve afectada por la inhibición de la PP-2B (ver Perez-Burgos et al., 2008).

En resumen, los datos refuerzan la conclusión previa de que la modulación muscarínica sobre Ca_v2 es llevada a cabo a través de la activación de PKC y se descarta la rama (variante) de la vía de señalización que involucra a la PP-2B.

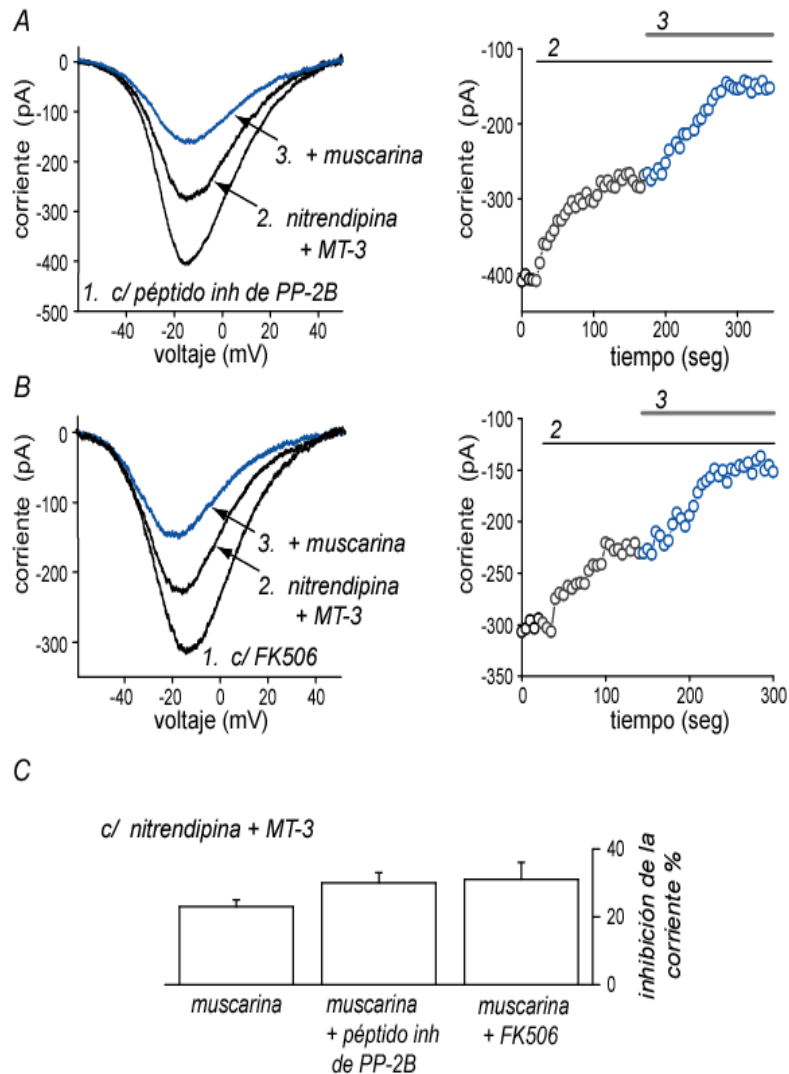


Figura 5. La modulación muscarínica de los canales Ca_v2 no es mediada por PP-2B.

A) La aplicación intracelular del péptido inhibidor de PP-2B (25 μ M) no interfiere con la modulación muscarínica de Ca_v2 . B) FK506 (1 μ M), otro inhibidor de PP-2B tampoco evita esta modulación. C) El histograma ilustra como el bloqueo de PP-2B no induce cambios significativos en la modulación muscarínica.

6.4 Explicación de la fracción no modulable pro PKC: el receptor muscarínico

M_1 modula al canal $Ca_v2.2$ pero no al $Ca_v2.1$ a través de la vía PLC/ IP_3 -DAG/ Ca^{2+} /PKC.

Según los resultados descritos hasta el momento, se requieren las acciones de la PLC y la PKC para llevar a cabo la modulación muscarínica de los canales Ca_v2 . Sin embargo, cuando estas proteínas fueron inhibidas, se redujeron las

acciones muscarínicas sobre estos canales mas no se eliminaron totalmente; hay una fracción refractaria (ver arriba) a la modulación. Más del 10% de la modulación permanece al bloquear la PKC. Esto puede deberse a que la modulación muscarínica de ambos canales es mediada sólo parcialmente por las acciones esta cascada, o a que sólo uno de los canales Ca_v2 es modulado a través de dicha cascada. Debido a lo anterior, nos dimos a la tarea de esclarecer si la modulación muscarínica de los canales $Ca_v2.1$ y $Ca_v2.2$ es en ambos casos ejercida mediante la activación de la PKC.

En los experimentos que a continuación serán descritos se utilizó nuevamente nitrendipina y el péptido MT-3 para bloquear a los canales de Ca^{2+} Ca_v1 y antagonizar al receptor muscarínico de tipo M_4 respectivamente. Para observar las acciones del receptor M_1 sobre los canales de Ca^{2+} $Ca_v2.1$ y $Ca_v2.2$ por separado, ω -conotoxina-GVIA (1 μ M) y ω -agatoxina-TK (400 nM) fueron utilizadas, de acuerdo a si se requería dejar libre para ser modulado al canal $Ca_v2.1$ ó al $Ca_v2.2$, respectivamente.

Así, en presencia de nitrendipina (para bloquear los canales Ca_v1), MT-3 (para bloquear los receptores muscarínicos M_4) y ω -agatoxina-TK (para bloquear los canales $Ca_v2.1$ o P/Q), dejamos libres para ser modulados a los canales $Ca_v2.2$ (N). Primero, corroboramos que la activación del receptor M_1 reduce la corriente de Ca^{2+} mediada por estos canales en $13 \pm 2\%$ (fig. 6A; mediana= 12%, $n=11$, $P<0.01$, T de Wilcoxon). En las mismas condiciones, la muscarina fue aplicada a las neuronas cuya PKC había sido previamente inhibida con BIS I. BIS I redujo la inhibición muscarínica a $5 \pm 2\%$ (fig. 6B; mediana= 4%, $n=5$; $P<0.05$), porcentaje de modulación significativamente menor al encontrado en condiciones control y ya dentro de la variación producida por el *rundown* en algunas células, por lo que

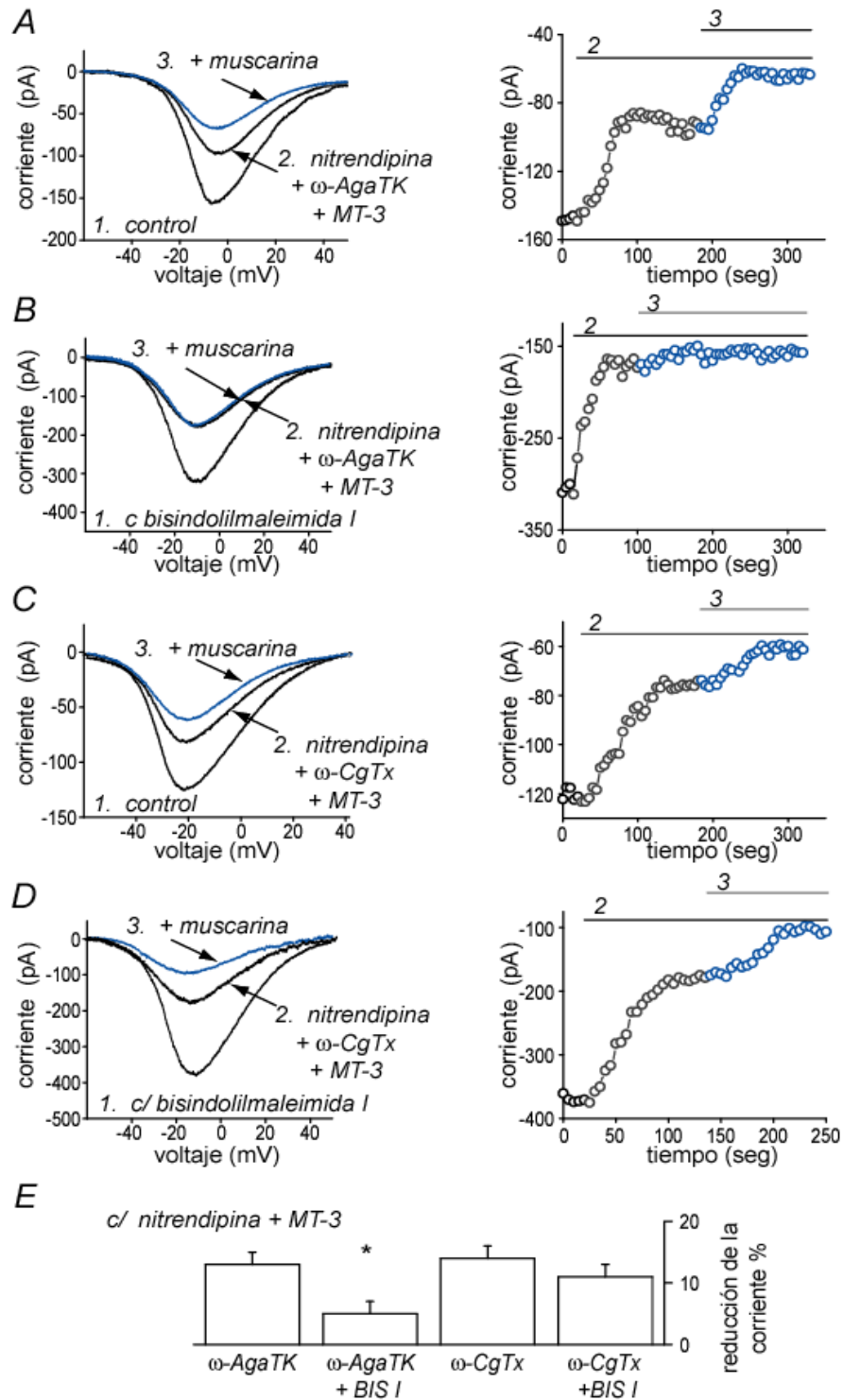
podemos concluir que el canal $Ca_v2.2$ (N) SI es modulado por el receptor M_1 a través de PKC (ver figura 6B).

Experimentos similares se llevaron a cabo en presencia de: nitrendipina, MT-3 y ω -conotoxina-GVIA (para bloquear los canales $Ca_v2.2$) y dejar libres para ser modulados por los receptores muscarínicos M_1 a los canales $Ca_v2.1$ (P/Q). En estas condiciones la corriente de Ca^{2+} mediada por los canales $Ca_v2.1$ fue de $14 \pm 2\%$ (fig. 6C; mediana= 12%, $n=7$, $P<0.03$), confirmando que el canal $Ca_v2.1$ es modulado por la activación del receptor M_1 . En las mismas condiciones, la muscarina fue aplicada a neuronas en las que previamente se había inhibido la PKC con BIS I. En este caso, BIS I no fue capaz de evitar la modulación muscarínica que fue de $11 \pm 2\%$ (fig. 6D; mediana= 10%, $n=7$, NS). Por lo anterior, concluimos que la cadena canónica de señalización que involucra a la PKC por activación de los receptores M_1 , sólo modula a los canales $Ca_v2.2$ pero no así a los $Ca_v2.1$.

Ver página siguiente para la:

Figura 6. PKC modula a los canales $Ca_v2.2$ pero no a los $Ca_v2.1$.

A) En presencia de nitrendipina y MT-3, se añadió ω -agatoxina-TK (400 nM) para bloquear a los canales $Ca_v2.1$. De este modo, si la modulación persiste involucra únicamente a $Ca_v2.2$. En estas condiciones, hubo una clara modulación muscarínica ($P<0.01$). B) En presencia de BIS I la modulación muscarínica de $Ca_v2.2$ fue virtualmente abolida; lo cual sugiere que PKC modula al canal N. C) En experimentos similares se añadió ω -conotoxina-GVIA (1 μ M) para bloquear a los canales $Ca_v2.2$; de la corriente mediada por Ca_v2 , permitiendo así, únicamente la modulación de $Ca_v2.1$. En estas condiciones, la modulación muscarínica de los canales $Ca_v2.1$ se mantuvo ($P<0.03$) confirmando que el receptor M_1 modula tanto el canal N como el P/Q. D) Sin embargo, el bloqueo de la PKC con BIS I no evitó la modulación muscarínica sobre el canal $Ca_v2.1$. E) El histograma muestra que la inhibición de PKC solo afecta la modulación muscarínica del canal $Ca_v2.2$. Nótese que la modulación sumada de los dos canales se aproxima al porcentaje de modulación total de los canales de Ca^{2+} Ca_v2 .



6.5 La activación del receptor M_1 también modula a los canales Ca_v1 mediante la cascada de señalización PLC/IP₃-DAG/ Ca^{2+} /PKC.

Como mencionamos antes, en trabajos previos se ha propuesto de manera no concluyente que el receptor muscarínico de tipo M_1 modula los canales Ca_v1 a través de la activación dependiente de Ca^{2+} de la enzima PP-2B (Howe y Surmeier, 1995; Rakhilin et al., 2004). Sin embargo, ni esos experimentos eran directos y concluyentes, ni tampoco se descartó la cascada canónica de señalización. De suerte que nuestro siguiente paso fue dilucidar si esta cascada podía descartarse.

En los experimentos descritos a continuación se utilizaron: el péptido MT-3 para antagonizar las posibles acciones de los receptores muscarínicos de tipo M_4 y una mezcla de los bloqueadores específicos de los canales de Ca^{2+} $Ca_v2.1$ y $Ca_v2.2$ (ω -agatoxina-TK y ω -conotoxina-GVIA, respectivamente), para dejar disponibles para ser modulados únicamente a los canales Ca_v1 . En estas condiciones, la aplicación del agonista muscarina reduce la corriente mediada por los canales de Ca^{2+} L en un $26 \pm 3\%$ (fig. 7A; mediana= 28%, $n=6$, $P<0.05$).

A continuación, indagamos si la activación si la PLC se encuentra involucrada en esta modulación. Así, utilizamos U73122 (10 μ M) para inhibir a la PLC. En estas condiciones la modulación muscarínica se redujo a $7 \pm 1\%$ (fig. 7B; mediana= 7%, $n=6$; $P<0.05$). Para descartar acciones inespecíficas utilizamos el análogo inactivo del inhibidor, U73343 (10 μ M) como control negativo. Este fármaco, no impidió la modulación, pues esta fue de $23 \pm 6\%$ (fig. 7C; mediana= 18%, $n=3$, NS). Por lo que concluimos que el receptor M_1 necesita activar a la PLC para modular a los canales Ca_v1 .

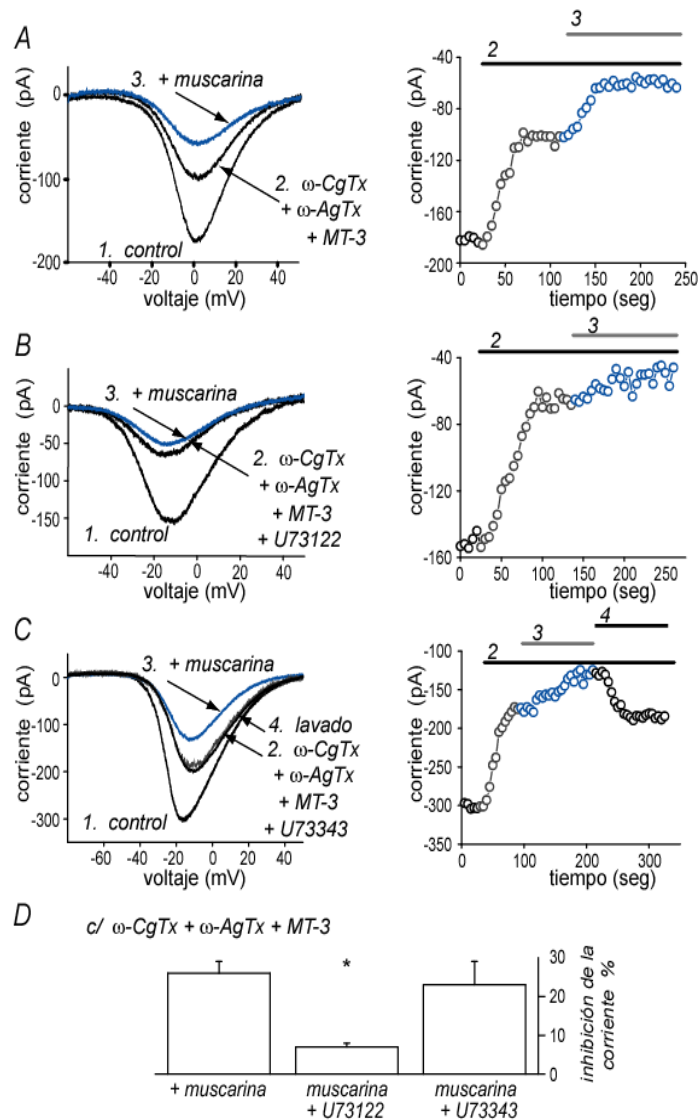


Figura 7. La activación de la PLC es necesaria para la modulación muscarínica de los canales Ca_v1 .

A) se utilizaron las toxinas ω -agatoxina-TK y ω -conotoxina-GVIA para bloquear los canales $Ca_v2.1$ y $Ca_v2.2$, respectivamente, así como la toxina MT-3 para antagonizar a los receptores muscarínicos de tipo M_4 . En estas condiciones, los canales Ca_v1 fueron modulados de manera sustancial por la activación del receptor muscarínico M_1 . B) Al bloquear a la enzima PLC con U73122, la modulación muscarínica de los canales Ca_v1 fue virtualmente abolida. C) Sin embargo, el análogo inactivo del inhibidor, U73343, no afectó la modulación. D) El histograma muestra como la modulación de los canales Ca_v1 mediada por el receptor M_1 involucra una cascada de señalización en la que participa la PLC.

Posteriormente, decidimos examinar el otro extremo de la cascada canónica de señalización: la participación de la PKC. El activador de la PKC, PMA, fue capaz de mimetizar y ocluir las acciones muscarínicas sobre los canales Ca_v1 . Por sí mismo, PMA redujo la corriente de forma significativa: $17 \pm 4\%$ (fig. 8A; mediana= 21% , $n=6$), pero de manera similar a la muscarina. Cuando se aplicó muscarina en

presencia de PMA, las acciones del agonista fueron ocluidas: $7 \pm 2\%$ (fig. 8A; mediana= 9%, $n=6$; $P<0.01$). A continuación, utilizamos BIS I para inhibir a la PKC. BIS I prácticamente abolió las acciones muscarínicas sobre los canales Ca_v1 dejándolas en $4 \pm 2\%$ (fig. 8B; mediana=3, $n=4$; $P<0.05$). Para asegurarnos de la especificidad utilizamos el análogo inactivo BIS V. El resultado fue que BIS V no afectó significativamente la acción muscarínica sobre los canales Ca_v1 : $18 \pm 3\%$ (fig. 8C; mediana= 18%, $n=5$; NS). Tomados de manera conjunta, los experimentos descritos sugieren fuertemente que la modulación muscarínica de los canales Ca_v1 , al igual que la de los $Ca_v2.2$, utiliza la cascada canónica de señalización que comienza activando la PLC y termina activando la PKC.

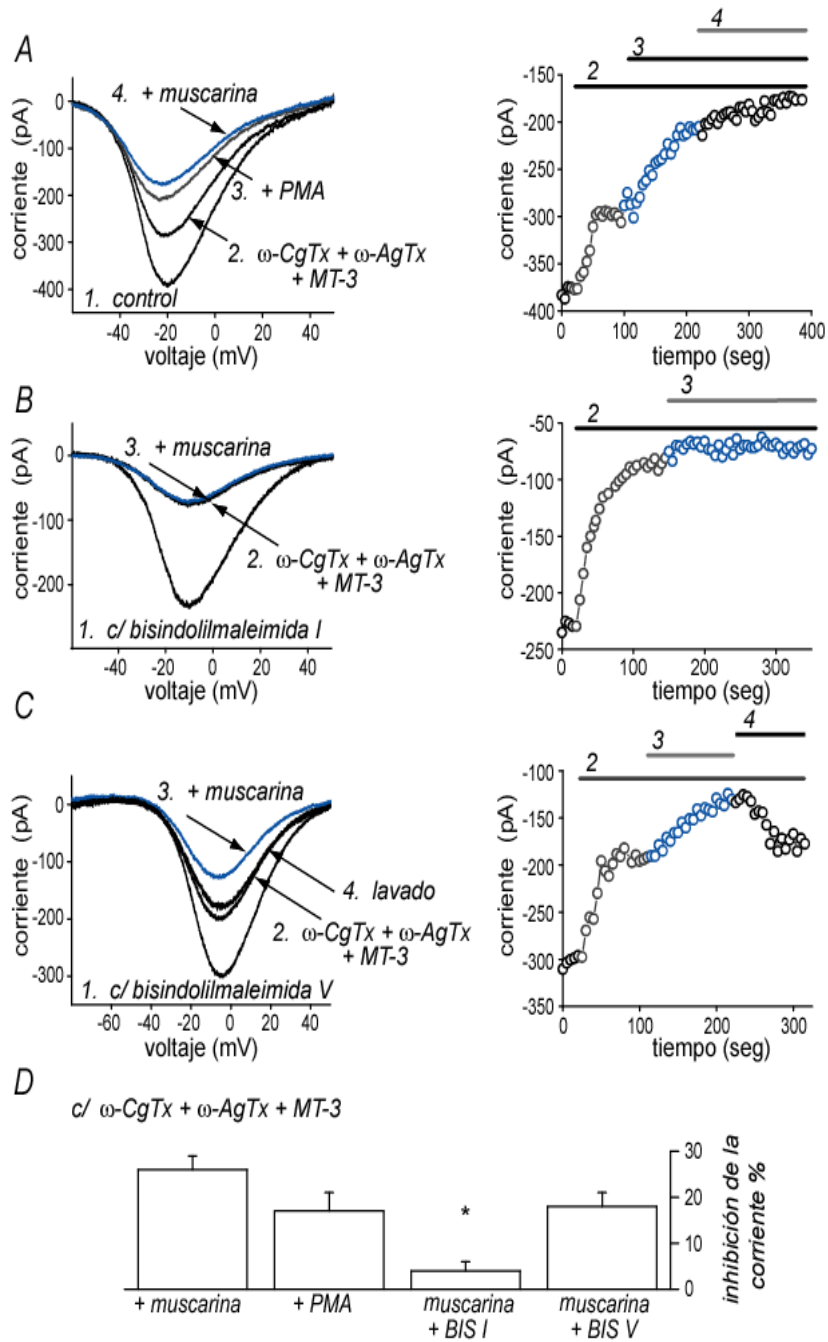


Figura 8. La modulación de los canales Ca_v1 mediada por el receptor M_1 es a través de la activación de la PKC.

Para estos experimentos, los receptores M_4 los canales $Ca_v2.1$ y $Ca_v2.2$, fueron bloqueados. A) La modulación muscarínica de los canales Ca_v1 es mimetizada por PMA (500 nM), agente que además ocluye la acción de la muscarina. B) El inhibidor de la PKC: BIS I (200 nM), abole las acciones inducidas por la activación del receptor M_1 sobre estos canales de Ca^{2+} . C) el análogo inactivo BIS V no impide la modulación permite que el M_1 inhiba la corriente mediada por Ca_v1 . D) El histograma resume estos experimentos.

No obstante lo anterior, la existencia de trabajos que sugieren que en esta modulación participa la PP-2B, nos obligó a realizar experimentos control para

aclarar un posible papel de esta proteína en la modulación. Así, en un grupo de experimentos, las neuronas fueron preincubadas con el inhibidor de la PP-2B, FK506 (1 μ M), y en estas condiciones, la modulación muscarínica sobre los canales Ca_v1 no fue inhibida: $20 \pm 1\%$ (fig. 9A; mediana= 20%, $n=3$). El mismo resultado se obtuvo en presencia de otro inhibidor: el péptido inhibidor de la PP-2B (aplicado intracelularmente): $20 \pm 4\%$ (fig. 9B; mediana= 18%, $n=7$). Estos experimentos nos llevan a concluir que la modulación debida a la activación del receptor M_1 sobre los canales Ca_v1 no requiere de la participación de la PP-2B.

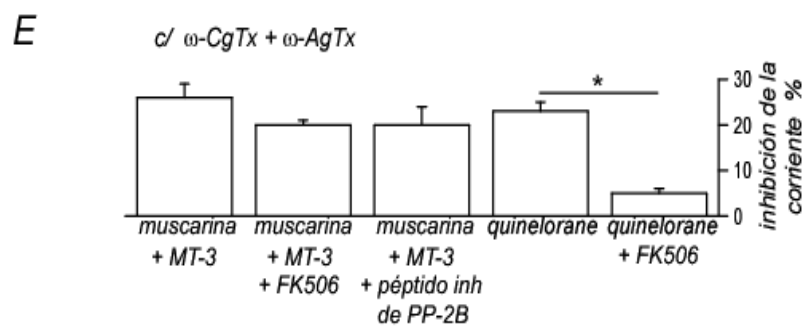
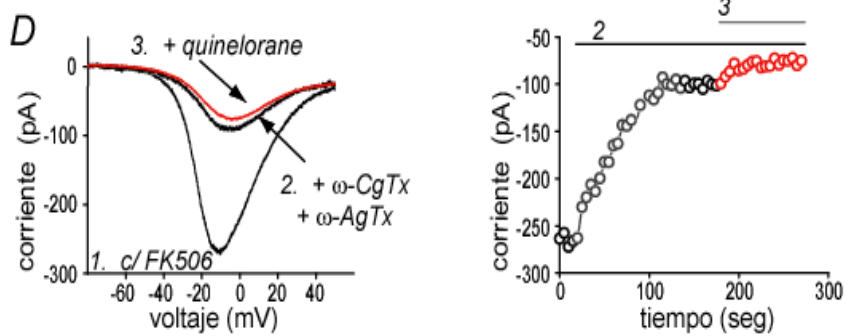
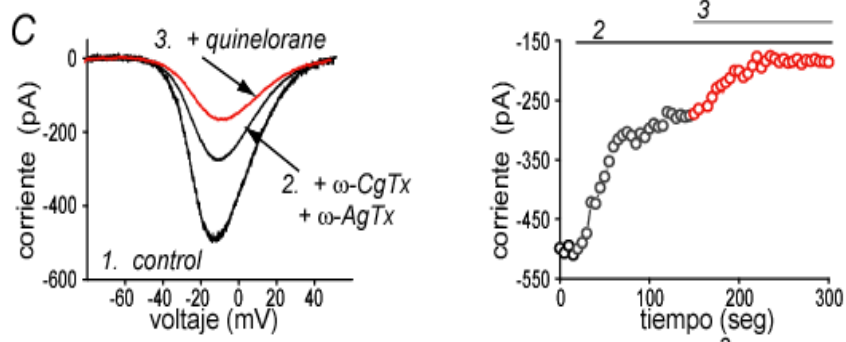
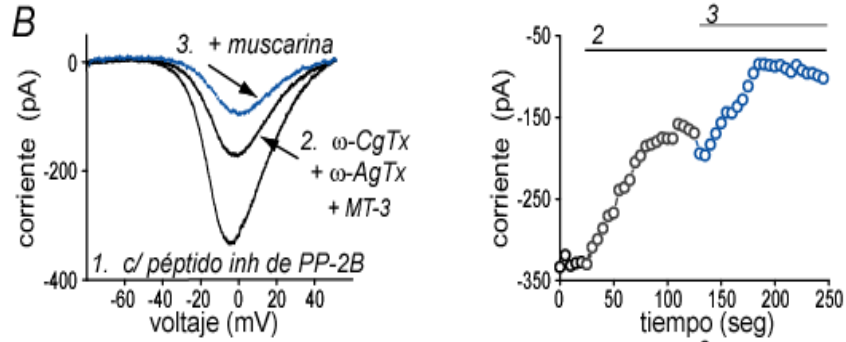
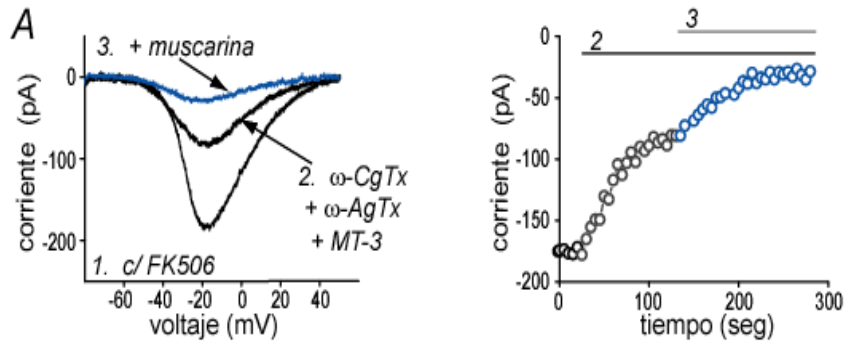
Pero para asegurarnos aún más de este resultado, decidimos observar si la PP-2B estaba presente y era funcional en nuestras neuronas. Para ello, realizamos el siguiente control positivo: ya que está probado que la modulación dopaminérgica de los canales Ca_v1 mediada por los receptores de la familia D_2 (D_2 , D_3 y D_4) se lleva a cabo a través de la activación de la PP-2B (Hernandez-Lopez et al, 2000), comprobamos que esta modulación estuviera presente en nuestras condiciones de trabajo. De esta manera, un agonista de los receptores dopaminérgico D_2 ($D_{3/2}$), quinolorane (10 μ M), se añadió en presencia de los bloqueadores de los canales $Ca_v2.1$ y $Ca_v2.2$ (ω -agatoxina-TK y ω -conotoxina-GVIA, respectivamente). La activación de los receptores de la clase D_2 redujo la corriente mediada por los canales Ca_v1 en $23 \pm 2\%$ (fig. 9C; mediana= 24%, $n=6$, $P<0.05$). Después bloqueamos la PP-2B con FK506 y repetimos los experimentos. En estas condiciones, la modulación dopaminérgica de los canales Ca_v1 se abatió: $5 \pm 1\%$ (fig. 9D; mediana= 5%, $n=3$; $P<0.05$). Esto muestra que las neuronas expresan PP-2B funcional, y si no detectamos su acción durante la modulación colinérgica es porque no participan en ésta, mientras que sí lo hacen en la dopaminérgica. El histograma de la figura 9E resume los efectos muscarínicos y dopaminérgicos sobre

los canales Ca_v1 en presencia y ausencia de la inhibición de la PP-2B: claramente se puede observar que la inhibición de esta proteína no interfiere con las acciones moduladoras del receptor M_1 pero sí lo hace con las del receptor $D_{2/3}$ (Hernandez-Lopez et al., 2000; Rakhilin et al., 2004, Olson et al., 2005).

Ver página siguiente para la:

Figura 9. La calcineurina es la proteína involucrada en la modulación dopaminérgica de los canales Ca_v1 pero no lo es en la modulación muscarínica de los mismos canales.

(A, B) Los canales $Ca_v2.1$ y $Ca_v2.2$, así como los receptores M_4 han sido bloqueados; FK506 ($1 \mu M$) y PICA N ($25 \mu M$) (dos diferentes inhibidores de PP-2B) fueron incapaces de impedir la modulación muscarínica de los canales de Ca^{2+} Ca_v1 . C) Modulación dopaminérgica de los canales Ca_v1 . D) La inhibición de la PP-2B si es capaz de abatir la modulación del receptor $D_{2/3}$ sobre los canales Ca_v1 . E) El histograma ilustra como el bloqueo de la calcineurina no afecta la modulación muscarínica de estos canales pero si la modulación dopaminérgica.



6.6 La inhibición de PKC impide la reducción del PPH mediada por la activación del receptor M₁.

En NEMs del NSt, la activación del receptor muscarínico M₁ reduce el PPH que sigue al potencial de acción (PA) (Pineda et al., 1995). Así, la modulación muscarínica de los canales Ca_v2.1 y Ca_v2.2 regula indirectamente al PPH e incrementa la frecuencia de disparo de las NEMs del NSt (Perez-Rosello et al., 2005); esto se debe a que la entrada de Ca²⁺ a través de la apertura de ambos canales, es la fuente de Ca²⁺ que induce la apertura de los canales de K⁺ dependientes de Ca²⁺ (K_{Ca2+}) que median el PPH (Vilchis et al., 2000). La inhibición muscarínica de los canales de Ca²⁺, hace que los canales K_{Ca2+} también se vean inhibidos y esto reduce el PPH haciendo que la célula alcance más fácilmente el umbral de disparo, reduciendo así el intervalo inter-espiga e incrementando la frecuencia de disparo.

Sin embargo, ambos canales, el Ca_v2.1 y el Ca_v2.2 requieren de ser bloqueados para ver una reducción sustancial del PPH (Perez-Garci et al., 2003).

Por lo tanto el PPH es un fenómeno fisiológico modulado por el receptor muscarínico de tipo M₁, donde nuestras conclusiones previas sobre la participación de PKC en la modulación muscarínica de Ca_v2.1 y Ca_v2.2 pueden ser desafiadas. Si la inhibición de ambos canales es requerida para ver una reducción del PPH y la activación del receptor M₁ inhibe estos dos canales de Ca²⁺, el bloquear la actividad de la PKC únicamente, nos dejaría uno de los canales sin modular, el canal Ca_v2.1, pues la PKC no interfiere con su modulación. Entonces, el bloquear la PKC no bastaría para mimetizar la acción del agonista muscarínico sobre el PPH.

Primeramente, mediante registros intracelulares confirmamos que 1 μM de muscarina es capaz de reducir el PPH de 7.3 ± 0.4 mV obtenido en condiciones

control a 4.2 ± 0.4 mV. Esta reducción muscarínica del PPH fue de $43 \pm 4\%$ (fig. 10A; $n=15$; $P<0.01$). Sin embargo, cuando las rebanadas cerebrales fueron preincubadas con 200 nM de BIS I para inhibir la PKC, el PPH ya no sufrió una reducción significativa: 6.7 ± 1.2 mV ($n=7$, NS), lo cual sugiere fuertemente que nuestra hipótesis es correcta y que PKC sólo modula uno de los canales que generan el PPH.

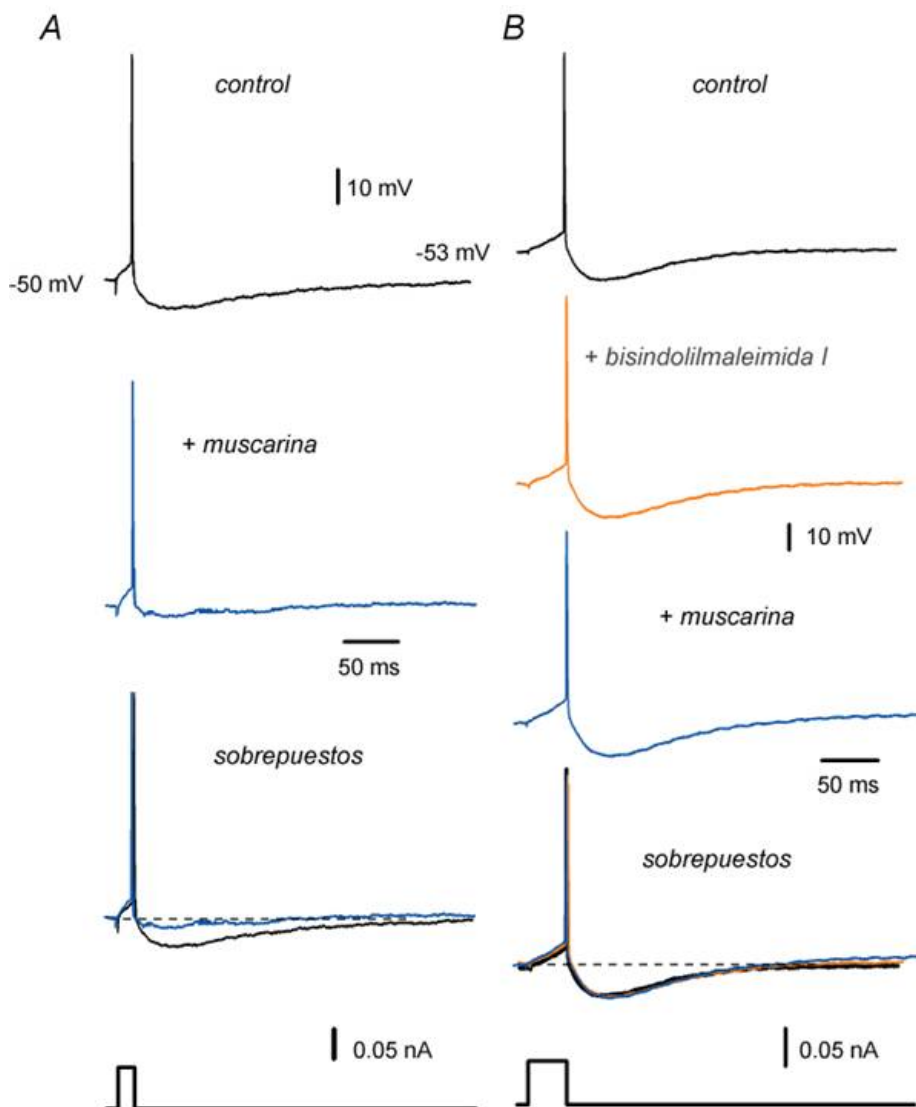


Figura 10. La inhibición de PKC impide la reducción del PPH generada por el receptor muscarínico de tipo M_1 .

A) Inyección intracelular de pulsos despolarizantes de corriente con un potencial de mantenimiento de -50 mV, provocan la aparición del PPH a continuación de un solo potencial de acción (control). Después de la aplicación de 1 μ M de muscarina el PPH se reduce. B) Experimentos similares inhibiendo la PKC con BIS I (200 nM) muestran la pérdida de la acción muscarínica sobre el PPH; confirmando que tanto $Ca_v2.1$ como $Ca_v2.2$ requieren de ser inhibidos para bloquear el PPH. Los

trazos superpuestos son mostrados en la parte inferior del panel A y B de esta y la siguiente figura. Los protocolos de estimulación son añadidos en la parte inferior de esta y la siguiente figura.

6.7 La regulación muscarínica de la despolarización sostenida se debe a la inhibición de los canales Ca_v1 a través de PKC.

La modulación muscarínica de los canales Ca_v1 es mediada únicamente por el receptor de tipo M_1 (Howe y Surmeier, 1995; Perez-Rosello et al., 2005). Estos canales, no participan en la generación del PPH en las NEMs del NSt (Vilchis et al., 2000). No obstante, participan en las despolarizaciones prolongadas que permanecen después de estímulos breves despolarizantes (e.g., inyecciones de corriente despolarizantes aplicadas en la configuración de fijación de corriente en la preparación de rebanadas cerebrales). Esto es causa de un incremento en la frecuencia de disparo pues acerca el potencial de membrana de la célula al umbral de disparo (Hernandez-Lopez et al., 1997).

Como los experimentos descritos previamente apuntan a una inhibición de los canales Ca_v1 mediada por el receptor M_1 , la activación de este receptor debiera ser capaz de reducir también la despolarización prolongada. En la figura 11A puede observarse que, en efecto, la muscarina reduce la despolarización prolongada inducida a potenciales despolarizados en $51 \pm 8\%$ (midiendo el área bajo la curva de la respuesta en voltaje ($n=7$, $P<0.05$). Sin embargo, note que si la PKC es inhibida previamente con el inhibidor BIS I, el efecto desaparece ($n=5$). Por sí misma, BIS I no modifica esta despolarización lenta ($n=5$, la reducción de BIS I fue de 0.04%, NS, ver figura 11B). Este experimento corrobora no solo que la modulación muscarínica de los canales Ca_v1 mediada por el receptor M_1 en NEMs del NSt se debe a la activación de la proteína PKC, sino que esta modulación tiene importantes acciones para la regulación de la excitabilidad.

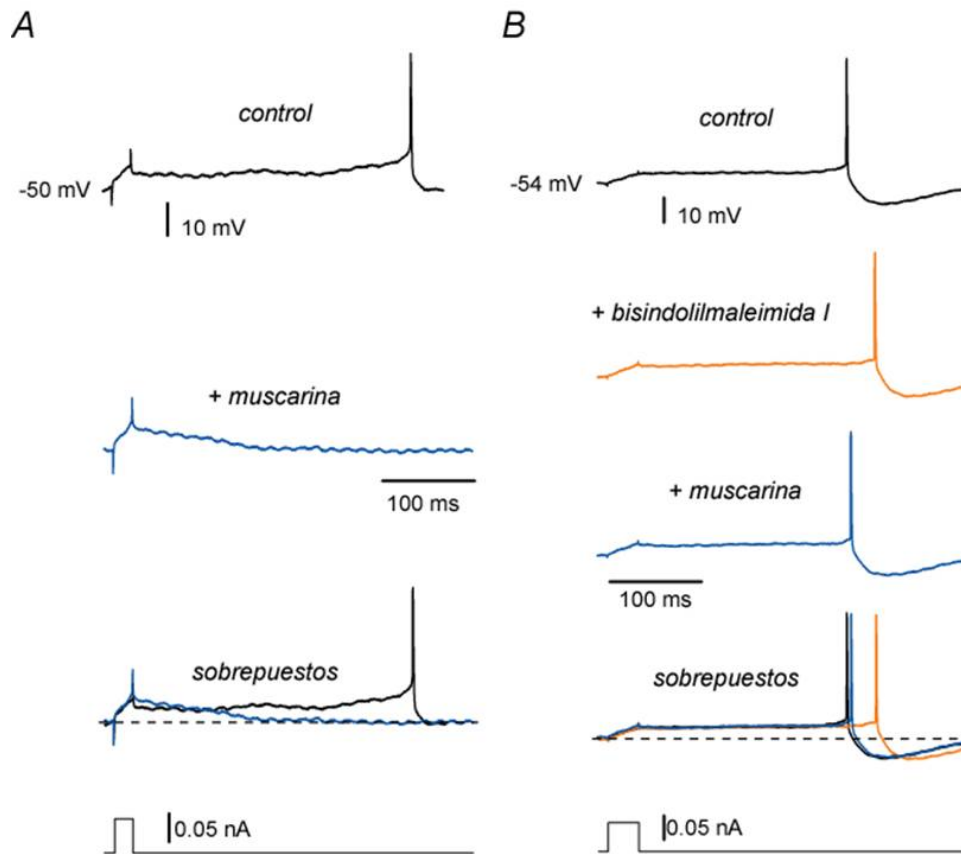


Figura 11. La inhibición de PKC impide la reducción de la despolarización subumbral lenta generada por el receptor muscarínico de tipo M_1 .

A) Breves pasos de corriente inyectados en NEMs con potencial de mantenimiento cercano al umbral de disparo (-50 mV aproximadamente) genera un despolarización lenta capaz de inducir potenciales de acción (PA) mucho tiempo después de la terminación del estímulo que provoca la despolarización (control). La muscarina reduce la despolarización lenta (+ muscarina) B) Una vez que la PKC fue inhibida, la muscarina ya no fue capaz de reducir la despolarización lenta.

Una vez dilucidado el mecanismo de modulación de los canales Ca_v1 y $Ca_v2.2$, durante la segunda sección del proyecto, nos avocamos a la tarea de esclarecer el mecanismo de modulación del canal $Ca_v2.1$ a través del receptor muscarínico M_1 . Puesto que a pesar de ser modulado por la activación de este receptor, su modulación no fue inhibida por el bloqueo de la PKC.

En resumen, encontramos que para ser modulado, este canal requiere de la activación de la $PLC\beta$, la cual hidroliza el $PI(4,5)P_2$ localizado en la membrana plasmática. Esta única acción es capaz de modular al canal, el cual parece requerir

la unión de este fosfolípido para su adecuado funcionamiento (Suh y Hille, 2005). Asimismo, encontramos que la inhibición de la PI-4K (quinasa lipídica) impide la reversión de la inhibición; lo que sugiere que esta reversión requiere de la resíntesis de PI(4,5)P₂. Adicionalmente, la inhibición de PI-3K evita en la mayor parte de los casos la reversión de la inhibición; lo que sugiere que la resíntesis de PI(3,4,5)P₃ es también requerida. Esto se comprobó mediante la aplicación intracelular de PI(4,5)P₂ y PI(3,4,5)P₃; manipulación que ocluyó la inhibición del canal mediada por el receptor muscarínico M₁.

6.8 La activación del receptor muscarínico M₁ inhibe de manera reversible la corriente mediada por el canal Ca_v2.1.

La muscarina (1 μM) fue utilizada en todos los experimentos que a continuación se describirán para activar a los receptores muscarínicos de tipo M₁. Debido a que en estas células (NEMs) además del receptor muscarínico de tipo M₁ se expresa también el receptor muscarínico de tipo M₄, utilizamos la toxina muscarínica 3 (MT-3, 20 nM) para antagonizar de manera específica los posibles efectos muscarínicos sobre el canal P/Q mediados por la activación del receptor muscarínico M₄, y así quedarnos, exclusivamente, con los efectos M₁.

Además, en todos los experimentos se utilizó una combinación de nitrendipina (10 μM) y ω-conotoxina GVIA (1 μM) para bloquear los canales de Ca²⁺ de tipo L y N, respectivamente, y quedarnos así, con los únicos canales modulables: los Ca_v2.1.

En estas condiciones, la muscarina redujo la corriente mediada por los canales de Ca²⁺ (que corresponden al canal de tipo P/Q) en un 14 ± 2 % (fig. 12A; n=18, P<0.0001). Este efecto fue reversible.

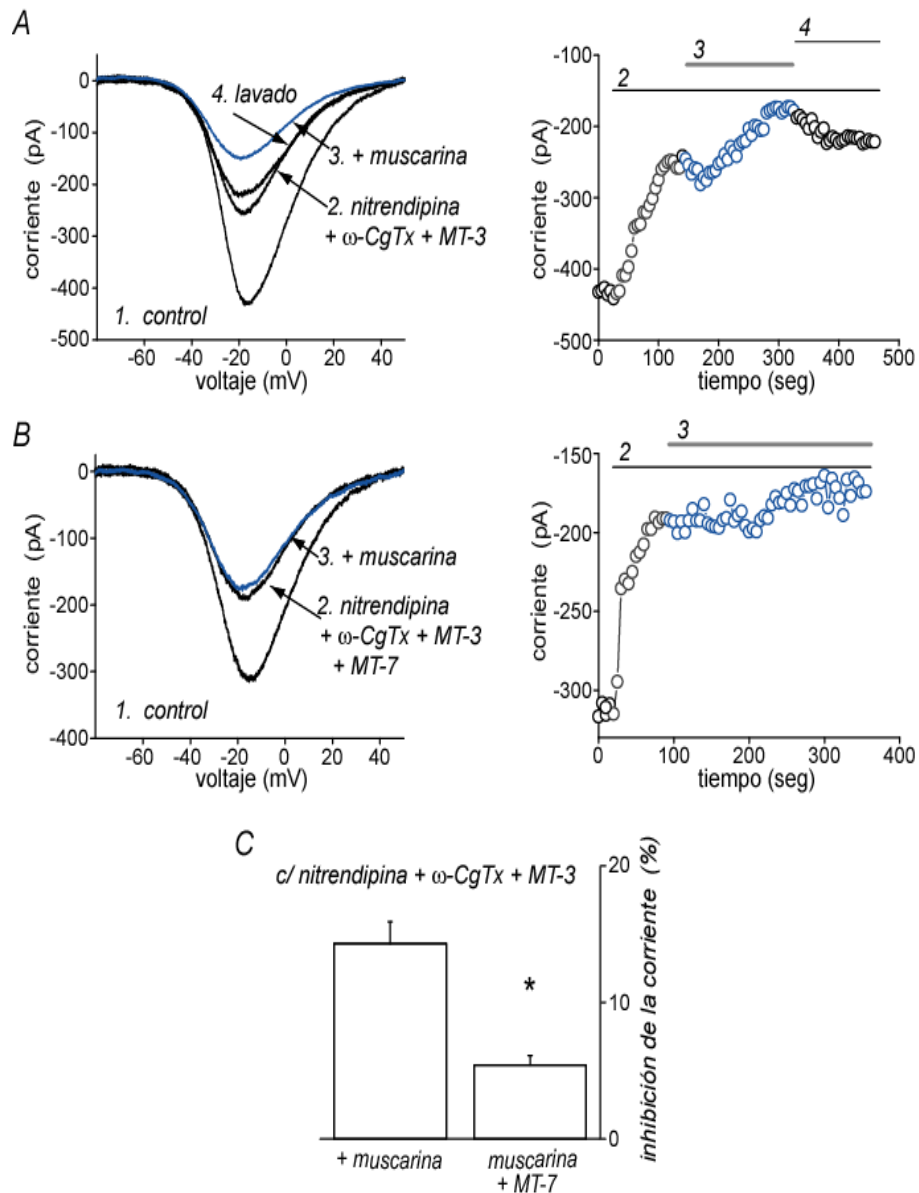


Figura 12. La inhibición muscarínica del canal $Ca_v2.1$ es reversible y mediada por el receptor muscarínico de tipo M_1 . En estos y los siguientes experimentos, se utilizaron los fármacos nitrendipina y ω -conotoxina-GVIA para bloquear los canales Ca_v1 y $Ca_v2.2$ respectivamente, así como MT-3 para antagonizar al receptor muscarínico de tipo M_4 . A) En estas condiciones, la muscarina inhibe reversiblemente la corriente de Ba^{2+} mediada por el canal $Ca_v2.1$. B) El efecto muscarínico sobre este canal se ve bloqueado en presencia del antagonista del receptor M_1 con MT-7. A la derecha pueden observarse los cursos temporales de ambos experimentos. C) Resumen de todas las muestras experimentales; los datos son presentados como media \pm E.E.M.

Para verificar que este efecto se debe únicamente a la activación del mACh-R de tipo M_1 utilizamos la toxina muscarínica 7 (MT-7, 50 nM) para antagonizar de manera específica al receptor muscarínico de tipo M_1 . En presencia de este fármaco, la muscarina no fue capaz de reducir las corrientes de Ba^{2+} mediadas por

el canal P/Q; en este caso, la modulación muscarínica fue de 5 ± 0.7 % (fig. 12B; mediana= 5.6 %, $n= 3$, $p<0.5$).

6.9 La PLC está involucrada en la modulación muscarínica del canal $Ca_v2.1$.

A continuación, investigamos la participación de la fosfolipasa C (PLC) en esta modulación. Para ello, incubamos las células con el inhibidor de la PLC, U73122 (10 μ M). En estas circunstancias, la inhibición muscarínica de la corriente se redujo a un 7 ± 1.9 % (fig. 13A; mediana=7 %, $n=7$; $P<0.05$), lo cual indica que la modulación es mediada por un mecanismo regulado por PLC.

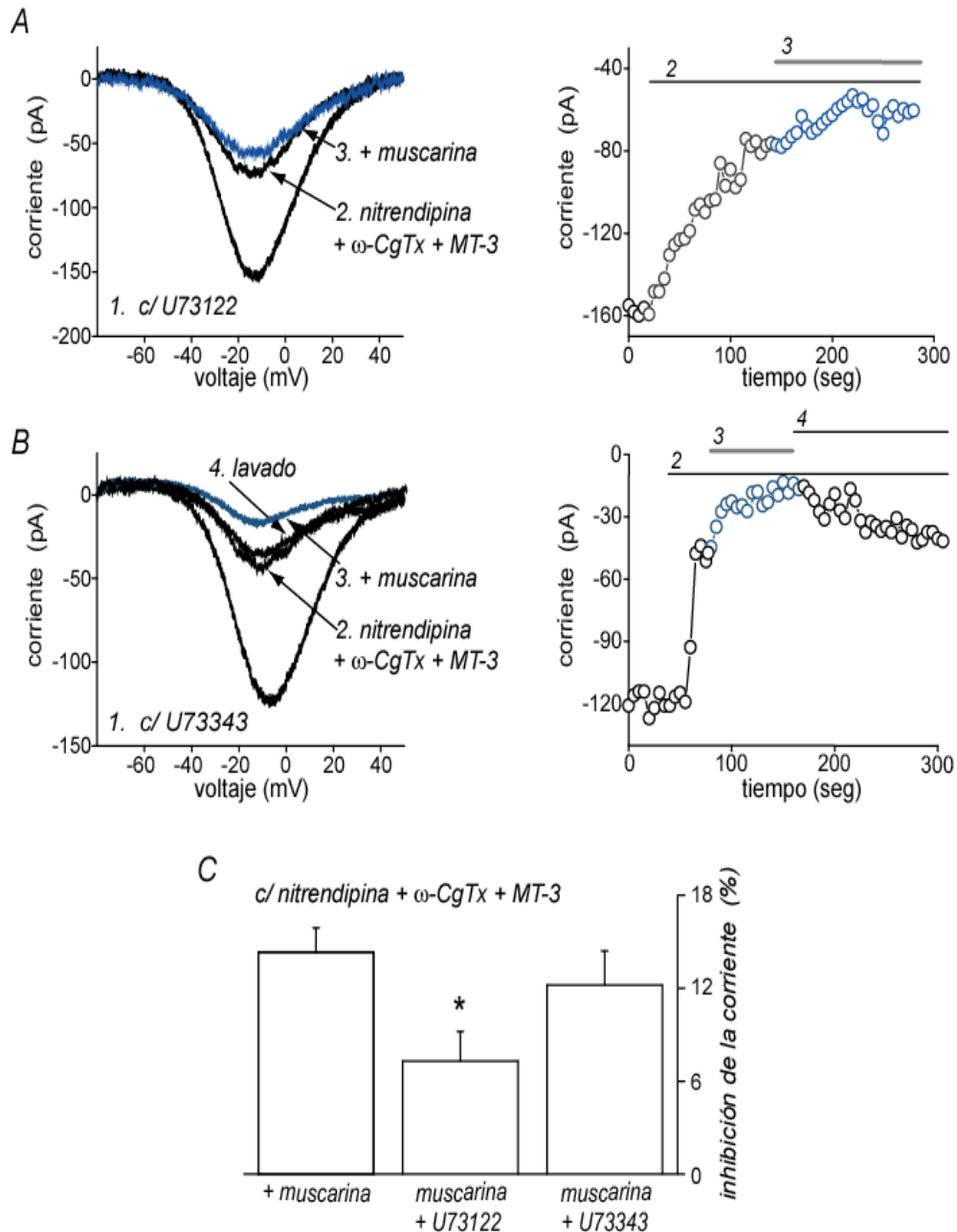


Figura 13. Las acciones de la PLC son necesarias para llevar a cabo la modulación muscarínica del canal $Ca_v2.1$. A) El inhibidor de PLC, U73122, es capaz de bloquear la inhibición del canal $Ca_v2.1$ mediada por el receptor M_1 . B) En presencia del análogo inactivo de U73122 (U73343) la modulación muscarínica del canal es similar a la encontrada en condiciones control. A la derecha pueden observarse los cursos temporales de ambos experimentos. C) Resumen de las muestras experimentales; los datos son presentados como media \pm E.E.M.

Con el objeto de descartar la posibilidad de que este efecto se deba a efectos inespecíficos del fármaco U73122 utilizamos el análogo inactivo de éste (U73343, 10 μ M) como control negativo. En presencia de este análogo la muscarina tuvo un efecto similar al encontrado en condiciones control: 12 ± 2 % (fig. 13B;

mediana= 14 %, $n=6$, NS). El efecto de la muscarina sobre la corriente fue reversible.

6.10 La reversión de la inhibición muscarínica del canal $Ca_v2.1$ requiere de la síntesis de fosfoinosítidos a través de PI-4K y de PI-3K.

La PLC β se encarga de hidrolizar el PI(4,5)P₂ de la membrana, y otros fosfoinosítidos. Esta hidrólisis, puede generar la formación de segundos mensajeros tales como el DAG y el IP₃, que a su vez, pueden activar a la PKC, a la PP-2B y otras proteínas y quinasas, como por ejemplo a la calmodulina y la Ca-calmodulina quinasa II, es decir, que la cascada de señalización iniciada con la activación de la PLC, tiene múltiples ramas. En los resultados encontrados en la primera parte de este proyecto y descritos previamente, la modulación del canal $Ca_v2.1$ no involucra ni a la PKC, ni a la PP-2B. Pero como sí involucra a la PLC, debemos averiguar, cuál de las ramas de la cascada de señalización es la encargada.

Así que, si la PLC β se encuentra involucrada en el proceso de modulación sin involucrar la vía canónica, la primera rama de la cascada para ser probada debe ser la que está al comienzo de la misma: la hidrólisis de fosfoinosítidos (principalmente el PI(4,5)P₂) *per se*. Para tratar de tener evidencias de este proceso, en los siguientes experimentos decidimos averiguar si los inhibidores de las quinasas lipídicas que llevan a la síntesis del PI(4,5)P₂, tales como la PI-3K y la PI-4K, son capaces de impedir la reversibilidad de la modulación, que como vimos en las figuras 12A y 13B, es rápidamente alcanzada después de lavar el agonista. En otras palabras, hay que comprobar que la recuperación de la corriente depende de la resíntesis del fosfoinosítido previamente hidrolizado por la PLC (Suh y Hille, 2002; Gamper et al., 2004; Shen et al., 2005).

Primero utilizamos el inhibidor de quinasas lipídicas, wortmanina (50 μ M) , para inhibir ambas quinasas: la PI-3K y la PI-4K impidiendo así la resíntesis: PI(3)P > PI(3,4)P₂ > PI (4,5)P₂ > PI(3,4,5)P₃ (Eyster, 2007). Encontramos que, efectivamente, la aplicación de wortmanina evita la recuperación de la corriente cuando se lava el agonista (fig. 14A; $n=7$). De hecho, la modulación muscarínica de la corriente aumentó en presencia de wortmanina de 14 ± 2 % (en condición control) a 27 ± 3 % (mediana=26 %; $P < 0.05$).

Después utilizamos un inhibidor específico de la PI-3K: LY294002 (10 μ M) para indagar el tipo de fosfoinosítido que requiere ser sintetizado para recuperar la corriente. La inhibición de la PI-3K evitó la recuperación de la corriente en $n = 8$ de 12 neuronas probadas. Hubo recuperación parcial de la modulación muscarínica en 4 neuronas de la muestra; así, las células que presentaron esta recuperación parcial lograron recuperar 37 ± 7 % de la modulación muscarínica total (fig. 14B; mediana= 40.5 %; $n=4$), las células restantes no presentaron ninguna recuperación (fig. 14C; $n= 8$) La inhibición muscarínica durante el bloqueo de la PI-3K de 24 ± 4 % (mediana= 21 %; $n=12$; $P<0.05$ respecto de la inhibición producida por muscarina solamente). Esto sugiere que en la modulación muscarínica del canal P/Q pueden participar de manera parcial alguna forma 3 de los fosfoinosítidos, probablemente PI(3,4,5)P₃, puesto que como mencionamos en la introducción su precursor es el PI(4,5)P₂ y al hidrolizarse este último reduce también los niveles de PI(3,4,5)P₃, además, algunos trabajos recientes aportan evidencia de que este fosfoinosítido también puede modular algunos canales iónicos.

Para asegurarnos de que el efecto sea específico utilizamos el análogo inactivo LY303511 (10 μ M) como control negativo. En presencia de este análogo la muscarina tuvo un efecto similar al encontrado en condiciones control: 11 ± 1.7 %

(mediana= 10.6 %, $n=3$). Note la reversibilidad de la modulación cada vez que se lava el agonista (fig. 14D).

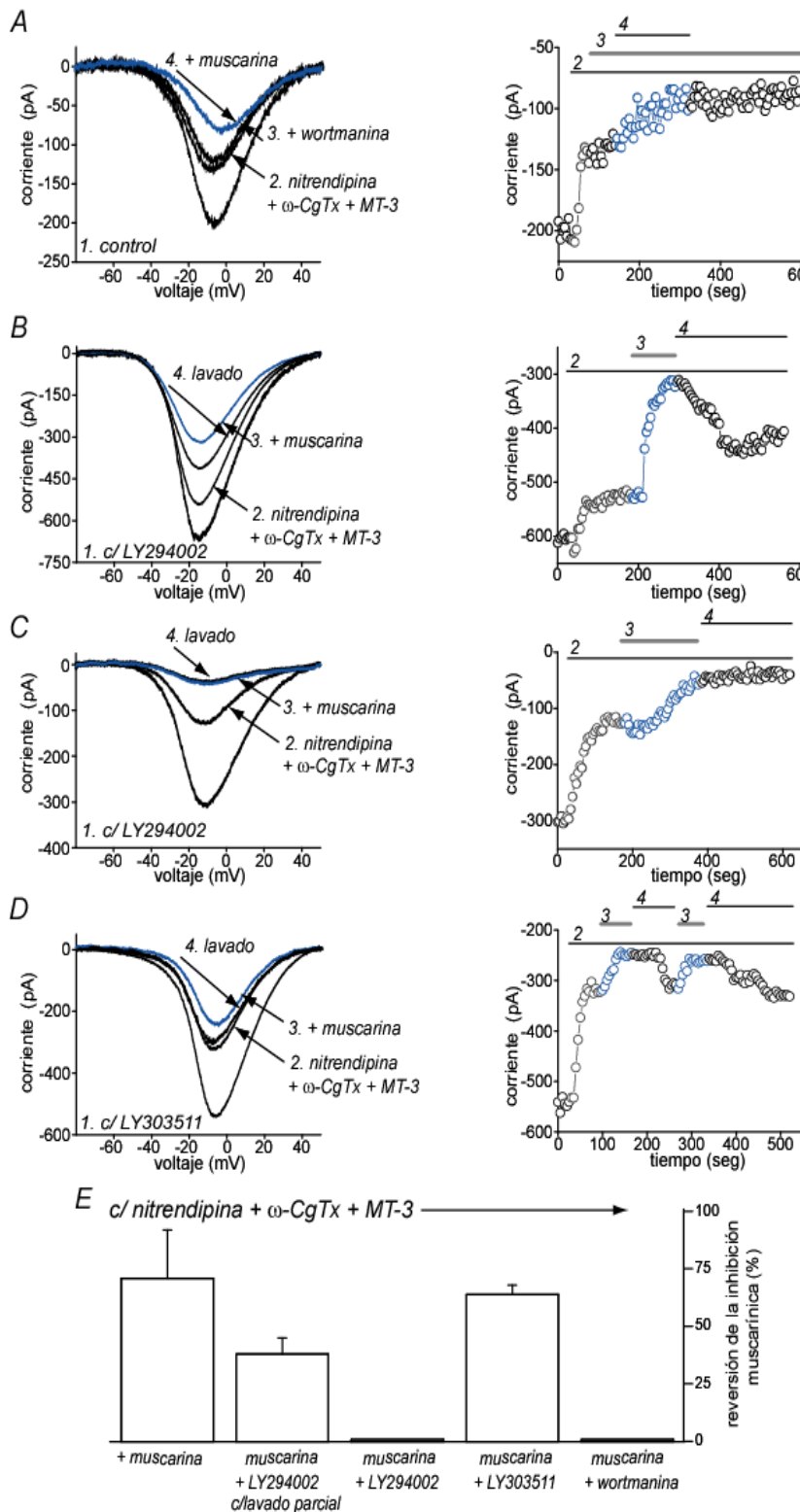


Figura 14. La reversión de la inhibición muscarínica requiere de la síntesis de PI(4,5)P₂ y un fosfoinosítido de la forma 3 (probablemente el PI(3,4,5)P₃).

A) En presencia de wortmanina para inhibir la PI-3K y la PI-4K, los efectos muscarínicos mediados por la activación del receptor M₁ sobre el canal Ca_v2.1 ya no se revierten.

B-C) Al inhibir la PI-3K con LY294002 algunas células recuperan la corriente cuando se lava el agonista (B) y otras no (C).

D) El análogo inactivo del inhibidor permite la reversión de la inhibición muscarínica cada vez que ésta se lava.

E) Reversión de la acción muscarínica en presencia y en ausencia de los inhibidores de las quinzas de fosfolípidos.

6.11 PI(4,5)P₂ y PI(3,4,5)P₃ son mediadores principales de la modulación muscarínica del canal Ca_v2.1 en las neuronas neostriatales de proyección.

Si la hidrólisis de fosfoinosítidos mediada por las acciones de PLC β modula al canal Ca_v2.1 quiere decir que la disminución de estos lípidos de membrana alrededor del canal es la causa del decremento de la corriente; acaso debido a una disminución en su probabilidad de apertura (para una revisión en extenso de este tema ver Suh y Hille, 2005; Huang, 2007).

Por lo tanto, la modulación debe ser bloqueada si por la pipeta de registro suministramos cantidades suficientes de PI(4,5)P₂ (10 μ M) al interior celular de forma que la hidrólisis por PLC no disminuya la concentración del mensajero y el canal mantenga su conductancia. Este fue el caso: se abolió la modulación muscarínica del canal Ca_v2.1 en presencia del fosfolípido en 6 de 9 neuronas probadas: 2.4 ± 1.6 % (mediana=2.5, $n=6$, $p \leq 0.003$, U de Mann Whitney, fig. 15A). Lo cual corrobora nuestra hipótesis.

A continuación, decidimos probar también el efecto de otro fosfolípido de membrana presente en la proximidad del canal: el PI(3,4,5)P₃, también introducido al medio intracelular por medio de la pipeta de registro (e.g., Le Blanc et al., 2004; Pochynyuk et al., 2007). Para nuestra sorpresa, cuando el PI(3,4,5)P₃ fue suministrado al interior de la neuronas la muscarina produjo un incremento de la corriente de 24 ± 6 % (fig. 15B; mediana= 17, $n=5$, $P < 0.001$) en 5 de 8 células probadas. En otras palabras, la concentración de fosfolípidos de membrana definitivamente favorece la conductividad del canal. En las neuronas restantes, una no respondió al agonista y dos neuronas mostraron inhibición de 14 ± 2 %; similar a la control, por lo que o bien, el mensajero no se dializó correctamente o bien existe

una población celular que no se modula por PI(3,4,5)P₃, pues como vimos arriba, en unos casos la inhibición de la PI-3K (LY294002) no impide la recuperación de la corriente al lavar el agonista. Sin embargo, como la wortmanina si bloqueó la modulación en todos los casos, los experimentos sugieren que se necesita de más de un tipo de fosfolípido para que el canal permanezca totalmente disponible (*willing*).

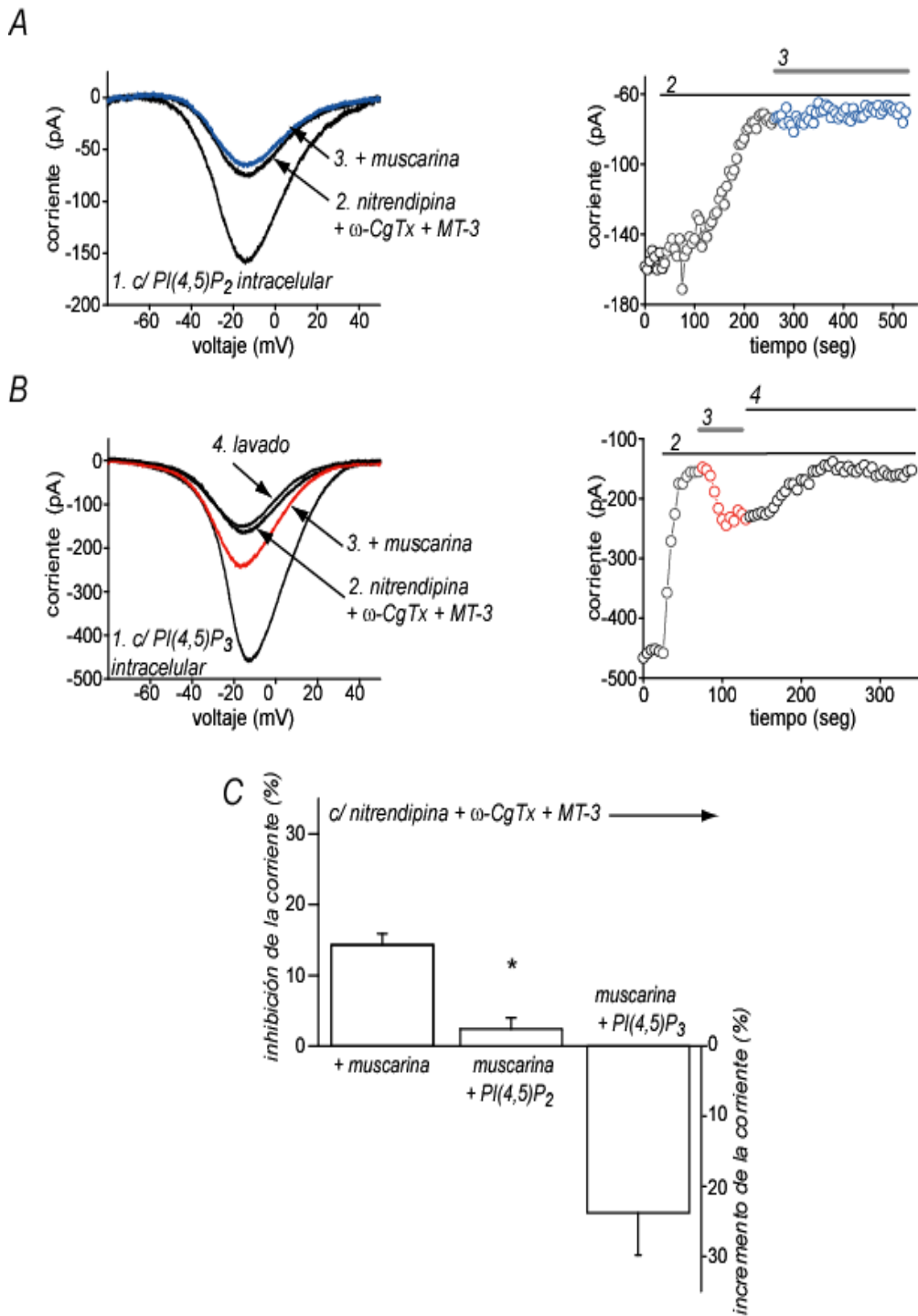


Figura 15. Los fofolípidos de membrana PI(4,5)P₂ y PI(3,4,5)P₃ son necesarios para que el canal Ca_v2.1 mantenga su conductividad óptima.

A) PI(4,5)P₂ suministrado intracelularmente abole el efecto de la muscarina sobre el canal Ca_v2.1 en la mayor parte de las células. B) PI(3,4,5)P₃ suministrado intracelularmente provoca un incremento de la corriente cuando el agonista muscarínico es aplicado; este incremento es reversible. A la derecha pueden observarse los cursos temporales de ambos experimentos C) Histograma que resume estos experimentos.

Los resultados anteriores abren la posibilidad de que la activación del receptor muscarínico M₁ no sólo reduzca la corriente de calcio sino también que la

aumente dependiendo de la abundancia de determinados fosfolípidos de membrana en la cercanía del canal. En todo caso, obtuvimos evidencia convincente de que estos lípidos controlan la disponibilidad del canal y que su hidrólisis debida a la activación del receptor lleva a la reducción de la corriente. Esta hidrólisis, es por tanto, un mecanismo de señalización y control.

7. DISCUSIÓN

La activación de los mACh-R produce importantes acciones sobre los canales iónicos dependientes de voltaje en las neuronas estriatales. En la presente tesis nos enfocamos a las acciones sobre los canales de calcio, vitales para el control de la excitabilidad de estas neuronas (Galarraga et al., 1989; Bargas et al., 1994; Pérez-Garci et al., 2003; Perez-Rosello et al., 2005; Salgado et al., 2005). Nos restringimos a estudiar las acciones de uno de los receptores presentes en estas neuronas, los de la clase M_1 . El otro receptor expresado en las mismas, el M_4 , aguarda un estudio por separado. Además, las interneuronas del circuito poseen otros receptores más, de suerte que todos los receptores muscarínicos, del M_1 al M_5 se encuentran en este circuito. Por último, otros autores han descrito las acciones del receptor M_1 sobre las corrientes salientes de K^+ (Galarraga et al., 1999; Shen et al., 2007) y entrantes de Na^+ (Carrillo-Reid et al., en prensa). En conjunto, es fácil de ver que dilucidar las acciones de un transmisor modulador en una sola neurona es harto complicado, pues la modificación simultánea de muchos canales produce, en la práctica, otra neurona funcionalmente hablando, con otra manera de procesar las entradas y de responder e integrar. Los efectos finales no son intuitivos y se requiere del trabajo paralelo con modelación matemática.

Pero dilucidar lo que sucede en el circuito, es un reto aún mayor. El trabajo apenas comienza para la mayor parte de los transmisores moduladores activadores de receptores de siete dominios transmembranales. En particular, asociar las cascadas de señalización con acciones electrofisiológicas específicas es una línea de investigación que apenas empieza, y como ya se mencionó, de nada sirve generalizar lo hallado en un tipo neuronal a los demás. Queda pues, mucho trabajo por delante, pero se espera que del resultado de este trabajo y de futuras investigaciones surja finalmente, no sólo el mejor entendimiento de los circuitos, sino también nueva farmacología y terapéutica.

Nuestra contribución en la presente tesis consistió en esclarecer los mecanismos por los cuales los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje expresados en las neuronas estriatales de proyección, son modulados cuando el receptor muscarínico M_1 es activado.

Demostramos que la activación de este receptor reduce la entrada de Ca^{2+} mediada por los canales de los tipos Ca_v1 (L), $\text{Ca}_v2.1$ (P/Q) y $\text{Ca}_v2.2$ (N) (ver también Perez-Rosello et al., 2005). En ningún caso la modulación fue delimitada a membrana. De acuerdo a la literatura, este tipo de modulación es más frecuente para los receptores de la clase M_2 (Beech et al., 1992; Howe y Surmeier, 1995; Yan and Surmeier, 1996; Nathanson, 2000; Liu y Rittenhouse, 2003a; Ding et al., 2006; Tedford y Zamponi, 2006). También demostramos que el canal $\text{Ca}_v2.3$ (R), no es modulado por la activación del receptor M_1 .

De los canales modulados, los tipos Ca_v1 y $\text{Ca}_v2.2$ resultaron ser regulados a través de la vía canónica de señalización que cuenta con más datos bioquímicos y de biología molecular en la literatura: la vía $M_1/\text{G}_{q/11}/\text{PLC}/\text{DAG}/\text{IP}_3/\text{Ca}^{2+}/\text{PKC}$ (Hammond et al., 1987; Doerner and Alger, 1992; Yang and Tsien, 1993; Pemberton

and Jones, 1997; Yamada et al., 1999; Kamatchi et al., 2003; Michel et al., 2005; Tai et al., 2006). Es alentador encontrar esta relación entre la excitabilidad neuronal y una vía tan conocida. De acuerdo a lo que sabemos, antes del presente trabajo se tenían datos en neuronas periféricas y sistemas de expresión (Rinne et al, 1989; Pemberton y Jones, 1997; Zhu y Yakel, 1997; Yamada et al, 1999; Sculptoreanu et al, 2001; Kamatchi et al, 2003; Bannister et al, 2004). Sin embargo, las correlaciones, parciales, en neuronas centrales son escasas (Doerner y Alger, 1992; Michel et al., 2005; Tai et al., 2006; Salgado et al., 2007). Además, la mayor parte de los trabajos describen la modulación de una corriente pero sin buscar el correlato con la excitabilidad, la liberación de transmisores o alguna evidencia del posible significado funcional de la modulación.

Así, la subunidad $\alpha 1$ de los canales $Ca_v1.2$ expresada en ovocitos de *Xenopus* que genera corriente de calcio, es inhibida por la PKC, al fosforilarse dos residuos de treonina en los sitios 27 y 31 en el extremo N-terminal (Catterall, 2000; McHugh et al., 2000). Pero muchos otros sitios consenso de fosforilación por PKC, PKA y CamKII, entre otras quinasas, han sido hallados tanto para la subunidad $\alpha 1$ como para la β del canal $Ca_v1.2$ (Jahn et al., 1988; Catterall, 2000). También se sabe que la PKC puede revertir la inhibición delimitada a membrana de los canales $Ca_v2.1$ y $Ca_v2.2$ (Herlitz et al., 2001). Al parecer, esto se debe a que el lazo intracelular que une los dominios I y II de la subunidad $\alpha 1$ posee el sitio de unión con la subunidad $\beta\gamma$ de la proteína G (que media la inhibición delimitada a membrana) y, al mismo tiempo, es un sitio consenso para fosforilación por PKC, es decir, la fosforilación y la subunidad $\beta\gamma$ compiten (Zamponi et al., 1997). Por eso fue una sorpresa encontrar en este trabajo que los canales $Ca_v2.1$ de las neuronas estriatales no son modulados por PKC cuando el receptor M_1 es activado (Perez-

Burgos et al., 2008), sino que por lo contrario, es la hidrólisis de fosfoinosítidos de membrana la que hace la tarea. ¿Cuántas otras sorpresas nos esperan? La esperanza de encontrar fármacos específicos para modular el mismo canal en distintas neuronas queda como una posibilidad abierta.

El hecho de que un solo receptor (M_1) module al mismo tiempo 3 diferentes canales de calcio mediante ramas diferentes de la misma cascada que arranca con la actividad de la PLC requiere de reflexión. Ya no sólo queremos saber por qué la célula requiere de una diversidad de canales de calcio sino además debemos explicar por qué se modulan de manera diferente: ¿ahorro de energía?, ¿diversos cursos temporales?, ¿diversas funciones para cada canal?, ¿distinta localización en la membrana?

La activación de los receptores a dopamina de las familias D_2 y D_1 regulan los mismos canales, pero sobretodo los Ca_v1 , a través de la activación de la fosfatasa 2B (calcineurina). Así, la activación del receptor D_2 , activa la misma cascada de señalización, aunque lo hace mediante una proteína $G_{i/o}$. Sin embargo, la rama utilizada es diferente: PP-2B. De todas formas, todo comienza con la actividad de la PLC (Hernandez-Lopez et al., 2000; Ma et al., en prensa). ¿Cómo es que cada transmisor “escoge” una rama diferente de la cascada? ¿Será un mecanismo de sinergismo? Como se ve, de los nuevos hallazgos surgen más preguntas que las que se quisieron responder en un principio. Lo que sugiere que un mismo canal, e.g., el Ca_v1 puede ser modulado en el mismo tipo celular por mecanismos de fosforilación y defosforilación que involucran quinasas y fosfatasas. Pero la neurona posee sinapsis colinérgicas y dopaminérgicas, ¿cómo se hace selectiva la regulación? ¿se debe a microdominios alrededor de sinapsis específicas?. Así, en las NEMs se ha propuesto que el extremo C-terminal del canal

de Ca^{2+} $\text{Ca}_v1.3$ posee dominios de unión PDZ y SH3 que unen a la proteína de andamiaje Shank. Esta a su vez interactúa con proteínas HOMER capaces de formar un complejo de señalización que permite al receptor M_1 mantenerse cerca de los sitios de liberación de Ca^{2+} activada por los receptores a IP_3 . Ambos DAG y Ca^{2+} se requieren para activar PKC. Sin embargo, lo anterior parece ser un mecanismo específico de modulación para el canal $\text{Ca}_v1.3$ y no para el $\text{Ca}_v1.2$ (los tipos de canal Ca_v1 que expresan estas células; Olson et al., 2005).

Por otra parte, las NEMs expresan los receptores muscarínicos M_1 y M_4 . El primero expresado en prácticamente todas las neuronas de proyección, mientras que el segundo se expresa preferencialmente en neuronas de la vía directa. El receptor M_3 se encuentra en una pequeña proporción de las neuronas de proyección, mientras que casi ninguna célula de este tipo neuronal posee mRNA para el receptor M_2 (Santiago y Potter, 2001; Yan et al., 2001). Para descartar las acciones M_3 en nuestra muestra experimental utilizamos una mezcla de los antagonistas específicos para los receptores M_1 (MT-7) y M_4 (MT-3). En estas condiciones, toda modulación muscarínica fue abolida.

Ahora bien, los canales de calcio expresados en las NEM sí se encargan de funciones diferentes: Así, los canales los $\text{Ca}_v2.1$ y $\text{Ca}_v2.2$ median la liberación de GABA de sus terminales (Tecuapetla et al., 2005), los $\text{Ca}_v2.2$ lo hacen durante el desarrollo y los $\text{Ca}_v2.1$ en la neurona adulta (Salgado et al., 2005). Es lógico entonces haber encontrado que los receptores M_1 reducen la liberación de GABA en las terminales de estas neuronas (Perez-Rosello et al., 2005).

Como la hidrólisis de fosfoinosítidos de membrana acontece más rápido que la activación de PKC, se podría argüir que este mecanismo es un nuevo tipo de “modulación delimitada a membrana”. Si el canal modulado es el que media la

liberación de GABA, he aquí que las terminales sinápticas pueden cambiar sus propiedades funcionales en muy corto plazo sin que esto signifique un gran aumento en la concentración de Ca^{2+} mediada por IP_3 . Se sabe, que los activadores de PKC aumentan la liberación de transmisor. Así que tiene lógica desechar a la PKC si lo que queremos es controlar, mediante inhibición presináptica, la salida del transmisor.

Por otra parte, se necesita de la inhibición de cualquiera de los canales, el $\text{Ca}_v2.1$ o el $\text{Ca}_v2.2$ para reducir la entrada de calcio de manera suficiente como para reducir la generación de las corrientes de K^+ -activadas por Ca^{2+} . Esto reduce la amplitud del PPH, acorta el intervalo entre las espigas y aumenta la frecuencia de disparo ante un mismo estímulo (Vichis et al., 2000; Perez-Garci et al., 2003; Perez-Rosello et al., 2005). Así, la disminución de las corrientes entrantes de Ca^{2+} desembocan en un aumento de la excitabilidad postsináptica. Si a esto le agregamos la inhibición de la corriente KCNQ (M) (Shen et al., 2007), la facilitación de una corriente de Na^+ persistente (Carrillo-Reid et al., en prensa), y la facilitación de la corriente sináptica producida por el receptor-canal NMDA (Calabresi et al., 1998), vemos por qué las acciones colinérgicas sobre estas neuronas son tremendamente excitadoras. Así, durante la hipercolinergia presente en el parkinsonismo (Ding et al., 2006; Pisani et al., 2007), las neuronas estriatales tienen aumentada su actividad de manera exagerada, explicando el temblor y la rigidez (Day et al., 2006; Shen et al., 2007). Por lo menos para la acción directamente asociada con los canales de calcio, la generación de PPH, demostramos que puede ser abolida inhibiendo a la PKC (Perez-Burgos et al., 2008), bloqueando sólo uno de los canales de calcio (Perez-Garci et al., 2003), el $\text{Ca}_v2.2$, lo que reduciría la excitabilidad sin afectar la función sináptica. Esto es, la diversidad de mecanismos

de control sobre los canales de calcio permite de alguna forma disociar las funciones neuronales: disparo y liberación de transmisor.

Recordemos que la membrana somatodendrítica de la neurona se encuentra en el estriado, mientras que la mayor parte de sus terminales se encuentran en los núcleos blanco (GPi, SNr, GPe) y que estos diferentes núcleos reciben innervación colinérgica de fuentes diversas a la fuente estriatal (la interneurona colinérgica). Es por tanto, perfectamente posible la modulación diferencial de la excitabilidad postsináptica del control presináptico de la liberación.

Pero, ¿si la ACh aumentara en ambos lados, pre- y post-sinapsis?; sabemos que algunas terminales se quedan en el estriado formando colaterales axónicas. Habría un incremento en la frecuencia de disparo y al mismo tiempo una tendencia a disminuir la liberación de neurotransmisor. ¿Para qué querría la célula algo así? De hecho, durante la hipercolinergia del parkinsonismo (Ding et al., 2006; Pisani et al., 2007) se observa justamente eso: un aumento en la excitabilidad neuronal (ver arriba) acompañado de un debilitamiento de la fuerza sináptica entre las neuronas estriatales (Taverna et al., 2008). Pero sin llegar a los extremos patológicos, es posible que variaciones finas de ambos parámetros permitan ajustar la sincronía neuronal del microcircuito durante la realización de tareas específicas (Carrillo-Reid et al., 2009).

Por otro lado, la modulación de canales iónicos a través de los niveles de fosfolípidos de membrana es un campo emergente que cada vez proporciona más segundos mensajeros: PI(4,5)P₂ y PI(3,4,5)P₃ (McLaughling y Murray, 2005; Suh y Hille, 2005, 2008; Huang, 2007). Se han descrito al menos una docena de canales iónicos regulados por la depleción de PI(4,5)P₂ (Huang, 2007; Suh y Hille, 2008). Ejemplos de modulación de canales iónicos por PI(3,4,5)P₃ empiezan a surgir (Le

Blanc et al., 2004; Zhainazarov et al., 2004; Pochynyuk et al., 2008; Vaithianathan et al., 2008). Sin embargo, antes de realizar los experimentos de este proyecto habían muy pocos trabajos describiendo la regulación de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje mediante la hidrólisis de fosfolípidos en neuronas (Wu et al., 2002; Gamper et al., 2004). Ninguno de los mismos estaba realizado en neuronas cerebrales. De manera similar, nótese que antes del presente trabajo no había ninguna evidencia del papel de $\text{PI}(3,4,5)\text{P}_3$ en neuronas de ningún tipo, y menos por acción de los mACh-R. El único reporte previo describía el fenómeno en canales de Ca^{2+} cardiacos (Le Blanc et al., 2004).

Como se puede inferir por las referencias, esta tesis forma parte de un proyecto de investigación de largo aliento acerca del papel de la acetil-colina y los receptores muscarínicos en el microcircuito estriatal normal y patológico. Como se puede ver también, la comprensión completa de las acciones colinérgicas en el microcircuito es probable que consuma el trabajo de varios laboratorios y las vidas de varios científicos. Pero algo es seguro, antes de dilucidar estas acciones, todas las interpretaciones conductuales (e.g., memoria) y fisiopatológicas (enfermedades de Parkinson, de Alzheimer, etc.) de las mismas, sólo pueden basarse en hipótesis empíricas, lo mismo que la terapéutica.

BIBLIOGRAFÍA

Adem A, Karlsson E (1997) Muscarinic receptor subtype selective toxins. *Life Sci* 60:1069-1076.

Albin RL, Young AB, Penney JB (1995) The functional anatomy of disorders of the basal ganglia. *Trends Neurosci* 18:63-64.

Arikkath J, Campbell KP (2003) Auxiliary subunits: essential components of the voltage-gated calcium channel complex. *Curr Opin Neurobiol* 13:298-307.

Bargas J, Galarraga E, Aceves J (1989) An early outward conductance modulates the firing latency and frequency of neostriatal neurons of the rat brain. *Exp Brain Res* 75:146-156.

Bargas J, Howe A, Eberwine J, Cao Y, Surmeier DJ (1994) Cellular and molecular characterization of Ca²⁺ currents in acutely isolated, adult rat neostriatal neurons. *J Neurosci* 14:6667-6686.

Beech DJ, Brnheim L, Hille B (1992) Pertussis toxin and voltage dependence distinguish multiple pathways modulating calcium channels of rat sympathetic neurons. *Neuron* 8:97-106.

Beech DJ, Bernheim L, Mathie A, Hille B (1991) Intracellular Ca²⁺ buffers disrupt muscarinic suppression of Ca²⁺ current and M current in rat sympathetic neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:652-656.

Bennet BD, Wilson CJ (2000) Synaptology and physiology of neostriatal neurons. In: *Brain dynamics and striatal complex* (Miller R, Wickens JR, eds), pp 11-140. Amsterdam: Harwood Academic Publishers.

Bernheim L, Mathie A, Hille B (1992) Characterization of muscarinic receptor subtypes inhibiting Ca²⁺ current and M current in rat sympathetic neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:9544-9548.

Blair, RJ (2003) Neurobiological basis of psychopathy. *Br J Psychiatry* 182:5-7.

Bolam JP, Hanley JJ, Booth PA, Bevan MD (2000) Synaptic organisation of the basal ganglia. *J Anat* 196:527-542.

Boland LM, Allen AC, Dingledine R (1991) [Inhibition by bradykinin of voltage-activated barium current in a rat dorsal root ganglion cell line: role of protein kinase C.](#) *J Neurosci* 11:1140-1149.

Bradley KN (2000) Muscarinic toxins from the green mamba. *Pharmacol Ther* 85:87-109.

Brody DL, Patil PG, Mulle JG, Snutch TP, Yue DT (1997) Bursts of action potential waveforms relieve G-protein inhibition of recombinant P/Q-type Ca²⁺ channels in HEK 293 cells. *J Physiol* 499.3:637-644.

Brown DA, Hughes SA, Marsh SJ, Tinker A (2007) Regulation of M(Kv7.2/7.3) channels in neurons by PIP2 and products of PIP2 hydrolysis: significance for receptor-mediated inhibition. *J Physiol* 582.3:917-925.

Brown DA, Sihra TS (2008) Presynaptic signaling by heterotrimeric G-proteins. *Handb Exp Pharmacol* 184:207-60.

Calabresi P, Centonze D, Gubellini P, Pisani A, Bernardi G (1998) Endogenous ACh enhances striatal NMDA-responses via M1-like muscarinic receptors and PKC activation. *Eur J Neurosci* 10:2887-2895.

Carrillo-Reid L, Tecuapetla F, Ibáñez-Sandoval O, Hernández-Cruz A, Galarraga E, Vargas J (2009) Activation of the cholinergic systems endows compositional properties to striatal cell assemblies. *J Neurophysiol* 101:737-749.

Carrillo-Reid L, Tecuapetla F, Vautrelle N, Hernández A, Vergara R, Galarraga E, Vargas J. Muscarinic enhancement of persistent sodium current synchronizes striatal medium spiny neurons. *J Neurophysiol*, en prensa.

Catterall WA (2000) Structure and regulation of voltage-gated Ca²⁺ channels. *Annu Rev Cell Dev Biol* 16:521-555.

Catterall WA, Few AP (2008) Calcium channel regulation and presynaptic plasticity. *Neuron* 59:882-901.

Catterall WA, Perez-Reyes E, Snutch TP, Striessnig J (2005) International Union of Pharmacology XLVIII. Nomenclature and structure-function relationships of Voltage-Gated Calcium Channels. *Pharmacol Rev* 57:411-425.

Caulfield MP (1993) Muscarinic receptors-characterization, coupling and function. *Pharmacol Ther* 58:319-379.

Clapham DE, Neer EJ (1997) G proteins $\beta\gamma$ subunits. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 37:167-203.

Day M, Wang Z, Ding J, An X, Ingham CA, Shering AF, Wokosin D, Ilijic E, Sun Z, Sampson AR, Mugnaini E, Deutch AY, Sesack SR, Arbuthnott GW, Surmeier DJ (2006) Selective elimination of glutamatergic synapses on striatopallidal neurons in Parkinson disease models. *Nat Neurosci* 9:251-259.

Delmas P, Abogadie FC, Dayrell M, Haley JE, Milligan G, Caulfield MP, Brown DA, Buckley NJ (1998) G-proteins and G-protein subunits mediating cholinergic inhibition of N-type calcium currents in sympathetic neurons. *Eur J Neurosci* 10:1654-1666.

Delmas P, Brown DA (2005) Pathways modulating neural KCNQ/M (Kv7) potassium channels. *Nature Rev* 6:850-862.

Ding J, Guzman JN, Tkatch T, Chen S, Goldberg JA, Ebert PJ, Levitt P, Wilson CJ, Hamm HE, Surmeier DJ (2006) RGS4-dependent attenuation of M4 autoreceptor

function in striatal cholinergic interneurons following dopamine depletion. *Nat Neurosci* 9:832-842.

Doering CJ, Zamponi GW (2003) Molecular pharmacology of high voltage-activated calcium channels. *J Bioenerg Biomembr* 35:491-505.

[Doerner D, Alger BE \(1992\)](#) Evidence for hippocampal calcium channel regulation by PKC based on comparison of diacylglycerols and phorbol esters. *Brain Res* 597:30-40.

Dolezal V, Tucek S (1999) Calcium channels involved in the inhibition of acetylcholine release by presynaptic muscarinic receptors in rat striatum. *Br J Pharmacol* 127:1627-32.

Dorn GW 2nd, Force T (2005) Protein kinase cascades in the regulation of cardiac hypertrophy. *J Clin Invest* 115:527-537.

Eyster KM (2007) The membrane and lipids as integral participants in signal transduction: lipid signal transduction for the non-lipid biochemist. *Adv Physiol Educ* 31:5-16.

Felder CC (1995) Muscarinic acetylcholine receptors: signal transduction through multiple effectors. *FASEB J* 9:619-625.

Figuroa A, Galarraga E, Bargas J (2002) Muscarinic receptors involved in the subthreshold cholinergic actions of neostriatal spiny neurons. *Synapse* 46:215-223.

Flores-Barrera E, Laville A, Plata V, Tapia D, Bargas J, Galarraga E (2009) Inhibitory Contribution to Suprathreshold Corticostriatal Responses: An Experimental and Modeling Study. *Cell Mol Neurobiol*, DOI:10.1007/s10571-009-9394-2.

Galarraga E, Bargas J, Sierra A, Aceves J (1989) The role of calcium in the repetitive firing of neostriatal neurons. *Exp Brain Res* 75:157-168.

Galarraga E, Hernandez-Lopez S, Reyes A, Miranda I, Bermudez-Rattoni F, Vilchis C, Bargas J (1999) Cholinergic modulation of neostriatal output: a functional antagonism between different types of muscarinic receptors. *J Neurosci* 19:3629-3638.

Galarraga E, Hernández-López S, Tapia D, Reyes A, Bargas J (1999) Action of substance P (neurokinin-1) receptor activation on rat neostriatal projection neurons. *Synapse* 33:26-35.

Gamper N, Reznikov V, Yamada Y, Yang J, Shapiro MS (2004) Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate signals underlie receptor-specific Gq/11-mediated modulation of N-type Ca²⁺ channels. *J Neurosci* 24:10980-10992.

Gerfen CR, Engber TM, Mahan LC, Susel Z, Chase TN, Monsma FJ, Jr., Sibley DR (1990) D1 and D2 dopamine receptor-regulated gene expression of striatonigral and striatopallidal neurons. *Science* 250:1429-1432.

Grillner S, Hellgren J, Ménard A, Saitoh K, Wikström MA (2005) Mechanisms for selection of basic motor programs-roles for the striatum and pallidum. *Trends Neurosci* 28:364-370.

Gu Q (2003) Contribution of acetylcholine to visual cortex plasticity. *Neurobiol Learn Mem* 80:291-301.

Hall KE, Browning MD, Dudek EM, Macdonald RL (1995) Enhancement of high threshold calcium currents in rat primary afferent neurons by constitutively active protein kinase C. *J Neurosci* 15:6069-6076.

Hammond C, Paupardin-Tritsch D, Nairn AC, Greengard P, Gerschenfeld HM (1987) Cholecystinin induces a decrease in Ca^{2+} current in snail neurons that appears to be mediated by protein kinase C. *Nature* 325:809-811.

Harvey AL, Bradley KN, Cochran SA, Rowan EG, Pratt JA, Quillfeldt JA, Jerusalinsky DA (1998) What can toxins tell us for drug discovery? *Toxicon* 36:1635-1640.

Herlitze S, Zhong H, Scheuer T, Catterall WA (2001) Allosteric modulation of Ca^{2+} channels by G proteins, voltage-dependent facilitation, protein kinase C, and $Ca(v)$ beta subunits. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:4699-4704.

Hernandez-Lopez S, Bargas J, Surmeier DJ, Reyes A, Galarraga E (1997) D1 receptor activation enhances evoked discharge in neostriatal medium spiny neurons by modulating an L-type Ca^{2+} conductance. *J Neurosci* 17:3334-3342.

Hernandez-Lopez S, Tkatch T, Perez-Garci E, Galarraga E, Bargas J, Hamm H, Surmeier DJ (2000) D2 dopamine receptors in striatal medium spiny neurons reduce L-type Ca^{2+} currents and excitability via a novel $PLC\beta_1$ - IP_3 -calcineurin-signaling cascade. *J Neurosci* 20:8987-8995.

Hildebrand ME, David LS, Hamid J, Mulatz K, Garcia E, Zamponi GW, Snutch TP (2007) Selective inhibition of Cav3.3 T-type calcium channels by $G\alpha_q/11$ -coupled muscarinic acetylcholine receptors. *J Biol Chem* 282:21043-21055.

Hille B (1994) Modulation of ion-channel function by G-protein-coupled receptors. *TINS* 17:531-536.

Hille B (2001) Modulation, slow synaptic action, and second messengers. In: *Ion channels of excitable membranes*, 3rd ed. (Sinauer), pp. 201-236 Sunderland.

Howe AR, Surmeier DJ (1995) Muscarinic receptors modulate N-, P-, and L-type Ca^{2+} currents in rat striatal neurons through parallel pathways. *J Neurosci* 15:458-469.

Huang CL (2007) Complex roles of PIP2 in the regulation of ion channels and transporters. *Am J Physiol Renal Physiol* 293:1761-1765.

Hulme EC (1990) Muscarinic acetylcholine receptors: typical G-coupled receptors. *Symp Soc Exp Biol* 44:39-54.

Ince E, Ciliax BJ, Levey AI (1997) Differential expression of D1 and D2 dopamine and m4 muscarinic acetylcholine receptor proteins in identified striatonigral neurons. *Synapse* 27:357-366.

Inoue M, Yoshii M (1992) Modulation of ion channels by somatostatin and acetylcholine. *Prog Neurobiol* 38:203-230.

Jahn H, Nastainczyk W, Rohrkasten A, Schneider T, Hofmann F (1988) Site-specific phosphorylation of the purified receptor for calcium-channel blockers calmodulin-dependent protein kinase II and casein kinase II. *Eur J Biochem* 178:535-542.

Jerusalinsky D, Kornisiuk E, Alfaro P, Quillfeldt J, Ferreira A, Rial VE, Duran R, Cerveñansky C (2000) Muscarinic toxins: novel pharmacological tools for the muscarinic cholinergic system. *Toxicon* 38:747-761.

Kamatchi GL, Tiwari SN, Chan CK, Chen D, Do SH, Durieux ME, Lynch C 3rd (2003) Distinct regulation of expressed calcium channels 2.3 in *Xenopus* oocytes by direct or indirect activation of protein kinase C. *Brain Res* 968:227-237.

Karczmar AG (1996) The Otto Loewi Lecture. Loewi's discovery and the XXI century. *Prog Brain Res* 109:1-27.

Karlsson E, Jolkkonen M, Mulugeta E, Onali P, Adem A (2000) Snake toxins with high selectivity for subtypes of muscarinic acetylcholine receptors. *Biochimie* 82:793-806.

Kawaguchi Y, Wilson CJ, Augood SJ, Emson PC (1995) Striatal interneurons: chemical, physiological and morphological characterization. *Trends Neurosci* 18:527-535.

Kawaguchi Y, Wilson CJ, Emson PC (1990) Projection subtypes of rat neostriatal matrix cells revealed by intracellular injection of biocytin. *J Neurosci* 10:3421-3438.

Keef KD, Hume JR, Zhong J (2001) Regulation of cardiac and smooth muscle Ca²⁺ channels (Ca_v1.2a,b) by protein kinases. *Am J Physiol Cell Physiol* 281:C1743-C1756.

Koos T, Tepper JM (2002) Dual cholinergic control of fast-spiking interneurons in the neostriatum. *J Neurosci* 22:529-535.

Le Blanc C, Mironneau C, Barbot C, Henaff M, Bondeva T, Wetzker R, Macrez N (2004) Regulation of vascular L-type Ca²⁺ channels by phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *Circ Res* 95:300-307.

Liu L, Heneghan JF, Michael GJ, Stanish LF, Egertova M, Rittenhouse AR (2008) L- and N-current but not M-current inhibition by M1 muscarinic receptors requires DAG lipase activity. *J Cell Physiol* 216:91-100.

Liu L, Rittenhouse AR (2003) Arachidonic acid mediates muscarinic inhibition and enhancement of N-type Ca²⁺ current in sympathetic neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:295-300.

Liu L, Rittenhouse AR (2003a) Pharmacological discrimination between muscarinic receptor signal transduction cascades with bethanechol chloride. *Br J Pharmacol* 138:1259-1270.

Liu L, Roberts ML, Rittenhouse AR (2004) Phospholipid metabolism is required for M1 muscarinic inhibition of N-type calcium current in sympathetic neurons. *Eur Biophys J* 33:255-264.

Liu L, Zhao R, Bai Y, Stanish LF, Evans JE, Sanderson MJ, Bonventre JV, Rittenhouse AR (2006) M1 muscarinic receptors inhibit L-type Ca²⁺ current and M-current by divergent signal transduction cascades. *J Neurosci* 26:11588-11598.

Lucas-Meunier E, Fossier P, Baux G, Amar M (2003) Cholinergic modulation of the cortical neuronal network. *Pflugers Arch* 446:17-29.

Ma LQ, Wang F, Liu C, Xie N, Gu J, Fu H, Wang JH, Cai F, Liu J, Chen JG. Activation of phosphatidylinositol-linked novel D1 dopamine receptors inhibits high voltage activated Ca²⁺ currents in primary cultured striatal neurons. *J Neurophysiol*: en prensa.

McCormick DA, Prince DA (1986) Mechanisms of action of acetylcholine in the guineapig cerebral cortex in vitro. *J Physiol* 375:169-194.

McHugh D, Sharp EM, Scheuer T, Catterall WA (2000) Inhibition of cardiac L-type calcium channels by protein kinase C phosphorylation of two sites in the N-terminal domain. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:12334-12338.

McLaughlin S, Murray D (2005) Plasma membrane phosphoinositide organization by protein electrostatics. *Nature* 438:605-611.

Michel FJ, Fortin GD, Martel P, Yeomans J, Trudeau LE (2005) M₃-like muscarinic receptors mediate Ca²⁺ influx in rat mesencephalic GABAergic neurones through a protein kinase C-dependent mechanism. *Neuropharmacol* 48:796-809.

Misgeld U, Calabresi P, Dodt HU (1986) Muscarinic modulation of calcium dependent plateau potentials in rat neostriatal neurons. *Pflugers Arch* 407:482-487.

Nathanson NM (2000) A multiplicity of muscarinic mechanism: enough signaling pathways to take your breath away. *Proc Natl Acad Sci* 97:6245-6247.

Neubig RR, Siderovsky DP (2002) Regulators of G-protein signaling as new central nervous system drug targets. *Nat Rev Drug Discov* 1:187-197.

Nicola SM, Surmeier J, Malenka RC (2000) Dopaminergic modulation of neuronal excitability in the striatum and nucleus accumbens. *Annu Rev Neurosci* 23:185-215.

Olson PA, Tkatch T, Hernandez-Lopez S, Ulrich S, Ilijic E, Mugnaini E, Zhang H, Bezprozvanny I, Surmeier DJ (2005) G-protein-coupled receptor modulation of striatal CaV1.3 L-type Ca²⁺ channels is dependent on a Shank-binding domain. *J Neurosci* 25:1050-1062.

Parker PJ, Murray-Rust J (2004) PKC at a glance. *J Cell Sci* 117:131-132.

Pemberton KE, Jones SV (1997) Inhibition of the L-type calcium channel by the five muscarinic receptors (m1-m5) expressed in NIH 3T3 cells. *Pflugers Arch* 433:505-514.

Perez-Burgos A, Perez-Rosello T, Salgado H, Flores-Barrera E, Prieto G, Figueroa A, Galarraga E, Bargas J (2008) Muscarinic M1 modulation of N and L types of calcium channels is mediated by PKC in neostriatal neurons. *Neuroscience* 155:1079-1097.

Perez-Garci E, Bargas J, Galarraga E (2003) The role of Ca²⁺ channels in the repetitive firing of striatal projection neurons. *Neuroreport* 14:1253-1256.

Perez-Rosello T, Figueroa A, Salgado H, Vilchis C, Tecuapetla F, Guzman NJ, Galarraga E, Bargas J (2005) Cholinergic control of firing pattern and neurotransmission in rat neostriatal projection neurons: role of CaV2.1 and CaV2.2 Ca²⁺ channels. *J Neurophysiol* 93:2507-2519.

Pineda JC, Bargas J, Flores-Hernandez J, Galarraga E (1995) Muscarinic receptors modulate the afterhyperpolarizing potential in neostriatal neurons. *Eur J Pharmacol* 281:271-277.

Pineda JC, Galarraga E, Bargas J, Cristancho M, Aceves J (1992) Charybdotoxin and apamin sensitivity of the calcium-dependent repolarization and the afterhyperpolarization in neostriatal neurons. *J Neurophysiol* 68:287-294.

Pisani A, Bernardi G, Ding J, Surmeier DJ (2007) Re-emergence of striatal cholinergic interneurons in movement disorders. *Trends Neurosci* 30:545-553.

Pochynyuk O, Bugaj V, Stockand JD (2008) Physiologic regulation of the epithelial sodium channel by phosphatidylinositides. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 17:533-540.

Pochynyuk O, Tong Q, Medina J, Vandewalle A, Staruschenko A, Bugaj V, Stockand JD (2007) Molecular Determinants of PI(4,5)P₂ and PI(3,4,5)P₃ Regulation of the Epithelial Na⁺ Channel. *J Gen Physiol* 130:399-413.

Rakhilin SV, Olson PA, Nishi A, Starkova NN, Fienberg AA, Nairn AC, Surmeier DJ, Greengard P (2004) A network of control mediated by regulator of calcium/calmodulin-dependent signaling. *Science* 306:698-701.

Rinne JO, Lönnberg P, Marjamäki P, Rinne UK (1989) Brain muscarinic receptor subtypes are differently affected in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Brain Res* 483:402-406.

Rozov A, Burnashev N, Sakmann B, Neher E (2001) Transmitter release modulation by intracellular Ca²⁺ buffers in facilitating and depressing nerve terminals of pyramidal cells in layer 2/3 of the rat neocortex indicates a targetcell-specific difference in presynaptic calcium dynamics. *J Physiol* 531:807-826.

Salgado H, Tecuapetla F, Perez-Rosello T, Perez-Burgos A, Perez-Garci E, Galarraga E, Vargas J (2005) A reconfiguration of Ca_v2 Ca²⁺ channel current and its dopaminergic D₂ modulation in developing neostriatal neurons. *J Neurophysiol* 94: 3771-3787.

Santiago MP, Potter LT (2001) Biotinylated m4-toxin demonstrates more M4 muscarinic receptor protein on direct than indirect striatal projection neurons. *Brain Res* 894:12-20.

Sculptoreanu A, Yoshimura N, de Groat WC, Somogyi GT (2001) Protein kinase C is involved in M₁-muscarinic receptor-mediated facilitation of L-type Ca²⁺ channels in neurons of the major pelvic ganglion of the adult male rat. *Neurochem Res* 26:933-942.

Shapiro MS, Gomez J, Hamilton SE, Hille B, Loose MD, Nathanson NM, Roche JP, Wess J (2001) Identification of subtypes of muscarinic receptors that regulate Ca²⁺ and K⁺ channel activity in sympathetic neurons. *Life Sci* 68:2481-2487.

Shapiro MS, Loose MD, Hamilton SE, Nathanson NM, Gomez J, Wess J, Hille B (1999) Assignment of muscarinic receptor subtypes mediating G-protein modulation of Ca²⁺ channels by using knockout mice. *Proc Natl Acad Sci* 96:10899-10904.

Shapiro MS, Zhou J, Hille B (1996) Selective disruption by protein kinases of G-protein-mediated Ca²⁺ channel modulation. *J Neurophysiol* 76:311-320.

Shen W, Hamilton SE, Nathanson NM, Surmeier DJ (2005) Cholinergic suppression of KCNQ channel currents enhances excitability of striatal medium spiny neurons. *J Neurosci* 25:7449-7458.

Shen W, Tian X, Day M, Ulrich S, Tkatch T, Nathanson NM, Surmeier DJ (2007) Cholinergic modulation of Kir2 channels selectively elevates dendritic excitability in striatopallidal neurons. *Nat Neurosci* 10:1458-1466.

Suh BC, Hille B (2002) Recovery from muscarinic modulation of M current channels requires phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate synthesis. *Neuron* 35:507-520.

Suh BC, Hille B (2005) Regulation of ion channels by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Curr Opin Neurobiol* 15:370-378.

Suh BC, Hille B (2008) PIP₂ Is a necessary cofactor for ion channel function: How and Why? *Annu Rev Biophys* 37:175-195.

Tai C, Kuzminski JB, MacVicar BA (2006) Muscarinic enhancement of R-type calcium currents in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J Neurosci* 26:6249-6258.

Taverna S, Ilijic E, Surmeier DJ (2008) Recurrent collateral connections of striatal medium spiny neurons are disrupted in models of Parkinson's disease. *J Neurosci* 28: 5504-5512.

Tecuapetla F, Carrillo-Reid L, Guzmán JN, Galarraga E, Bargas J (2005) Different inhibitory inputs onto neostriatal projection neurons as revealed by field stimulation. *J Neurophysiol* 93:1119-1126.

Tedford HW, Zamponi GW (2006) Direct G protein modulation of Cav2 calcium channels. *Pharmacol Rev* 58:837-862.

Tepper JM, Bolam JP (2004) Functional diversity and specificity of neostriatal interneurons. *Curr Opin Neurobiol* 14:685-692.

Vaithianathan T, Bukiya A, Liu J, Liu P, Asuncion-Chin M, Fan Z, Dopico A (2008) Direct regulation of BK channels by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate as a novel signaling pathway. *J Gen Physiol* 132:13-28.

Vilchis C, Bargas J, Ayala GX, Galvan E, Galarraga E (2000) Ca²⁺ channels that activate Ca²⁺-dependent K⁺ currents in neostriatal neurons. *Neuroscience* 95:745-752.

Wanke E, Ferroni A, Malgaroli A, Ambrosini A, Pozzan T, Meldolesi J (1987) Activation of a muscarinic receptor selectively inhibits a rapidly inactivated Ca²⁺ current in rat sympathetic neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:4313-4317.

Wichmann T, DeLong MR (2003) Pathophysiology of Parkinson's disease: the MPTP primate model of the human disorder. *Ann N Y Acad Sci* 991:199-213.

Wilson CJ (2004) Basal Ganglia. In: *The Synaptic Organization of the Brain* (Shepard GM, ed), pp 361-414. Oxford: Oxford University Press.

Wilson CJ, Groves PM (1980) Fine structure and synaptic connections of the common spiny neuron of the rat neostriatum: a study employing intracellular inject of horseradish peroxidase. *J Comp Neurol* 194:599-615.

Winks JS, Hughes S, Filippov AK, Tatulian L, Abogadie FC, Brown DA, Marsh SJ (2005) Relationship between membrane phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate and receptor-mediated inhibition of native neuronal M channels. *J Neurosci* 25:3400-3413.

Wu L, Bauer CS, Zhen XG, Xie C, Yang J (2002) Dual regulation of voltage gated calcium channels by PtdIns (4,5) P₂. *Nature* 419:947-952.

[Yamada T, Endoh T, Suzuki T](#) (1999) Inhibition of calcium channels by neurokinin receptor and signal transduction in hamster submandibular ganglion cells. *J Auton Nerv Syst.* 76:1-8.

Yan Z, Surmeier DJ (1996) Muscarinic (m2/m4) receptors reduce N- and P-type Ca²⁺ currents in rat neostriatal cholinergic interneurons through a fast, membrane delimited, G-protein pathway. *J Neurosci* 16:2592-2604.

Yang J, Tsien RW (1993) Enhancement of N- and L-type calcium channel currents by protein kinase C in frog sympathetic neurons. *Neuron* 10:127-136.

Yan Z, Flores-Hernandez J, Surmeier DJ (2001) Coordinated expression of muscarinic receptor messenger RNAs in striatal medium spiny neurons. *Neuroscience* 103:1017-1024.

Zhainazarov AB, Spehr M, Wetzel CH, Hatt H, Ache BW (2004) Modulation of the olfactory CNG channel by PtdIns(3,4,5)P₃. *J Membr Biol* 201:51-57.

Zamponi GW, Bourinet E, Nelson D, Nargeot J, Snutch TP (1997) Crosstalk between G proteins and protein kinase C mediated by the calcium channels alpha1 subunit. *Nature* 385:442-446.

Zamponi GW, Snutch TP (1998) Modulation of voltage-dependent calcium channels by G proteins. *Curr Opin Neurobiol* 8:351-356.

Zhang H, Craciun LC, Mirshani T, Rohacs T, Lopes CMB, Jin T, Logothetis DE (2003) PIP₂ Activates KCNQ channels, and its hydrolysis underlies receptor-mediated inhibition of M currents. *Neuron* 963-975.

Zhou J, Shapiro MS, Hille B (1997) Speed of Ca²⁺ channel modulation by neurotransmitters in rat sympathetic neurons. *J Neurophysiol* 77:2040-2048.

Zhou FM, Wilson CJ, Dani JA (2002) Cholinergic interneuron characteristics and nicotinic properties in the striatum. *J Neurobiol Rev* 53:590-605.

Zhu Y, Yakel JL (1997) Modulation of Ca²⁺ currents by various G protein-coupled receptors in sympathetic neurons of male rat pelvic ganglia. *J Neurophysiol* 78:780-789.

MUSCARINIC M₁ MODULATION OF N AND L TYPES OF CALCIUM CHANNELS IS MEDIATED BY PROTEIN KINASE C IN NEOSTRIATAL NEURONS

A. PEREZ-BURGOS, T. PEREZ-ROSELLO, H. SALGADO, E. FLORES-BARRERA, G. A. PRIETO, A. FIGUEROA, E. GALARRAGA AND J. BARGAS*

Departamento de Biofísica, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City DF, PO Box 70-253, Mexico 04510

Abstract—In some neurons, muscarinic M₁-class receptors control L-type (Ca_v1) Ca²⁺-channels via protein kinase C (PKC) or calcineurin (phosphatase 2B; PP-2B) signaling pathways. Both PKC and PP-2B pathways start with phospholipase C (PLC) activation. In contrast, P/Q- and N-type (Ca_v2.1, 2.2, respectively) Ca²⁺-channels are controlled by M₂-class receptors via G proteins that may act, directly, to modulate these channels. The hypothesis of this work is that this description is not enough to explain muscarinic modulation of Ca²⁺ channels in rat neostriatal projection neurons. Thus, we took advantage of the specific muscarinic toxin 3 (MT-3) to block M₂-type receptors in neostriatal neurons, and leave in isolation the M₁-type receptors to study them separately. We then asked what Ca²⁺ channels are modulated by M₁-type receptors only. We found that M₁-receptors do modulate L, N and P/Q-types Ca²⁺ channels. This modulation is blocked by the M₁-class receptor antagonist (muscarinic toxin 7, MT-7) and is voltage-independent. Thereafter, we asked what signaling pathways, activated by M₁-receptors would control these channels. We found that inactivation of PLC abolishes the modulation of all three channel types. PKC activators (phorbol esters) mimic muscarinic actions, whereas reduction of intracellular calcium virtually abolishes all modulation. As expected, PKC inhibitors prevented the muscarinic reduction of the afterhyperpolarizing potential (AHP), an event known to be dependent on Ca²⁺ entry via N- and P/Q-type Ca²⁺ channels. However, PKC inhibitors (bisindolylmaleimide I and PKC-1936) only block modulation of currents through N and L types Ca²⁺ channels; while the modulation of P/Q-type Ca²⁺ channels remains unaffected. These results show that different branches of the same signaling cascade can be used to modulate different Ca²⁺ channels. Finally, we found no evidence of calcineurin modulating these Ca²⁺ channels during M₁-receptor activation, although, in the same cells, we demonstrate functional PP-2B by activating dopaminergic D₂-receptor modulation. © 2008 IBRO. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

*Corresponding author. Tel: +52-55-5622-5670; fax: +52-55-5622-5607. E-mail address: jlbargas@iflc.unam.mx (J. Bargas).

Abbreviations: AHP, afterhyperpolarizing potential; BAPTA, 1,2-bis-(o-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid; BIS I, bisindolylmaleimide I; BIS V, bisindolylmaleimide V; DAG, diacylglycerol; DMSO, dimethyl sulfoxide; IP₃, inositol 1,4,5 triphosphate; I–V plots, current–voltage relationships; MT-3, muscarinic toxin 3; MT-7, muscarinic toxin 7; NMDG, N-methyl-D-glucamine; PD, Parkinson disease; PIP₂, phosphatidylinositol (4, 5) biphosphate; PKC, protein kinase C; PLC, phospholipase C; PMA, phorbol 12-myristate 13-acetate; PP-2B, protein phosphatase 2B; TTX, tetrodotoxin; ω-AgTx-TK, ω-agatoxin TK; ω-CgTx-GVIA, ω-conotoxin GVIA.

0306-4522/08 © 2008 IBRO. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved. doi:10.1016/j.neuroscience.2008.06.047

Key words: protein kinase C, phospholipase C, medium spiny neurons, neostriatum, muscarinic receptors.

Neostriatal spiny projection neurons receive cholinergic innervation from local interneurons that exhibit spontaneous firing (Zhou et al., 2002; Wilson, 2004), thus enduring a cholinergic tone (Aosaki et al., 1995; Galarraga et al., 1999). Multiple muscarinic actions have been reported on neostriatal spiny neurons including: the modulation of inward rectification (Galarraga et al., 1999; Figueroa et al., 2002; Shen et al., 2007), transient A-channels (Akins et al., 1990) and delayed persistent M-channels (Shen et al., 2005). During Parkinson disease (PD), the release of acetylcholine is increased (Marti et al., 1999; Birdsall et al., 2001; Ding et al., 2006). Therefore, anticholinergic drugs are used in the treatment of PD in trying to reduce an excessive cholinergic tone (Birdsall et al., 2001).

Five types of muscarinic receptors (M₁ to M₅) are subdivided into two classes according to their coupling to G proteins: the M₁ class (M₁, M₃ and M₅ types) coupled to the Gq/11 class of G proteins, and the M₂ class (M₂ and M₄ types) mainly coupled to Gi/o class of G proteins (Caulfield, 1993; Caulfield and Birdsall, 1998). While the action of M₁-class receptors on ion channels is voltage independent, the action of M₂-class receptors may be voltage dependent or independent (Birdsall et al., 2001; Nathanson, 2000). The most abundant types of muscarinic receptors expressed in neostriatal projection neurons, M₁ and M₄, belong to each of these classes (Bernard et al., 1992; Yan and Surmeier, 1996).

Pharmacological, electrophysiological and molecular (PCR) studies demonstrate that varieties of all high voltage-activated (HVA) Ca²⁺ channels (L, N, P/Q and R) are expressed in neostriatal projection neurons (Bargas et al., 1994; Howe and Surmeier, 1995; Olson et al., 2005). However, muscarinic M₁-type receptors only modulate L, N and P/Q Ca²⁺ channel types (Perez-Rosello et al., 2005). It has been posited that muscarinic M₁-type receptors control L-type (Ca_v1) Ca²⁺-channels via a diffusible voltage-independent pathway (Misgeld et al., 1986; Howe and Surmeier, 1995; Perez-Rosello et al., 2005). In contrast, M₂-type receptors use G proteins to directly modulate P/Q- and N-types (Ca_v2.1 and 2.2, respectively) Ca²⁺-channels (Howe and Surmeier, 1995). This work continues the description of muscarinic M₁-type receptor modulation of Ca²⁺ channels in neostriatal neurons. Thus, we took advantage of the specific muscarinic toxin 3 (MT-3) to block M₂-type receptors in neostriatal neurons,

and leave in isolation the M_1 -type receptors to study them separately (Perez-Rosello et al., 2005).

Little is known about the signaling cascades involved in M_1 -receptor-mediated modulation of Ca^{2+} channels in neostriatal neurons, although phosphorylation and dephosphorylation mechanisms are expected to participate (Felder, 1995; Catterall, 2000; Nathanson, 2000; Budde et al., 2002). And certainly, muscarinic M_1 -receptor-mediated modulation of Ca^{2+} channels, through the canonical protein kinase C (PKC) phosphorylation pathway, has seldom been reported in any brain neuron (e.g. Doerner and Alger, 1992; Michel et al., 2005; Tai et al., 2006; Salgado et al., 2007). Available information mostly comes from peripheral neurons or heterologous expression systems (e.g. Rane et al., 1989; Pemberton and Jones, 1997; Zhu and Yakel, 1997; Yamada et al., 1999; Sculptoreanu et al., 2001; Kamatchi et al., 2003; Bannister et al., 2004).

The canonical signaling pathway associated with M_1 -class receptors and its coupled Gq/11 class of G proteins is the phospholipase C- β pathway, involving the production of inositol 1,4,5 triphosphate (IP_3) and diacylglycerol (DAG). IP_3 releases calcium from intracellular stores (Berridge, 1987). Both released Ca^{2+} and DAG activate PKC (Parker and Murray-Rust, 2004). Consequently, the PKC pathway is an obvious candidate to phosphorylate Ca^{2+} channels and explain a part of the muscarinic modulation in striatal neurons. Nevertheless, the PLC/ IP_3 - Ca^{2+} -DAG/PKC cascade may have other terminal branches, as for example, the activation of protein phosphatase 2B (PP-2B) or calcineurin (Hosey et al., 1986; Armstrong, 1989; Rakhilin et al., 2004). Therefore, either phosphorylation (by PKC) or dephosphorylation (by PP-2B) could explain the voltage-independent muscarinic M_1 -class modulation of Ca^{2+} -channels in neostriatal neurons. We demonstrate here that PKC activated by M_1 -receptors modulates at least two of the Ca^{2+} -channels modulated by M_1 -receptors: $Ca_v2.2$ (N) and Ca_v1 (L).

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Preparation of slices and dissociated cells

The protocols followed the National University of Mexico (UNAM) and the National Institutes of Health guide for the care and use of laboratory animals (NIH Publications No. 8023, revised 1996) including minimizing the number of animals to achieve statistical significance and avoiding their suffering. Brain slices and acutely dissociated neurons were obtained as described in previous work (Bargas et al., 1999). Briefly, adult Wistar rats (120 g; >40 post-natal days) from our Animal House were deeply anesthetized and their brains quickly removed into ice-cold saline (4 °C) containing (in mM): 126 NaCl, 3 KCl, 26 $NaHCO_3$, 2 $CaCl_2$, 1 $MgCl_2$, 11 glucose, 0.2 thiourea and 0.2 of ascorbic acid (25 °C; pH=7.4 with HCl, 300±5 mOsm/l with glucose; saturated with 95% O_2 and 5% CO_2). Sagittal brain slices, 300 μ m thick, were cut on a vibratome and placed for 1 h at room temperature in the same saline solution. Slices were then transferred to a recording chamber (intracellular recordings) or were used to obtain dissociated cells.

To obtain dissociated cells the dorsal neostriatum was dissected and then returned into a 10 mM Hepes saline solution with 1 mg/ml of pronase E type XIV (Sigma; St. Louis, MO, USA) at 36 °C. After about 20 min of digestion, the slices were transferred to a low Ca^{2+} (0.4 mM $CaCl_2$) saline solution to obtain the cells.

Then, slices were mechanically dissociated with a graded series of fire-polished Pasteur pipettes. The cell suspension (1 ml) was plated into a Petri dish mounted on the stage of an inverted microscope. Neurons adhered to the bottom of the dish within 10–15 min. The dish contained 1 ml of the whole-cell recording saline (in mM): 0.001 tetrodotoxin (TTX), 140 NaCl, 3 KCl, 5 $BaCl_2$, 2 $MgCl_2$, 10 Hepes, and 10 glucose (pH=7.4 with NaOH; 300±5 mOsm/l with glucose). After 10–15 min the cells began to be superfused at about 1 ml/min with saline of the same composition.

Voltage clamp recordings of calcium currents

Voltage-clamp recordings were performed on medium-sized neostriatal neurons (10–12 μ m main diameters; whole-cell capacitance 6–7 pF) with a few short dendritic trunks. Larger neurons were avoided on purpose since it is known that dissociated neurons with whole-cell capacitance of 6–7 pF overwhelmingly correspond to medium spiny projection neurons (Yan and Surmeier, 1996). Patch pipettes of borosilicate glass (WPI, Sarasota, FL, USA) were pulled in a Flaming-Brown puller (Sutter Instrument Corporation, Novato, CA, USA) and fire polished prior to use. The internal saline contained (in mM): 180 *N*-methyl-D-glucamine (NMDG), 40 Hepes, 10 EGTA, 4 $MgCl_2$, 2 ATP, 0.4 GTP and 0.1 leupeptin (pH=7.2 with H_2SO_4 ; 280±5 mOsm/l).

Whole-cell recordings employed standard techniques. D.C. electrode resistances were 3–6 M Ω in the bath. Liquid junction potentials (<5 mV) were corrected. Recordings were obtained with an Axopatch 200B patch-clamp amplifier (Axon Instruments, Foster City, CA, USA) and controlled and monitored with the pClamp program (version 8.2) with a 125 kHz DMA interface (Axon Instruments). After seal rupture, the series resistance (<10 M Ω) was compensated (70–80%) and periodically monitored.

We record the currents that pass through Ca^{2+} channels using the whole-cell configuration of the patch-clamp technique with Ba^{2+} as the charge carrier. Ba^{2+} is a potent potassium channel blocker. Sodium channels were blocked with 1 μ M TTX. In addition, intracellular potassium was replaced by 180 mM NMDG. Once isolated in this way, and as reported previously (Bargas et al., 1994; Howe and Surmeier, 1995; Vilchis et al., 2000; Perez-Rosello et al., 2005; Salgado et al., 2005), current-voltage relationships (I-V plots) of Ba^{2+} -currents, before (once the current reaches stability) and after drugs applications, were built with both 20 ms step voltage commands, from -80 to 50 mV in 10 mV steps, and with current responses to voltage ramp commands (0.7 mV/ms) from -80 to 50 mV. I-V plots from both methods coincided (see Fig. 1). For clarity reasons most figures only show representative averaged responses to voltage ramps (e.g. Vilchis et al., 2000; Perez-Rosello et al., 2005).

Intracellular recordings

Slices obtained as above were recorded in a submerged chamber and superfused with the same extracellular saline used to obtain the slices at 1 ml/min (34–36 °C). Intracellular recordings were performed with microelectrodes filled with 3 M K-acetate (D.C. resistances: 80–120 M Ω) and the help of an active bridge electrometer (Neuro Data, Cygnus Tech. Inc., DWG, PA, USA). Records were digitized and saved on VHS tapes (40 kHz) and analyzed off-line in a PC clone. Neurons accepted for experiments had input resistance larger than 40 M Ω and resting potentials around -80 mV. Stimulation consisted of intracellular injections of constant brief current steps to evoke either afterhyperpolarizing potentials (AHP) after a single action potential with suprathreshold stimulus (Pineda et al., 1992; Perez-Rosello et al., 2005), or slow depolarizing responses when action potentials are not fired after subthreshold stimulus (Hernandez-Lopez et al., 1997). The brief weak stimuli used in current-clamp experiments were intended to

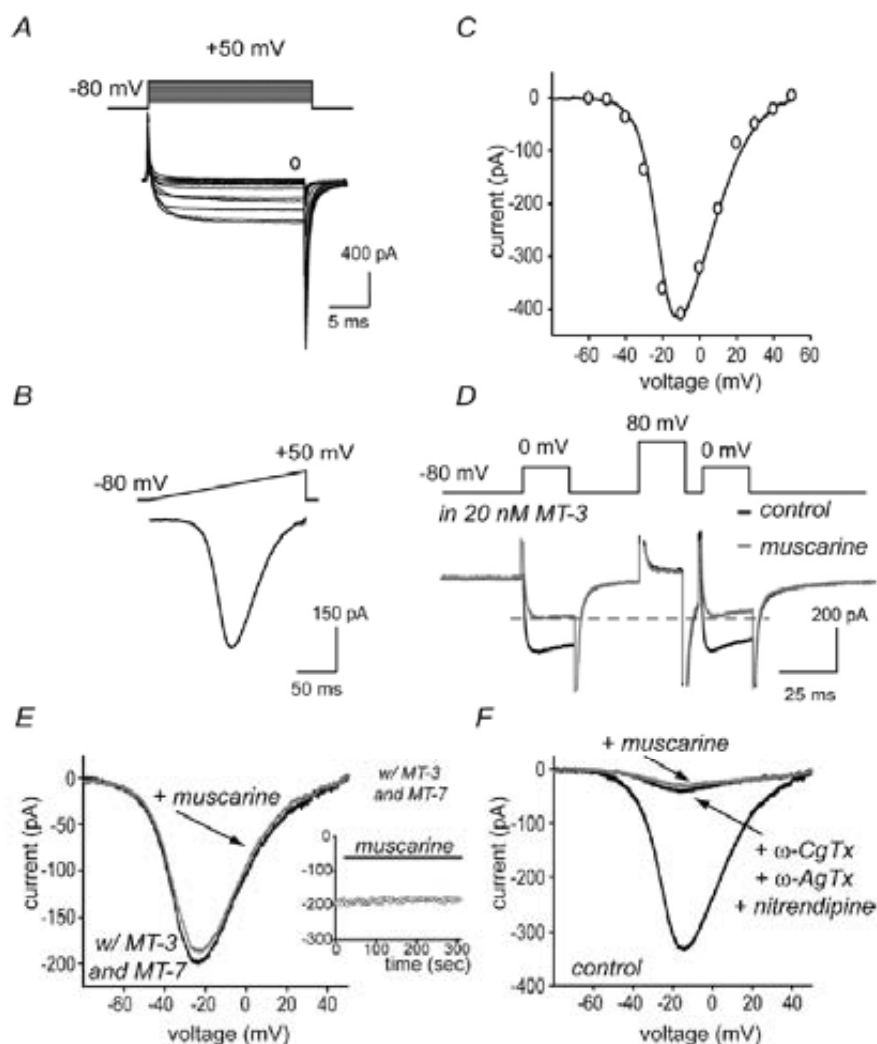


Fig. 1. Muscarinic modulation of L-, N- and P/Q-type calcium channels is mediated by M_1 -type receptor activation in a voltage-independent way. (A, B) Protocols used to evoke Ca^{2+} -current in neostriatal neurons. (A) Currents elicited by depolarizing voltage commands from -80 to $+50$ mV in 10 mV steps and (B) current elicited by 180 ms ramp commands (0.7 mV/ms). (C) I–V plots built from both protocols are superimposable (circles: step commands; continuous line: ramp command). Note that I–V plot built with current evoked with a ramp has the appearance of a function fitted to the I–V plot obtained with step commands. For clarity, we show I–V plots built with currents evoked by ramp commands in the next figures. Ba^{2+} (5 mM) was used as the charge carrier in all experiments. (D) After blocking M_2 -type receptors with 20 nM MT-3, muscarine (1 μ M) still reduces the amplitude of the Ca^{2+} -currents. Reduction is the same before and after a prepulse to 80 mV suggesting that most modulation is voltage-independent. (E) Muscarine is not capable of modulating calcium current in the presence of 20 nM MT-3 and 50 nM of MT-7 peptides. The inset shows the time course of this experiment showing that rundown is inconsequential for the duration of a typical observation (cf., Fig. 2 and see: Perez-Rosello et al., 2005) (F) Muscarine does not modulate the Ca^{2+} -current left after blocking L, N and P/Q Ca^{2+} -channels: apparently, it does not modulate R-type channels.

avoid, as much as possible, the activation of the slowly-activating M-current (activation may take hundreds of milliseconds after cholinergic agonists in the bath) (McCormick and Prince, 1986), so that Ca^{2+} -dependent events are manipulated better (since we are studying Ca^{2+} -currents). Bridge balance as well as recovery periods (without D.C. current) were monitored between sample records. The medium-sized projection neurons were identified for their electrophysiological properties as reported by Kawaguchi et al. (1989) and routinely were also filled with biocytin and identified with histochemical techniques (not shown but see: Carrillo-Reid et al., 2008a).

Materials and drugs

Drugs were applied with a gravity-fed system that positioned a glass capillary tube 100 μ m from the recording cell in the direction of superfusion flow. Solution changes were performed with a D.C.-controlled microvalve system (Lee; Essex, CT, USA). This method allowed reversible drug applications (see Perez-Rosello et al., 2005). Substances used were added to the superfusate from thawed stock solutions. ω -Conotoxin GVIA (ω -CgTx-GVIA), and TTX were obtained from Alomone Laboratories (Jerusalem, Israel). ω -Agstoxin TK (ω -AgTx-TK) and MT-3 and muscarinic

toxin 7 (MT-7) were obtained from Peptides International (Louisville, KY, USA). Nitrendipine, muscarine, PKC-1936 and bisindolylmaleimide V (BIS V) were obtained from Sigma-Aldrich-RBI (St. Louis, MO, USA). FK 506 was obtained from A.G. Scientific Inc. (San Diego, CA, USA). Bisindolylmaleimide I (BIS I), U-73122, U-73343, phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), calcineurin inhibitor peptide and 1,2-bis(*o*-aminophenoxy)ethane-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid (BAPTA) were all obtained from Calbiochem (La Jolla, CA, USA). Most active substances were dissolved in water to get stock solutions and added to the superfusate to give the final concentration. Nitrendipine, PMA, FK 506 and U-73122 were prepared in dimethyl sulfoxide (DMSO, 1%), in which case control saline also contained DMSO at the same final concentration. Stock solutions were never older than a week.

Data analysis

Digitized data were imported for analysis and graphing into commercial software (Origin 7, Microcal, Northampton, MA, USA). Mean \pm S.E.M. and median of peak Ba^{2+} -currents ($I_{\text{Ba}^{2+}}$) are reported. Distribution-free statistical tests were used to assess statistical significance: Mann-Whitney's *U* test or Wilcoxon's *t*-test (depending on non-paired or paired samples).

To approximate the muscarinic modulation for P/Q and N types of Ca^{2+} channels ($\text{Ca}_v2.1$ and $\text{Ca}_v2.2$) in each situation, we isolated the tested current with the help of different calcium channel blockers (nitrendipine for L-type; ω -AgTx-TK for P/Q-type; and ω -CgTx-GVIA for N-type calcium channels respectively). We compare muscarinic modulation in the presence and absence of the blockers (Perez-Rosello et al., 2005), the rationale being that if the blocked channel is a target for modulation, its blockage should eliminate or reduce muscarinic action.

RESULTS

Voltage independence of muscarinic M_1 -receptor modulation of Ca^{2+} currents in neostriatal spiny neurons

Fig. 1A shows a family of Ba^{2+} currents evoked with 20 ms depolarizing voltage commands from -80 to 50 mV in 10 mV steps. Fig. 1B shows, in the same cell, a Ba^{2+} current evoked with a ramp voltage command from -80 to 50 mV (0.7 mV/ms). Currents measured after step commands (empty circles) and ramp commands (continuous line) are graphed against command voltage in Fig. 1C. As it has been shown before, the resultant I-V plots are superimposable (Bargas et al., 1994; Howe and Surmeier, 1995; Vilchis et al., 2000; Perez-Rosello et al., 2005; Salgado et al., 2005) suggesting an acceptable space clamp control. Because neostriatal neurons have both M_1 - and M_4 -type receptors, and because most muscarinic modulation of the current is mediated by M_1 -type receptors (Perez-Rosello et al., 2005), in this work we chose to explore the canonical signaling cascade associated to M_1 -receptors (Felder, 1995; Catterall, 2000; Nathanson, 2000; Budde et al., 2002) while blocking the activation of M_4 -type receptors. Fig. 1D shows that bath application of $1 \mu\text{M}$ muscarine, in the presence of saturating concentrations of the specific M_4 -receptor antagonist MT-3 (8 – 20 nM; K_i at M_4 -type receptors is 1.3 nM) (Jerusalinsky et al., 2000), reduces Ba^{2+} -current evoked after voltage steps to 0 mV. The reduction is the same before and after a pre-pulse command to 80 mV: current reduction before the pre-pulse was

$42 \pm 9\%$ (median = 42%), and after the pre-pulse was $44 \pm 9\%$ (median = 44% , $n=7$; NS, Wilcoxon's *t*-test). Current kinetics after the pre-pulse are somehow changed, but in the same way before and after muscarine, suggesting that signaling other than that evoked by M_1 -receptor activation is responsible. Given that a significant fraction of the whole current is reduced by muscarine in MT-3 presence (see Howe and Surmeier, 1995), the results confirm that: first, Ba^{2+} current left after the blockage of M_4 -type receptors (M_2 -class receptors) is modulated by muscarine via M_1 -type receptors, and secondly, that this modulation is voltage-independent (Felder, 1995; Howe and Surmeier, 1995; Catterall, 2000; Nathanson, 2000; Budde et al., 2002; Liu and Rittenhouse, 2003). We have previously shown that muscarinic actions are reversible and that current rundown is negligible during the time course of a typical experiment in our experimental conditions (see: Perez-Rosello et al., 2005 Fig. 1, and other washouts in Figs. 2C, 3C, 7C and 8C in this work).

Fig. 1E shows that all muscarinic actions were occluded when both receptors types, M_1 and M_4 , were blocked in the presence of both 20 nM MT-3 and 50 nM MT-7. The muscarinic modulation was $7 \pm 2\%$ (median = 6% , $n=3$; not significantly different than current rundown: inset in Fig. 1E, after several minutes recording; see also: Perez-Rosello et al., 2005) versus $45 \pm 3\%$ (median = 42% , $n=7$) in control conditions ($P < 0.05$; Mann-Whitney's *U* test; data not shown but see: Perez-Rosello et al., 2005). These experiments support the view that muscarinic actions are specific and mediated by M_1 -type receptors.

Fig. 1F shows that after application of ω -CgTx-GVIA, ω -AgTx-TK and nitrendipine (N-, P/Q- and L-type calcium channel blockers), muscarine has no additional actions on the current which is left-mediated by $\text{Ca}_v2.3$ (R-type calcium channels) (current reduction: $3.6 \pm 0.5\%$, median = 3.5% , $n=4$). These experiments further confirm that M_1 -type receptor activation effects are on N-, P/Q- and L-types, and not on R-type Ca^{2+} -channels (Perez-Rosello et al., 2005).

Muscarinic M_1 -receptor mediated modulation of Ca_v2 Ca^{2+} channels is mediated by the PLC/IP₃- Ca^{2+} -DAG/PKC signaling cascade

After blocking L-type Ca^{2+} channels (Ca_v1) and muscarinic M_4 -type receptors with $10 \mu\text{M}$ nitrendipine and 8 – 20 nM of MT-3, respectively, a great fraction of the Ba^{2+} current is reduced by $1 \mu\text{M}$ muscarine: $23 \pm 2\%$, (median = 24% , $n=10$; $P < 0.001$, Wilcoxon's *t*-test; Fig. 2A, D). Clearly, there is a reduction of Ba^{2+} current through Ca_v2 channels which is not mediated by M_4 -type receptors. This result, together with that in Fig. 1F, shows that this Ba^{2+} current reduction is blocked by MT-7 (Fig. 1E) and involves N-, and P/Q-, but not R-type Ca^{2+} channel types (Fig. 1F, see also: Bargas et al., 1994; Perez-Rosello et al., 2005).

This clear muscarinic M_1 -receptor mediated modulation of P/Q- and N-type Ca^{2+} channels ($\text{Ca}_v2.1$ and $\text{Ca}_v2.2$) (Perez-Rosello et al., 2005) does not exclude additional modulation by M_4 -type receptors (e.g. Zhu and Ikeda, 1994;

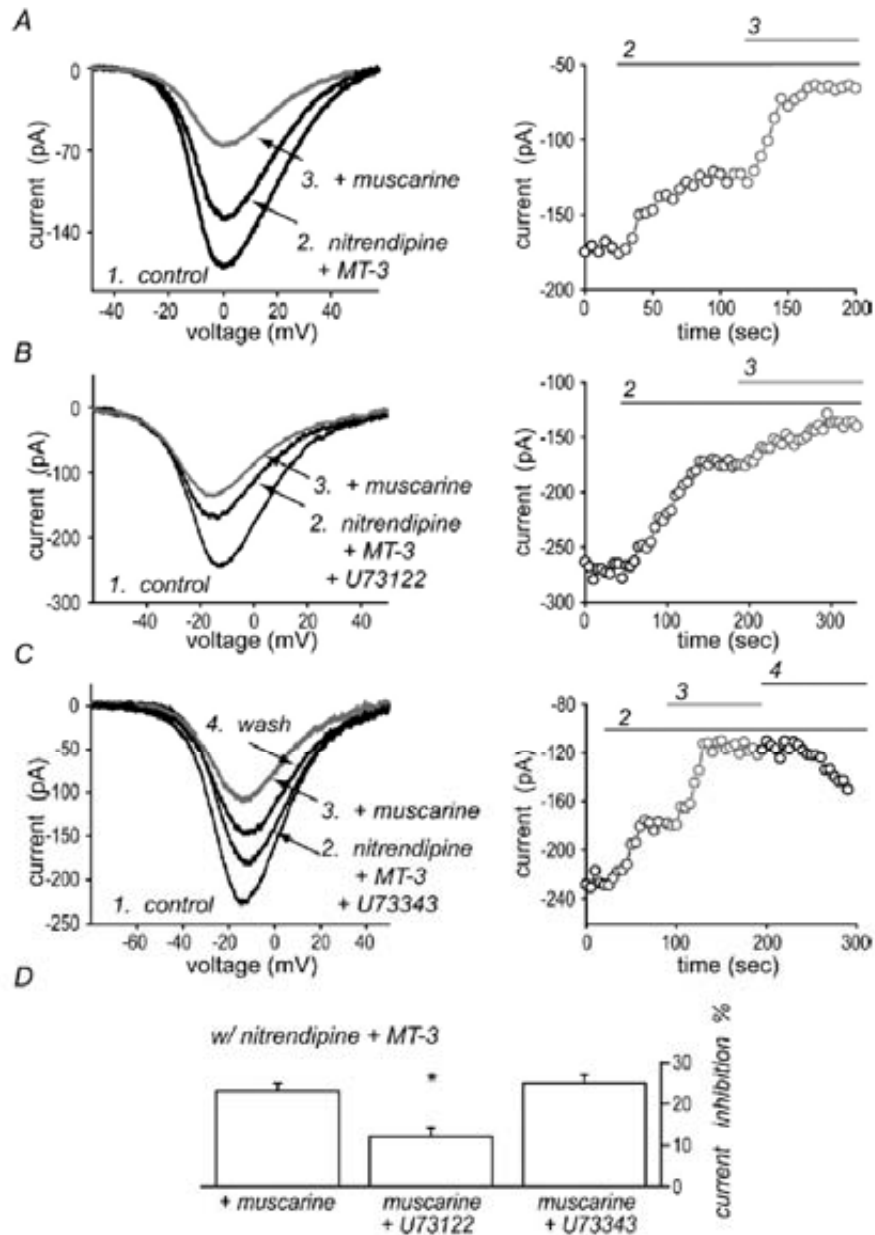


Fig. 2. Muscarinic modulation of Ca_v2 Ca^{2+} -currents mediated by M_1 -type receptor occurs through PLC signaling. (A) In these experiments, 10 μ M nitrendipine were used to block Ca_v1 (L-type) Ca^{2+} channels, and 8 nM of the MT-3 toxin was used to block modulation through muscarinic M_4 -type receptors. There is a clear modulation of Ca_v2 Ca^{2+} -currents that is not mediated by M_4 -type receptors in these conditions ($P < 0.001$). Time courses are at the right. (B) Ca_v2 Ca^{2+} -current modulation was inhibited by bath application of 10 μ M of the PLC-inhibitor U73122. (C) The inactive analog of the PLC-inhibitor, U73343 (10 μ M), used as a negative control of U73122, did not prevent the muscarinic modulation of these Ca_v2 channels, suggesting that the effects were specific. Partial recovery can be seen after washing off muscarine showing that the action on Ca_v2 Ca^{2+} -currents is reversible (4) (Perez-Rosello et al., 2005). (D) Histogram shows a summary of the experimental samples; the data are displayed as mean \pm S.E.M. of the effects in this and the next figures. There were significant differences in the percentage of muscarinic modulation between the control group and that with U73122 ($P < 0.05$).

Howe and Surmeier, 1995; Pemberton and Jones, 1997; Hamid et al., 1999; Yamada et al., 1999; Bannister et al., 2004; Tai et al., 2006; Salgado et al., 2007).

It is very well known that M_1 -class receptors couple to Gq/11 proteins (e.g. Haley et al., 2000) to activate phospholipase C- β and then produce IP_3 plus DAG (Rhee,

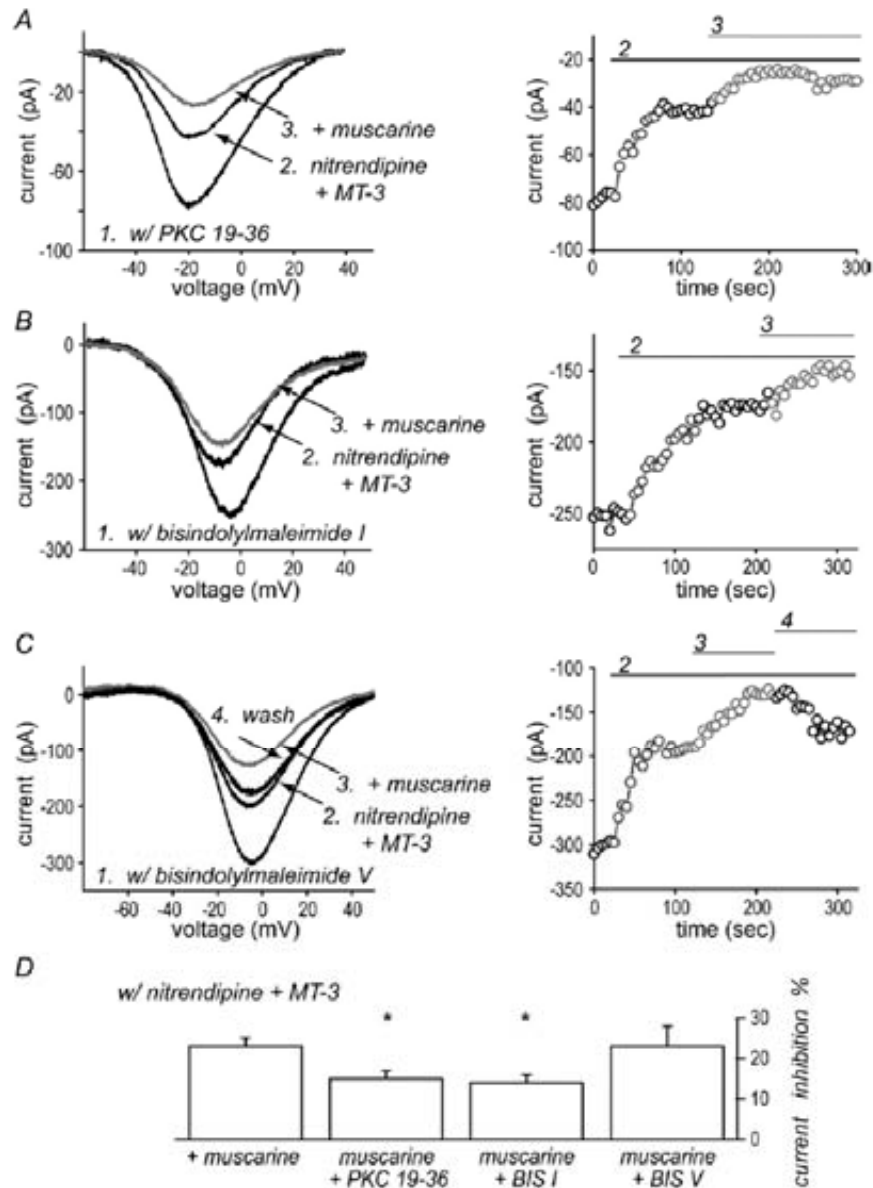


Fig. 3. The muscarinic M_1 modulation of Ca_v2 channels is mediated by PKC. (A) The muscarinic modulation was reduced with respect to the control after intracellular application of 50 μ M PKC 19–36 (PKC- inhibitor peptide) ($P < 0.05$). (B) Another PKC inhibitor, 200 nM BIS I, had the same effects ($P < 0.05$). (C) However, 200 nM BIS V, the inactive analog of BIS I, did not prevent the muscarinic modulation of these calcium channels. Instead, this experiment confirmed a negligible rundown of modifiable current (Ca_v2) and reversibility of muscarine action (time course at right) on that current (Perez-Rosello et al., 2005). (D) Histogram shows a summary of all the experimental samples. The percentage of effects of muscarine in control conditions (with L-type Ca^{2+} -channels and M_1 -type receptors blocked) has significant differences with both PKC 19–36 and BIS I, reductions.

2001) to produce a rise in intracellular Ca^{2+} and activation of PKC (i.e. the PLC/ IP_3 - Ca^{2+} -DAG/PKC signaling cascade; Berridge, 1987; Wu et al., 2002; Suh and Hille, 2005). To see if this signaling cascade participates in M_1 -receptor actions, we used two different drugs. First, we blocked the first step of the pathway by incubating the cells with 10 μ M of the PLC inhibitor U73122 (in the continuous

block of M_1 -type receptors and L-type Ca^{2+} channels). Fig. 2B shows a representative result of these experiments: muscarine action was significantly reduced, to $13 \pm 2\%$ as compared with control reduction (median = 13%, $n = 8$, $P < 0.05$, Mann-Whitney's U test).

Second, to determine if this effect was specific we also tested the inactive analog, U73343 (10 μ M), as a negative

control in the same conditions (Fig. 2C). U73343 was unable to interfere with the muscarinic modulation of Ca_v2 channels ($25 \pm 2\%$, median = 24% , $n=3$). In addition, the experiment confirmed that muscarine action on Ca_v2 current is reversible (Fig. 2C) (Perez-Rosello et al., 2005).

Next, we tested the probable last step of the signaling cascade: PKC involvement (Nathanson, 2000). Four different drugs and experimental samples were performed to assess PKC involvement. First, we inhibited PKC with $50 \mu\text{M}$ PKC19-36 (Fig. 3A). Second, we inhibited PKC with 200 nM BIS I (Fig. 3B). Both drugs reduced muscarinic action with respect to the control in a similar way, to: $14 \pm 2\%$ (median = 13% , $n=7$; $P < 0.05$) and $14 \pm 2\%$ (median = 12% , $n=6$, $P < 0.05$), for PKC 19-36 and BIS I, respectively (Mann-Whitney's U test). Third, we tested the inactive analog 200 nM BIS V (Fig. 3C) as a negative control. This drug had no actions whatsoever (Fig. 3C, D)

on the muscarinic modulation of Ca_v2 channels ($23 \pm 5\%$, median = 24% , $n=8$, NS, Mann-Whitney's U test) suggesting that the effects of the two inhibitors used are specific. However, the experiment with the inactive analog confirmed again that muscarine action on Ca_v2 Ca^{2+} -current is reversible (Fig. 3C) (Perez-Rosello et al., 2005).

Still, a fourth drug was used to assess PKC-involvement in the modulation: the PKC activator PMA (500 nM). Fig. 4A shows that PMA mimics muscarinic actions on currents carried by Ca_v2 channels (Pineda et al., 1995). PMA reduced Ca^{2+} currents by $35 \pm 5\%$ (median = 32% , $n=7$; $P < 0.05$, Wilcoxon's t -test) (e.g. Doerner and Alger, 1992; Yamada et al., 1999). Inactive PMA analogues do not have any action (not shown here but see Pineda et al., 1995).

Muscarine action is greatly occluded after PMA treatment. Reduction of current by muscarine after PMA treat-

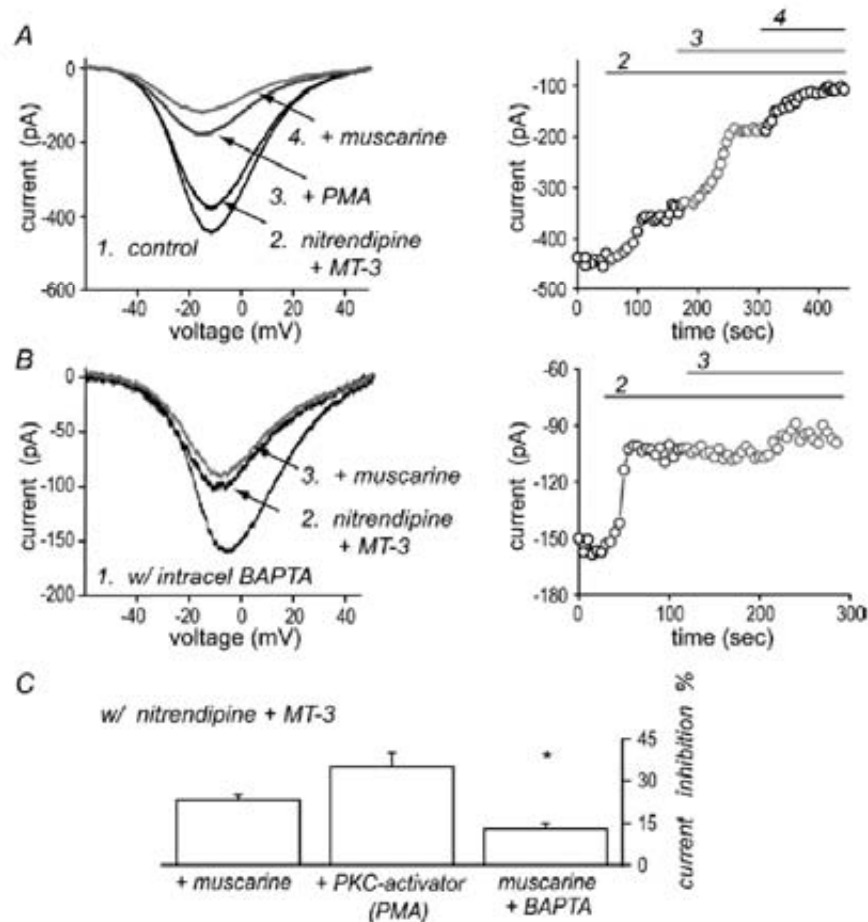


Fig. 4. The muscarinic M_1 modulation of Ca_v2 channels is mediated by PKC. (A) As in Figs. 2 and 3, L-type Ca^{2+} -channels and M_2 -type receptors were blocked since the control. Activation of PKC mimics muscarine action: Ca_v2 Ca^{2+} -current modulation was induced by 500 nM of the PKC-activator PMA (B). In addition, reduction of intracellular calcium abolished muscarine action, intracellular calcium was reduced with 15 mM BAPTA in the recording pipette ($P < 0.05$). (C) Histogram shows a summary of all the experiments. Differences between percent modulation by muscarine and PMA were not significant. However, there were significant differences between muscarinic effects in the control vs. those obtained with intracellular BAPTA.

ment has acted was only $14 \pm 2\%$ (median = 13%, $n = 8$; $P < 0.05$ with respect to the reduction without PMA; Mann-Whitney's U test). To summarize, an array of coherent results obtained with four different drugs and experimental samples suggests that muscarinic M_1 -type receptors in neostriatal spiny neurons may be acting, at least in part, through the PLC/IP₃-Ca²⁺-DAG/PKC signaling cascade to reduce Ca²⁺ currents through Ca_v2 channels.

To further substantiate this inference, we tested the intermediate step of the cascade using 15 mM intracellular BAPTA to block the intracellular Ca²⁺ rises that have been repeatedly proven to happen as a result of M_1 receptor activation (Howe and Surmeier, 1995; Figueroa et al., 2002; Carrillo-Reid et al., 2008b). Fig. 4B shows that this maneuver reduces muscarine action with respect to the control to $13 \pm 2\%$ (median = 15%, $n = 8$; $P < 0.05$; Mann-Whitney's U test), suggesting that muscarinic modulation depends on intracellular Ca²⁺. Histograms in Figs. 2D, 3D and 4C summarize results from the experimental samples used in the above experiments.

The actions of inhibitors, at each step of the cascade, led to a significant reduction of muscarine action, during L-type Ca²⁺-channels and M_4 -type receptor blockage. The most parsimonious interpretation of these results is that the PLC/IP₃-Ca²⁺-DAG/PKC signaling cascade can reduce Ca_v2 currents through the activation of M_1 -type receptors via its canonical voltage-independent signaling (e.g. Shapiro et al., 1999; Hamid et al., 1999; Yamada et al., 1999; Colecraft et al., 2000; Bannister et al., 2004; Tai et al., 2006; Salgado et al., 2007). Lack of action of inactive analogues on the first and last step of the cascade reinforces this view.

However, the PLC/IP₃-Ca²⁺-DAG/PKC signaling cascade has other possible branches or end steps. For example, it has been suggested that muscarinic M_1 -type receptors may modulate ionic channels through PP-2B (or calcineurin) (e.g. Armstrong, 1989). PP-2B can be activated by a rise in intracellular Ca²⁺ produced during the activation of the PLC/IP₃-Ca²⁺ steps of the same pathway. Therefore, instead of accepting the above results without further testing, experiments were designed to see if the muscarinic modulation of Ca_v2 Ca²⁺ channels in spiny neurons was partially mediated by calcineurin.

Muscarinic M_1 -receptor-mediated modulation of Ca_v2 Ca²⁺ channels is not through PP-2B

Inhibitors of PP-2B were used in experiments performed during blockage of L-type Ca²⁺ channels with 10 μ M nifedipine, to isolate current through Ca_v2 Ca²⁺ channels, and M_4 -type receptors blockage with 8–20 nM MT-3, to isolate M_1 -type receptor actions.

Two different PP-2B inhibitors were used to assess muscarine action on Ca_v2 Ca²⁺-channels. First, application of 25 μ M of the calcineurin inhibitor peptide through the recording pipette was unable to block muscarinic modulation (Fig. 5A): $30 \pm 3\%$ (median = 32%, $n = 7$; $P < 0.05$, Wilcoxon's t -test). Second, the PP-2B inhibitor, 1 μ M FK 506, was also unable to block the muscarinic modulation (Fig. 5B): $31 \pm 5\%$ (median = 29%, $n = 7$, NS, Wilcoxon's

t -test). Fig. 5C summarizes these results, and discards calcineurin as the enzyme in charge of Ca_v2 channels' modulation via M_1 -type receptors, reinforcing the view that PKC is (see above).

Nonetheless, we performed an additional negative control: we checked if PP-2B was present and functional in the dissociated neurons used for recordings. We found that PP-2B was present and functional (see below and Fig. 9C, D), it is just that M_1 -receptor signaling does not use it.

The above experiments show that muscarinic M_1 -receptor modulation of Ca_v2 Ca²⁺-channels was significantly reduced after PKC inhibition. Nonetheless, it is also shown that there is a remaining muscarinic modulation not blocked by PKC inhibition. This modulation was above 10%. Because the current through Ca_v2 Ca²⁺ channels could be carried either by P/Q-type (Ca_v2.1) or N-type (Ca_v2.2) Ca²⁺ channels (Perez-Rosello et al., 2005), we hypothesized that only one of these channel types, N or P/Q, was being modulated by the PLC/IP₃-Ca²⁺-DAG/PKC signaling cascade.

The PLC/IP₃-Ca²⁺-DAG/PKC signaling cascade modulates N (Ca_v2.2) but not P/Q (Ca_v2.1) Ca²⁺ channels

The experiments to test this hypothesis were done in the same conditions (nitrendipine + MT-3, see above, to block L-type Ca²⁺-channels and M_4 -type receptors). In addition, we applied either one of the following peptidic toxins: 1 μ M ω -CgTx-GVIA to block N-type channels, or 400 nM ω -AgTx-TK, to block P/Q-type channels, the rationale being that either toxin would only occlude the muscarinic reduction of the modulated channel.

Fig. 6A shows that after blocking the P/Q-type component (Ca_v2.1) of the Ca_v2 current with ω -AgTx-TK, leaving only the N-type component (Ca_v2.2) available for modulation, muscarine keeps modulating the available current. Reduction was about $13 \pm 2\%$ (median = 12, $n = 11$; $P < 0.01$, Wilcoxon's t -test). This shows that muscarine modulates N-type Ca²⁺ channels.

Fig. 6B shows that modulation of N-type channels (Ca_v2.2) was virtually abolished by the PKC inhibitor BIS I (200 nM). After PKC inhibition, the modulation left was $5 \pm 2\%$ (median = 4, $n = 5$; $P < 0.05$, Mann-Whitney's U test). Therefore, N-type Ca²⁺ channels (Ca_v2.2) are modulated by PKC.

We then observed the remaining muscarinic modulation after blocking the N-type component of the Ca_v2 current with ω -CgTx-GVIA, leaving the P/Q-type component (Ca_v2.1) available for modulation. A clear modulation could still be seen on P/Q-type channels of about: $14 \pm 2\%$ (median = 12, $n = 7$; $P < 0.03$, Wilcoxon's t -test) (Fig. 6C). Note that the sum of individual modulations of N- and P/Q-type channels, equals the amount modulated of Ca_v2 Ca²⁺-channels.

However, in this case it was seen that BIS I block of PKC (Fig. 6D) did not affect the muscarinic modulation of the P/Q-type current: $11 \pm 2\%$ (median = 10, $n = 7$; NS, Mann-Whitney's U test). Therefore, although muscarine modulates both the P/Q-type (Ca_v2.1) and N-type (Ca_v2.2) components of the Ba²⁺ current through M_1 -type receptors activation and a PLC-dependent diffusible path-

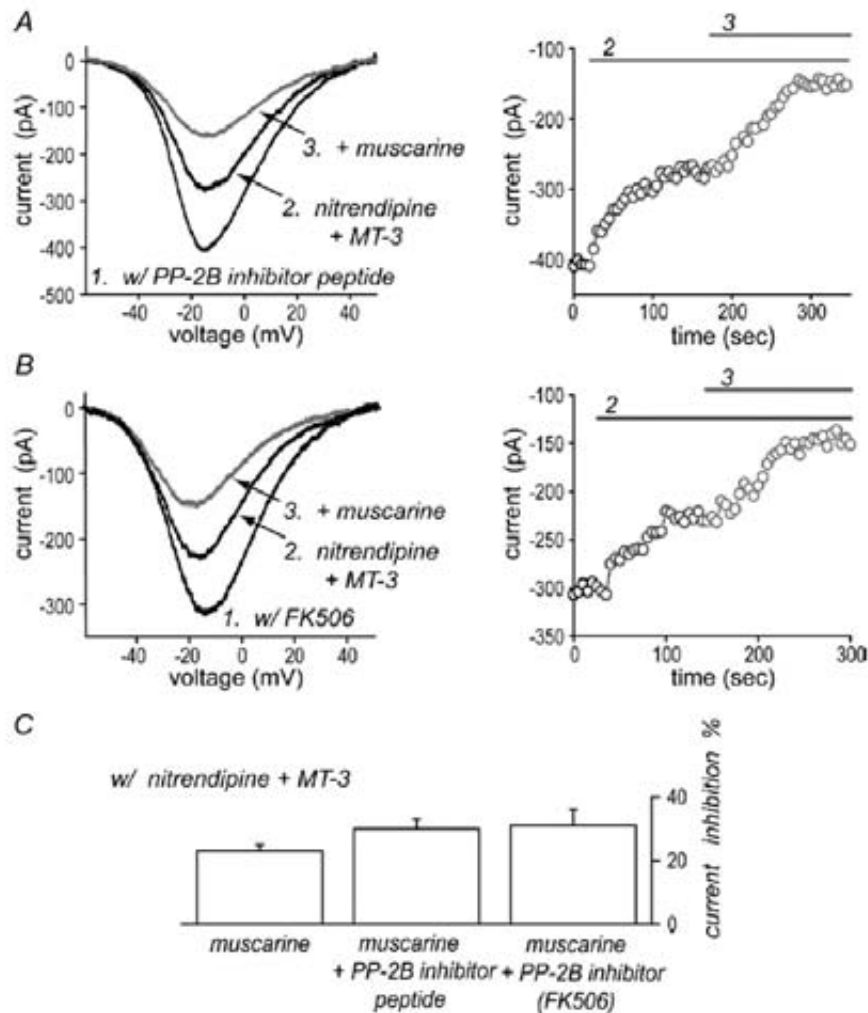


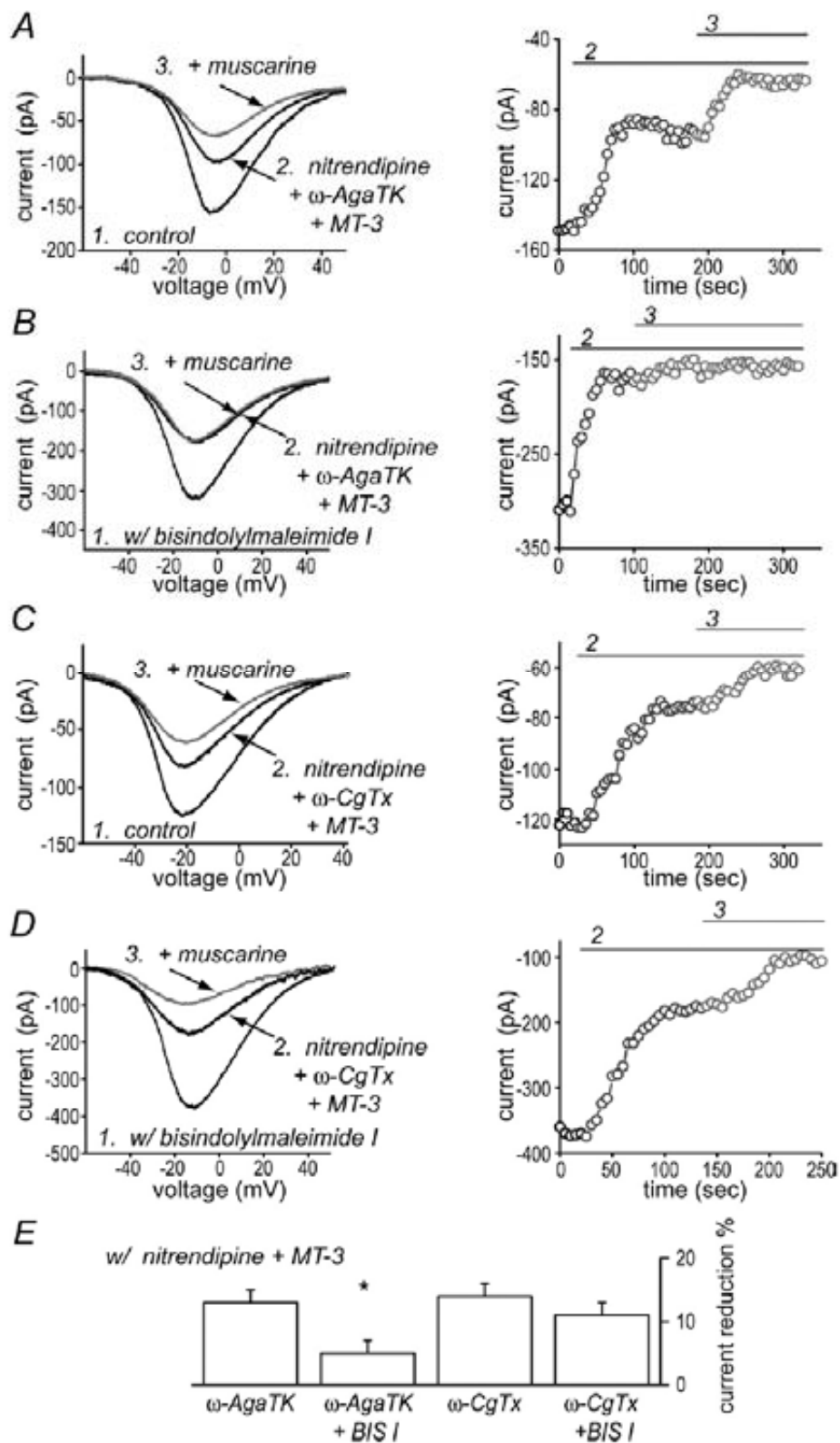
Fig. 5. Calcineurin does not mediate muscarinic modulation of Ca_v2 Ca^{2+} currents. (A, B) As in the previous figures L-type Ca^{2+} -channels and M_1 -type receptors were blocked since the control. Neither intracellular application of 25 μ M of the PP-2B inhibitor peptide nor bath application of 1 μ M FK506, another PP-2B inhibitor, impeded muscarine modulation of Ca_v2 Ca^{2+} -currents. (C) Histogram illustrates that calcineurin blockage had no significant effects on muscarinic modulation.

way, it does not modulate the P/Q-type component through PKC, but only the N-type component, thus explaining the remaining modulation after PKC inhibition. A histogram in Fig. 6E summarizes these results suggesting that different branches of a signaling cascade, activated by a single receptor type, are capable of targeting different effectors, even if they belong to the same family of proteins (voltage dependent Ca_v2 Ca^{2+} channels in this case).

M_1 -receptors also modulate L-type (Ca_v1) Ca^{2+} channels through the PLC/IP₃- Ca^{2+} -DAG/PKC signaling cascade

Activation of muscarinic M_1 -type receptors can reduce L-type (Ca_v1) Ca^{2+} channels through a diffusible signal (Howe and Surmeier, 1995; Pemberton and Jones, 1997;

Perez-Rosello et al., 2005). Therefore, we tested if this signal comes from the PLC/IP₃- Ca^{2+} /PP-2B pathway, or alternatively, if it occurs through the PLC/IP₃- Ca^{2+} -DAG/PKC signaling cascade as it is the case of N-type Ca^{2+} channels. To perform the corresponding experiments we again used the MT-3 toxin to block the M_1 -type receptors, and in exchange of nitrendipine, we used a combination of ω -CgTx-GVIA (1 μ M) and ω -AgTx-TK (400 nM) to block N- and P/Q-types of Ca^{2+} channels (Ca_v2). In this manner, L-type Ca^{2+} channels (Ca_v1) are left functional and available for modulation. We chose not to enhance L-type Ca^{2+} current with a dihydropyridine agonist (e.g. with Bay K 8644) due to a modification of signaling conveyed by this maneuver (e.g. Katoh et al., 2000). Fig. 7A shows, first, that muscarinic M_1 -type receptor activation has an action



on Ba^{2+} currents after blocking the components sensitive to ω -CgTx-GVIA (N) and ω -AgTx-TK (P/Q), that is, muscarine (1 μ M) reduces Ba^{2+} current through L-type (Ca_v1) Ca^{2+} channels by $26 \pm 3\%$ (median=28%, $n=6$, $P < 0.05$, Wilcoxon's *t*-test). Second, Fig. 7B shows that the PLC inhibitor (10 μ M U73122) greatly occludes the action of muscarine on L-type Ca^{2+} channels to $7 \pm 1\%$ (median=7%, $n=6$, $P < 0.05$, Mann-Whitney's *U* test). Third, we used the inactive analog, U73343 (10 μ M), in order to discard possible unspecific effects of U73122. In this case, muscarine still reduces the current by $23 \pm 6\%$ (median=18%, $n=3$, Fig. 7C), not significantly different to the control (Fig. 7C, D), in the presence of the inactive analog. The lack of action of the inactive analog suggests that PLC-blockage by U73122 is specific. Fig. 7C shows that muscarine action on L-type current is reversible (Perez-Rosello et al., 2005). These experiments show that L-type current modulation involves PLC.

Fig. 8A shows experiments with three different drugs to see the involvement of PKC on L-type channel modulation. First, in the presence of ω -CgTx-GVIA and ω -AgTx-TK, the PKC activator PMA (500 nM) is capable of reducing the current by $17 \pm 4\%$ (median=21%, $n=6$, NS as compared with muscarine alone, Mann-Whitney's *U* test). Muscarine action was largely occluded after PMA (Fig. 5B): $7 \pm 2\%$ (median=9%, $n=6$, $P < 0.01$, Mann-Whitney's *U* test). Therefore, PMA is capable of mimicking muscarine action on L-type Ca^{2+} channels.

Second, the PKC inhibitor BIS I (200 nM) abolished the muscarinic action on the current ($3.6 \pm 1.7\%$, median=3, $n=4$, $P < 0.05$, Mann-Whitney's *U* test, Fig. 8B). That is, a PKC activator mimics, while a PKC inhibitor abolishes, muscarinic modulation.

Third, application of the inactive analog, BIS V (200 nM) had no effect, suggesting that the action of BIS I is specific ($18 \pm 3\%$, median=18, $n=5$, NS, Mann-Whitney's *U* test). Under this condition, muscarine actions on L-type current could be washed off (Fig. 8C). Furthermore, Fig. 8B shows negligible rundown of modulatable current when muscarine action is blocked.

The most parsimonious interpretation of these results taken together is that muscarinic M_1 -type receptor activation modulates Ca_v1 Ca^{2+} channels in neostriatal spiny cells via PKC (Howe and Surmeier, 1995; Perez-Rosello et al., 2005).

Still, we performed a fourth test, using two different drugs, to demonstrate that muscarine was still capable of reducing the current through L-type Ca^{2+} -channels when

PP-2B was inhibited (Fig. 9A and 9B). First, in the bath presence of the PP-2B inhibitor, 1 μ M FK506, or alternatively, in the intracellular presence of the PP-2B inhibitor peptide (25 μ M), the muscarinic modulation was still present: about $20 \pm 1\%$ (median=20%, $n=3$, NS, Mann-Whitney *U* test) and $20 \pm 4\%$ (median=18%, $n=7$, NS, Wilcoxon's *t*-test), respectively; and not significantly different to the control (cf., Fig. 7A).

Nevertheless, it could still be argued that PP-2B is not active in our preparation. Therefore, we obtained an independent indication that PP-2B was functional in the recorded cells (control for muscarine actions). Thus, in the representative experiment shown in Fig. 9D we probed FK506 on the dopaminergic D_2 -class receptor modulation of L-type Ca^{2+} channels, known to be mediated by the PP-2B branch of the cascade (Hernandez-Lopez et al., 2000). Thus, Fig. 9C illustrates that the $D_{2/2}$ -type dopaminergic receptor agonist, quinolorane (10 μ M), was capable of reducing L-type current by a $23 \pm 2\%$ (median=24%, $n=6$, $P < 0.05$, Wilcoxon's *t*-test; in the bath presence of ω -CgTx-GVIA and ω -AgTx-TK). Then, Fig. 9D shows that quinolorane modulation was inhibited by the bath presence of the PP-2B inhibitor (1 μ M FK506) (modulation left was $5 \pm 1\%$, median=5%, $n=3$, $P < 0.05$; Mann-Whitney's *U* test). The PP-2B inhibitor peptide had similar actions (data not shown). Therefore, PP-2B was present and functional in the recorded neurons. It is not used by M_1 -type receptors signaling but it is used by D_2 -type receptor signaling (Hernandez-Lopez et al., 2000). Therefore, different receptors may use different end branches of the same signaling cascade to modulate the same channel, suggesting the possibility of additive or synergistic effects.

Histograms in Figs. 7D, 8D and 9E summarize these experiments clearly indicating that the muscarinic modulation is via the PKC branch of the pathway.

Double control of the AHP

Ca^{2+} -activated K^+ -currents are important contributors to make up the AHP that follows action potentials in spiny neostriatal neurons (Pineda et al., 1992; Bargas et al., 1999). Ca^{2+} -activated K^+ -currents in these neurons are selectively activated by Ca^{2+} influx through N- and P/Q-type Ca^{2+} channels (Ca_v2), but not L-type Ca^{2+} channels (Ca_v1) (Vilchis et al., 2000). Because muscarinic M_1 -type receptors enhance evoked discharge in part due to a reduction of AHP resulting in briefer interspike intervals (Pineda et al., 1995; Vilchis et al., 2000), it is then inferred

Fig. 6. PKC modulates the N-type ($Ca_v2.2$) but no the P/Q-type ($Ca_v2.1$) Ca^{2+} currents. (A) In the presence of nifedipine and MT-3 (to block L-type Ca^{2+} channels and M_1 -type receptors), 400 nM ω -AgTx-TK was added to block the $Ca_v2.1$ channel component of the Ca_v2 current. Thus, modulation, if present, should involve $Ca_v2.2$ (N-type) Ca^{2+} -channels only. In these conditions, there was a clear muscarinic modulation ($P < 0.01$). (B) In the presence of the PKC-inhibitor BIS I, the muscarine modulation on $Ca_v2.2$ were virtually abolished ($P < 0.05$), suggesting that PKC modulates N-channels. (C) In the reverse experiments, we used 1 μ M of ω -CgTx-GVIA to block the $Ca_v2.2$ channel component of the Ca_v2 current, thus allowing modulation on $Ca_v2.1$ (P/Q-type) Ca^{2+} -channels only. In these conditions, the muscarine modulation on $Ca_v2.1$ was still present ($P < 0.03$) confirming that muscarine modulates both N- and P/Q-type channels. (D) In the presence of the 200 nM BIS I, the muscarine modulation of P/Q-type channels was unaffected. (E) Histogram shows that inhibition of PKC only affected the modulation of N-channels, and not that of P/Q-channels. There were significant differences between the percentage of muscarinic reduction on N-type channels with and without BIS I. Note that the modulation of N- plus the modulation of P/Q-type currents approximates the total modulation of Ca_v2 Ca^{2+} channels (cf., A, C with Fig. 2A).

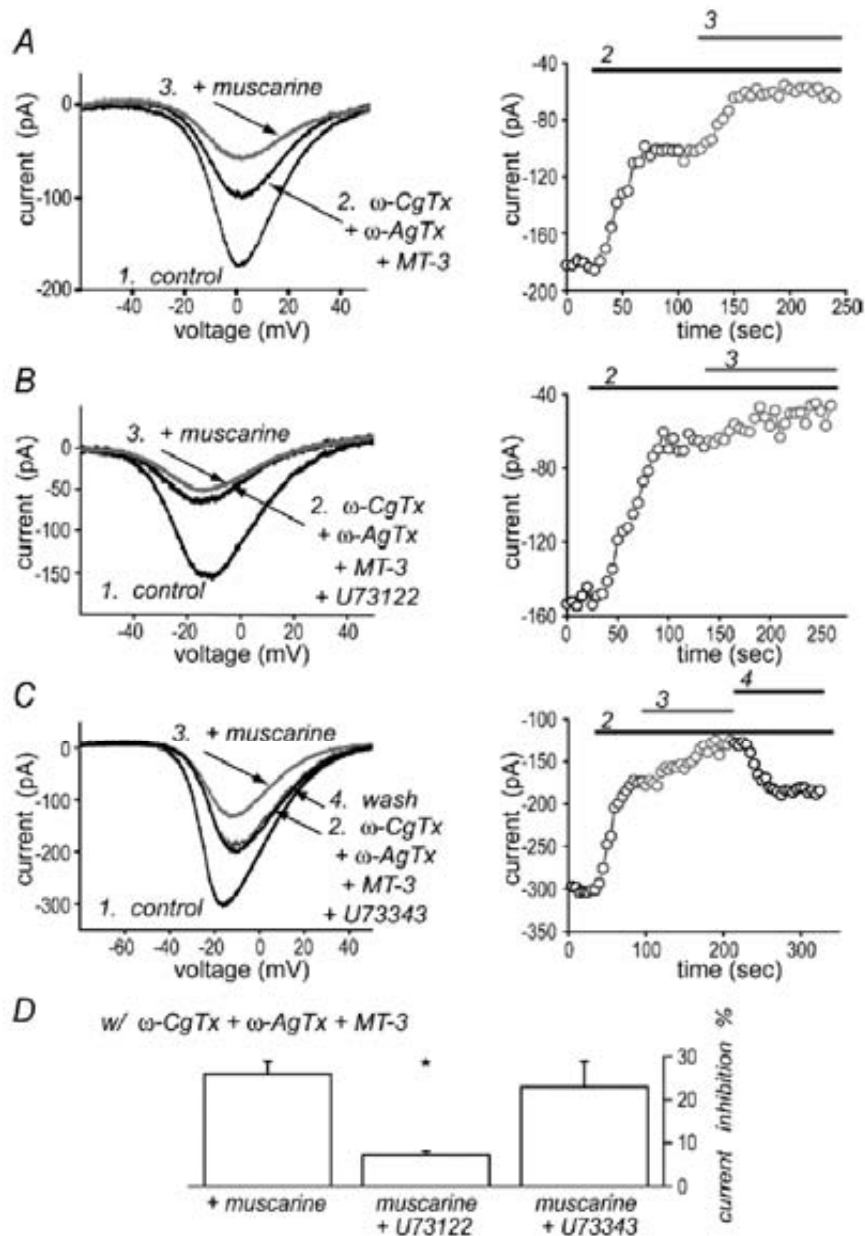


Fig. 7. Muscarinic modulation of Ca_v1 Ca^{2+} -currents can be blocked by a PLC inhibitor. (A) ω -AgTx-TK and ω -CgTx-GVIA were used to block $\text{Ca}_v2.1$ and $\text{Ca}_v2.2$ channels, respectively. The MT-3 toxin was used to block M_2 -type muscarinic receptors. In these conditions, M_1 muscarinic modulation (reduction) of L-type Ca^{2+} -channels was evident ($P < 0.05$). (B) The PLC-inhibitor U73122 ($10 \mu\text{M}$) blocked muscarinic modulation of L-channels ($P < 0.05$). (C) U73343 ($10 \mu\text{M}$), the negative control of U73122 did not prevent the muscarinic modulation of Ca_v1 channels involves the PLC pathway. Thus, there were significant differences between percentage of muscarinic effects on L-type channels with and without U73122.

that muscarinic M_1 -receptor modulation may be acting, in part, through modulating Ca_v2 Ca^{2+} -currents.

Interestingly, however, blocking just one of the channels involved, N or P/Q, has only partial effects (Vilchis et al., 2000; Salgado et al., 2005). Both N and P/Q channels have

to be blocked simultaneously in order to significantly reduce the AHP (Perez-Garci et al., 2003). The above results show that N and P/Q channels are modulated by different branches of the M_1 -receptors signaling cascade. It is then inferred that, blocking only one of these branches, e.g. PKC, would not

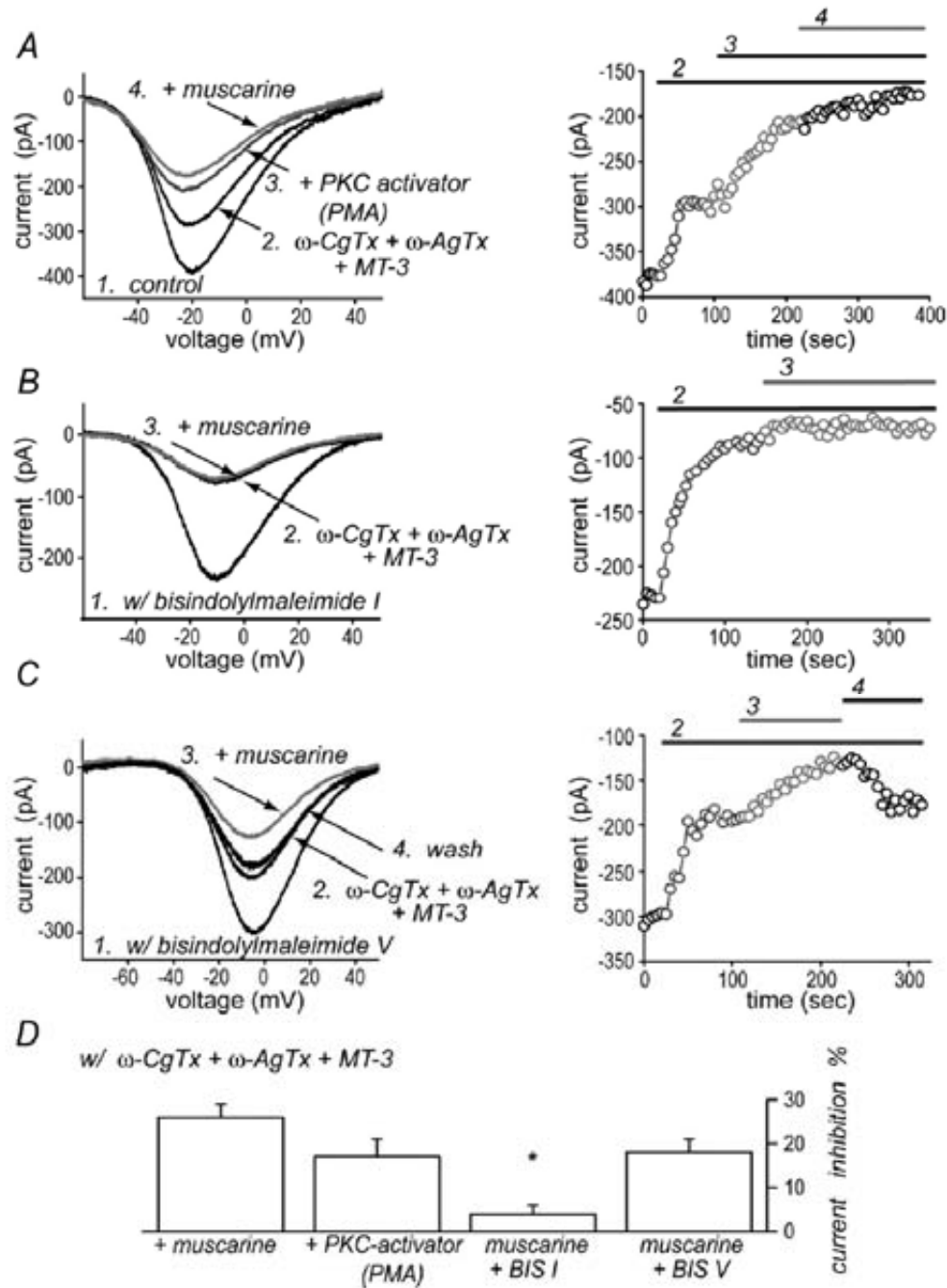


Fig. 8. Ca_v1 current is modulated by PKC. (A) As in Fig. 7, N- and P/Q-type Ca^{2+} -channels and M_2 -type receptors were blocked. The M_1 muscarinic modulation of Ca_v1 channels was mimicked by 500 nM of the PKC activator PMA. (B) The PKC-inhibitor BIS I (200 nM) abolished muscarinic actions on L-type channels ($P < 0.05$). (C) However, 200 nM BIS V, the negative control of BIS I, did not prevent the muscarinic modulation of Ca_v1 current. However, this figure shows reversibility of muscarine actions on Ca_v1 channels. (D) Histogram shows a summary of these experiments. Differences between percentage modulation of muscarine in the control vs. that after PMA were not significant. However, there were significant differences between muscarinic effects in control conditions and with BIS I.

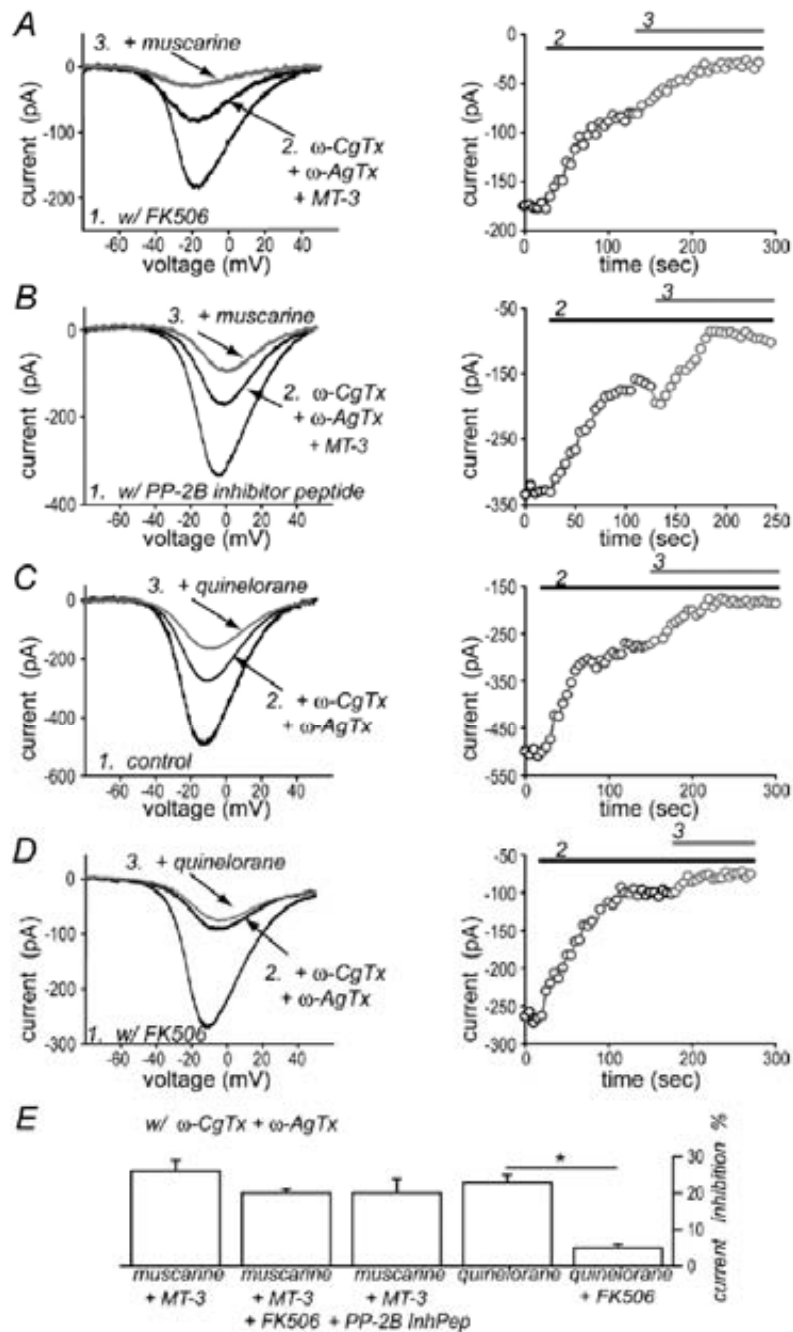


Fig. 9. Calcineurin does not mediate M_1 -receptor modulation of Ca_v1 Ca^{2+} currents. (A, B) As in Figs. 7 and 8, N- and P/Q-type Ca^{2+} -channels and M_4 -type receptors are blocked. Neither, bath application of $1 \mu M$ FK506 a PP-2B inhibitor nor intracellular application of $25 \mu M$ of the PP-2B inhibitor peptide, impeded muscarinic modulation of Ca_v1 Ca^{2+} -currents. (C) In the presence of N- and P/Q-type calcium channel blockers, dopaminergic D_2 modulation (reduction) of L-type Ca^{2+} -channels can be observed. (D) Bath application of $1 \mu M$ FK506, a PP-2B inhibitor, impeded dopaminergic modulation of Ca_v1 Ca^{2+} -currents. (E) Histogram illustrates that calcineurin blockage has no significant effects on muscarinic modulation, but it is capable of preventing the dopaminergic modulation on Ca_v1 channels. Calcineurin blockage had significant differences with respect to the control on dopaminergic modulation ($P < 0.05$) while muscarinic modulation was not affected.

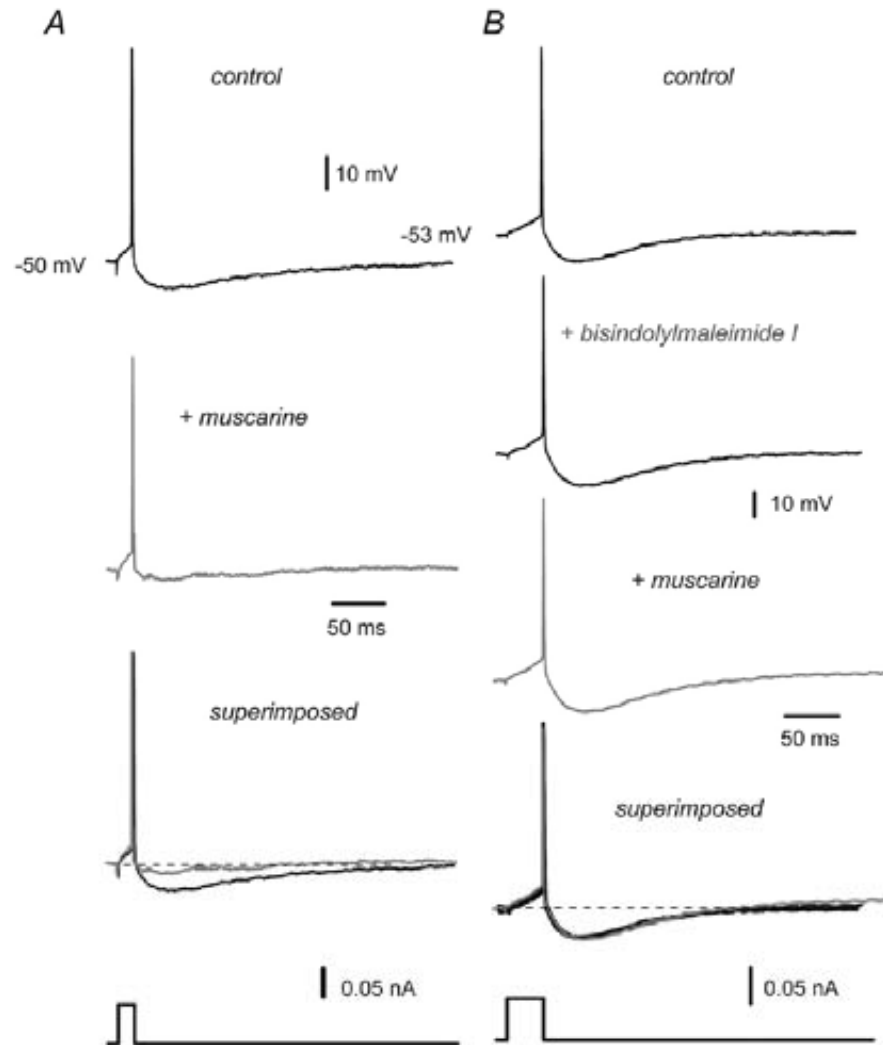


Fig. 10. PKC inhibition impedes the reduction of the AHP produced by muscarine. (A) Intracellular injections of brief depolarizing current steps evoked an AHP after a single action potential from about -50 mV (control). After muscarine ($1 \mu\text{M}$) application the AHP was greatly reduced (+muscarine) ($P < 0.01$). This action is mimicked by PKC-activators (Pineda et al., 1995). Superimposed traces are also shown. Stimulus is at the bottom. Note that the AHP is generated after the stimulus (when the electrode is not passing current). (B) Similar experiments were repeated during 200 nM BIS I. When PKC was inhibited, muscarine lost its action on the AHP. This confirms that both channels, N and P/Q, need to be inhibited to block the AHP.

affect the AHP because only one channel type would be affected (Perez-Garci et al., 2003). This predicted result was obtained and is illustrated in Fig. 10.

Thus, it was first confirmed that muscarine ($1 \mu\text{M}$) is capable of reducing the AHP (Pineda et al., 1995) (Fig. 10A): the AHP was reduced from 7.3 ± 0.4 mV in the control to 4.2 ± 0.4 mV after muscarine, for a $43 \pm 4\%$ reduction ($n = 15$; $P < 0.01$, Wilcoxon's *t*-test). However, when muscarine is tested in the presence of the PKC inhibitor, 200 nM BIS I, to avoid, exclusively, N-type Ca^{2+} -channels participation (Fig. 10B), the AHP was affected in only a small percentage: from 7.3 ± 1.2 before to 6.7 ± 1.2 after muscarine ($n = 7$; NS, Fig. 10B) (Perez-Garci et al., 2003; Vilchis et al., 2000). This predicted result confirms that

inhibition of PKC is only affecting one of the calcium channels in charge of generating the AHP.

Interestingly, this result also suggests that transmitters that only affect one of these channels (e.g. dopamine, see: Salgado et al., 2005) would not affect the AHP significantly (see Discussion). It is known that M_4 -type receptors have no action on sustained outward currents or the AHP, and instead, it is known that M_1 -type receptors modulate both (Shen et al., 2005; Pineda et al., 1995; Perez-Rosello et al., 2005).

Regulation of sustained depolarizations

L-type Ca^{2+} channels are only modulated through muscarinic activation of M_1 -type receptors (Howe and Surmeier,

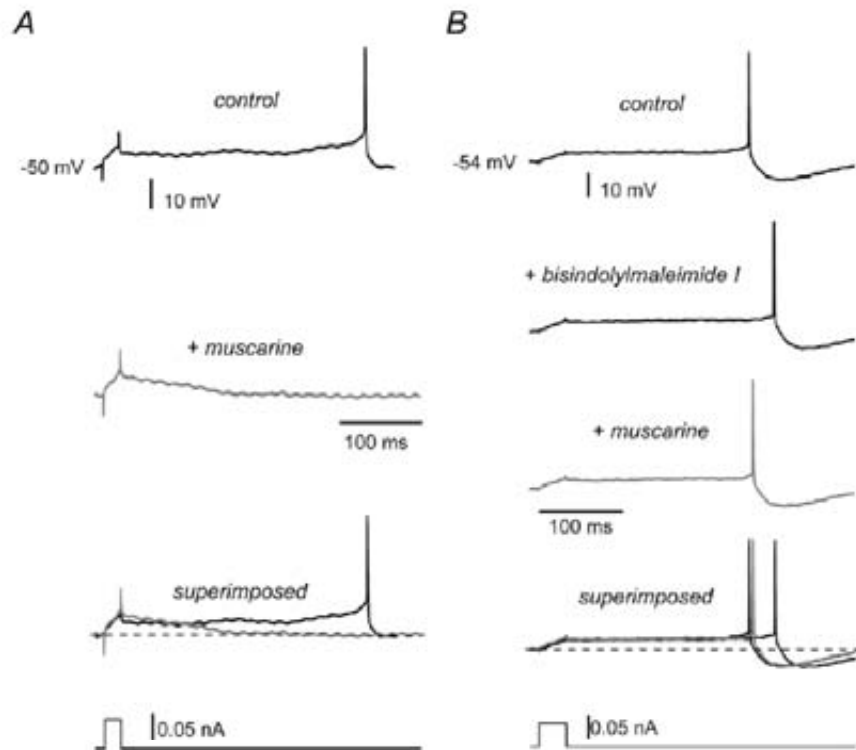


Fig. 11. PKC inhibition blocks muscarine reduction of slow subthreshold depolarizations. (A) Brief current steps given at near threshold potentials (-50 mV, approximately) generate slow depolarizations capable of inducing firing at times much longer than the duration of the stimulus that evokes the depolarization (control). Muscarine ($1 \mu\text{M}$) reduced the slow depolarization ($P < 0.05$). Superimposed traces are also shown. (B) After PKC inhibition, muscarine was no longer capable of reducing the slow depolarization.

1995; Perez-Rosello et al., 2005). L-type Ca^{2+} channels do not participate in AHP generation in neostriatal neurons (Vilchis et al., 2000). Instead, L-type Ca^{2+} channels generate prolonged depolarizations that outlast stimulus duration and boost weak depolarizing stimulus changing firing threshold and frequency (Hernández-Lopez et al., 1997; Perez-Garci et al., 2003). Because the above experiments indicate that muscarine reduces current through L-type Ca^{2+} channels, it should also be capable of reducing these slow depolarizations. Fig. 11A shows that this is the case: muscarine reduces the prolonged depolarizations evoked at depolarized potentials (Hernández-Lopez et al., 1997) by $51 \pm 8\%$ (measuring the area under the voltage response; $n=7$; $P < 0.05$; Wilcoxon's t -test). However, after PKC inhibition muscarine was no longer capable of reducing the prolonged depolarizations ($n=5$; change = 0.03% ; NS). By itself, bisindolylmaleimide did not modify the slow depolarization ($n=5$; change = 0.04% ; NS, Fig. 11B).

DISCUSSION

The present work shows, and to our knowledge it has not been shown before, that: 1) the same muscarinic receptor type, the M_1 -receptor, modulates N ($\text{Ca}_v2.2$), P/Q ($\text{Ca}_v2.1$) and L (Ca_v1) calcium channel types simulta-

neously, but not the R-type ($\text{Ca}_v2.3$) calcium channels in neostriatal projection neurons. 2) the three modulated calcium channel types can be controlled by a PLC-dependent pathway activated by the M_1 -receptor. This pathway is diffusible, voltage-independent, and dependent on intracellular calcium, 3) two of these channels, N and L, are modulated via PKC, and the third channel (P/Q) is modulated by another (undetermined) branch of the same pathway, and 4) this signaling pathway has a potential impact in the control of the firing pattern via the AHP and subthreshold response modifications.

Previously, we had shown that M_1 -receptors control the firing pattern of medium spiny neurons (Pineda et al., 1995; Galarraga et al., 1999) and transmitter release from the terminals of these neurons (Perez-Rosello et al., 2005), a release that is controlled by P/Q-type channels in adult neurons (Salgado et al., 2005). Now we are showing a part of the intracellular signaling underlying these M_1 -actions. It involves PKC activation. Notably, muscarinic M_1 -receptor-mediated modulation of Ca^{2+} channels through the canonical PKC phosphorylation pathway has seldom been reported in brain neurons (e.g. Doerner and Alger, 1992; Michel et al., 2005; Tai et al., 2006; Salgado et al., 2007).

In contrast, dopaminergic D_2 -receptors only control P/Q and L channels (but not N-channels) in adult neurons. Because there is need to control both N and P/Q channels to regulate the AHP, dopamine does not control firing through AHP regulation, but by controlling the subthreshold depolarization generated by L-channels (Hernandez-Lopez et al., 1997, 2000). Nonetheless, dopamine controls transmitter release via P/Q-channels (Salgado et al., 2005) and using the PP-2B pathway (Hernandez-Lopez et al., 2000).

To block M_4 -type receptor actions and isolate M_1 -receptor actions, we used the very specific M_4 -type receptor antagonist MT-3 (Jerusalinsky et al., 2000; Perez-Rosello et al., 2005). Interestingly, not all neostriatal projection neurons possess M_4 -type receptors (Yan et al., 2001) but all of them exhibit AHP reduction and firing enhancement after muscarinic agonists (Pineda et al., 1995; Perez-Rosello et al., 2005). In fact, there is an overwhelming presence of M_1 -receptors in most striatal neurons (Yan et al., 2001).

Modulation of Ca^{2+} -channels by PKC

Data relating neuronal firing with intracellular signaling cascades are still insufficient to adequately associate transmitters that activate G-protein-linked receptors with behavioral models (Graybiel, 1995). For example, both facilitation and reduction of Ca^{2+} -currents have been described due to activation of PKC (Hammond et al., 1987; Doerner and Alger, 1992; Yang and Tsien, 1993; Pember-ton and Jones, 1997; Yamada et al., 1999; Kamatchi et al., 2003; Michel et al., 2005; Tai et al., 2006). In the present case, muscarinic M_1 -receptor-mediated attenuation of $Ca_v2.2$ (N-type) and Ca_v1 (L-type) Ca^{2+} -channels occurs via the "canonical" PKC signaling cascade (Caulfield, 1993), and does not occur via the branch of this cascade that involves the activation of PP-2B (calcineurin)-which is used by dopamine $D_{2/3}$ receptors. That is, it is shown that even if different receptors (D_2 and M_1) apparently "share" the same signaling pathway to control the same effector protein, they may not use the same end branches to modulate this protein. In addition, muscarinic M_1 -type receptors may modulate Ca^{2+} -channels through a diffusible intracellular cascade that is not carried by intracellular Ca^{2+} or PKC in adult rat superior cervical ganglion neurons (Beech et al., 1991; Bernheim et al., 1991, 1992). This shows that one cannot generalize the findings in some neuron class to imply other neuron classes.

Furthermore, a main finding of this work demonstrates that the same receptor expressed by the same cell class (M_1 -receptors) modulates $Ca_v2.2$ (N-type) and Ca_v1 (L-type) Ca^{2+} -channels via PKC (Doerner and Alger, 1992; Zhu and Ikeda, 1994; Howe and Surmeier, 1995; Pember-ton and Jones, 1997; Hamid et al., 1999; Yamada et al., 1999; Bannister et al., 2004; Tai et al., 2006; Salgado et al., 2007), but it does not modulate $Ca_v2.1$ (P/Q-type) Ca^{2+} -channels via this kinase (Nathanson, 2000). One working hypothesis could be that these Ca^{2+} -channels may be modulated through phosphatidylinositol (4, 5) bisphosphate (PIP_2) hydrolysis mediated by PLC (Huang,

2007; Suh and Hille, 2005). Specifically, P/Q-channels rundown has been attributed to PIP_2 hydrolysis in *Xenopus* oocytes (Wu et al., 2002). Additional control may be exerted via M_4 -type receptors (Howe and Surmeier, 1995). Finally, muscarinic M_1 -type receptors do not modulate R-type ($Ca_v2.3$) calcium channels in neostriatal neurons (see Perez-Rosello et al., 2005 and Fig. 1F) as it has been reported in heterologous expression systems (Bannister et al., 2004).

In summary, different receptors may use different branches of the PLC-cascade and the same receptor may use different branches, too. But the results cannot be generalized and each cell class has to be studied by itself.

Functional implications

Questions arise about the presence of several mechanisms to control Ca^{2+} -channels in the same neuron. A working hypothesis could be as follows: if different mechanisms (PP-2B, PKC) regulate the same channel (L), then synergistic actions on synaptic transmission are possible (Perez-Rosello et al., 2005; Salgado et al., 2005). In addition, channel cooperativity in AHP generation may be the reason why one transmitter (e.g. dopamine) may be able to affect synaptic transmission without affecting the AHP, while other transmitter (acetylcholine) may affect both. In one case there may be dissociation between firing and release (dopamine), in the other case may be not (acetylcholine). It is intriguing to know that a transmitter increases the firing frequency and at the same time decreases transmitter release. This mechanism could avoid unwanted long-term plastic changes in the synapses in spite of enhanced firing, and may facilitate alternation between network states (Carrillo-Reid et al., 2008a,b). To conclude, Ca^{2+} -channel diversity may allow differential regulation of excitability and synaptic transmission.

To summarize, a single modulatory transmitter such as ACh may have multiple and complex actions on neostriatal neurons (Akins et al., 1990; Howe and Surmeier, 1995; Galarraga et al., 1999; Calabresi et al., 2000; Figueroa et al., 2002; Shen et al., 2005, 2007), involving several ionic conductances, and a manifold of a single signaling cascade (Nathanson, 2000). This may not be easy to understand in *in vivo* physiological situations unless, first, each action is correlated with a specific branch of a signaling cascade with precise electrophysiological *in vitro* protocols.

The above conclusions may not come as a surprise given the complexity of intracellular signaling and sheds some light into the understanding of complex physiopathological mechanisms (Alzheimer disease, Tourette syndrome, schizophrenia and PD; Lucas-Meunier et al., 2003) and their therapeutics.

CONCLUSION

Data linking signaling with firing mechanisms are scarce and, most importantly, they are probably not the same in every neuron. The present work shows that for the case of M_1 -receptor signaling modulating N- and L-type Ca^{2+} -

channels, the cascade is the canonical one, and its effects on firing mechanism are readily predictable, that is, they can be used to explain circuit behavior during motor actions in different contexts. On the other hand, this work shows that P/Q-type Ca^{2+} -channels are not following the same canonical path. A similar situation is true for other channels modulated by M_1 -receptors (e.g. Harvey and Belevych, 2003). The same signaling cascade activated by a given transmitter receptor may use different end branches to modulate different effectors, i.e.: different Ca^{2+} channels.

Acknowledgments—We thank Antonio Laville and Dagoberto Tapia for technical support and advice. This work was supported by grants from a Program Project grant IMPULSA 03 to E. Galarraga and J. Vargas, by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (México) Grant 49484 to J. Vargas, and by grants from Dirección General de Asuntos del Personal Académico, Universidad Nacional Autónoma de México: IN201607 to J. Vargas and IN201507 to E. Galarraga.

REFERENCES

- Akns PT, Surmeier DJ, Kitai ST (1990) Muscarinic modulation of a transient K^+ conductance in rat neostriatal neurons. *Nature* 344:240–242.
- Aosaki T, Kimura M, Graybiel AM (1995) Temporal and spatial characteristics of tonically active neurons of the primate's striatum. *J Neurophysiol* 73:1234–1252.
- Armstrong DL (1989) Calcium channel regulation by calcineurin, a Ca^{2+} -activated phosphatase in mammalian brain. *Trends Neurosci* 12:117–122.
- Bannister RA, Mellitt K, Adams BA (2004) Differential modulation of $\text{Ca}_v2.3$ Ca^{2+} channels by $G_{\alpha q/11}$ -coupled muscarinic receptors. *Mol Pharmacol* 65:381–388.
- Bargas J, Ayala GX, Vilchis C, Pineda JC, Galarraga E (1999) Ca^{2+} -activated outward currents in neostriatal neurons. *Neuroscience* 88:479–488.
- Bargas J, Howe A, Eberwine J, Cao Y, Surmeier DJ (1994) Cellular and molecular characterization of Ca^{2+} currents in acutely isolated, adult rat neostriatal neurons. *J Neurosci* 14:6667–6686.
- Beech DJ, Bernheim L, Mathie A, Hille B (1991) Intracellular Ca^{2+} buffers disrupt muscarinic suppression of Ca^{2+} current and M current in rat sympathetic neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:652–656.
- Bernard V, Normand E, Bloch B (1992) Phenotypical characterization of the rat striatal neurons expressing muscarinic receptor genes. *J Neurosci* 12:3591–3600.
- Bernheim L, Beech DJ, Hille B (1991) A diffusible second messenger mediates one of the pathways coupling receptors to calcium channels in rat sympathetic neurons. *Neuron* 6:859–867.
- Bernheim L, Mathie A, Hille B (1992) Characterization of muscarinic receptor subtypes inhibiting Ca^{2+} current and M current in rat sympathetic neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:9544–9548.
- Berridge MJ (1987) Inositol trisphosphate and diacylglycerol: two interacting second messengers. *Annu Rev Biochem* 56:159–193.
- Birdsall NJM, Nathanson NM, Schwarz RD (2001) Muscarinic receptors: it's a knockout. *Trends Pharmacol Sci* 22:215–219.
- Budde T, Meuth S, Pape HC (2002) Calcium-dependent inactivation of neuronal calcium channels. *Nat Rev Neurosci* 3:873–883.
- Calabresi P, Centonze D, Gubellini P, Pisani A, Bernardi G (2000) Acetylcholine-mediated modulation of striatal function. *Trends Neurosci* 23:12012–12016.
- Carrillo-Reid L, Tecuapetla F, Tapia D, Hernandez-Cruz A, Galarraga E, Drucker-Colin R, Vargas J (2008a) Encoding network states by striatal cell assemblies. *J Neurophysiol* 99:1435–1450.
- Carrillo-Reid L, Tecuapetla F, Galarraga E, Hernandez-Cruz A, Vargas J (2008b) Compositionality of striatal cell assemblies. *Soc Neurosci Abstr meeting*.
- Catterall WA (2000) Structure and regulation of voltage-gated Ca^{2+} channels. *Annu Rev Cell Dev Biol* 16:521–555.
- Caulfield MP (1993) Muscarinic receptors—characterization, coupling and function. *Pharmacol Ther* 58:319–379.
- Caulfield MP, Birdsall NJ (1998) International Union of Pharmacology. XVII. Classification of muscarinic acetylcholine receptors. *Pharmacol Rev* 50:279–290.
- Colecraft HM, Patil PG, Yue DT (2000) Differential occurrence of reluctant openings in G-protein-inhibited N- and P/Q-type calcium channels. *J Gen Physiol* 115:175–192.
- Ding J, Guzman JN, Tkatch T, Chen S, Goldberg JA, Ebert PJ, Levitt P, Wilson CJ, Hamm HE, Surmeier DJ (2006) RGS4-dependent attenuation of M_4 autoreceptor function in striatal cholinergic interneurons following dopamine depletion. *Nat Neurosci* 9:832–842.
- Doerner D, Alger BE (1992) Evidence for hippocampal calcium channel regulation by PKC based on comparison of diacylglycerols and phorbol esters. *Brain Res* 597:30–40.
- Felder CC (1995) Muscarinic acetylcholine receptors: signal transduction through multiple effectors. *FASEB J* 9:619–625.
- Figueroa A, Galarraga E, Vargas J (2002) Muscarinic receptors involved in the subthreshold cholinergic actions of neostriatal spiny neurons. *Synapse* 46:215–223.
- Galarraga E, Hernandez-Lopez S, Reyes A, Miranda I, Bermudez-Rattoni F, Vilchis C, Vargas J (1999) Cholinergic modulation of neostriatal output: a functional antagonism between different types of muscarinic receptors. *J Neurosci* 19:3629–3638.
- Graybiel AM (1995) Building action repertoires: memory and learning functions of the basal ganglia. *Curr Opin Neurobiol* 5:733–741.
- Haley JE, Delmas P, Offermanns S, Abogadie FC, Simon MI, Buckley NJ, Brown DA (2000) Muscarinic inhibition of calcium current and M current in Gq-deficient mice. *J Neurosci* 20:3973–3979.
- Hamid J, Nelson D, Spaetgens R, Dubel SJ, Snutch TP, Zamponi GW (1999) Identification of an integration center for cross-talk between protein kinase C and G protein modulation of N-type calcium channels. *J Biol Chem* 274:6195–6202.
- Hammond C, Paupardin-Tritsch D, Nairn AC, Greengard P, Gerschenfeld HM (1987) Cholecystokinin induces a decrease in Ca^{2+} current in snail neurons that appears to be mediated by protein kinase C. *Nature* 325:809–811.
- Harvey RD, Belevych AE (2003) Muscarinic regulation of cardiac ion channels. *Br J Pharmacol* 139:1074–1084.
- Hernandez-Lopez S, Bargas J, Surmeier DJ, Reyes A, Galarraga E (1997) D_2 receptor activation enhances evoked discharge in neostriatal medium spiny neurons by modulating an L-type Ca^{2+} conductance. *J Neurosci* 17:3334–3342.
- Hernandez-Lopez S, Tkatch T, Perez-García E, Galarraga E, Bargas J, Hamm H, Surmeier DJ (2000) D_2 dopamine receptors in striatal medium spiny neurons reduce L-type Ca^{2+} currents and excitability via a novel $\text{PLC}\beta 1$ - IP_3 -calcineurin-signaling cascade. *J Neurosci* 20:8987–8995.
- Hosey MM, Borsotto M, Lazdunski M (1986) Phosphorylation and dephosphorylation of dihydropyridine-sensitive voltage-dependent Ca^{2+} channel in skeletal muscle membranes by cAMP- and Ca^{2+} -dependent processes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:3733–3737.
- Howe AR, Surmeier DJ (1995) Muscarinic receptors modulate N-, P-, and L-type Ca^{2+} currents in rat striatal neurons through parallel pathways. *J Neurosci* 15:458–469.
- Huang CL (2007) Complex roles of PIP2 in the regulation of ion channels and transporters. *Am J Physiol Renal Physiol* 293:1761–1765.
- Jerusalinsky D, Korniskuk E, Alfaro P, Quillfeldt J, Ferreira A, Rial VE, Duran R, Cerveñansky C (2000) Muscarinic toxins: novel pharmacological tools for the muscarinic cholinergic system. *Toxicon* 38:747–761.

- Kamatchi GL, Thwari SN, Chan CK, Chen D, Do SH, Durlieux ME, Lynch C 3rd (2003) Distinct regulation of expressed calcium channels 2.3 in *Xenopus oocytes* by direct or indirect activation of protein kinase C. *Brain Res* 966:227–237.
- Kaloh H, Schlotthauer K, Bers DM (2000) Transmission of information from cardiac dihydropyridine receptor to ryanodine receptor: evidence from BayK 8644 effects on resting Ca^{2+} sparks. *Circ Res* 87:106–111.
- Kawaguchi Y, Wilson CJ, Emson PC (1989) Intracellular recording of identified neostriatal patch and matrix spiny cells in a slice preparation preserving cortical inputs. *J Neurophysiol* 62:1052–1066.
- Liu L, Rittenhouse AR (2003) Pharmacological discrimination between muscarinic receptor signal transduction cascades with bethanechol chloride. *Br J Pharmacol* 138:1259–1270.
- Lucas-Mouner E, Fossier P, Baux G, Amar M (2003) Cholinergic modulation of the cortical neuronal network. *Pflügers Arch* 446:17–29.
- Marti M, Strerina S, Fuxe K, Bianchi C, Beani L, Morari M (1999) In vitro evidence for increased facilitation of striatal acetylcholine release via pre- and postsynaptic NMDA receptors in hemiparkinsonian rats. *J Neurochem* 72:875–878.
- McCormick DA, Prince DA (1986) Mechanisms of action of acetylcholine in the guinea-pig cerebral cortex in vitro. *J Physiol* 375:169–194.
- Michel FJ, Fortin GD, Martel P, Yeomans J, Trudeau LE (2005) M_2 -like muscarinic receptors mediate Ca^{2+} influx in rat mesencephalic GABAergic neurons through a protein kinase C-dependent mechanism. *Neuropharmacology* 48:796–809.
- Misgeld U, Calabresi P, Doit HU (1986) Muscarinic modulation of calcium dependent plateau potentials in rat neostriatal neurons. *Pflügers Arch* 407:482–487.
- Nathanson NM (2000) A multiplicity of muscarinic mechanisms: enough signalling pathways to take your breath away. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:6245–6247.
- Olson PA, Tkatch T, Hernandez-Lopez S, Ulrich S, Iljic E, Mugnaini E, Zhang H, Bezprozvanny I, Surmeier DJ (2005) G-protein-coupled receptor modulation of striatal $Ca_v1.3$ L-type Ca^{2+} channels is dependent on a shank-binding domain. *J Neurosci* 25:1050–1062.
- Parker PJ, Murray-Rust J (2004) PKC at a glance. *J Cell Sci* 117:131–132.
- Pemberton KE, Jones SV (1997) Inhibition of the L-type calcium channel by the five muscarinic receptors (m1-m5) expressed in NIH 3T3 cells. *Pflügers Arch* 433:505–514.
- Perez-Gard E, Bargas J, Galarraga E (2003) The role of Ca^{2+} channels in the repetitive firing of striatal projection neurons. *Neuroreport* 14:1253–1256.
- Perez-Rosello T, Figueroa A, Saigado H, Vilchis C, Tecuapetla F, Guzman NJ, Galarraga E, Bargas J (2005) Cholinergic control of firing pattern and neurotransmission in rat neostriatal projection neurons: role of $Ca_v2.1$ and $Ca_v2.2$ Ca^{2+} channels. *J Neurophysiol* 93:2507–2519.
- Pineda JC, Bargas J, Flores-Hernandez J, Galarraga E (1995) Muscarinic receptors modulate the afterhyperpolarizing potential in neostriatal neurons. *Eur J Pharmacol* 281:271–277.
- Pineda JC, Galarraga E, Bargas J, Cristancho M, Aceves J (1992) Charybdotoxin and apamin sensitivity of the calcium-dependent repolarization and the afterhyperpolarization in neostriatal neurons. *J Neurophysiol* 68:287–294.
- Rakhilin SV, Olson PA, Nishi A, Starkova NN, Fienberg AA, Nairn AC, Surmeier DJ, Greengard P (2004) A network of control mediated by regulator of calcium/calmodulin-dependent signaling. *Science* 306:698–701.
- Rane SG, Walsh MP, McDonald JR, Dunlap K (1989) Specific inhibitors of protein kinase C block transmitter-induced modulation of sensory neuron calcium current. *Neuron* 3:239–245.
- Rhee SG (2001) Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C. *Annu Rev Biochem* 70:261–312.
- Saigado H, Bellay T, Nichols JA, Bose M, Martinovich L, Perrotti L, Atzori M (2007) Muscarinic M_2 and M_1 receptors reduce GABA release by Ca^{2+} channel modulation through activation of PI3K/ Ca^{2+} -independent and PLC/ Ca^{2+} -dependent PKC. *J Neurophysiol* 98:952–965.
- Saigado H, Tecuapetla F, Perez-Rosello T, Perez-Burgos A, Perez-Garci E, Galarraga E, Bargas J (2005) A reconfiguration of Ca_v2 Ca^{2+} channel current and its dopaminergic D_2 modulation in developing neostriatal neurons. *J Neurophysiol* 94:3771–3787.
- Sculptoreanu A, Yoshimura N, de Groat WC, Somogyi GT (2001) Protein kinase C is involved in M_2 -muscarinic receptor-mediated facilitation of L-type Ca^{2+} channels in neurons of the major pelvic ganglion of the adult male rat. *Neurochem Res* 26:933–942.
- Shapiro MS, Loose MD, Hamilton SE, Nathanson NM, Gomez J, Wess J, Hille B (1999) Assignment of muscarinic receptor subtypes mediating G-protein modulation of Ca^{2+} channels by using knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:10899–10904.
- Shen W, Hamilton SE, Nathanson NM, Surmeier DJ (2005) Cholinergic suppression of KCNQ channel currents enhances excitability of striatal medium spiny neurons. *J Neurosci* 25:7449–7458.
- Shen W, Tian X, Day M, Ulrich S, Tkatch T, Nathanson NM, Surmeier DJ (2007) Cholinergic modulation of Kir2 channels selectively elevates dendritic excitability in striatopallidal neurons. *Nat Neurosci* 10:1458–1466.
- Suh BC, Hille B (2005) Regulation of ion channels by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Curr Opin Neurobiol* 15:370–378.
- Tai C, Kuzmiski JB, MacVicar BA (2006) Muscarinic enhancement of R-type calcium currents in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J Neurosci* 26:6249–6258.
- Vilchis C, Bargas J, Ayala GX, Galvan E, Galarraga E (2000) Ca^{2+} channels that activate Ca^{2+} -dependent K^+ currents in neostriatal neurons. *Neuroscience* 95:745–752.
- Wilson CJ (2004) Basal ganglia. In: *The synaptic organization of the brain*, 5th ed (Shepherd GM, ed), pp 361–413. New York: Oxford University Press.
- Wu L, Bauer CS, Zhen XG, Xie C, Yang J (2002) Dual regulation of voltage gated calcium channels by PtdIns (4,5) P₂. *Nature* 419:947–952.
- Yamada T, Endoh T, Suzuki T (1999) Inhibition of calcium channels by neurokinin receptor and signal transduction in hamster submandibular ganglion cells. *J Auton Nerv Syst* 76:1–8.
- Yan Z, Flores-Hernandez J, Surmeier DJ (2001) Coordinated expression of muscarinic receptor messenger RNAs in striatal medium spiny neurons. *Neuroscience* 103:1017–1024.
- Yan Z, Surmeier DJ (1996) Muscarinic (m2/m4) receptors reduce N- and P-type Ca^{2+} currents in rat neostriatal cholinergic interneurons through a fast, membrane-delimited, G-protein pathway. *J Neurosci* 16:2592–2604.
- Yang J, Tsien RW (1993) Enhancement of N- and L-type calcium channel currents by protein kinase C in frog sympathetic neurons. *Neuron* 10:127–136.
- Zhou FM, Wilson CJ, Dani JA (2002) Cholinergic interneuron characteristics and nicotinic properties in the striatum. *J Neurobiol Rev* 53:590–605.
- Zhu Y, Ikeda SR (1994) Modulation of Ca^{2+} -channel currents by protein kinase C in adult rat sympathetic neurons. *J Neurophysiol* 72:1549–1560.
- Zhu Y, Yakel JL (1997) Modulation of Ca^{2+} currents by various G protein-coupled receptors in sympathetic neurons of male rat pelvic ganglia. *J Neurophysiol* 78:780–789.

(Accepted 20 June 2008)
(Available online 1 July 2008)