



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA
CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL I.P.N.



**ACTIVACIÓN DE LA CALCIO CALMODULIN CINASA II α (CaMKII α) EN TERMINALES
ESTRIADO-NIGRALES DE LA RATA, POR DESPOLARIZACIÓN Y ACTIVACIÓN DE
RECEPTORES DOPAMINÉRGICOS D1 Y D3**

TESIS

QUE PRESENTA

ALEIDA JEANNETTE FLORES PÉREZ

PARA OBTENER EL GRADO DE

BIÓLOGA

Dr. BENJAMÍN FLORÁN GARDUÑO
TUTOR

Dr. JOSE ARTURO AVALOS FUENTES
CO-TUTOR

SEPTIEMBRE DE 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

Este trabajo fue realizado en el laboratorio 4 del Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del I.P.N., bajo la dirección del Dr. Benjamín Florán Garduño, gracias al donativo otorgado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) No. 152326.

A Constanca Zarco, quién fue un pilar muy importante para mí. La recuerdo siempre y sus palabras guían y fortalecen mi vida día a día...

Lo más importante es hacer lo que te apasiona, siempre con ánimo y alegría. Hacerlo te llevará a ese lugar en el cual te has propuesto estar. No pierdas de vista tu meta, busca la manera de llegar, ser objetiva y honesta siempre será la mejor arma para lograr el éxito...

RECONOCIMIENTO

Al Dr. Benjamín Florán Garduño, por darme la oportunidad de ser parte de su equipo de trabajo, por todo el apoyo, la confianza y los consejos que me brindó.

Al Dr. José Arturo Avalos Fuentes, por guiarme en cada paso durante éste proyecto, por tener la paciencia para enseñarme las distintas formas en que una persona puede lograr sus objetivos, por la amabilidad y disponibilidad que siempre recibí de ti. Gracias Arturo...

A los sinodales:

Dra. Bertha Segura Alegría

Dra. Elizabeth Hernández Echeagaray

Dr. Jaime A. Barral Caballero

A quienes agradezco su valiosa asesoría, orientación, consejos y por supuesto, el tiempo dedicado a este proyecto.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	8
Control motor.....	8
Ganglios Basales.....	9
Organización anatómica.....	9
Estriado.....	9
Globo Pálido.....	10
Núcleo Subtalámico.....	11
Sustancia Negra.....	11
Sustancia Negra compacta.....	12
Sustancia Negra reticulada.....	12
Organización funcional de los ganglios basales.....	13
Vía directa.....	13
Vía indirecta.....	13
La dopamina en el control motor.....	14
Receptores Dopaminérgicos.....	15
Familia tipo D1.....	15
Familia tipo D2.....	16
Degeneración dopaminérgica y su implicación en enfermedades motoras.....	17
Participación del Ca ²⁺ en la regulación intracelular a través del complejo Calmodulina/Calcio calmodulina cinasa.....	18
Cinasa dependiente de calcio-calmodulina (CaMK).....	19
CaMKII:	
Morfología y distribución.....	21
Fisiología.....	21
JUSTIFICACIÓN.....	24
ANTECEDENTES.....	25

OBJETIVOS	
Objetivo general.....	27
Objetivo particular.....	27
MATERIALES Y MÉTODOS.....	28
Sujetos experimentales.....	28
Obtención del tejido.....	28
Obtención de la fracción sinaptosomal.....	28
Fármacos	29
Determinación de la proteína por Western blot.....	29
RESULTADOS.....	32
Fosforilación de la CaMKII α inducida por despolarización.....	32
Fosforilación de la CaMKII α por activación de los receptores dopaminérgicos D1 y D3.....	34
Curso temporal de fosforilación de la CaMKII α , tras la co-activación de receptores D1-D3.....	36
Participación de canales de calcio tipo L en la fosforilación de la CaMKII α , mediante la activación de los receptores D1-D3.....	38
DISCUSIÓN.....	40
Fosforilación de la CaMKII α inducida por despolarización.....	41
Fosforilación de la CaMKII α por activación de los receptores dopaminérgicos D1 y D3.....	42
Curso temporal de fosforilación de la CaMKII α , tras la co-activación de receptores D1-D3	44
Participación de canales de calcio tipo L en la fosforilación de la CaMKII α , mediante la activación de los receptores D1-D3.....	46
CONCLUSIONES.....	52
LITERATURA CITADA.....	53
ANEXO.....	59

ABREVIATURAS

AC	Adenilato ciclasa
AMPc	Adenosina Monofosfato cíclico
Akt	Cinasa dependiente de Serina-Treonina (PKB)
BRET	Transferencia de Energía por Resonancia de Biolumiscencia
CaM	Calmodulina
CaMK	Calcio-calmodulina Cinasa
CaMKK	Calcio-calmodulina Cinasa Cinasa
CaMKII	Calcio-calmodulina Cinasa II
CaMKII-P	Calcio-calmodulina CinasaII Fosforilada
CaMKII-T	Calcio-calmodulina Cinasa II – Total
CBP	Proteína de unión a CREB
CCTL	Canal de Calcio Tipo L
CREB	Elemento de unión y respuesta a AMPc
DA	Dopamina
D.O.	Densidad Óptica
ENK	Encefalina
FRET	Transferencia de Energía por Resonancia de Fluorescencia
GABA	Ácido γ -amino butírico
GB	Ganglios Basales
GP	Globo Pálido
GPCRs	Receptores acoplados a Proteínas G
GPe	Globo Pálido externo
GPI	Globo Pálido interno
HEK	Células Embrionarias de Riñon
L-DOPA	L-Dihidroxifenilalanina
NEMs	Neuronas Espinosas Medianas
NST	Núcleo Subtalámico
PLC	Fosfolipasa C
PKA	Proteína Cinasa A
PKB	Proteína Cinasa B

PP1	Proteína Fosfatasa 1
PP2	Proteína Fosfatasa 2
RNA _m	Ácido Ribonucleico mensajero
Ser	Serina
SN	Sustancia Negra
SNC	Sistema Nervioso Central
SNC	Sustancia Negra compacta
SNr	Sustancia Negra reticulada
SP	Sustancia P
TH	Tirosina Hidroxilasa
Thr-286	Thr-286 Treonina

INTRODUCCIÓN

Control motor

Percibir las condiciones del medio externo, regular el estado de los órganos internos, coordinar los movimientos (voluntarios e involuntarios), así como las conductas que presenta cada organismo, son funciones que se llevan a cabo por un complejo sistema de redes neuronales que forman parte del Sistema Nervioso (Kardog, 1999).

El Sistema Nervioso presenta una alta complejidad morfofisiológica, lo que ha generado la colaboración de científicos provenientes de diversas áreas: matemáticas, física, química, fisiología, medicina, biología molecular, etc. El objetivo conjunto es entender de manera más clara la función del sistema, mismo que se divide morfológicamente para su estudio en Sistema Nervioso Periférico y Sistema Nervioso Central.

El Sistema Nervioso Central (SNC) está constituido por el diencefalo, mesencefalo, puente (tallo cerebral) y la médula espinal, mismos que reciben estímulos provenientes del medio externo y responden a ellos. Dentro de las respuestas que se generan, una que provoca gran interés es el movimiento (Kandel *et al.*, 2000). Para que un movimiento sea ejecutado por una extremidad se requiere: a) activar los músculos agonistas que ejecutan el movimiento (ej. flexores), b) inhibir los músculos antagonistas que se oponen a dicho movimiento (ej. extensores), y c) activar ciertos músculos posturales o antigravitatorios para preservar el centro de gravedad del cuerpo, manteniendo el equilibrio mientras el movimiento se efectúa. Así, el correlato neural de todo movimiento requiere que las neuronas de unos músculos se activen y las de otros se inhiban (Bargas y Galarraga, 2000).

La activación o inhibición de estructuras como el sistema extrapiramidal, el tronco encefálico y el núcleo rojo permiten la ejecución del movimiento deseado; otras estructuras encargadas de coordinar el movimiento también, son el cerebelo y los Ganglios Basales (Sánchez, 2012).

Ganglios Basales

Organización anatómica

Los Ganglios Basales (GB) son un grupo de núcleos subcorticales, que se encuentran conectados entre sí, formando un circuito neuronal. Estos núcleos desempeñan una importante función en el control del movimiento voluntario (Bolam *et al.*, 2000). Sin embargo, al contrario de la mayoría de los demás componentes del sistema motor, no tiene conexiones directas de entrada o salida con la médula espinal. Estos núcleos reciben información primaria de la corteza y responden enviando señales a través del tálamo, éste a su vez envía señales a la corteza prefrontal, premotora y motora. Las funciones motoras de los ganglios basales por lo tanto están mediadas, en gran parte, por áreas motoras de la corteza frontal (Kandel *et al.*, 2000). Los núcleos que conforman el circuito de los ganglios basales son: el Cuerpo Estriado, el Globo Pálido, la Sustancia Negra y el Núcleo Subtalámico, (figura 1); algunos núcleos a su vez se subdividen, como se describe a continuación (Bar-Gad *et al.*, 2003).

Estriado

Se encuentra formado por el Núcleo Caudado y el Putámen, así como por el núcleo Accumbens (Bar-Gad *et al.*, 2003). El caudado y putámen en primates reciben el nombre de estriado, mientras que en roedores recibe el nombre de neostriado (Kandel *et al.*, 2000). Este es el núcleo de entrada de los ganglios basales y es blanco de aferencias corticales (de naturaleza glutamatérgica), así como aferencias nigrales, provenientes de la porción compacta de la sustancia negra, de naturaleza dopaminérgica (Blandini *et al.*, 2000). Las neuronas del estriado están divididas en dos poblaciones principales: Neuronas Espinosas Medianas (NEMs) que son de proyección y conforman el 95 % de la población y las interneuronas, que comprenden el 5 % restante. Las NEMs miden de 12 a 20 μm de diámetro e irradian de 4 a 5 dendritas primarias, se caracterizan por sus numerosas arborizaciones, dicho patrón permite una interacción colateral con otras neuronas. Las NEMs usan Ácido γ -amino butírico (GABA) como neurotransmisor principal, se sabe también que pueden coexpresar algunos neuropéptidos como sustancia P, encefalina, dinorfina o neurotensina,

dependiendo del blanco de cada neurona. Las interneuronas (de origen colinérgico), se caracterizan por la ausencia o rara presencia de espinas en sus dendritas, lo cual contrasta con la alta densidad de NEMs (Parent y Hazrati, 1995a). Las neuronas estriatales, proyectan al globo pálido en su porción externa e interna, así como también a la sustancia negra en su porción reticulada, siendo los dos últimos los principales núcleos de salida del circuito de los ganglios basales.

Globo Pálido

Conocido también como complejo palidal, el globo pálido comprende dos segmentos, el globo pálido externo (GPe) y globo pálido interno (GPi), ambos de actividad autónoma. Las neuronas de ambos segmentos son muy similares morfológicamente y ambos tienen un papel importante dentro del control motor (Parent y Hazrati, 1995b).

El GPe ha sido clásicamente considerado como punto de relevo o integrador central dentro de los GB, ya que recibe aferentes del estriado y proyecta tanto al NST como a la sustancia negra reticulada, al GP interno y hacia el Tálamo (Parent y Hazrati, 1995b; Bar-Gad *et al.*, 2003; Sánchez, 2012). La mayor parte de las neuronas que componen a éste segmento del GP son neuronas de proyección cuyas dendritas alcanzan 1000 μm de largo. Varios estudios han revelado que el 85 % de sus células poseen una frecuencia de disparo alta (con pausas); como el estriado, el GPe es de naturaleza GABAérgica (Bar-Gad, 2003).

El GPi es el núcleo más pequeño de los GB, está relacionado funcionalmente con la sustancia negra en su porción reticulada (SNr), es decir, es también un núcleo de salida. Sus aferentes son de tipo GABAérgicas (provenientes del estriado) y glutamatérgicas (provenientes del núcleo subtalámico). Proyecta hacia el Tálamo y al núcleo habenuar. Sus neuronas poseen una frecuencia de disparo alta que a diferencia del GPe, son disparos no pausados. Se considera que participa de manera importante en el movimiento del sistema músculo esquelético (Parent y Hazrati, 1995b).

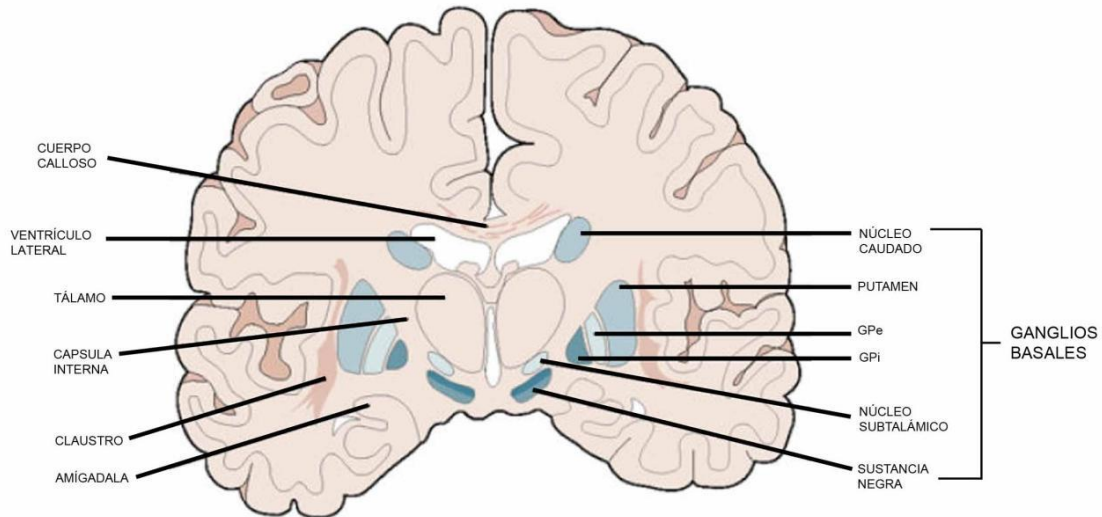


Figura 1. Los ganglios basales. Esquema que ilustra la posición de los núcleos que conforman el circuito de los ganglios basales: Estriado (Caudado-Putamén), Globo Pálido externo (GPe), Globo Pálido interno (GPi), Núcleo Subtalámico (NST), Sustancia Negra (Sánchez, 2012).

Núcleo Subtalámico

Se caracteriza por ser el único núcleo del circuito con proyecciones excitatorias, es decir, las neuronas del NST son de naturaleza glutamatérgica, compuestas principalmente por NEMs que se encuentran tónicamente activas. El NST proyecta hacia ambos segmentos tanto del GP como de la SN (Bargad *et al.*, 2003).

Sustancia Negra

Se extiende a lo largo del mesencéfalo y la parte caudal del diencefalo, sus neuronas contienen neuromelanina, característica de estos núcleos. Dividida en dos porciones: Sustancia Negra en su porción compacta (SNc) y Sustancia Negra en su porción reticulada (SNr), (Bargas y Galarraga, 2000).

Sustancia Negra compacta

La SNc regula el circuito de los ganglios basales por medio de la liberación de dopamina (DA), sus proyecciones van al estriado, al núcleo subtalámico y al GPe. Sus dendritas proyectan hacia la SNr. Las aferentes GABAérgicas provienen del estriado, complejo palidal y SNr; las aferentes glutamatérgicas provienen principalmente de la corteza media prefrontal, núcleo subtalámico y núcleo pedunculopontino. Recibe además inervación serotoninérgica proveniente del núcleo del rafe (Sánchez, 2012).

Sustancia Negra reticulada

La Sustancia Negra en su porción reticulada (de naturaleza GABAérgica), tiene actividad espontánea, envía sus proyecciones al Tálamo, al colículo superior y al núcleo pedunculopontino. La actividad de la SNr está regulada por aferentes de diferentes tipos: glutamatérgicas (provenientes del NST); GABAérgicas (provenientes del estriado, del GP y de las colaterales de los axones de las propias neuronas de la SNr) y aferentes dopaminérgicas provenientes de dendritas de las neuronas de la SNc (Ibañez-Sandoval *et al.*, 2006; Sánchez, 2012). Las proyecciones que van de la SNr al colículo superior tienen un efecto marcado en el control de los movimientos oculares (Parent y Hazrati, 1995a).

La SNr es la salida primaria dentro de los ganglios basales, al igual que el segmento interno del GP (Radnikow and Misgeld, 1998); son considerados en muchos casos como una sola entidad dentro de los GB (Bar-Gad *et al.*, 2003), por lo tanto, hay que inhibir y/o activar selectivamente a algunas neuronas de la SNr y GPi para que se realice correctamente un movimiento deseado (Bargas y Galarraga, 2000), de tal manera que, la coordinación de estos núcleos se ve reflejada en el control motor de los individuos (Blandini *et al.*, 2000).

Organización funcional de los Ganglios Basales

El modelo predominante para explicar el funcionamiento de los ganglios basales se basa en la existencia de dos vías: una vía directa y una vía indirecta (Gerfen *et al.*, 1995). Ambas vías son activadas en presencia de dopamina, ésta última se proporciona a todo el circuito por las neuronas de la SNc. La activación de ambas vías tiene como resultado, un efecto sinergista en la promoción del movimiento, a través del circuito compuesto por los ganglios basales (Baragas y Galarraga, 2000; Obeso *et al.*, 2002).

Vía directa

La vía directa o proyección estriado-nigral, es denominada así, debido a que la información que llega al núcleo de entrada, viaja directamente al núcleo de salida. Es decir, la información proveniente de la corteza llega al estriado y las neuronas de éste núcleo proyectan directamente al segmento interno del globo pálido (GPi) y a la SNr. Al activar ésta vía se promueve la activación del tálamo y éste a su vez estimula la actividad de la corteza motora, por lo tanto se facilita el movimiento. La vía directa se caracteriza por expresar receptores dopaminérgicos de la familia del tipo D1, principalmente (Surmeier, 1996; Avalos-Fuentes, 2013).

Vía indirecta

La vía indirecta recibe éste nombre debido a que la información proveniente del núcleo de entrada, realiza un relevo sináptico en dos núcleos más, previo a su llegada al núcleo de salida. Es decir, las neuronas del estriado proyectan al segmento externo del globo pálido (GPe), a su vez el GPe proyecta al núcleo subtalámico (NST), el cual es de naturaleza glutamatérgica y finalmente el NST proyecta hacia el GPi y la SNr. La actividad basal del estriado inhibe al GPe, en ésta condición el GPe no puede inhibir al NST, por lo tanto el NST envía actividad glutamatérgica a la SNr, aumentando su actividad (GABAérgica), lo cual deriva en la inhibición del tálamo y la corteza, lo que resulta en la disminución del movimiento. La vía indirecta se conoce también como proyección estriado-palidal y se caracteriza por expresar receptores dopaminérgicos de la familia tipo D2 (Obeso *et al.*, 2002).

Como se mencionó anteriormente, las respuestas que se generan dentro del circuito de los GB llegan al tálamo a través de los núcleos de salida (GPi/SNr). La respuesta es mediada por el neurotransmisor GABA principalmente, el cual llega directamente a la parte ventrolateral del tálamo así como al núcleo pedúnculo pontino. La actividad neuronal en los núcleos de salida es mediada por un mecanismo de control dual, donde se regulan ambas vías (figura 2), ya que en presencia de DA, la actividad de la vía directa aumenta la inhibición del GPi/SNr, provocando la desinhibición del tálamo y la corteza motora, promoviendo así el movimiento; por otra parte, la activación de la vía indirecta, inhibe la liberación GABAérgica del estriado al GPe, por lo tanto el GPe se encuentra activo y al ser de naturaleza GABAérgica, inhibe al NST (el cual es de naturaleza Glutamatérgica), en ésta condición el NST no puede activar a la SNr, al estar inhibida la SNr, ésta no puede inhibir al tálamo y por lo tanto el tálamo estimula a la corteza motora, promoviendo también el movimiento (Obeso *et al.*, 2002).

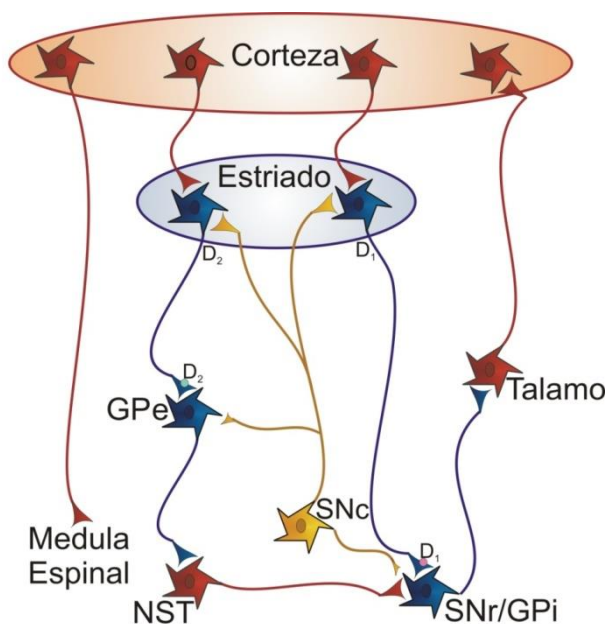


Figura 2. Esquema de la organización funcional de los ganglios basales. Se muestra la innervación correspondiente a cada núcleo, el color rojo indica innervación glutamatergica, en azul se indica innervación GABAérgica y en amarillo se indica innervación dopaminérgica.

La dopamina en el control motor

El funcionamiento correcto de ambas vías está mediado por la regulación dopaminérgica. La dopamina pertenece al grupo de las aminas biogénicas, sustancias que por su conformación química se les denomina catecolaminas. Las proyecciones del sistema dopaminérgico inervan a la corteza, al sistema límbico, al tálamo y todos los núcleos de los ganglios basales (Obeso y Lanciego, 2011). Esta se sintetiza a partir del aminoácido tirosina, que a través de la tirosinhidroxilasa (TH) es convertida en un compuesto denominado L-dopa (L-dihidroxifenilalanina), que a su vez se convierte en dopamina por la descarboxilasa de aminoácidos aromáticos, como se muestra en la figura 3 (Nelson y Cox, 2000).

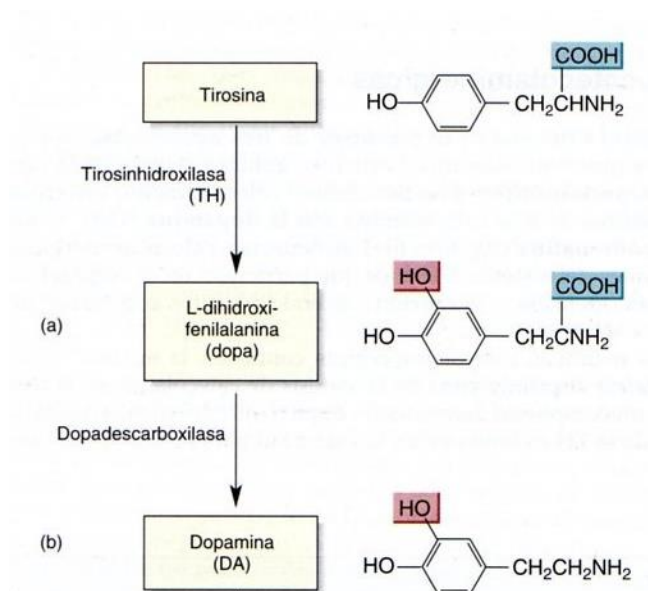


Figura 3. Síntesis de dopamina, neurotransmisor que se forma a partir del aminoácido tirosina.

Receptores Dopaminérgicos

La transmisión dopaminérgica es mediada por receptores de siete segmentos transmembranales acoplados a proteínas G (GPCR's por sus siglas en inglés) (figura 4). Existen cinco receptores dopaminérgicos: D1, D2, D3, D4 y D5, agrupados en dos familias con base en su homología y propiedades farmacológicas (Shioda *et al.*, 2010).

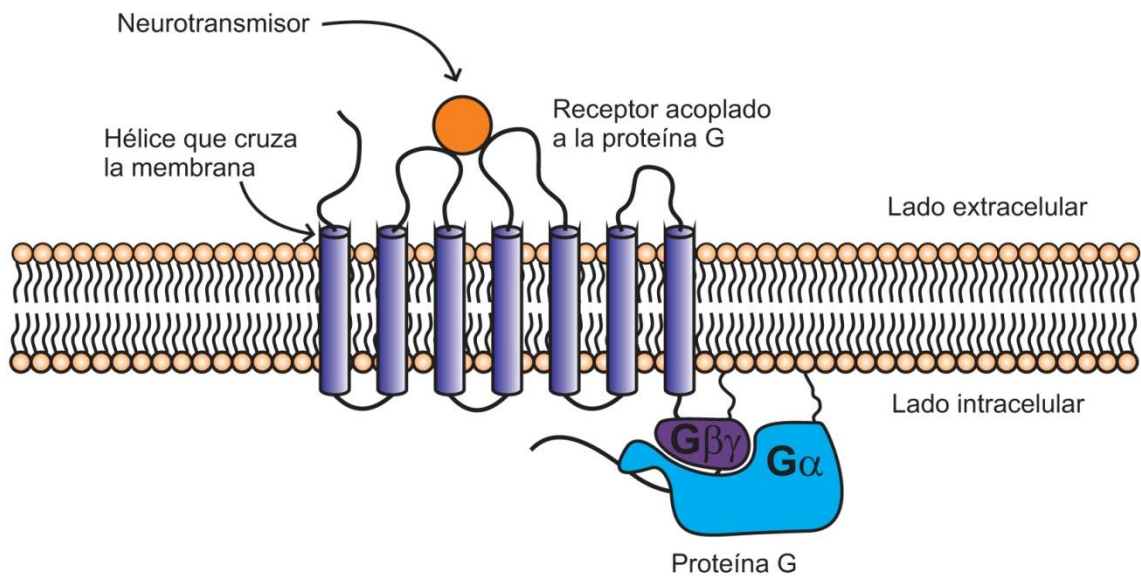


Figura 4. Estructura básica de un receptor acoplado a proteína G. Consta de siete dominios transmembranales, con el sitio de unión al transmisor en la parte extracelular y el sitio de unión a la proteína G en la parte intracelular.

Familia tipo D1

Dentro de la familia del tipo D1 se encuentran los receptores D1 y D5, los cuales presentan una alta homología (85 %) en sus dominios transmembranales (Missale *et al.*, 1998). Se caracterizan por tener el tercer loop intracelular corto y el carboxilo terminal largo (Shioda *et al.*, 2010). Ambos receptores se acoplan a proteínas $G_{\alpha/olf}$ o $G_{\alpha/s}$ (estimuladoras), es decir, estimulan la actividad de la Adenilato ciclasa elevando los niveles de formación de AMPc, activando a su vez a la PKA (Neve *et al.*, 2004; Surmeier *et al.*, 2011). Los receptores de ésta familia se expresan preferencialmente en neuronas que son inmunopositivas para sustancia P y dinorfina, es decir, en neuronas de la vía directa (Missale *et al.*, 1998).

Familia tipo D2

La familia del tipo D2, está conformada por los receptores D2, D3 y D4, donde el receptor D2 presenta una homología del 75 % con el receptor D3, y es homólogo en un 53 % con el receptor D4 (Missale *et al.*, 1998). El tercer loop intracelular largo es una característica común en los receptores de ésta familia, así como el carboxilo terminal corto (Shioda *et al.*, 2010). Los receptores de la familia tipo D2, se acoplan a proteínas $G_{i/o}$ (inhibitorias), por lo que inhiben la actividad de la Adenilato ciclasa (Neve *et al.*, 2004; Surmeier *et al.*, 2011). Los receptores D2, D3 y D4 se expresan preferencialmente en neuronas que son inmunopositivas para encefalinas (coliberan encefalinas), es decir, en neuronas de la vía indirecta (Missale *et al.*, 1998; Karpa *et al.*, 2000).

Degeneración dopaminérgica y su implicación en enfermedades motoras

Los receptores dopaminérgicos juegan un papel muy importante dentro del circuito de los GB y de ellos depende en gran medida el correcto funcionamiento del mismo (Matuszewich y Yamamoto, 1999), por lo que la disfunción o degeneración dopaminérgica está implicada en la etiología de trastornos motores (Radnikow y Misgeld, 1998).

Dada la frecuencia y al amplio espectro de desórdenes motores que causan, los trastornos de los GB son de importancia médica (Surmeier *et al.*, 2011). Dichos trastornos se pueden dividir en hipocinéticos e hiperkinéticos. Los trastornos hipocinéticos se caracterizan por el deterioro del inicio del movimiento (acinesia) y por una menor amplitud y velocidad del movimiento voluntario (bradicinesia). Por lo general, estos signos van acompañados de rigidez muscular (aumento de la resistencia al desplazamiento pasivo) y temblor, mientras que los trastornos hiperkinéticos, se caracterizan por una actividad motora excesiva, cuyos síntomas son movimientos involuntarios y reducción del tono muscular (Kandel *et al.*, 2000). La enfermedad de Parkinson, es un claro ejemplo de trastornos motores causados por la degeneración de neuronas dopaminérgicas (Radnikow y Misgeld, 1998).

La degeneración de las neuronas de la SNc provoca una deficiencia importante tanto en la síntesis como en la liberación de dopamina, lo que se traduce en un problema para el sistema motor, dado que las neuronas dopaminérgicas participan en la activación de canales iónicos y en la liberación de otros neurotransmisores (Koeltzow *et al.*, 1998). Se ha demostrado que controla de manera positiva la liberación de GABA en las terminales estriado-nigrales a través de la activación de receptores presinápticos D1 y D3 (Florán *et al.*, 1990; Avalos-Fuentes *et al.*, 2013); a su vez, se ha observado que la activación de receptores dopaminérgicos D1 y D2 pueden mediar por distintos mecanismos, cambios en los niveles de calcio (Ca^{2+}) intracelular (Missale *et al.*, 1998).

Participación del Ca^{2+} en la regulación intracelular a través del complejo Calmodulina/Calcio calmodulina cinasa

Las concentraciones de Ca^{2+} intracelular son finamente reguladas por una amplia variedad de canales, acarreadores y bombas, tanto en la membrana plasmática como en organelos (retículo endoplasmático, mitocondria, etc.). La regulación de la concentración de calcio en la célula es importante, dado que un incremento prolongado de éste, promueve muerte celular; diferencias en la amplitud, frecuencia y localización de calcio puede codificar una variedad de mensajes que son decifrados por un amplio número de proteínas de unión al

calcio, como la calmodulina (CaM), la cual es una proteína de alta afinidad por calcio (Wayman *et al.*, 2011). La CaM se encuentra presente en todas las células nucleadas, especialmente en el tejido nervioso (Bradford, 1985), actúa como sensor de calcio celular para activar canales iónicos y enzimas que regulan el ciclo celular, organización del citoesqueleto y desarrollo (Shioda *et al.*, 2010).

El complejo $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ se puede unir a varios blancos, incluyendo a las cinasas de la familia de Serina-Treonina (Ser/Thr), regulando su actividad y funcionalidad, tal es el caso de la Cinasa dependiente de Calcio calmodulina o CaMK, por sus siglas en inglés (Wayman *et al.*, 2011).

Cinasa dependiente de calcio-calmodulina (CaMK)

La cinasa dependiente de $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ es una proteína involucrada en numerosos procesos fisiológicos (Wayman *et al.*, 2011), ha sido identificada en conocidos modelos experimentales (*Aplysia* y *Drosophila*), así como en el tejido nervioso de varias especies de mamíferos. Se ha reportado que se expresa en hipocampo, neocorteza, corteza piriforme, septum lateral, caudado, putámen y sustancia negra (Colbran, 1992).

La cinasa dependiente de $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ comprende cuatro variantes referidas como CaMK I, II, IV y CaMKK. La CaMKI así como la CaMKIV son proteínas monoméricas que presentan una propiedad común de activación que implica la unión de $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ y fosforilación por la CaMKK, por lo que se ubican dentro de un proceso conocido como cascada de cinasas dependientes de calcio-calmodulina (fig. 5). La CaMKI es ampliamente expresada en citosol y puede fosforilar varios sustratos, como la sinapsina I. En contraste la CaMKIV, conocida también como CaMK-Gr ya que es abundante en células granulares cerebelares, es localizada principalmente en núcleos. La CaMKIV fosforila factores de transcripción incluyendo PKA, CREB y CBP, mismos que juegan un rol importante dentro de la transcripción de genes (Soderling, 1999). La CaMKK controla la actividad de ambas cinasas, (I y II). Tiene dos isoformas, α y β , ricamente expresadas en citoplasma y núcleo respectivamente. La CaMKK participa también en la activación de PKB (Akt), importante protector neuronal

ante muerte celular programada, durante el desarrollo (Soderling, 2000; Hudmon and Schulman, 2002).

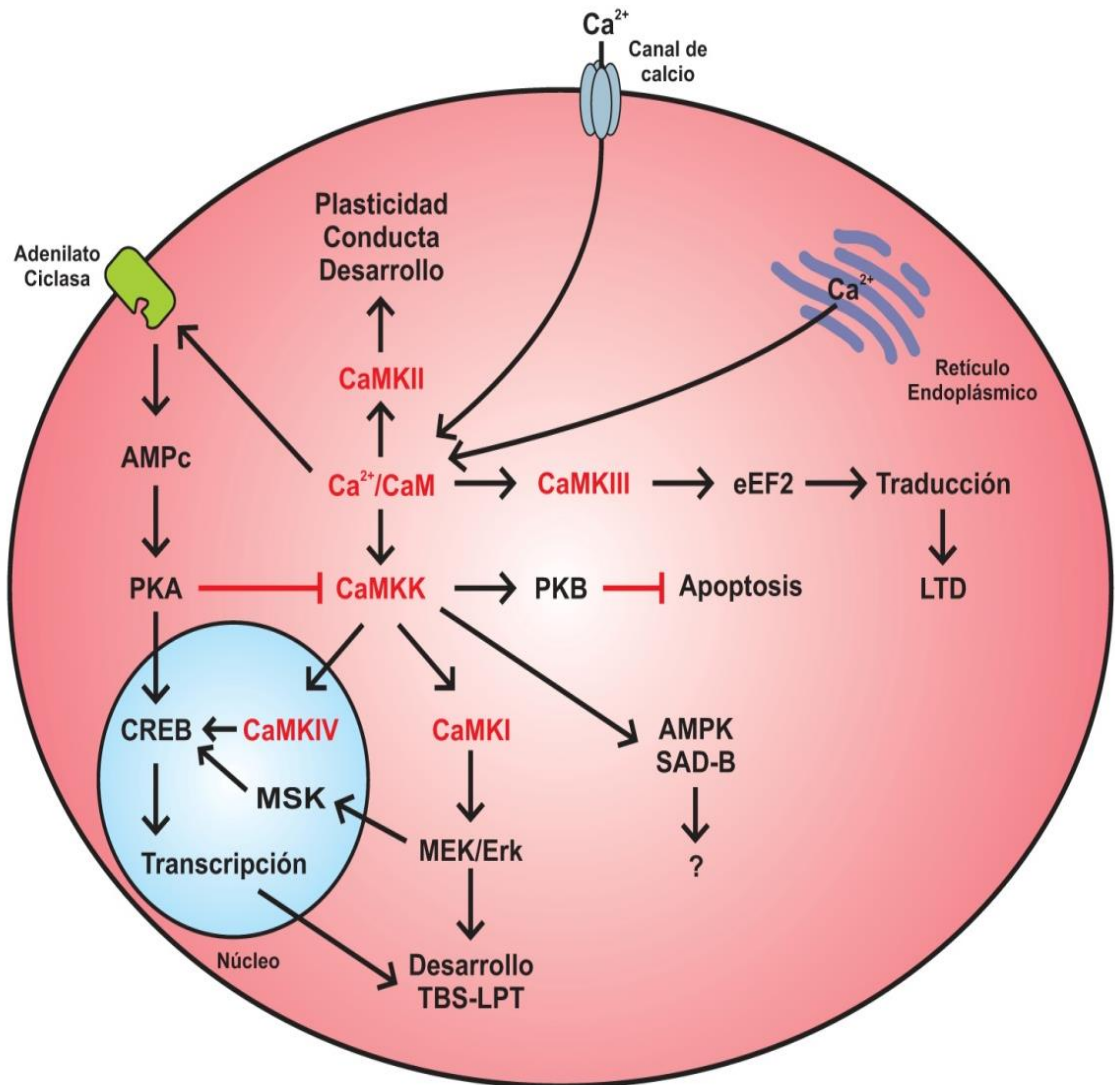


Figura 5. Calcio calmodulina proteína cinasa o CaMK (por sus siglas en inglés). La entrada de calcio a la célula activa a la CaMK tras unirse a la calmodulina. Se muestran las variantes que presenta la CaMK así como su función dentro de la célula. Se aprecia que la CaMKII participa en importantes funciones como la conducta, el desarrollo y la plasticidad cerebral.

CaMKII

Morfología y distribución

La CaMKII es probablemente, la cinasa dependiente de $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ más ampliamente estudiada. Es un heterómero de doce subunidades, cuya estructura es conformada por dos anillos hexaméricos (fig.6a) superpuestos (Huynh and Pagratis, 2011). Presenta cuatro subunidades denominadas α , β , γ y δ , de las cuales, es la subunidad α la que se expresa mayormente en el cerebro (Wayman *et al.*, 2011).

La CaMKII α tiene un peso molecular de 54 kDa que, junto con la CaMKII β (60 kDa) logran el 1 % de la proteína total presente en el cerebro de roedores (Hudmon and Schulman, 2002). Está constituida por un dominio catalítico (N-terminal), un dominio regulatorio y un dominio de asociación (C-terminal). Dichos dominios representan los sitios de inactivación, regulación y activación de la proteína (fig. 6b), respectivamente (Colbran and Brown, 2004).

CaMKII: Fisiología

Una característica importante de la CaMKII α es que posee dos procesos de activación que no son mutuamente excluyentes, uno dependiente de calcio y otro independiente de calcio (Hudmon y Shulman, 2002).

La unión Ca/CaM -CaMKII α se da tras el aumento en los niveles de calcio intracelular, ésta unión promueve la fosforilación de la Treonina 286 (Thr286), lo que resulta en la activación de la CaMKII α (activación dependiente de Ca^{2+}). La Thr286 no es el único sitio de fosforilación de la CaMKII α , pero sí uno de los más importantes, ya que éste sitio tiene la capacidad de autofosforilarse, proceso que le confiere a la cinasa actividad independiente de Ca^{2+} (fig. 7). Al autofosforilarse, la CaMKII α es capaz de permanecer activa aun cuando haya ocurrido la disociación del complejo $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ o cuando los niveles de Ca^{2+} intracelular hayan disminuido (Wayman *et al.*, 2008); por consiguiente la actividad independiente (o autónoma) de la CaMKII α evoca una prolongada respuesta fisiológica (Soderling, 2000; Hudmon and Schulman, 2002).

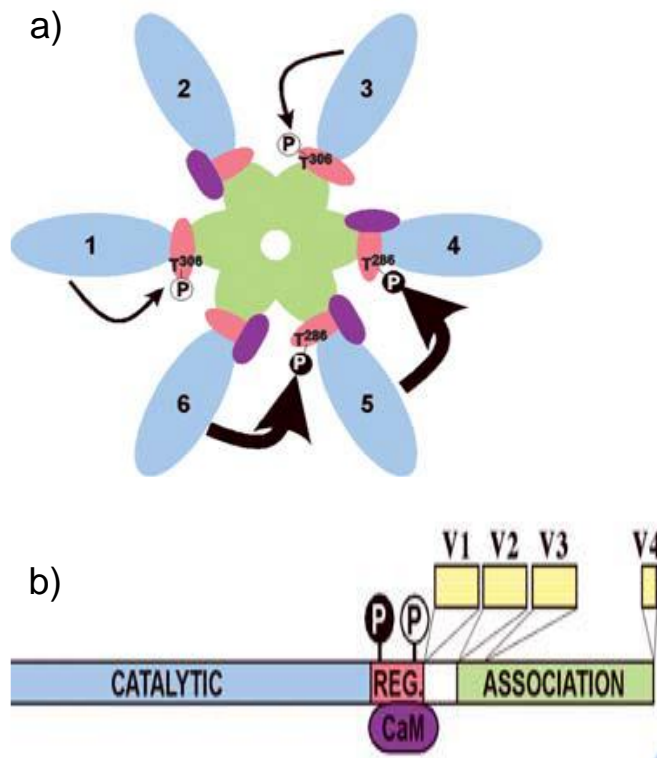


Figura 6. Estructura de la CaMKII α . En el panel a): anillo hexamérico, la cinasa se compone por un par de estos anillos, observado por microscopía electrónica, el eje o centro es formado por el dominio de asociación, seguido por el dominio regulatorio y rodeado por el dominio catalítico, el cual queda expuesto. En el panel b): Dominios de regulación de la CaMKII, catalítico (azul), regulatorio (rosa) y de asociación (verde). Tomado de Colbran, 2004.

Dadas las características de la CaMKII α , es decir, su amplia distribución y alta expresión en neuronas, especialmente en poblaciones post-sinápticas (Soderling, 2000), se le ha implicado en múltiples vías de señalización. Está bien documentado que participa en crecimiento dendrítico (Colbran and Brown, 2004), así como en procesos relacionados con la memoria y activación neuronal; contribuye de manera importante en los procesos de plasticidad sináptica e inducción de LTP (Hudmon and Schulman, 2002), a su vez modula aspectos neuronales de expresión genética, síntesis y exocitosis de neurotransmisores, funciones de canales iónicos, receptores y morfología e interacciones del citoesqueleto (Colbran, 2004). La CaMKII α puede también, interactuar con diversas proteínas y/o receptores, se ha visto que co-precipita con el receptor NMDA en extractos de cerebro y co-localiza con el mismo receptor en cultivos celulares de hipocampo. La CaMKII interactúa también

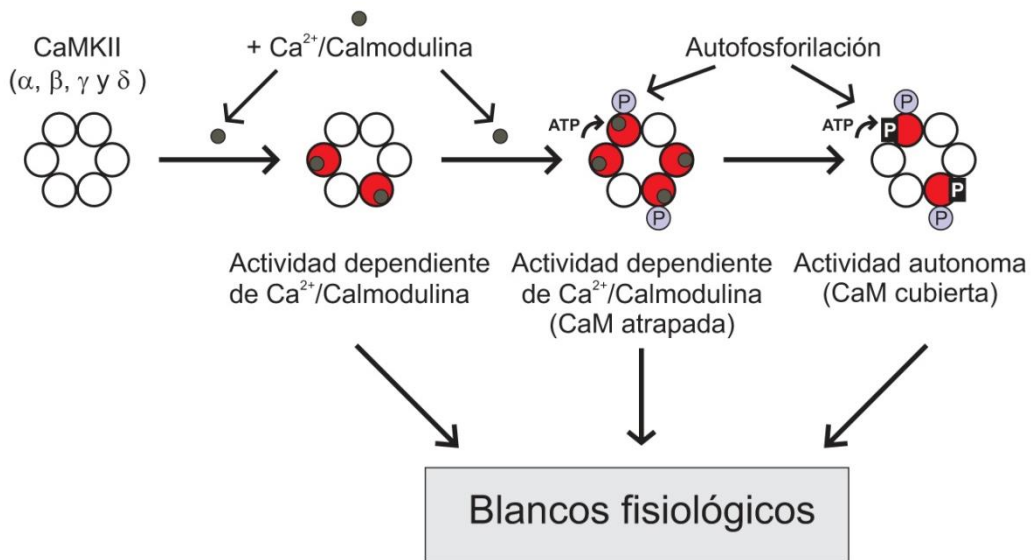


Figura 7. Se esquematiza la forma de activación de la Calcio-Calmodulin cinasa tipo II. La autofosforilación de la proteína puede provocar cambios funcionales y de regulación celular. Tomado de Hudmon y Shulman, 2002.

con densina-180, syntaxina y otras proteínas. Estos datos sugieren que la interacción de la CaMKII con múltiples proteínas presinápticas aumenta la fosforilación de sustratos y promueve la liberación de neurotransmisores (Colbran, 2004).

Lo anterior describe a la CaMKII α como una compleja estructura oligomérica que permite mecanismos regulatorios únicos, así como interacciones proteína-proteína de funciones esenciales (Wayman *et al.*, 2008).

JUSTIFICACIÓN

Recientemente en nuestro laboratorio se observó que la CaMKII α , al activarse bloquea la actividad del receptor D3, impidiendo que éste cumpla con su función de potenciar los efectos observados tras la activación de receptores D1 en terminales estriado-nigrales (Avalos-Fuentes, *et al.*, 2013). Este efecto inhibitorio de la CaMKII α sobre el receptor D3, en teoría podría efectuarse mediante cualquier mecanismo que incremente el influjo de calcio a la terminal sináptica. Por lo tanto, la activación de la CaMKII α es determinante para que se lleve a cabo la inhibición del receptor D3, sin embargo, no es claro aún, el mecanismo por el cual esta cinasa puede ser activada para llevar a cabo su efecto inhibitorio sobre estos receptores, por ello en el presente estudio se evalúan los diferentes mecanismos de activación de la CaMKII α en las terminales estriado nigrales.

ANTECEDENTES

Surmeier *et al.*, en 1996 reportaron que las Neuronas Espinosas Medianas del estriado que expresan el RNAm para encefalina (ENK), proyectan preferencialmente hacia el GP, mientras que las neuronas que expresan el RNAm para Sustancia P (SP), generalmente proyectan hacia la SNr/GPi; además hay cierto porcentaje de NEMs que expresan ambos mensajeros (ENK y SP), y éstas neuronas proyectan tanto al GPe como a la SNr/GPi. Reportaron también que en las NEMs de la vía directa (las cuales proyectan del Estriado a la SNr) cerca de un 50 %, pueden coexpresar receptores D1 (familia D1) y receptores D3 (familia D2).

Por su parte Marcelino *et al.*, en 2008 propusieron que los receptores D1 y D3 podrían estar formando un dímero, con base en las señales de FRET y BRET obtenidas en su estudio, el cual realizaron en células HEK y en Estriado. Éste grupo de trabajo reportó también, que la formación del heterómero D1-D3 tiene una respuesta funcional; mediante experimentos conductuales demostraron que el significado funcional de los receptores D3 es obtener una respuesta potenciada del receptor D1, es decir, que el receptor D3 potencia el efecto del receptor D1.

Lo anterior concuerda con los resultados obtenidos por Fiorentini *et al.*, en 2008, quienes también reportaron la posible heterodimerización de los receptores D1 y D3 en estriado, demostrado por co-precipitación. Además reportaron que la activación de éste heterodímero estimula la formación de AMPc, mostrando también, que el receptor D3 es capaz de potenciar los efectos del receptor D1.

Posteriormente se demostró que en el núcleo accumbens, el receptor D3 es capaz de co-precipitar con la CaMKII, es decir, existe una interacción física entre ambas proteínas y como resultado funcional de esa interacción, la CaMKII regula de manera negativa al receptor D3, inhibiendo sus efectos (Liu *et al.*, 2009).

En 2013 Cruz-Trujillo *et al.*, reportaron que el receptor D1 co-precipita con el receptor D3 en terminales estriado-nigrales (sinaptosomas). Mediante el

estudio de corrientes miniatura inhibitorias demostraron que el receptor D3 es capaz de potenciar el efecto del receptor D1 en la liberación de GABA, dicho efecto potenciador se observó también en experimentos de formación de AMPc en sinaptosomas de la SNr.

Finalmente, Avalos-Fuentes *et al.*, en 2013 reportaron que en terminales estriado-nigrales la CaMKII α modula la actividad del receptor D3. Mediante experimentos de liberación de GABA y de formación de AMPc, encontraron que, el receptor D3 es capaz de potenciar el efecto de los receptores D1, como se había mencionado previamente, pero solo en presencia de KN-62, un inhibidor de la CaMKII α , lo que sugiere que en estas terminales los receptores D3 son regulados de manera negativa por la CaMKII α , inhibiendo su efecto potenciador.

Con base en lo anteriormente mencionado se plantearon los siguientes objetivos.

Objetivo general

Estudiar los diferentes mecanismos de activación de la CaMKII α en terminales estriado-nigrales de la rata, que modulan la interacción de los receptores D1 y D3.

Objetivos particulares

Estudiar el nivel de fosforilación de la CaMKII α en sinaptosomas de la SNr por despolarización con KCl.

Estudiar el nivel de fosforilación de la CaMKII α en sinaptosomas de la SNr por co-activación de receptores D1 y D3.

Determinar el curso temporal de fosforilación de la CaMKII α por la activación de los receptores D1 y D3.

Determinar el tipo de canales de calcio que están involucrados en el influjo de calcio a la terminal estriado-nigral que podría estar activando a la CaMKII α , mediante la activación de los receptores D1 y D3.

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente estudio se realizó en el laboratorio cuatro del departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias del CINVESTAV del I.P.N.

Sujetos experimentales

Se emplearon ratas macho de la cepa Wistar, de entre 200 y 230 gramos, las cuales fueron mantenidas en condiciones de bioterio: temperatura de 18-23 °C, ciclos de luz-oscuridad de 12 x 12 hrs; con alimento y agua *ad libitum*.

Obtención del tejido

Las ratas fueron sacrificadas por dislocación cervical y rápidamente decapitadas para la obtención del cerebro, el cual fue fijado al fondo de una caja Petri cubierta con solución Krebs-Henseleit (NaCl 127 mM, KCl 3.73 mM, MgSO₄ 1.18 mM, KH₂PO₄ 1.18 mM, CaCl₂ 1.8 mM, HEPES 20 mM, Glucosa 11 mM, pH 7.4, previamente oxigenado en una mezcla O₂ y CO₂/ 4 °C) y se realizaron cortes coronales de 300 µm de espesor con ayuda de un vibratómo (CAMPDEN instruments ltd, USA). Las rebanadas se colocaron en un portaobjetos y se obtuvo la SNr con ayuda de un microscopio estereoscópico, identificando al núcleo de acuerdo al atlas de Paxinos y Watson.

Obtención de la fracción sinaptosomal

Una vez obtenido el tejido fue suspendido en una solución HEPES-Sacarosa 0.32 M (HEPES 5 mM, Sacarosa 0.32 M, pH 7.4) y se homogenizó diez veces a 450 rpm. El homogenizado fue centrifugado a 2000 rpm durante 10 minutos a 4 °C, separando de esta manera núcleos y mitocondrias de las membranas. El sobrenadante fue recuperado y centrifugado a 15,000 rpm durante 30 minutos, posteriormente se recuperó la pastilla (P1) y fue re-suspendida en solución cama HEPES-Sacarosa 0.32 M, la cual se vertió sobre una solución HEPES-Sacarosa 0.8 M (HEPES 5 mM, Sacarosa 0.8 M, pH 7.4) que fue centrifugado a 15,000 rpm durante 30 minutos, y se recuperó la pastilla 2 (P2) de la cual se obtuvieron los sinaptosomas purificados. A dichos sinaptosomas

se les agregaron los fármacos correspondientes para cada condición y posteriormente fueron colocados en hielo para finalizar la reacción.

Fármacos utilizados

KN 62: Inhibidor selectivo para la CaMKII α (4 μ M), SKF 38393: Agonista selectivo para receptores D1 (1 μ M), PD 128, 907: Agonista selectivo para receptores D3 (100 nM), Nifedipina: Bloqueador de canales de calcio tipo L (10 μ M), Solución con alto potasio (K⁺): Krebs-Henseleit (NaCl 107 mM, KCl 15 mM, MgSO₄ 1 mM, KH₂PO₄ 1.2 mM, CaCl₂ 1.8 mM, NaHCO₃ 16.5 mM, Glucosa 11 mM, pH 7.4).

Determinación de la proteína por Western-Blot

Los sinaptosomas se re-suspendieron en RIPA (Tris-HCl 40 mM, NaCl 150 mM, EDTA 2 mM, Glicerol 10 %, Tritón X-100 1 %, Desoxicolato de sodio 0.5 %, SDS 0.2 %, pH 7.6) junto con inhibidores de proteasas (Complete 20 μ l y PMSF 100 mM, 5 μ l) y se colocaron en hielo por 15 minutos. Posteriormente los sinaptosomas se sonicaron 10 veces y se cuantificó la proteína por el método de Bradford. Una vez cuantificada la proteína, se adicionó buffer de muestra (Tris-Base 0.3125 M, Glicerol 50 %, SDS 10 %, Azul Bromofenol 0.5 %, β -Mercaptoetanol 25 %, pH 6.8). La mezcla fue hervida durante diez minutos para poder así, congelarla para su posterior estudio.

Electroforesis

Se preparó el gel de acrilamida al 10 % (dado que la CaMKII α tiene un peso de 54 kD), en el cual se cargó el equivalente a 30 μ g de proteína por carril para cada condición. Se colocó buffer de corrida (Tris-Base 0.125 M, Glicina 0.96 M, SDS 0.5 %, pH 8.3) en la cámara y se realizó la electroforesis a amperaje constante (75 mA) hasta que la muestra migró hasta el fondo del gel.

Transferencia

Posteriormente se realizó la transferencia en cámara semiseca, para lo cual se utilizó una membrana de PVDF (0.45 μm) que fue activada con metanol durante un minuto y lavada por 10 minutos antes de ser hidratada junto con las almohadillas con buffer de transferencia (Tris-Base 0.05 M, Glicina 0.38 M, Metanol 20 %, pH 8.3) durante 15 minutos. Se colocó una almohadilla, sobre ésta se colocó la membrana y sobre ésta a su vez se colocó el gel para cubrirlo con otra almohadilla (sándwich) y así colocarlo en la cámara, se realizó la transferencia a amperaje constante (440 mA) por 35 minutos. Una vez realizada la transferencia se retiraron las almohadillas y el gel para quedarnos solo con la membrana, la cual se dejó secar para ser reactivada posteriormente, con metanol y se lavó con solución TBS-Tween 0.2 % (Tris-Base 1M, pH 8, NaCl 1.5 M, Tween 20 0.2 %) durante 10 minutos. Una vez lavada la membrana, se colocó una solución de bloqueo (leche libre de grasa al 10 %) durante 2 horas en agitación constante, una vez transcurrido éste tiempo, se incubó la membrana con el anticuerpo correspondiente.

Incubación con anticuerpos

Las membranas fueron incubadas con los anticuerpos primarios (Sta. Cruz Biotechnology) correspondientes de la siguiente forma: para la CaMKII α total se utilizó a una dilución 1: 1000 durante 3 horas, mientras que para la CaMKII α fosforilada fue en una dilución 1: 2000 por 14hrs. Posteriormente se retiró el anticuerpo primario y la membrana fue lavada con solución TBS-Tween 0.2 % durante 40 minutos. Posteriormente las membranas fueron incubadas con el anticuerpo secundario (α - Mouse) en una dilución 1: 5000 durante 2 horas, después de éste tiempo, se lavó la membrana nuevamente con TBS-Tween 0.2 % durante 40 minutos.

Revelado

Se aplicó un agente quimioluminescente (ECL-plus General Electric) sobre la membrana cinco minutos previos a ser revelada por el método de Kodak. Las placas fotográficas obtenidas por dicho método, fueron analizadas por densitometría óptica con el programa Kodak 1D, el cual proporciona unidades arbitrarias de densitometría de las bandas obtenidas con base en la siguiente relación:

$$\text{Densitometría Unidades Arbitrarias} = \frac{\text{Intensidad neta} - \text{Fondo}}{\text{Área en pixeles}}$$

Los datos obtenidos fueron graficados con el software Graph Pad Prism versión 5. Se aplicó un ANOVA de una vía seguido de una post-prueba de Tukey. $P < 0.05$ fue tomado como nivel de significancia estadístico mínimo aceptable entre los grupos.

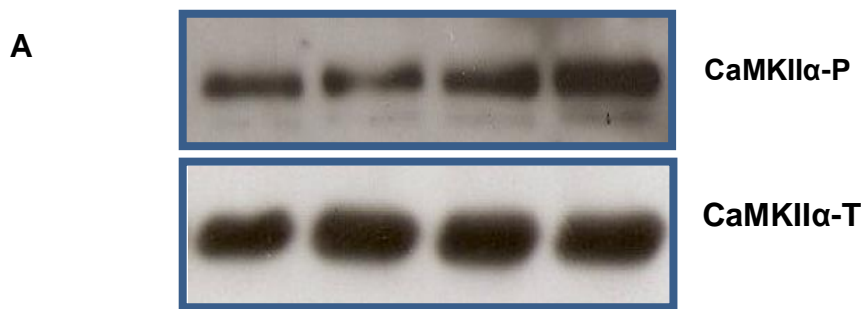
Los resultados son presentados para cada condición, en dos paneles, referidos como A y B, donde A corresponde a las placas fotográficas obtenidas por medio de Western-Blot. La placa superior representa a la CaMKII α fosforilada (CaMKII α -P), mientras que la placa inferior representa el control de carga, expresado en proteína total (CaMKII α -T). En el panel B se presenta la gráfica obtenida por medio del análisis densitométrico realizado a cada placa fotográfica, donde se expresa en porcentaje, el nivel de fosforilación de la CaMKII α para cada condición.

RESULTADOS

Se considera que la CaMKII α al ser fosforilada en el residuo T-286 aumenta su actividad de cinasa, por lo tanto, su nivel de fosforilación se traduce en nivel de actividad. Para estudiar las posibles vías por las cuales ésta cinasa es activada, en el presente proyecto nos propusimos estudiar el nivel de fosforilación de la CaMKII α en terminales estriado-nigrales (sinaptosomas) por medio de Western Blot.

Fosforilación de la CaMKII α inducida por despolarización

Para estudiar la actividad de la cinasa, la primera estrategia experimental fue evaluar la fosforilación de la CaMKII α , para lo cual, se aplicó a los sinaptosomas un pulso despolarizante con alto K⁺ durante diez minutos. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 8A, donde (de izquierda a derecha) la banda 1 corresponde a la fosforilación basal tomada como el 100 %. La banda 2 corresponde al efecto obtenido al aplicar el inhibidor de la CaMKII α (KN-62), donde se observa que el KN-62 no modifica la fosforilación basal de la cinasa (D.O. Relativa 91.6 ± 3.85 % vs control; ns). La banda 3 muestra el efecto obtenido al aplicar el pulso despolarizante (KCl) en presencia de KN-62, en donde se encontró que el KN-62 es capaz de prevenir la fosforilación de la CaMKII α , inducida por el pulso despolarizante (D.O. Relativa 92.6 ± 2.35 % vs control; ns). Finalmente la banda 4, muestra que el pulso despolarizante (15 mM KCl) promueve un aumento en la fosforilación de la CaMKII α (D.O. Relativa 159.3 ± 11.5 % vs control; *** $p < 0.0001$), lo que se traduce en un incremento en la actividad de la cinasa. Lo anterior se aprecia de manera más clara en la gráfica, donde al comparar las barras correspondientes a la condición en la que se aplicó KCl y la correspondiente al control, se observa que el aumento en la fosforilación de la CaMKII α al aplicar el pulso despolarizante es estadísticamente significativo, lo que indica que la despolarización participa de manera importante en la activación de la CaMKII α en terminales estriado-nigrales.



B Fosforilación de CaMKII α

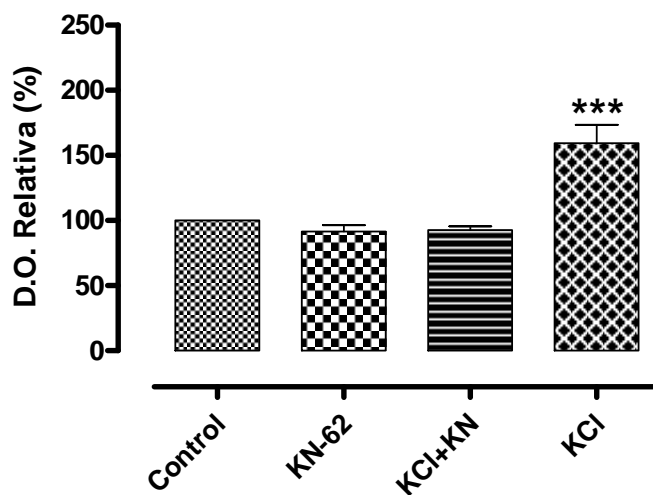


Figura 8. Fosforilación de la Calcio calmodulin cinasa II α (CaMKII α) en terminales estriado-nigrales inducida por despolarización con KCl. En el panel A: Western Blot que muestra la fosforilación de la CaMKII α en la Thr 286 (-P), así como la cantidad total de CaMKII α (-T), en presencia de distintos tratamientos. En el panel B: Análisis cuantitativo de la CaMKII α -P. Se observa que al aplicar el pulso despolarizante (KCL, 15 mM), la fosforilación de la cinasa incrementa, no así, en presencia del inhibidor de la CaMKII α (KN-62, 4 μ M). *** $p < 0.0001$ vs control; ANOVA de una vía seguido de una post-prueba de Tukey; $n=3$.

Fosforilación de la CaMKII α por activación de los receptores dopaminérgicos D1 y D3

Una vez que observamos que la CaMKII α es activada al despolarizar las terminales, el siguiente objetivo fue determinar si la cinasa podía activarse al estimular a los receptores dopaminérgicos, tanto de manera individual, como conjunta y estudiar el proceso de fosforilación de la cinasa durante dicha maniobra. En éste experimento se activaron los receptores D1 y D3 durante 30 minutos y la fosforilación basal se tomó como 100 % (control). Los resultados obtenidos se muestran en la figura 9A y 9B, donde encontramos que al activar al receptor D1 (con su agonista selectivo, SKF 38393), se presenta un incremento en la fosforilación de la CaMKII α , con respecto al control (D.O. Relativa 125.6 ± 6.34 % vs control; * $p < 0.01$); caso contrario con el receptor D3; ya que al activar a dicho receptor (con su agonista selectivo, PD 128,907), el nivel de fosforilación de la CaMKII α es similar al que se observa de manera basal (D.O. Relativa 99 ± 1.41 % vs control; ns), lo que nos indica que la autofosforilación de la CaMKII α no es modulada por la activación del receptor D3. Sin embargo, al activar de manera conjunta a ambos receptores, es decir, al activar tanto al receptor D1, como al receptor D3 (SKF 38393 + PD 128,907), encontramos que la cinasa aumenta su nivel de fosforilación más aún, que la que muestra la sola activación de los receptores D1 (D.O. Relativa 187 ± 14.96 % vs control; *** $p < 0.0001$), como se muestra en la figura 9B. Con base en éste resultado podemos decir que, la activación del receptor D1 participa en la activación de la CaMKII α , no así, la activación del receptor D3, sin embargo la co-activación de ambos receptores sí influye de manera importante en la activación de la CaMKII α .

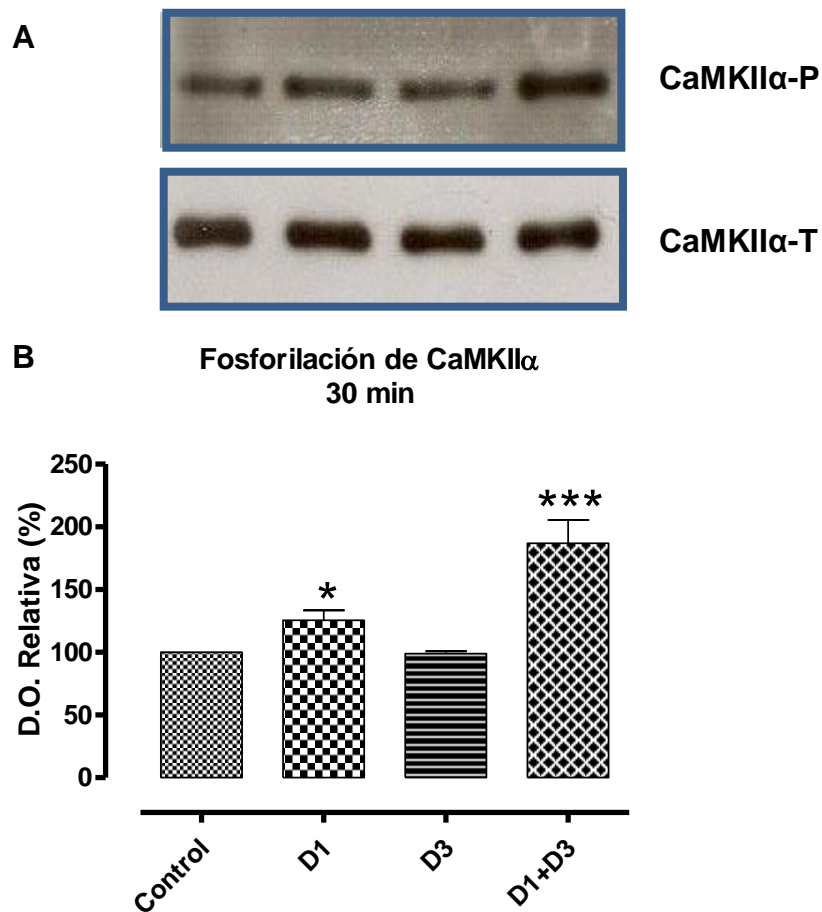


Figura 9. Fosforilación de la CaMKIIα en terminales estriado-nigrales mediante la activación de receptores dopaminérgicos D1 y D3. En el panel A: Western Blot que muestra la fosforilación de la CaMKIIα en la Thr 286 (-P), así como la cantidad total de CaMKIIα (-T), en presencia de los agonistas para el receptor D1 y el receptor D3 (SKF 38393: 1 μM y PD 128,907: 100nM, respectivamente). En el panel B: Análisis cuantitativo de la CaMKIIα-P. Se observa que al aplicar SKF 38393, la fosforilación de la cinasa incrementa, no así, en presencia de PD 128,907, sin embargo, al aplicar ambos agonistas, la fosforilación de la CaMKIIα aumenta aún más. *** $p < 0.0001$ vs control; * $p < 0.01$ vs control; ANOVA de una vía seguido de una post-prueba de Tukey; $n=3$.

Curso temporal de fosforilación de la CaMKII α , tras la co-activación de receptores D1-D3

Después de los resultados obtenidos en los experimentos de activación de la CaMKII α por despolarización y por activación de receptores D1 y D3, donde encontramos que ambos mecanismos son capaces de activar a ésta cinasa, nuestro siguiente objetivo fue determinar el curso temporal de activación de la CaMKII α después de la activación de los receptores D1-D3. Para dicho objetivo, se realizó la co-activación de los receptores antes mencionados con los agonistas selectivos de cada receptor (D1: SKF 38393 y D3: PD 128,907) y se obtuvieron muestras a distintos tiempos posteriores a ésta acción. En la figura 10A, se presentan las bandas correspondientes a los tiempos posteriores a la co-activación del dímero. De izquierda a derecha representan la respuesta después de 0, 15, 30 y 60 minutos respectivamente. Es claro que la fosforilación de la cinasa aumenta con respecto al tiempo. En el panel B puede observarse la gráfica del análisis densitométrico, la cual expresa en porcentaje, el nivel de fosforilación de la CaMKII α . De izquierda a derecha, la primera barra corresponde al nivel de fosforilación basal de la cinasa (0 minutos), misma que representa el 100 %; en la segunda barra se observa que a partir de 15 minutos hay un incremento en la fosforilación de la cinasa (D.O. Relativa 113.6 ± 3.6 % vs control; ns), pero es hasta los 30 minutos cuando se observa un aumento significativo en la fosforilación de la CaMKII α (D.O. Relativa 132.6 ± 6.5 % vs control; *** $p < 0.0001$), regresando a los niveles basales al minuto 60 (99.3 ± 14 % vs control; ns). Lo que nos indica que la CaMKII α presenta una alta actividad tras la co-activación de los receptores D1-D3. Éstos resultados nos ayudan a entender de manera más clara, el tiempo que la CaMKII α requiere para su actividad, denotando que es a los treinta minutos posteriores a la co-activación de los receptores D1-D3, cuando la CaMKII α alcanza un alto nivel de actividad en las terminales estriado-nigrales.

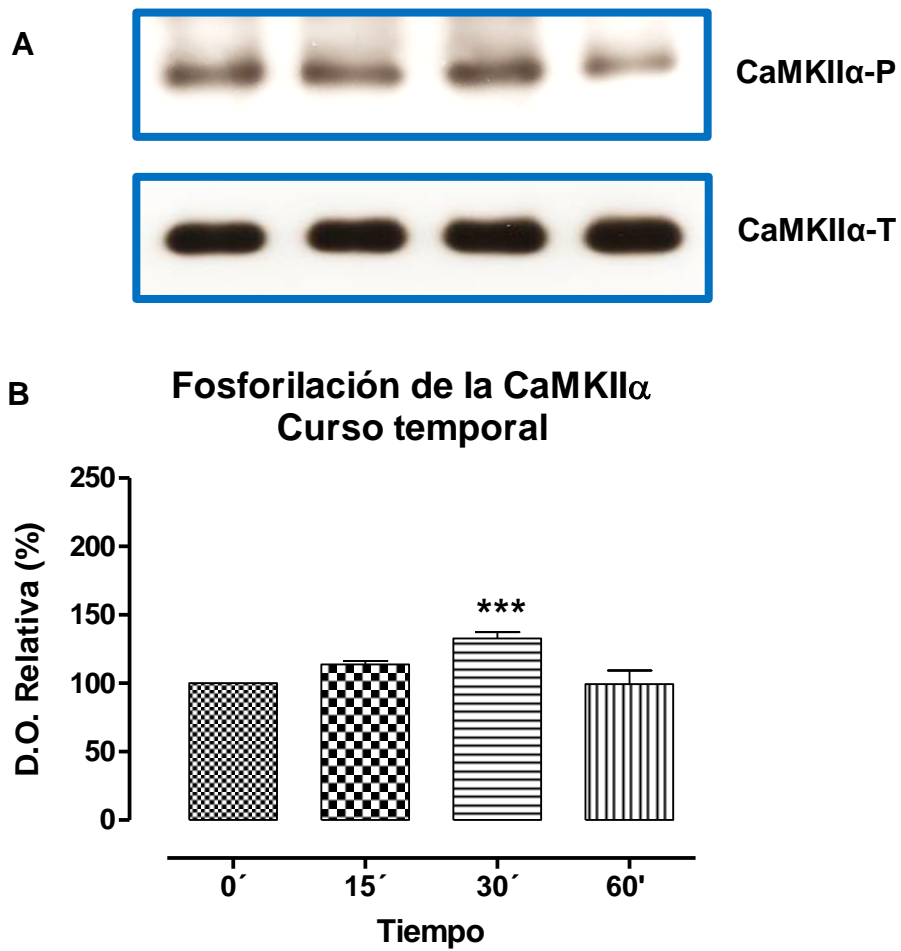


Figura 10. Curso temporal de la CaMKIIα en terminales estriado-nigrales, mediante activación de los receptores D1-D3. En el panel A: Western Blot que muestra la fosforilación de la CaMKIIα en la Thr 286 (-P), así como la cantidad total de CaMKIIα (-T), durante la co-activación del dímero D1-D3, durante 0, 15, 30 y 60 minutos (de izquierda a derecha, respectivamente). En el panel B: Análisis cuantitativo de la CaMKIIα-P. La actividad de la cinasa aumenta con respecto al tiempo, siendo a los 30' cuando se encuentra en un estado de mayor actividad. *** $p < 0.0001$ vs control; ANOVA de una vía seguido de una post-prueba de Tukey; $n = 3$.

Participación de canales de calcio tipo L en la fosforilación de la CaMKII α , mediante la activación de los receptores D1-D3

La activación de la CaMKII α depende del influjo de calcio a la célula, en éste trabajo hemos demostrado hasta el momento que la cinasa es activada al despolarizar las terminales, así como al activar a los receptores D1 y D3, por lo cual entendemos que, ambos procesos promueven el influjo de calcio a la célula, pero, ¿cuál es el mecanismo de entrada de calcio que posiblemente media la activación de la CaMKII α tras la activación de los receptores D1 y D3?. Resolver ésta pregunta, fue nuestro último objetivo. Estudios realizados en nuestro laboratorio, en las mismas terminales (estriado-nigrales), demostraron que los canales de calcio tipo P/Q y L son activados durante la despolarización con alto K⁺ (Ochoa-Sánchez, 2011), sin embargo solo los canales tipo L participan en la liberación de GABA estimulada por la activación de receptores D1 (Recillas-Morales *et al.*,2013), por lo que creemos que quienes podrían estar mediando la respuesta de la CaMKII α en éste caso son los canales de calcio tipo L, por lo cual en éstos experimentos utilizamos un bloqueador de dichos canales, la nifedipina (10 μ M). Los resultados que obtuvimos nos indican que al activar a los receptores D1-D3, incrementa de manera significativa la fosforilación de la CaMKII α (D.O. Relativa 149.9 ± 4.6 % vs control; *** $p < 0.0001$), sin embargo al activar ambos receptores en presencia del bloqueador de los canales de calcio tipo L, la fosforilación de la cinasa es prevenida, al mismo nivel que el control (D.O. Relativa 98.64 ± 4.56 % vs control; ns); la nifedipina por sí sola no muestra cambios en la fosforilación basal de la cinasa (D.O. Relativa 98.5 ± 5.39 % vs control; ns), lo que significa que los cambios observados son realizados por los distintos tratamientos. En la figura 11, se aprecia que el aumento en la fosforilación de la CaMKII α visto tras la activación del dímero D1-D3, es prevenida en su totalidad por la nifedipina, llevándola a niveles basales. Esto nos sugiere fuertemente que la corriente de calcio que entra a las terminales estriado-nigrales tras la activación de los receptores D1-D3, entra a través de los canales de calcio tipo L.

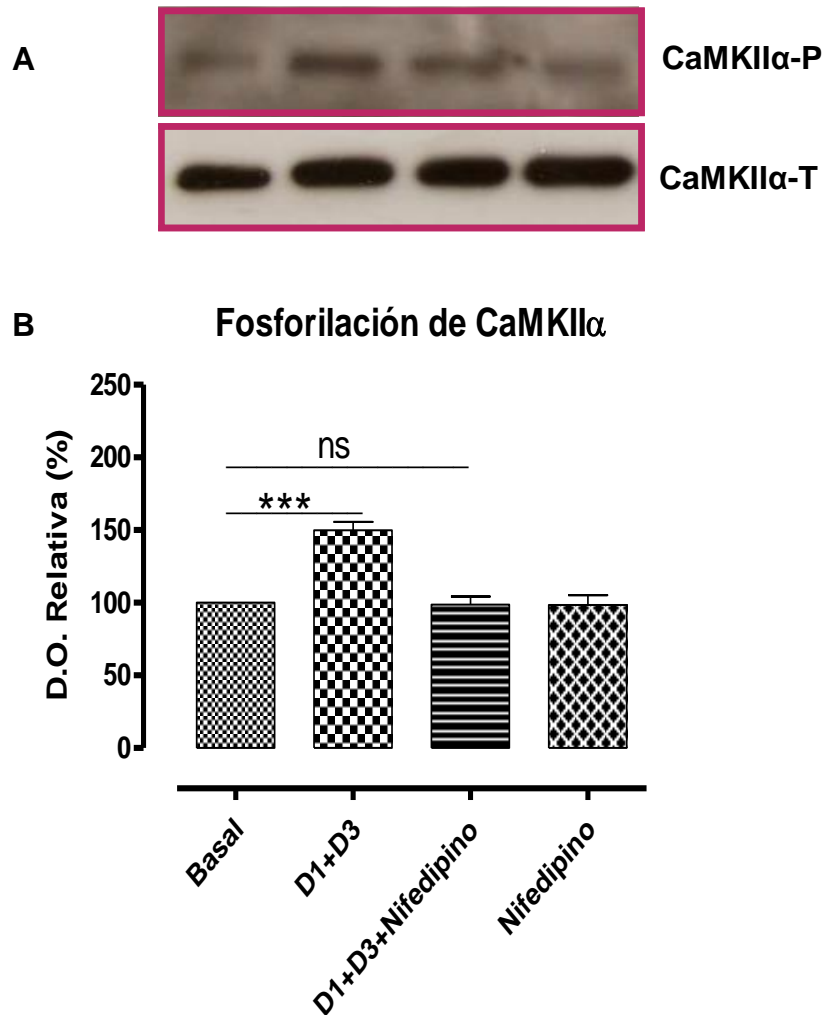


Figura 11. Participación de canales de calcio tipo L en la activación de la CaMKII α , mediante la activación de los receptores D1-D3. En el panel A: Western Blot que muestra la fosforilación de la CaMKII α en la Thr 286 (-P), así como la cantidad total de CaMKII α (-T). Basal, D1-D3, D1-D3+Nifedipina y Nifedipina, de izquierda a derecha, respectivamente. En el panel B: Análisis cuantitativo de la CaMKII α -P. Se observa que al activar al dímero en presencia de Nifedipina (10 μ M), la fosforilación de la CaMKII α es prevenida, lo que sugiere fuertemente que la activación de ésta cinasa es mediada por canales de calcio tipo L, en terminales estriado-nigrales. *** $p < 0.0001$ vs control; ns: no significativo; ANOVA de una vía seguido de una post-prueba de Tukey; $n=3$.

DISCUSIÓN

La dopamina participa en diversas funciones fisiológicas, como el aprendizaje, la memoria, la motivación y la actividad motora. La pérdida de neuronas dopaminérgicas deriva en disfunciones implicadas en el desarrollo de enfermedades como Parkinson, Huntington, esquizofrenia y abuso de drogas (Arias *et al.*, 2007). La dopamina actúa a través de cinco receptores (D1, D2, D3, D4 y D5) que se acoplan a proteínas G heterotriméricas (GPCR's). El receptor D1 es el receptor dopaminérgico más abundante en el cerebro, es encontrado en alta densidad en áreas límbicas y motoras. El receptor D3 es el menos abundante y presenta un patrón de distribución más estricto, se expresa principalmente en el estriado ventral, particularmente en el núcleo accumbens (shell), en islas de calleja, y en menor concentración en otras regiones del cerebro, como en los ganglios basales (Surmeier, 1996). Ambos receptores D1 y D3, han sido implicados en la regulación de mecanismos como la motivación, los procesos cognitivos y emocionales (Fiorentini *et al.*, 2008). Se ha demostrado que los receptores D1 y D3 pueden interactuar formando heterómeros en el estriado y mediar así, respuestas funcionales sobre la actividad locomotora, lo cual causa interés ya que ambos receptores señalizan por distintas vías (Gs/olf y Gi/o, respectivamente) (Marcellino *et al.*, 2008). Estudios recientes demuestran que el heterómero D1-D3 se encuentra formado también en terminales estriado-nigrales, donde la co-activación de ambos receptores estimula la formación de AMPc y modula la transmisión GABAérgica (Cruz-Trujillo *et al.*, 2013). La activación del receptor D3 tras la activación del receptor D1, induce un efecto potenciador en la liberación de GABA, dicho efecto se observa solo al activar de manera concomitante a dichos receptores, sin embargo hay una cinasa capaz de prevenir ésta respuesta: la CaMKII α , misma que es dependiente de calcio-calmodulina y que al ser activada puede modular la actividad del receptor D3, por lo tanto está implicada en la respuesta mediada por el dímero D1-D3. La CaMKII α es activada al ser autofosforilada, por lo que en éste trabajo se realizaron experimentos con sinaptosomas de la SNr, que nos permitieron estudiar posibles vías por las cuales la CaMKII α se fosforila. Los resultados obtenidos (descritos anteriormente) se discuten a continuación.

Fosforilación de la CaMKII α por despolarización

La CaMKII α se activa tras la unión del complejo calcio-calmodulina al dominio regulatorio de la cinasa (Hudmon and Schulman, 2002). Se ha demostrado que ésta cinasa puede modular negativamente la actividad del receptor D3 localizado postsinápticamente en el núcleo accumbens (Liu *et al.*, 2009). Sabemos también que al activar al dímero D1-D3, se estimula la formación de AMPc e incrementa de manera significativa la liberación de GABA en terminales estriado-nigrales solo en presencia del inhibidor de la CaMKII α (Avalos-Fuentes *et al.*, 2013), lo que indica que ésta cinasa está modulando la actividad del dímero, por lo que la pregunta principal de éste proyecto fue: ¿de qué manera se está activando la CaMKII α en las terminales estriado-nigrales?.

Dado que la activación de la CaMKII α es dependiente de calcio, consideramos que la despolarización es una posible vía de activación para la cinasa; ya que la despolarización con alto K⁺ provoca un aumento en el influjo de calcio a la célula, con lo cual incrementa la concentración de Ca²⁺ intracelular en sinaptosomas (Avalos-Fuentes *et al.*, 2013). En nuestros experimentos encontramos que al aplicar el pulso despolarizante (KCL) a las terminales estriado-nigrales, se estimula la fosforilación de la CaMKII α (figura 8), respuesta que atribuimos a que el cambio en la concentración de Ca²⁺ intracelular provocado por la despolarización, promueve la unión de calcio-calmodulina (Ca²⁺/CaM), facilitando así la unión del complejo Ca²⁺/CaM a la CaMKII α lo que permite su activación. Cabe recordar que la fosforilación de la cinasa puede ocurrir por dos procesos que no son mutuamente excluyentes, uno dependiente de Ca²⁺/CaM, que es el que proponemos se lleva a cabo a partir de la despolarización con alto K⁺ y otro que es independiente del complejo Ca²⁺/CaM, el cual ocurre a partir de un complejo hexamérico fosforilado que es capaz de fosforilar al complejo siguiente y activar a la cinasa en “serie”, a dicho proceso de fosforilación se le conoce como actividad autónoma. La fosforilación de la CaMKII α fue prevenida al aplicar KCL+KN-62, éste último es un fármaco que se une al sitio de unión del complejo Ca²⁺/CaM, inhibiendo así la activación de ésta (Colbran, 1992). Estos resultados sugieren fuertemente que la CaMKII α es activada por el influjo de calcio estimulado por

el pulso despolarizante con una solución con alto potasio en las terminales estriado-nigrales.

Fosforilación de la CaMKII α por activación de los receptores dopaminérgicos D1 y D3

En 2013, Cruz-Trujillo *et al.*, reportaron que el receptor D1 promueve la liberación de GABA mediante corrientes postsinápticas miniatura, así como también la formación de AMPc en terminales de la SNr, no así la activación del receptor D3, sin embargo encontraron que al co-activar a ambos receptores la liberación de GABA aumenta significativamente, por lo que se le atribuye al receptor D3 un efecto potenciador sobre la liberación GABAérgica estimulada por el receptor D1, efecto que explican, se da por un aumento en la afinidad del receptor D1 por el receptor D3.

En el mismo año, Avalos-Fuentes *et al.*, reportaron que en sinaptosomas de la SNr la activación del dímero D1-D3 estimula la formación de AMPc así como la liberación de GABA, pero agrega que el efecto potenciador del receptor D3 sobre la actividad del receptor D1 es modulada por la CaMKII α en éstas terminales. Con éstos resultados como base, nos dimos a la tarea de realizar experimentos que nos permitieran estudiar si la CaMKII α estaba siendo fosforilada por la activación de los receptores dopaminérgicos implicados, es decir, por la activación del receptor D1, por la activación del receptor D3 así como por la activación de ambos receptores. Encontramos que, la activación de receptores D1 es capaz de aumentar la fosforilación de la CaMKII α . El nivel de fosforilación aumenta significativamente (figura 9), este resultado puede deberse a que la activación de éstos receptores permite un incremento de las corrientes de calcio (Missale, 1998), lo cual podría estar facilitando la formación de complejos Ca²⁺/CaM, necesarios para activar a la CaMKII α . Se sabe también que, el receptor D1 puede modular los niveles de Ca²⁺ intracelular por varios mecanismos: 1.- vía fosfatidil inositol por PLC, 2.- vía PKC a PLC y 3.- vía PKA (Missale, 1998); sin embargo recientemente se demostró que en las

terminales estriado-nigrales el incremento de calcio intracelular ocurre mediante la vía de señalización AC-AMPC- PKA (Avalos-Fuentes, 2013).

Al activar al receptor D3, encontramos que la fosforilación de la $CaMKII\alpha$ es nula. Como se observa en la figura 2, el nivel de fosforilación de la cinasa tras la activación del receptor D3 se encuentra al nivel del control, lo que indica de manera clara que la activación del receptor D3 no estimula la fosforilación (y por lo tanto la actividad) de la $CaMKII\alpha$. Éste resultado puede deberse a que los receptores de la familia del tipo D2 también pueden mediar cambios en los niveles de calcio intracelular, se ha demostrado que pueden disminuir las corrientes de calcio. En particular el receptor D3, es capaz de inhibir corrientes de calcio (Missale, 1998), sin embargo su efecto inhibitorio en éstas terminales no ha sido reportado.

En cuanto a los resultados obtenidos mediante la activación de ambos receptores, tenemos que la fosforilación de la $CaMKII\alpha$ incrementa de manera significativa (como se muestra en la figura 9). Estos datos nos permiten pensar que quizá al activar al dímero las corrientes de calcio incrementan en las terminales estriado-nigrales y por lo tanto el influjo de calcio es mayor, tanto que permite que la $CaMKII\alpha$ se active a niveles por encima de los que presenta al ser activado solo el receptor D1; esto concuerda con los resultados obtenidos por Avalos-Fuentes *et al.*, en 2013, donde tanto la formación de AMPC como la liberación de GABA se ve aumentada por la activación del receptor D1 y potenciada tras la activación del dímero D1-D3. Es importante mencionar que en los experimentos de liberación realizados por Avalos y su grupo de trabajo, fue necesario el uso del inhibidor de la $CaMKII\alpha$ para poder evidenciar el efecto potenciador del receptor D3 sobre el receptor D1, ya que el pulso despolarizante aplicado, genera un influjo masivo de calcio a la terminal, lo cual, estaría activando a la cinasa y como resultado se tendría un efecto inhibitorio sobre el receptor D3.

Curso temporal de fosforilación de la CaMKII α tras la co-activación de los receptores D1-D3

Hemos demostrado hasta éste momento que la CaMKII α es fosforilada por despolarización, así como por la activación del dímero D1-D3. Otro punto importante de éste proyecto fue conocer el curso temporal de activación de la CaMKII α , ya que a éste respecto no hay mucha información disponible. Realizamos experimentos donde se estudió la fosforilación de la CaMKII α tras 0, 15, 30 y 60 minutos respectivamente, posteriores a la activación del dímero D1-D3. Observamos que la cinasa aumenta su fosforilación y por lo tanto su actividad, con respecto al tiempo. La CaMKII α incrementa su actividad de manera gradual durante 15 y 30 minutos posteriores a la activación del dímero, siendo a los 30 minutos cuando se presenta un incremento significativamente mayor; sin embargo, dicha actividad se ve disminuida al llegar a los 60 minutos (figura 10). Con base en estos datos planteamos un posible curso temporal de activación de la CaMKII α : Podemos decir que la cinasa es fosforilada tras la activación del dímero; aumenta su actividad al llegar a los 15 minutos y alcanza su mayor nivel de activación al llegar a los 30 minutos posteriores a la activación del dímero; finalmente disminuye su actividad al nivel inicial cuando han pasado 60 minutos de activación de los receptores D1-D3. La actividad de la CaMKII α es mediada por la fosforilación de la Treonina 286, dicha fosforilación se puede llevar a cabo mediante dos formas, una dependiente del complejo Ca²⁺/CaM y otra independiente de éste complejo. Como su nombre lo dice, la primera requiere de la presencia de Ca²⁺/CaM para llevar a cabo la activación de la cinasa, mientras que la segunda forma solo requiere de una subunidad fosforilada para activar a las subunidades “vecinas”, resultando en una funcionalidad cooperativa (De Koninck and Schulman, 1998), por lo que no requiere del complejo Ca²⁺/CaM, por ello recibe el nombre de actividad autónoma. Con base en lo anteriormente descrito, consideramos que en éste experimento podrían estar participando ambas formas de activación, ya que al activar al dímero debe haber un incremento en las corrientes de calcio en las terminales estriado-nigrales y por lo tanto la asociación del complejo Ca²⁺/CaM, que se une a la cinasa y la activa, esto durante la activación de los receptores D1-D3, así como durante los primeros 15 minutos. Posteriormente,

consideramos que una vez alcanzado cierto nivel de actividad, la CaMKII α emplea la actividad autónoma, donde ya no depende de la presencia de calcio para su activación, promoviendo así una actividad máxima, que sería representada por la alcanzada a los 30 minutos posteriores a la activación del dímero. Meyer *et al.*, en 1992, reportó que tras activar a la CaMKII α , la fosforilación continúa durante dos minutos, por lo que consideraron que las fosfatasas no inmovilizan a la enzima, disminuyen su actividad, no están presentes o no están activas, sin embargo, nosotros no consideramos que las fosfatasas no estén activas o que no puedan inmovilizar a la enzima, por el contrario, deben estar presentes y activarse pero es importante recordar que la actividad de la cinasa es mediada por dos mecanismos que no son mutuamente excluyentes y uno de ellos es dependiente de Ca²⁺/CaM, dado que el tiempo de activación de los receptores D1-D3 incrementa gradualmente, consideramos que el influjo de calcio a las terminales es constante durante la activación, por lo que explicamos que, mientras haya un influjo de calcio a la terminal, la CaMKII α continua fosforilandose, inicialmente de manera dependiente de Ca²⁺ y posteriormente podría ser de manera independiente (por autofosforilación); lo cual se traduciría en un incremento significativo de la actividad de la cinasa en la terminal. Consideramos entonces la posibilidad de que la cinasa incrementa su actividad a un grado en el que las fosfatasas no son suficientes para inactivarla. Hay que mencionar que dentro de las fosfatasas que pueden desfosforilar a la CaMKII, se encuentran la Proteínfosfatasa 1 y la Proteínfosfatasa 2 (PP1 y PP2), dichas fosfatasas tienen la capacidad de inhibir la actividad de la CaMKII, incluyendo el estado de autofosforilación de la Treonina 286, pero esto es altamente dependiente de la localización subcelular (Coultrap y Bayer, 2012). Sería conveniente realizar experimentos utilizando agonistas para PP1 y PP2 para observar cómo actúan sobre la actividad de la CaMKII α en terminales estriado-nigrales.

Meyer *et al.*, en 1992 además propuso mediante experimentos de electrofisiología que el tiempo medio de disociación de la cinasa es de 0.17 segundos, reportaron también que durante la autofosforilación (actividad autónoma) aumenta el tiempo medio de disociación a 3 segundos. Éste es de los pocos resultados en donde se propone un tiempo de activación y

disociación para la CaMKII α , si se pudiera extrapolar éstos datos con los obtenidos con nuestros experimentos se podría decir que coinciden relativamente. Sin embargo, es claro que hacen falta experimentos que ayuden a dilucidar los tiempos mínimos, medios y/o máximos de activación así como de disociación de la CaMKII α , lo cual sería una perspectiva de éste trabajo.

Participación de canales de calcio tipo L (CCTL) en la fosforilación de la CaMKII α , mediante la activación de los receptores D1-D3

Una vez establecido que la CaMKII α puede ser activada por despolarización así como por la activación de los receptores D1-D3, y tras observar un posible curso temporal de su activación, el siguiente paso fue estudiar el tipo de canal de calcio que se encuentra mediando la entrada de Ca²⁺ a las terminales estriado-nigrales.

Los canales P/Q y N constituyen la mayoría de las canales de calcio dependientes de voltaje presinápticos y han sido típicamente conocidos por controlar la liberación de neurotransmisor (Elliott *et al.*, 1995). Sin embargo, estudios realizados en nuestro laboratorio en terminales estriado-nigrales, demostraron que los canales de calcio tipo P/Q y L son activados durante la despolarización con alto K⁺ (Ochoa-Sánchez, 2011), pero solo los canales tipo L participan en la liberación de GABA estimulada por la activación de receptores D1 (Recillas-Morales *et al.*, 2013), por lo que en este proyecto estudiamos la fosforilación de la CaMKII α mediante la activación de los receptores D1-D3 en presencia de un bloqueador de los canales de calcio tipo L, la Nifedipina. Los resultados que obtuvimos nos indican que, como ya mencionamos anteriormente, al activar a los receptores D1-D3, se incrementa de manera significativa la fosforilación de la CaMKII α , sin embargo al activar ambos receptores en presencia del bloqueador de los canales de calcio tipo L, la fosforilación de la cinasa se previene, encontrándose a niveles mostrados por el control (figura 11). Este resultado soporta la idea aquí propuesta de que el influjo de calcio a las terminales estriado-nigrales tras la activación del dímero D1-D3, es mediada por canales de calcio de tipo L. Lo que concuerda con lo reportado por Avalos-Fuentes *et al.*, 2013, quienes realizaron experimentos de formación de AMPc en sinaptosomas de la SNr, y encontraron

que al agregar Nifedipino, el efecto observado tras la activación de los receptores D1-D3 en la formación de AMPc, disminuye a los niveles del control. Los CCTL, son canales que requieren de un alto umbral (de -40 a -20 mV) para poder ser activados. Se sabe que en NEMs los canales de calcio de tipo L son activados por actividad del receptor D1 (Surmeier *et al.*, 1995; Hernández-López *et al.*, 1997). La corriente de los CCTL aumenta por presencia de DA y disminuye por acetilcolina. Éstas corrientes generan despolarización sostenida (Vilchis *et al.*, 2000), estos datos aunados a los obtenidos en este trabajo en la primera fase experimental, en la cual se estudió la fosforilación de la CaMKII α por despolarización con alto K⁺ podrían explicar el aumento que observamos en la actividad de la cinasa al despolarizar las terminales estriado-nigrales así como al activar únicamente al receptor D1. Se ha propuesto que el receptor D1 es capaz de aumentar las corrientes de calcio mediante CCTL vía PKA. Al activar CCTL, éstos ayudan a mantener el estado de despolarización (Hernández-López *et al.*, 1997). Para el acople de excitación/transcripción, la entrada de Ca²⁺ a través de CCTL es de vital importancia y la CaMKII α puede unir y modular estos canales (Coultrap y Bayer, 2012), al ser activada ya sea por despolarización o por activación de receptores D1.

Los datos obtenidos en el presente estudio resultan interesantes ya que con base en ellos, podemos dilucidar posibles vías por las cuales la CaMKII α se está activando y modulando así al receptor D3 en terminales estriado-nigrales.

Es importante recordar que, en 2008, Marcellino *et al.*, reportaron que existe heterodimerización de los receptores D1 y D3 en estriado, además observaron que al administrar los agonistas de ambos receptores, de manera intraperitoneal, se promueve la actividad motora, efecto que atribuyeron a la formación del dímero D1-D3. La heterodimerización de los receptores D1-D3, fue estudiada también por Fiorentini *et al.*, en 2008, quienes reportaron que la formación del dímero está presente en estriado y que además, la activación de ambos receptores promueve un aumento en la formación de AMPc, es decir, la activación de los receptores D1 y D3, potencia la actividad del receptor D1. La presencia del dímero D1-D3, no se restringe al estriado, ya que en 2013 el grupo de trabajo de Cruz-Trujillo *et al.*, reportó la presencia de este dímero en

terminales estriado-nigrales y demostraron que como ocurre en el estriado, la activación del dímero promueve un aumento en la formación de AMPc, así como en la liberación de GABA. Sin embargo, se ha observado que en dichas terminales, la actividad del receptor D3 es modulada por la activación de la CaMKII α . Ha sido ya demostrado que la despolarización con alto K⁺ aumenta la fosforilación y por lo tanto el estado de activación de la CaMKII α así como la unión de ésta al receptor D3. La interacción D3/CaMKII α trae como resultado la inhibición en el efecto potenciador sobre la liberación de GABA en las terminales estriado-nigrales. Se ha mostrado también que es necesario bloquear a la cinasa durante la despolarización para que el receptor D3 pueda potenciar el efecto del D1 en liberación de GABA (Avalos-Fuentes *et al.*, 2013). La interacción D3/CaMKII α se había documentado previamente en el Núcleo accumbens, en donde observaron que el aumento de Ca²⁺ promueve la unión de la CaMKII α al receptor D3, regulando su función (Liu *et al.*, 2009).

Se sabe que la CaMKII α puede regular funciones presinápticas como la excitabilidad, dinámica vesicular y neurosecreción, de igual manera se ha indicado que el calcio liberado del retículo endoplásmico es determinante en la regulación de la CaMKII α en la liberación de neurotransmisores, neuropéptidos y neurotrofinas (Colbran and Brown, 2004).

La despolarización induce la actividad de vías dependientes de calcio y modula al receptor D3 en SNr, lo que indica que el disparo de las neuronas puede modular la actividad de los receptores a dopamina. Por ello durante los experimentos de despolarización con alto K⁺, obtuvimos un incremento marcado en la fosforilación de la CaMKII α , que en un inicio debió activarse tras el influjo de calcio a la terminal, estimulado por el pulso despolarizante, por lo que proponemos que su activación por despolarización es dependiente de calcio.

Por otra parte, se ha visto que como resultado de ésta posible dimerización, se incrementa la afinidad de los receptores D1 por su ligando (Avalos-Fuentes *et al.*, 2013). Otros estudios soportan ésta idea, de que el receptor D3 incrementa la afinidad del receptor D1 por su ligando, pero en células transfectadas y en células del estriado (Fiorentini *et al.*, 2008; Marcellino *et al.*, 2008). Esto podría

explicar el incremento observado en la fosforilación de la CaMKII α tras la activación de los receptores D1-D3. Si al coactivar a ambos receptores, aumenta la afinidad del receptor D1 por su ligando, esto quiere decir que aumenta la actividad del receptor. Está demostrado que la activación del receptor D1 estimula cambios en la concentración de calcio intracelular (Missale, 1998), por lo tanto si hay un incremento en la actividad del receptor, incrementa la concentración de calcio y se incrementa la fosforilación de la CaMKII α . Hay que recordar que la fosforilación de la cinasa incrementa de manera significativa al coactivar a ambos receptores, sin embargo Avalos-Fuentes *et al.*, en 2013, concluyen que la modulación de los receptores a dopamina por la CaMKII α en la SNr es selectiva para los receptores D3.

La activación de la CaMKII α se da mediante dos procesos que no son mutuamente excluyentes, uno dependiente de calcio y otro independiente de calcio, al segundo se le conoce como actividad autónoma. La magnitud de la actividad autónoma depende de la duración, amplitud y frecuencia en el incremento de calcio (Soderling, 2000); esto soporta nuestra propuesta de que al coactivar a los receptores D1-D3 durante un curso temporal, la CaMKII α aumenta su actividad conforme aumenta el tiempo de activación de los receptores, nosotros proponemos que la cinasa es capaz de fosforilarse por actividad autónoma, después de activar a los receptores D1-D3 durante 15 minutos, lo que le confiere un mayor nivel de actividad, el cual es observado a los 30 minutos.

No podemos negar que existe un grado de dificultad para interpretar los resultados obtenidos, sobre todo cuando se trata de receptores que se acoplan a proteínas G, ya que éstas se activan y modulan dependiendo del voltaje iónico o conductancias (mismos que dependen del potencial de membrana).

Hallazgos encontrados en otros trabajos indican que la dopamina, para modular la liberación de GABA en la SNr, utiliza a los receptores D1 y la vía de señalización que involucra a la AC-AMPC-PKA, modulando la actividad de la proteínofosfatasa 1 (capaz de desfosforilar a PKA y canales de calcio) y el estado de fosforilación de canales de calcio de tipo L (Sánchez, 2012). Datos publicados anteriormente también proponen que la vía de señalización del

receptor D1—AC —AMPc -- PKA puede ser modulada por CCTL (Surmeier *et al.*, 1995). En nuestro estudio, realizamos experimentos que concuerdan con lo publicado por Surmeier *et al.*, en 1995 y por Sánchez en 2012. Los datos nos permitieron corroborar que la activación de la CaMKII α es mediada por el influjo de calcio a través de canales de calcio tipo L, tras activar a los receptores D1-D3.

Todo lo anterior concuerda también con los datos obtenidos por Avalos-Fuentes *et al.*, en 2013, quienes mediante experimentos de formación de AMPc comprobaron que el efecto potenciador observado en la liberación GABAérgica estimulada por la activación del dímero D1-D3 actúa por la vía AC-AMPc-PKA. Con los datos obtenidos en este estudio, sugerimos que el efecto potenciador promovido por la activación de los receptores D1-D3, solo puede ser observado en presencia del inhibidor de la CaMKII α como lo dice Avalos-Fuentes, 2013, ya que al despolarizar con alto K⁺ se promueve el influjo de calcio a la célula con lo cual, la concentración de calcio intracelular aumenta y estimula la activación de la CaMKII α , ésta a su vez se une al receptor D3 y lo inactiva impidiendo así que el receptor D3 potencie la actividad del receptor D1, por lo tanto la respuesta obtenida es la observada en la vía clásica de señalización del receptor D1—AC—AMPc—PKA. Otro dato importante que debemos recordar es que el mismo grupo de trabajo, evidenció por co-precipitación que, al despolarizar las terminales estriado-nigrales, incrementa el nivel de interacción D3/ CaMKII α por lo tanto al despolarizar a las terminales debe agregarse el inhibidor de la cinasa, para prevenir la interacción D3/ CaMKII α y así observar el efecto potenciador que el receptor D3 le confiere al receptor D1.

La CaMKII α claramente juega un papel importante no solo en la señalización local e individual en la sinápsis, si no que participa de manera importante y más global en complejos procesos de señalización neuronal como es el propuesto en éste trabajo.

Los hallazgos de este estudio nos permiten conocer con más detalle las vías de activación de la CaMKII α en terminales estriado-nigrales. Sabemos que la CaMKII α puede modular la actividad del dímero D1-D3 al unirse al receptor D3, impidiendo que éste realice su función fisiológica cuando es activada. Los mecanismos por los cuales la CaMKII α se activa es la contribución más importante de nuestro trabajo, en el cual determinamos que la activación de la CaMKII α ocurre al despolarizar a las terminales estriado-nigrales, al activar a los receptores D1 y al activar al dímero D1-D3 (figura 12). Determinamos también que la entrada de calcio a las terminales se lleva a cabo por canales de calcio de tipo L y que la activación de la CaMKII α alcanza un estado máximo de fosforilación a los 30 minutos. Con éstos datos se podría proponer a la CaMKII α como blanco terapéutico para el tratamiento de los desórdenes implicados con los receptores dopaminérgicos D1-D3.

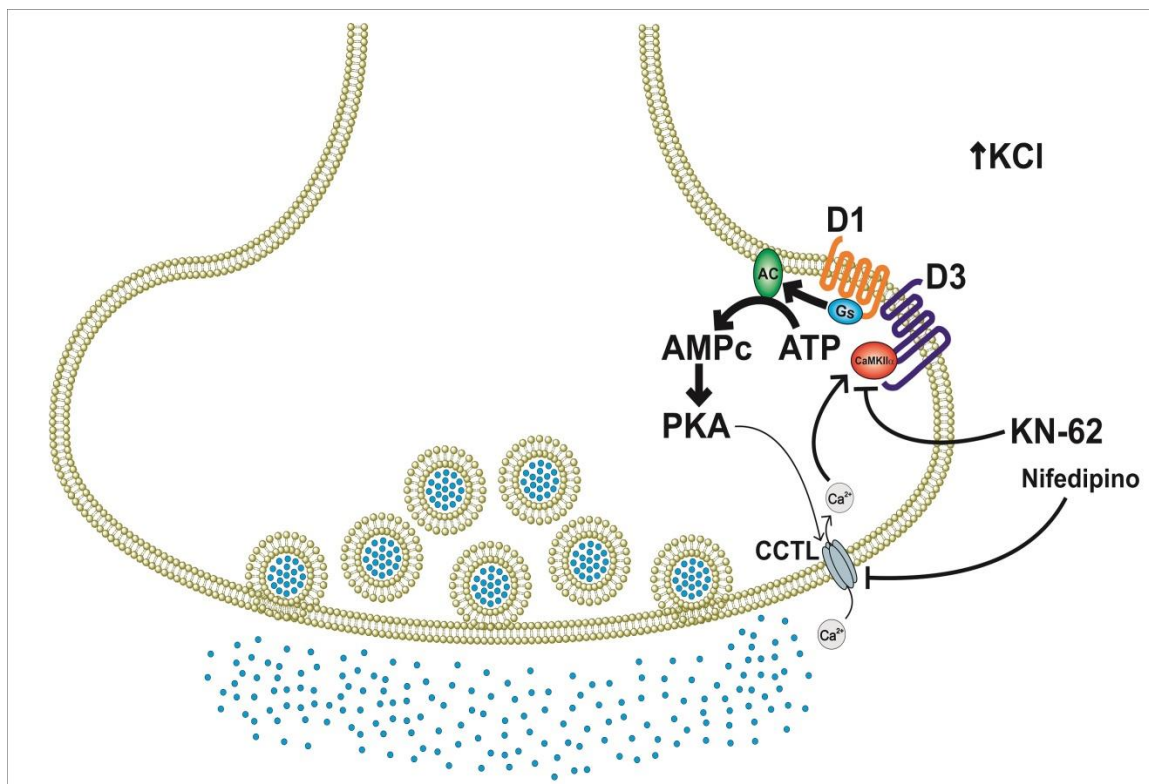


Figura 12. Mecanismos de activación de la CaMKII α en terminales estriado-nigrales. La cinasa se activa por diferentes vías: 1. Al despolarizar las terminales (KCL), 2. Al activar al receptor D1, y 3. Al activar al dímero D1-D3. La entrada de calcio a las terminales es mediada por los canales de calcio tipo L. La CaMKII α al activarse, impide que el receptor D3 potencie la actividad del receptor D1, sin embargo al aplicar KN-62, la actividad de la cinasa es bloqueada y en ésta condición el receptor D3 si potencia la respuesta del receptor D1, el cual actúa por la vía AC-AMPc-PKA, lo que se traduce en un aumento en la liberación GABAérgica.

CONCLUSIONES

1. La despolarización con alto K^+ aumenta la fosforilación de CaMKII α .
2. La co-activación de los receptores D1-D3 aumenta la fosforilación de la CaMKII.
3. En el curso temporal tras la co-activación de los receptores D1-D3, la actividad de la CaMKII α aumenta proporcionalmente con respecto al tiempo. Es a los 30' cuando la CaMKII alcanza su nivel máximo de fosforilación. 60' posteriores a la activación del dímero D1-D3 la fosforilación disminuye a los niveles del control.
4. Los canales de calcio tipo L participan en la entrada de calcio a la terminal estriado-nigral mediante activación de los receptores D1 y D3 promoviendo así la activación de la CaMKII α .

LITERATURA CITADA

Arias-Montaño, J.-A., Florán, B., Florán, L., Aceves, J., Young, J. M. 2007. Dopamine D₁ Receptor Facilitation of Depolarization-Induced Release of γ -Amino-butyric Acid in Rat Striatum is Mediated by the cAMP/PKA Pathway and Involves P/Q-Type Calcium Channels. *SYNAPSE* 61: 310-319.

Ahlgren-Beckendorf, J. A. and Levant, B. 2004. Signaling Mechanisms of the D3 Dopamine Receptor. *Journal of Receptors and Signal Transduction* 24 (3): 117-130.

Ashpole, N.M., Hudmon, A. 2011. Excitotoxic neuroprotection and vulnerability with CaMKII inhibition. *Molecular and Cellular Neuroscience* 46: 720-730.

Avalos-Fuentes, A., Loya-López, S., Flores-Pérez, A., Recillas-Morales, S., Cortés, H., Paz-Bermúdez, F., Aceves, J., Erlij, D., Florán, B. 2013. Presynaptic CaMKII α modulates dopamine D3 receptor activation in striatonigral terminals of the rat brain in a Ca²⁺ dependent manner. *Neuropharmacology* 71: 273-281.

Avalos, F.J.A. 2008. Papel del receptor dopaminérgico D3 sobre la supersensibilidad de la vía estriado-nigral inducida por denervación dopaminérgica. Tesis de maestría. CINVESTAV-IPN. México. 96 pp.

Bar-Gad, I., Morris, G., Bergman, H. 2003. Information processing, dimensionality reduction and reinforcement learning in the basal ganglia. *Progress in Neurobiology* 71: 439-473

Bargas, J., Galarraga, E. 2000. La acción neuromoduladora de la dopamina sobre los ganglios basales. *Ciencia al día* 3 (2): 1-18.

Blandini, F., Nappi, G., Tassorelli, C., Martignoni, E. 2000. Functional changes of the basal ganglia circuitry in Parkinson's disease. *Progress in Neurobiology* 62: 63-88.

Bolam, J.P., Hanley, J.J., Booth, P.A.C., Bevan, M.D. 2000. Synaptic organisation of the basal ganglia. *J Anatomy* 196: 527-542.

Bradford, H.F. 1985. Chemical neurobiology an introduction to neurochemistry. Ed. W.H. Freeman and company. E.U. 507 pp.

Colbran, R.J. 1992. Regulation and role of brain calcium/calmodulin- dependent protein kinase II. *Neurochemistry* 21 (4): 469-497.

Colbran, R.J. 2004. Targeting of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II. *Biochem* 378: 1-16.

Colbran, R.J., and Brown, A.M. 2004. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II and synaptic plasticity. *Current Opinion in Neurobiology* 14: 318-327.

Coultrap, S. J. and Bayer, U. 2012. CaMKII regulation in information processing and storage. *Cell* 35 (10): 607-618.

Cruz-Trujillo, R., Avalos-Fuentes, A., Rangel-Barajas, C., Paz-Bermúdez, F., Sierra, A., Escartín-Perez, E., Aceves, J., Erlij, D., Florán, B. 2013. D3 dopamine receptors interact with dopamine D1 but not D4 receptors in the GABAergic terminals of the SNr of the rat. *Neuropharmacology* 67: 370-378.

Ding, L. and Perkel, D.J. Dopamine Modulates Excitability of Spiny Neurons in the Avian Basal Ganglia. *The Journal of Neuroscience* 22 (12): 5210-5218.

Elliott, E. M., Malouf, T., & Catterall, A. 1995. Role of Calcium Channel Subtypes Hippocampal CA3 Neurons in Calcium Transients in. *The Journal of Neuroscience*, 15 (October).

Fiorentini, C., Busi, C., Gorruso, E., Gotti, C., Spano, P., Missaele, C. 2008. Reciprocal regulation of dopamine D1 y D3 receptor function and trafficking by heterodimerización. *Molecular Pharmacology* 74 (1): 59-69.

Gerfen, C., Keefe, K and Gauda, E. 1995. D1 and D2 dopamine receptors function in the striatum: co-activation of D1- and D2-dopamine receptors on separate populations of neurons in potentiated immediate early gene response in D1-containing neurons. *The Journal of Neuroscience* 15 (12): 8167-8176.

Hernández-López, S., Bargas, J., Surmeier, D. J., Reyes, A., Galarraga, E. 1997. D1 Receptor Activation Enhances Evoked Discharge in Neostriatal Medium Spiny Neurons by Modulating an L-Type Ca²⁺ Conductance. *The Journal of Neuroscience* 17 (9): 3334-3342.

Hudmon, A y Shulman, H. 2002. Structure-function of the multifunctional Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II. *Biochemistry* 364: 593-611.

Huynh, Q.K. and Pagratis, N. 2011. Kinetic mechanisms of Ca⁺⁺/calmodulin dependent protein kinases. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 506: 130-136.

Ibañez-Sandoval, O., Hernández. A., Florán, B., Galarraga, E., Tapia, D., Valdosierra, R., Erlij, D., Aceves, J., Bargas, J. 2006. Control of the Subthalamic Innervation of Substantia Nira Pars Reticulata by D1 and D2 Dopamine Receptors. *J Neurophysiol* 95: 1800-1811.

Kandel, E. R., Shwartz, J .H., Jessell, T.M. 2000. Principios de neurociencia. 4^a. ed. Ed. McGraw-Hill. España. 1400 pp.

Kardog, K.V. 1999. Vertebrados: Anatomía comparada, función y evolución. 4^a ed. Ed. Mc Graw-Hill. España. 782 pp.

Karpa, K.D., Lin, R., Kabbani, N., Levenson, R. 2000. The Dopamine D3 Receptor Interacts whith Itself and the Truncated D3 Splice Variant D3nf: D3-D3nf Interaction Causes Mislocalization of D3 Receptors. *Molecular Pharmacology* 58: 677-683.

Koeltzow, T.E., Xu, M., Cooper, D.C., Hu, X., Tonegawa, S., Wolf, M., White, F.J. 1998. Alterations in Dopamine Release But Not Dopamine Autoreceptor Function in Dopamine D3 Receptor Mutant Mice. *The Journal of Neuroscience* 18 (6): 2231-2238.

Liu, X., Mao, L., Zhang, G., Papasian, C.J., Fibuch, E.E., Lan, H., Zhou, H., Xu, M., Wang, J.Q. 2009. Activity-dependent modulation of limbic dopamine D3 receptors by CaMKII. *Neuron* 61: 425-438.

Marcellino, D., Ferré, S., Casado, V., Cortés, A., Le Foll, B., Mazzola, C., Drago, F., Saur, H., Stark, H., Soriano, A., Barnes, C., Goldberg, S.R., Lluís, C., Fuxe, K., Franco, R. 2008. Identification of Dopamine D1-D3 Receptor Heteromers, Indications for a role of synergistic D1-D3 receptor interactions in the striatum. *J of Biological Chemistry* 283 (38): 26016-26025.

Matuszewich, L. and Yamamoto, B.K. 1999. Modulation of GABA release by dopamine in the substantia nigra. *Sinapse* 32: 29-36.

Meyer, T. 1992. Calmodulin trapping by calcium-calmodulin-dependent protein kinase. *Science* 256: 1199-1202.

Missale, C., Russel, N.S., Robinson, W., Jaber, M., Caron, M.G. 1998. Dopamine Receptors: From Structure to function. *Physiological Reviews* 78 (1): 189-225.

Nelson, D.L. y Cox, M.M. 2000. Lehninger Principios de Bioquímica. 3ª ed. Ed. Omega. España. 1152 pp.

Neve, K.A., Seamans, J.K., Trantham-Davidson, H. 2004. Dopamine Receptor Signaling. *Journal of Receptors and Signal Transduction* 24 (3): 165-205.

Obeso, J.A., Rodríguez-Oroz, M.C., Rodríguez, M., Arbizu, J., Jiménez-Amaya, J.M. 2002. The basal ganglia and disorders of movement: pathophysiological mechanisms. *News Physiol Sci* 17: 51-55.

Obeso, J.A., Lanciego, J.L. 2011. Past, present, and future of the pathophysiological model of the basal ganglia. *Frontiers in Neuroanatomy* 5: 1-6.

Ochoa-Sánchez, N. 2011. Papel de las proteinfosfatasas y las cinasas Cdk-5 y PKA en el control de la liberación de GABA en la sustancia nigra reticulata. Tesis de maestría. CINVESTAV. México. 98 pp.

Parent, A. Hazrati, L. 1995a. Functional anatomy of the basal ganglia. I. The cortico-basal ganglia-thalamo-cortical loop. *Brain Research Reviews* 20: 91-127.

- Parent, A. Hazrati, L. 1995b. Functional anatomy of the basal ganglia. II. The place of subthalamic nucleus and external pallidum in basal ganglia circuitry. *Brain Research Reviews* 20: 128-154.
- Radnikow, G., Misgeld, U. 1998. Dopamine D1 Receptors Facilitate GABA Synaptic Currents in the Rat Substantia Nigra Pars Reticulata. *The Journal of Neuroscience* 18 (6): 2009-2016.
- Recillas-Morales, S., Sánchez-Vega, L., Ochoa-Sánchez, N., Caballero-Florán, I., Paz-Bermúdez, P., Silva, I., Aceves, J., Erlj, D., Florán, B. 2013. L-type Ca²⁺ channel activity determines modulation of GABA release by dopamine in the substantia nigra reticulata and the globus pallidus of the rat. *Neuroscience* 256: 292-301.
- Richtand, N.M. 2006. Behavioral Sensitization, Alternative Splicing, and D3 Dopamine Receptor-Mediated Inhibitory Function. *Neuropsychopharmacology* 31: 2368-2375.
- Richtand, N.M., Liu, Y., Ahlbrand, R., Sullivan, J.R., Hauck, N.A., McNamara, R.K. 2010. Dopaminergic Regulation of Dopamine D3 and D3nf Receptor mRNA Expression. *SYNAPSE* 64: 634-643.
- Sánchez, V. L. 2012. Vías de señalización de los receptores D1 y D4 presinápticos en el control de la liberación de 3H-GABA en la sustancia negra reticulada de la rata. Tesis de maestría. CINVESTAV. México. 72 pp.
- Shioda, N., Takeuchi, Y., Fukunaga, K. 2010. Advanced Research on Dopamine Signaling to Develop Drugs for the Treatment of Mental Disorders: Proteins Interacting With the Third Cytoplasmic Loop of Dopamine D2 and D3 Receptors. *J Pharmacol Sci* 114: 25-31.
- Soderling. T.S. 1999. The Ca²⁺-calmodulin-dependent protein kinase cascade. *TIBS* 232-236.
- Soderling, T.R. 2000. CaM-kinases: modulators of synaptic plasticity. *Current Opinion in Neurobiology* 10: 375-380.
- Surmeier, D.J., Bargas, J., Hemmings, H.C., Nairn, A.C., Greengard, P. 1995. Modulation of Calcium Currents by a D1 Dopaminergic Protein Kinase/Phosphatase Cascade in Rat Neostriatal Neurons. *Neuron* 14: 385-387.
- Surmeier, D.J., Song, W., Zhen, Y. 1996. Coordinated Expression of Dopamine Receptors in Neostriatal Medium Spiny Neurons. *The Journal of Neuroscience* 16 (20): 6579-6591.
- Surmeier, D.J., Carrillo-Reid, L., Bargas, J. 2011. Dopaminergic modulation of striatal neurons, circuits, and assemblies. *Neuroscience* 1:16.

Van Kampen, J.M., Eckman, C.B. 2006. Dopamine D3 Receptor Agonist Delivery to a Model of Parkinson's Disease Restores the Nigrostriatal Pathway and Improves Locomotor Behavior. *The Journal of Neuroscience* 26 (27): 7272-7280.

Vilchis, C., Bargas, J., Ayala, G. X., Galván, E., Galarraga, E. 2000. Ca²⁺ channels that activate Ca²⁺-dependent K⁺ currents in neostriatal neurons. *Neuroscience* 95 (3): 745-752.

Wayman, G.A., Lee, Y., Tokumitsu, H., Silva, A., Soderling, T.R. 2008. Calmodulin-Kinases: Modulators of Neuronal Development and Plasticity. *Neuron* 59: 914-931.

Wayman, G.A., Tokumitsu, H., Davare, M.A., Soderling, T.R. 2011. Analysis of CaM-kinase signaling in cells. *Cell Calcium* 50: 1-8.



Presynaptic CaMKII α modulates dopamine D3 receptor activation in striatonigral terminals of the rat brain in a Ca²⁺ dependent manner

Arturo Avalos-Fuentes^c, Santiago Loya-López^c, Aleida Flores-Pérez^a, Sergio Recillas-Morales^c, Hernán Cortés^d, Francisco Paz-Bermúdez^a, Jorge Aceves^a, David Erlj^b, Benjamín Florán^{a,*}

^a Department of Physiology, Biophysics and Neurosciences, CINVESTAV-IPN, Av. IPN # 2508, San Pedro Zacatenco, 07360 Mexico D.F., Mexico

^b Department of Physiology, SUNY Downstate Medical Center, NY, USA

^c Department of Pharmacology, CINVESTAV-IPN, Mexico

^d Genomic Medicine Laboratory, Department of Genetics, National Rehabilitation Institute, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 25 January 2013

Received in revised form

3 April 2013

Accepted 5 April 2013

Keywords:

CamKII

Substantia nigra

D1 presynaptic receptor

D3 presynaptic receptor

ABSTRACT

CaMKII α is expressed at high density in the nucleus accumbens where it binds to postsynaptic D3 receptors inhibiting their effects. In striatonigral projections, activation of presynaptic D3 receptors potentiates D1 receptor-induced stimulation of cAMP production and GABA release. In this study we examined whether the presynaptic effects of D3 receptor stimulation in the substantia nigra reticulata (SNr) are modulated by Ca²⁺ activation of CaMKII α . In SNr synaptosomes two procedures that increase cytoplasmic Ca²⁺, ionomycin and K⁺-depolarization, blocked the additional stimulation of cAMP accumulation produced by coactivating D3 and D1 dopamine receptors. The selective CaMKII α inhibitor KN-62 reversed the blockade produced by ionomycin and K⁺-depolarization. Incubation in either Ca²⁺-free solutions or with the selective Ca²⁺ blocker nifedipine, also reversed the blocking effects of K⁺-depolarization. Immunoblot studies showed that K⁺-depolarization increased CaMKII α phosphorylation in a KN-62 sensitive manner and promoted CaMKII α binding to D3 receptors. In K⁺-depolarized tissues, D3 receptors potentiated D1 receptor-induced stimulation of [³H]GABA release only when CaMKII α was blocked with KN-62. In the presence of this inhibitor, the selective D3 agonist PD 128,907 reduced the ED₅₀ for the D1 agonist SKF 38393 from 56 to 4 nM. KN-62 also enhanced the effects of dopamine on depolarization induced [³H]GABA release. KN-62 changed ED₅₀ for dopamine from 584 to 56 nM. KN-62 did not affect D1 and D4 receptor responses. These experiments show that in striatonigral projections, CaMKII α inhibits the action of D3 receptors in a Ca²⁺ dependent manner blocking their modulatory effects on GABA release. These findings suggest a mechanism through which the frequency of action potential discharge in presynaptic terminals regulates dopamine effects.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Dopamine modifies neuronal function by interacting with two classes of G protein-coupled receptor families, the D1 family (that includes D1 and D5 receptors) typically coupled to G_s proteins and the D2 family (D2, D3, and D4 receptors) typically couple to G_i proteins (Neve et al., 2004). The rat D3 receptor (D3R) messenger translates a 446 amino acid protein that has 52% homology with the rat D2 receptor; 75% of the homology is in the transmembrane-spanning domains. D3Rs are preferentially expressed in the mesolimbic dopaminergic projection areas, including the nucleus accumbens (NAc) (Sokoloff et al., 1990; Bouthenet et al., 1991). In

the nucleus accumbens D3Rs behave as typical D2 family receptors, i.e., they are coupled with G_i proteins inhibiting adenylyl cyclase (Schwartz et al., 1998). Recently it has been shown that D3R function in the NAc is markedly regulated by Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II α (CaMKII α). In this structure CaMKII α binds to D3Rs in a Ca²⁺-sensitive manner, phosphorylating the receptor and inhibiting its function (Liu et al., 2009).

D3Rs are also active in striatonigral nerve endings where they modulate GABA release (Cruz-Trujillo et al., 2013). In these structures the D3R signaling pathway is “atypical”. Instead of acting through coupling to G_i proteins; D3Rs enhance D1R-stimulated cAMP production and GABA release (Cruz-Trujillo et al., 2013). Since CaMKII α is an abundant enzyme in the brain, especially at synaptic sites (Kelly et al., 1984), we examined whether it also modulates D3Rs signaling localized in presynaptic endings where it is mediated by an “atypical” pathway.

* Corresponding author. Tel.: +52 55 5747 3800x5137; fax: +52 55 7473754.

E-mail addresses: bfloran@fisio.cinvestav.mx, bfloran@live.com.mx (B. Florán).

CaMKII α activity depends on the level of cytoplasmic Ca²⁺ (Lisman et al., 2002). As cytoplasmic Ca²⁺ increases, the enzyme is removed from its autoinhibitory state and becomes activated by the binding of Ca²⁺ and calmodulin (CaM). Activated CaMKII α phosphorylates its substrates as well as an autophosphorylation site within its autoregulatory domain. The autophosphorylation results in a Ca²⁺/CaM-independent kinase activity even after the initial Ca²⁺ stimulus subsides (Hudmon and Schulman, 2002; Colbran and Brown, 2004; Griffith, 2004).

In this study we evaluated whether procedures that markedly enhance cytoplasmic Ca²⁺ modify the effects of activating D3Rs in the striatal projections to the SNr via a CaMKII α -mediated process. We concentrated, mostly, on the effects of K⁺-induced depolarization because this procedure triggers Ca²⁺-dependent transmitter release that is akin to the naturally occurring process (Bernath, 1992). Furthermore, K⁺ depolarization of neuronal cultures leads to CaMKII α accumulation near active zones (AZs) (Tao-Cheng et al., 2006).

Regulation of dopaminergic receptors at presynaptic endings by CaMKII α is very likely of functional relevance since neural activity modifies presynaptic CaMKII α activity (see Shakiryanova et al., 2011). An account of our results has already been published in preliminary form (Arturo et al., 2010).

2. Methods

2.1. Animals

Male Wistar rats (180–200 g) housed together (five per cage) with water and food available ad libitum and kept under a natural light cycle were used throughout. All the procedures were carried out in accordance with the National Institutes of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals and were approved by the Institutional Animal Care Committee of the CINVESTAV.

2.2. Depletion of endogenous dopamine by reserpine

As indicated in the legends in most experiments rats were pretreated with reserpine (10 mg kg⁻¹, i.p.) 18 h before preparation of slices. Control animals were treated with the same volume (1 ml kg⁻¹) of vehicle (7% w/v lactic acid). This treatment causes more than 92% fall in dopamine content in the substantia nigra (Nava-Asbell et al., 2007).

2.3. Preparation of brain slices

After rapid sacrifice of the rat, the brain was immersed in oxygenated ice-cold artificial cerebrospinal fluid (ACSF) solution, and coronal brain slices (300 μ m thick) were obtained with a vibratome. The substantia nigra pars reticulata was microdissected under a stereoscopic microscope. The nucleus was identified according to the atlas of Paxinos and Watson (1997).

2.4. cAMP accumulation assay

cAMP accumulation assays were performed as previously described (Alexander, 1995; Rangel-Barajas et al., 2011). Synaptosomal fractions were isolated from SNr slices. The slices were homogenized in buffer (sucrose, 0.32 M; HEPES, 0.005 M, pH 7.4), and then homogenates were centrifuged at 800 \times g for 10 min. The resulting supernatant was further centrifuged at 20,000 \times g for 20 min. From this second centrifugation, the supernatant (S1) was discarded, and the pellet resuspended in a sucrose solution (composition: sucrose 0.8 M, HEPES 0.005 M, buffer, pH 7.4) and was newly centrifuged at 20,000 \times g for 20 min. Finally, the supernatant was discarded, and the new pellet containing synaptosomes was used. The pellet was suspended in Krebs–Henseleit buffer (composition: NaCl, 127; KCl, 1.75; MgSO₄, 1.18; KH₂PO₄, 1.25; CaCl₂, 1.8; HEPES, 20; glucose, 11; and 3-isobutyl-1-methylxanthine, 1; all in mM) and then was incubated with [³H]-adenine (130 nM) during 1 h at 37 °C. Aliquots of 10 μ l of drug containing solution were added to 250 μ l of the synaptosome samples. Incubation was continued for 10 min and stopped by adding 100 μ l of ice-cold trichloroacetic acid (15%) containing unlabeled ATP (2.5 mM) and cAMP (4.5 mM). After a period of 20 min on ice, the tubes were centrifuged (4000 rpm, 5 min, at 4 °C) and the supernatants loaded onto Dowex 50W-X4 columns (300 μ l per column). A fraction, containing [³H]-ATP, was eluted with 3 ml of distilled water. A second eluent, obtained with 5 ml of distilled water, was directly loaded onto neutral alumina columns. Alumina columns were finally eluted with 4 ml of 50 mM Tris–HCl buffer pH 7.4 to obtain [³H]-cAMP. Radioactivity was

determined by scintillation counting. The results were expressed as [³H]-cAMP \times 100/[³H]-cAMP + [³H]-ATP and were normalized to basal accumulation.

2.5. Protein preparation, immunoprecipitation, and western blot

The synaptosomal fraction was incubated with RIPA buffer (sodium orthovanadate 1 mM, sodium pyrophosphate 10 mM, sodium fluoride 100 mM, glycerol 10%, triton X-100, 1%, Tris–HCl 50 mM, NaCl 150 mM, MgCl₂ 1.5 mM, EGTA 1 mM, SDS 0.1% and sodium deoxycholate 1%) and a complete set of protease inhibitors (Roche Applied Science, México) for 15 min. To obtain the membranes, the synaptosomes were sonicated and protein was quantified by the Bradford method. A sample of 500 μ g of protein was incubated with antibody to phosphorylated CaMKII α (1:250) or antibody to D3Rs (1:250) for 6 h and then added to A-agarose beads (Roche Applied Science, México) for the next 12 h. Then samples were washed by centrifugation 3 times (10,000 rpm) for 5 min with 500 μ l of RIPA buffer. The resultant pellet of the third centrifugation was resuspended in sample buffer (Glycerol 50%, Tris–HCl 125 mM, SDS 4% Bromophenol blue 0.08%, β -mercaptoethanol 5%) and heated at 100 °C for 10 min.

To detect CaMKII α , phosphorylated CaMKII α and D3R the samples were resolved by SDS–PAGE, transferred onto PVDF membranes, and blotted for 1 h at room temperature in Tris buffered saline containing 0.2% Tween 20 and 5% nonfat powdered milk. Membranes were incubated overnight at 4 °C with either antibodies to CaMKII α (1:1000), phosphorylated CaMKII α antibody (1:2000 dilution) or D3Rs (1:2000 dilution). CaMKII α and phosphorylated CaMKII α monoclonal antibodies were obtained from Abcam C.O. Polyclonal antibodies for D3R were obtained from Santa Cruz Biotechnology Inc. The specificity of these antibodies has been reported by Fiorentini et al. (2008) and Everett and Senogles (2010). Detection of antibodies was performed by chemiluminescence (ECL-Plus Amersham) with HRP-conjugated secondary antibodies (1:5000 dilution for antibodies to CaMKII α and phosphorylated CaMKII α and 1:3000 for D3Rs).

2.6. Release studies

Once microdissected, the slices were incubated for 30 min at 37 °C in ACSF (composition in mM: NaCl 118.25, KCl 1.75, MgSO₄ 1, KH₂PO₄ 1.25, NaHCO₃ 25, CaCl₂ 2, and D-glucose 10) and gassed continuously with O₂/CO₂ (95:5, v/v). The tissues were then incubated for 30 min with 8 nM [³H]GABA in a 2 ml solution containing 10 μ M aminooxyacetic acid (to inhibit GABA transaminase, thus preventing degradation of the labeled GABA). At the end of this period, excess radiolabel was removed by washing twice with ACSF containing aminooxyacetic acid (10 μ M) and nipecotic acid (10 μ M) to prevent the reuptake of released [³H]GABA. Both compounds were present in the perfusion solution for the rest of the experiment.

Methods for measuring [³H]GABA release and data analysis used in the present work were the same as those described previously (Nava-Asbell et al., 2007). The slices were apportioned randomly between the chambers (usually four slices per chamber) of a superfusion system (volume of each chamber 80 μ l; 20 chambers in parallel) and perfused with the ACSF at a flow rate of 0.5 ml/min for 1 h. Basal release of [³H]GABA was measured by collecting 4 fractions of the superfusate (total volume 2 ml) before depolarizing the slices with a solution in which [K⁺] was raised to 15 mM. The composition of the high K⁺ solution was (mM): NaCl 106.25, KCl 13.75, MgSO₄ 1, KH₂PO₄ 1.25, NaHCO₃ 25, CaCl₂ 2 and D-glucose 10. Six more fractions were collected in the high K⁺ medium. To explore effects on basal release all drugs were added to the medium at fraction 2, that is before changing the superfusion to the high K⁺ medium. To determine the total amount of tritium remaining in the tissue, the slices were collected, treated with 1 ml of 1 M HCl and allowed to stand for 1 h before adding scintillator. [³H]GABA release was expressed initially as a fraction of the total amount of tritium remaining in the tissue. The effect of drugs on the basal release of [³H]GABA was assessed by comparing the fractional release in fraction 2 (immediately before exposure of the tissue to the drug) and fraction four (immediately prior to exposure to 15 mM of K⁺), using a paired *t*-test.

Changes in depolarization-induced [³H]GABA release by drugs and treatments, were assessed by comparing the area under the appropriate release curves between the first (fraction 5) and last fraction collected (fraction 10) after the change to high K⁺, making the assumption that the basal release of [³H]GABA remained unchanged at the level measured in the fraction immediately preceding K⁺ stimulation. In a previous paper (García et al., 1997) we found that when release was determined in fraction ten without any treatments it was 98 \pm 2% of that in fraction 4, indicating a minimal change in basal release.

2.7. Drugs

All drugs were obtained from Sigma (St. Louis, MO, USA): 4'-Acetyl-N-[4-[4-(2-methoxyphenyl)-1-piperazinyl]butyl]-[1,1'-biphenyl]-4-carboxamide (GR 103691), 2-Amino-7-(2-furanyl)-7,8-dihydro-5(6H)-quinazolinone (NKY80), N-[2-(p-Bromocinnamylamino)ethyl]-5-isoquinolinesulfonamide dihydrochloride (H89), R(-)-7-Chloro-8-hydroxy-3-methyl-1-phenyl-2,3,4, 5-tetrahydro-1H-3-benzazepine hydrochloride (SCH 23390), (3)-[4-(4-chlorophenyl)piperazin-1-yl]methyl]-1H-pyrrolo[2,3-b]pyridine hydrochloride (L-745,870), dopamine hydrochloride, ionomycin calcium salt, (S)-5-Isoquinolinesulfonic acid 4-[2-[(5-isoquinoliny)sulfonyl]

methylamino]-3-oxo-3-(4-phenyl-1-piperazinyl)propyl]phenyl ester, 1-[N,O-bis(5-Isoquinolinesulfonyl)-N-methyl-L-tyrosyl]-4-phenylpiperazine (KN-62), nifedipine, (RS)-2,3,4,5-tetrahydro-7,8-dihydroxy-1-phenyl-1H-3-epine hydrochloride (SKF 38393), (+)-(4aR,10bR)-3,4,4a,10b-Tetrahydro-4-propyl-2H,5H-[1]benzopyrano[4,3-b]-1,4-oxazin-9-ol hydrochloride (PD 128,907). The drugs were stored in a freezer as dry aliquots. Stock solutions were prepared just before each experiment and added to the perfusion solution at the final concentrations indicated below.

2.8. Statistics

All data were analyzed using Graph Pad Software, San Diego CA, USA. Except where indicated, one-way ANOVA combined with Tukey's test was used to compare differences between experimental groups. In the experiments on cAMP production, Dunnett's test was used to compare the effects of treatments with control data. Differences in densitometry of Western-blot were analyzed using One-Way ANOVA with Dunnett's posthoc or the single *t*-test. Concentration–response data were fitted by non-linear regression to obtain an unbiased estimate of ED₅₀ values and confidence interval using the same software.

3. Results

3.1. Increased cytoplasmic Ca²⁺ inhibits the potentiating effects of D3 receptor activation on D1 mediated cAMP production

Coactivation of D1Rs and D3Rs stimulate cAMP production and GABA release in SNr (Cruz-Trujillo et al., 2013). The effects of two treatments, ionomycin and K⁺-depolarization, that increase cytoplasmic Ca²⁺ in synaptosomes (Nachshen, 1985; Verhage et al., 1988, 1989) on the cAMP response are illustrated in Fig. 1A and B. D1R stimulation with the selective agonist SKF 38393 (1 μM) increased cAMP production (to 126.3 ± 0.3% in Fig. 1A and to 125.7 ± 1.20% in Fig. 1B, over the control; *p* < 0.001 for both groups. *F* = 145.8 in Fig. 1A and *F* = 242.6 in Fig. 1B; ANOVA followed by Dunnett's; *df* = 4; *n* = 3 experiments, 4 replicates per experiment). Concurrent D1R + D3R stimulation (by incubating also with the D3 agonist PD 128,907, 100 nM) further stimulated cAMP accumulation (to 150.0 ± 1.1% in Fig. 1A and to 147.3 ± 1.85% in Fig. 1B; *p* < 0.001 when compared with either control or SKF 38393 treated). When 50 nM ionomycin (Fig. 1A) and K⁺-depolarization (Fig. 1B) were tested, both reduced the effects of D1R + D3R stimulation to a value not significantly different from that observed when D1Rs were stimulated alone (Fig. 1A. SKF 38393 alone 126.3 ± 0.3%, vs. SKF + PD 128,907 + ionomycin 125.7 ± 2.96%. Fig. 1B. SKF 38393 alone 125.7 ± 1.20%, vs. SKF + PD 128,907 + KCl 125.0 ± 1.53%). PD 128,907 was without significant effects of its own on cAMP accumulation (101.0 ± 2.1%, *F* = 0.687, ANOVA followed by Dunnett's; *df* = 3; *n* = 3 experiments, 4 replicates, not illustrated).

In the same group of experiments, the CaMKIIα inhibitor KN-62 (4 μM), which acts by preventing calmodulin (CaM) binding to the enzyme (Tokumitsu et al., 1990; Huang and Hsu, 2012) reversed the blocking effects of both ionomycin and K⁺-depolarization (Fig. 1A: SKF 38393 + PD 128,907 + ionomycin + KN-62, 152.3 ± 2.33% vs. SKF 38393 + PD 128,907, 150 ± 1.15%. Fig. 1B: SKF 38393 + PD 128,907 + KCl + KN-62, 147.7 ± 0.88% vs. SKF 38393 + PD 128,907, 147.3 ± 1.86; both differences were not significant, *ns.*). In other experiments (not illustrated) we found that KN-62 of its own didn't modify cAMP production (100.7 ± 2.33%, *F* = 17.44; *ns.*, ANOVA followed by Dunnett's; *df* = 3; *n* = 3 experiments 4 replicates). KN-62 also didn't significantly affect the increase produced by SKF 38393 of its own (SKF 38393 alone, 125 ± 3, 29%, SKF 38393 + KN-62, 123.7%, *F* = 17.44, *ns.*, *df* = 3; *n* = 3 experiments, 4 replicates) nor the lack of effects of PD 128,907 given alone (PD 128,907 alone 101 ± 2.08%, PD 128,907 + KN-62 104.7 ± 3.75%, *F* = 0.689; *ns.*, *df* = 3; *n* = 3 experiments 4 replicates).

We next determined whether the inhibitory effects of K⁺ depolarization are Ca²⁺-dependent (Fig. 1C and D). Two procedures that interfere with [Ca²⁺] increases in the cytoplasm were used: a) Incubation in low Ca²⁺ solutions that prevent the depolarization-

induced stimulation of [³H]GABA release (Nava-Asbell et al., 2007). b) Incubation with nifedipine (10 μM), a selective antagonist of L-type Ca²⁺ channels that prevents CaMKIIα activation in NAc (Liu et al., 2009). In these experiments SKF 38393 given together with PD 128,907 also enhanced cAMP accumulation. Both nifedipine and Ca²⁺-free solutions prevented the depression of the D1R + D3R response caused by K⁺ depolarization (SKF 38393 + PD 128,907 + KCl + Ca²⁺-free, 160.7 ± 2.96% vs. SKF 38393 + PD 128,907, 157.3 ± 2.40%, *F* = 189.7; *ns.*, *df* = 4; *n* = 3 experiments 4 replicates. SKF 38393 + PD 128,907 + KCl + Nifedipine, 149.3 ± 5.24 vs. SKF 38393 + PD 128,907, 152.3 ± 2.96; *F* = 69.94; *ns.*, *df* = 4; *n* = 3 experiments, 4 replicates).

3.2. Depolarization enhances CaMKIIα phosphorylation and CaMKIIα binding to the D3 receptor

Increases of cytoplasmic Ca²⁺ stimulate binding of Ca²⁺/CaM to the regulatory domain of CaMKIIα leading to phosphorylation of the enzyme. This interaction increases phosphorylation of both substrates and also of an autophosphorylation site within the autoregulatory domain of the enzyme (Griffith, 2004). Fig. 2A shows that K⁺-depolarization of synaptosomes for 10 min with 15 mM K⁺ markedly increased CaMKIIα phosphorylation (relative O.D. 1.59 ± 0.08, *p* < 0.001 compared with respect control, ANOVA followed by Dunnett's, *F* = 54.85; *n* = 3 experiments). This increase was prevented when the CaMKIIα inhibitor KN-62 was present in the incubation solution (relative O.D. 0.97 ± 0.16, *ns.* compared with control ANOVA followed by Dunnett's, *F* = 54.85; *n* = 3 experiments). Fig. 2A also shows that KN-62 did not modify significantly basal CaMKIIα phosphorylation suggesting a low level of constitutive CaMKIIα activity (relative O.D. 0.98 ± 0.08 *ns.* when compared to control, ANOVA followed by Dunnett's, *F* = 54.85; *n* = 3 experiments).

In the nucleus accumbens Ca²⁺ enhances the binding of CaMKIIα to D3Rs thus regulating receptor function (Liu et al., 2009). We determined whether K⁺-depolarization in SNr affects the capacity of CaMKIIα to bind to D3Rs. Fig. 2B shows that CaMKIIα binding to D3Rs was increased when K⁺ was elevated (relative O.D. D3-CaMKIIα = 1.34 ± 0.04, *p* < 0.01 when compared to control, *t*-test; *n* = 3 experiments; relative O.D. CaMKIIα-D3 = 1.31 ± 0.01, *p* < 0.001 when compared to control, *t*-test; *n* = 3 experiments).

3.3. Blockade of CaMKIIα is required for modulation of K⁺ depolarization-induced [³H]-GABA release by dopamine D3 receptors

The results of the previous sections indicate that K⁺-depolarization activates CaMKIIα and that the activated enzyme interferes with D3R enhancement of D1R-stimulated adenylyl cyclase activity. Since the cAMP/PKA signaling cascade is the major signaling pathway modulating GABA release in striatonigral GABAergic terminals (Nava-Asbell et al., 2007), we examined whether CaMKIIα also interferes with D3 effects on depolarization-induced [³H]-GABA release.

Fig. 3A shows that the D1-stimulation of GABA release in K⁺ depolarized slices was not further enhanced when the D3 agonist PD 128,907 was also added to the perfusion solution (relative area SKF 38393 = 6.72 ± 0.54 vs. SKF 38393 + PD 128,907 = 6.32 ± 0.18, *F* = 15.07; *df* = 3; *ns.*, *n* = 3 experiments, 5 replicates).

To test whether the lack of effects of PD 128,907 was due to inhibition of D3R effects by CaMKIIα we performed similar experiments in the presence of the CaMKIIα inhibitor KN-62 (Fig. 3B). When CaMKIIα was blocked, PD 128,907 increased the SKF 38393 stimulated release in K⁺ depolarized slices (relative area SKF 38393 + KN-62 = 7.27 ± 0.40 vs. SKF 38393 + PD 128,907 + KN-

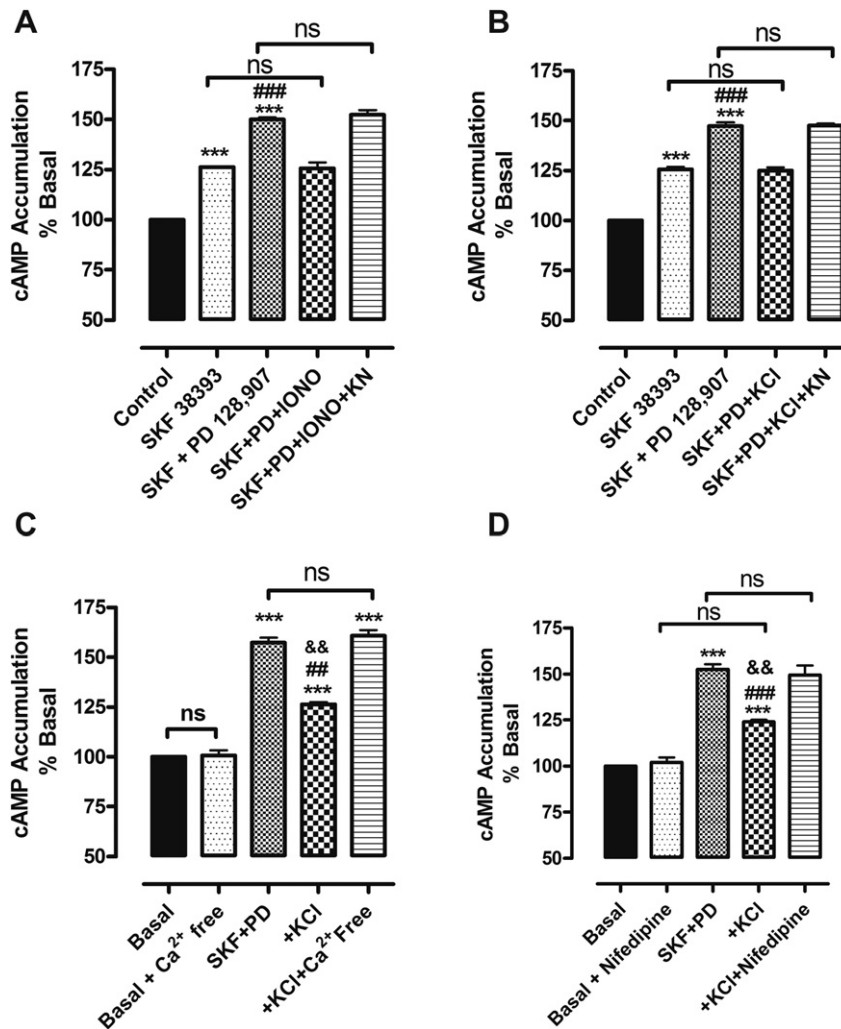


Fig. 1. A and B. Ionomycin and elevated K^+ block the potentiation of D1R stimulated cAMP accumulation produced by the D3R activation in a KN-62 dependent manner. A. Effects of D1 selective agonist SKF 38393 (1 μ M) administered alone and with D3 agonist PD 128,907 (100 nM), together with ionomycin (50 nM) and ionomycin plus KN-62 (4 μ M) on cAMP accumulation (** p < 0.001 compared with control, *** p < 0.001 compared with SKF 38393 alone; ns. not significant). B. Effects of D1 receptor selective agonist SKF 38393 (1 μ M) on cAMP accumulation administered alone and with D3 agonist PD 128,907 (100 nM) incubated together in high K^+ (15 mM) solution and high K^+ plus KN-62 (4 μ M) (** p < 0.001 compared with control, *** p < 0.001 compared with SKF 38393 alone; ns. not significant). C and D. Effects of Ca^{2+} -free solution and nifedipine (10 μ M) on the inhibitory effects of high K^+ solution on D3 receptor potentiation of D1 induced cAMP accumulation. *** p < 0.001 compared with control, *** p < 0.001 and ** p < 0.01 compared with SKF + PD, && p < 0.01 compared with +KCl + Ca^{2+} -free or +KCl + nifedipine, ns. not significant. Values mean \pm standard error, n = 3 experiments, 4 replicates per experiment. Samples obtained from reserpinized animals.

62 = 2.19 ± 0.93 , $F = 45.33$; $p < 0.001$; $df = 4$; $n = 3$ experiments, 4 replicates). PD 128,907 had no effects of its own or in the presence of KN-62 (relative area PD 128,907 = 4.43 ± 0.29 vs. PD 128,907 + KN-62 = 4.16 ± 0.83 , $F = 15.07$; ns., $df = 3$; $n = 3$ experiments 4 replicates). KN-62 also did not modify the stimulation caused by SKF 38393 administered alone (SKF 38393 alone = 6.72 ± 0.54 vs. SKF 38393 + KN-62 = 7.27 ± 0.40 , $F = 45.33$; ns., $df = 3$; $n = 3$ experiments, 4 replicates). In the presence of KN-62 the selective D3R antagonist GR 103691 (100 nM) reduced the effects produced by concurrent administration of SKF 38393 + PD 128,907 to the level observed when SKF 38393 was administered alone (Fig. 3C, relative area SKF 38393 alone = 7.40 ± 0.47 vs. SKF 38393 + PD 128,907 + GR 103691 = 6.95 ± 0.35 , $F = 53.24$; ns., $df = 4$; $n = 3$ experiments 4 replicates per experiment) while in the absence of KN-62 administration of GR 103691 did not modify the effects of administering SKF 38393 + PD 128,907 (relative area SKF 38393 + PD 128,907 = 7.60 ± 0.62 vs. SKF 38393 + PD 128,907 + GR 103691 = 7.47 ± 0.33 , $F = 9.14$; ns., $df = 4$; $n = 3$

experiments, 4 replicates, not shown in graphs). The D1R antagonist SCH 23390 (10 nM) completely eliminated the response produced by the coadministration of SKF 38393 + PD 128,907 (relative area, control = 4.07 ± 0.45 vs. SKF 38393 + PD 128,907 + SCH 23390 + KN-62 = 4.14 ± 0.5 , $F = 53.24$; ns., $df = 4$; $n = 3$ experiments, 4 replicates).

Fig. 3D and E illustrates the time course of the experiments from which the average values shown in Fig. 3A and B were derived. Vertical arrow indicates time when drug perfusion was initiated; horizontal bar indicates perfusion with 15 mM K^+ solution.

Fig. 4A illustrates the dependence of [3 H]-GABA release on the concentration of selective agonist SKF 38393 in the presence and absence of D3R activation by PD 128,907. ED_{50} for SKF 38393 was decreased by PD 128,907 (ED_{50} for SKF 38393 alone 56.04, $CI = 158-19$ nM; for SKF 38393 in presence of PD 128,907 4.0, $CI = 8.89-1.65$ nM). Fig. 4B shows the effects of dopamine in the presence and absence of KN-62. Experiments for dopamine were done in the presence of L 745,870 to prevent the activation of D4

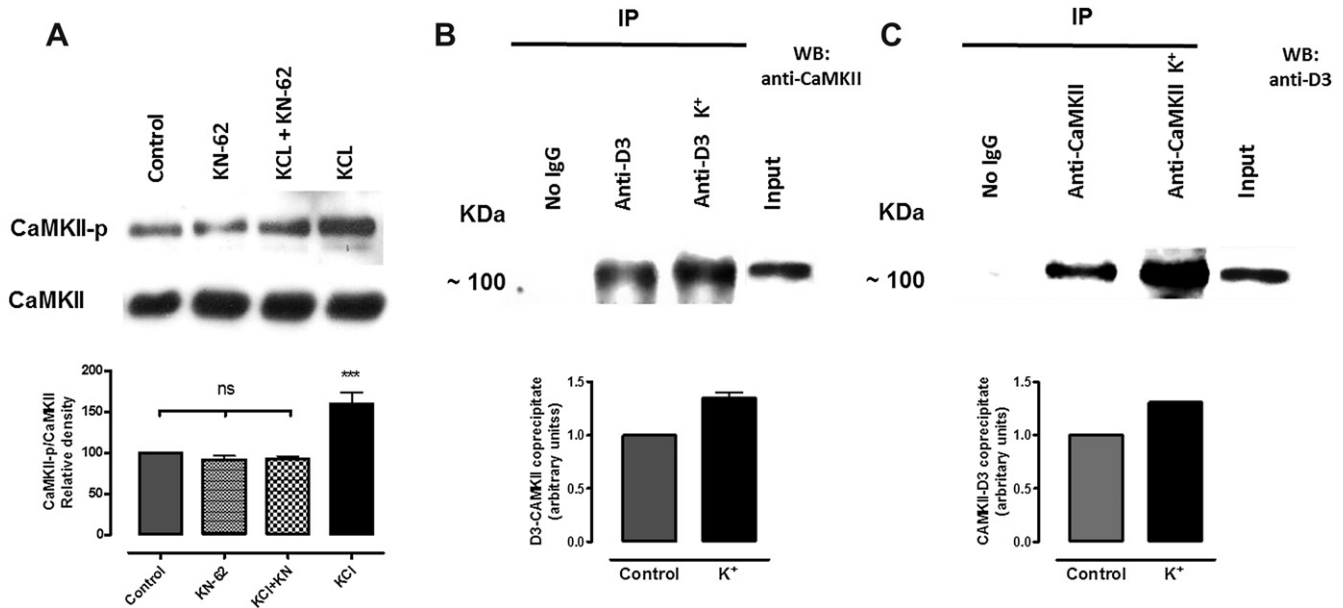


Fig. 2. A. Incubation in elevated K^+ solutions increases CaMKII α phosphorylation by. A. Representative images of immunoblots using antibodies to phosphorylated CaMKII α and CaMKII α from synaptosomes incubated for 10 min in different conditions: KN-62 (4 μ M) alone, KN-62 in a high K^+ (15 mM) solution and high K^+ solution alone. Lower graph: quantitative analyses of phosphorylated CaMKII α and CaMKII α ($***p < 0.001$, compared with control, ns. not significant). B and C. K^+ increases D3R binding to CaMKII α . B. Coimmunoprecipitation of CaMKII α and D3R in SNr synaptosomes: K^+ increases D3R binding to CaMKII α . Representative coIP of D3R by the antibody to phosphorylated CaMKII α . B (Left), Lane 1 was run in the absence of the precipitating antibody, control (lane 2) and high K^+ (15 mM) solutions (lane 3). B (Right), representative coIP of phosphorylated CaMKII α by the antibody to D3 in control (lane 2) and high K^+ (15 mM) solutions (lane 3). Lane 1 was run in the absence of the precipitating antibody. Lower graph: quantitative analyses of coIP experiments ($***p < 0.001$, compared with control). 500 μ g of proteins were used in each IP. Samples obtained from reserpinized animals.

receptors (Acosta-Garcia et al., 2009). The ED_{50} for dopamine was reduced from 584 nM (CI = 8156–205 nM) to 56 nM (CI = 105–28) by blocking CaMKII α with KN-62. The ED_{50} of PD 128,907 was not significantly changed by increasing SKF 38393 from 75 nM to 1 μ M (from 98 nM CI = 385–25 nM, to 71 nM CI = 412–4 nM) (Fig. 4C).

3.4. Stimulation of GABA release by D3 receptors and the cAMP/PKA signaling cascade

D3R stimulation of GABA release requires coactivation with D1Rs. These receptors in turn act by activating the cAMP/PKA cascade in the SNr (Nava-Asbell et al., 2007). To test whether activation of the cAMP/PKA cascade is sufficient to support the D3R potentiating effects we determined the effects of coactivating slices with PD 128,907 (100 nM) and forskolin (10 μ M) on [3 H]-GABA release (Fig. 5A). Forskolin had its typical stimulatory effects (Rangel-Barajas et al., 2008); however, coadministration with PD 128,907 either in the presence or absence of KN-62 was without any additional stimulatory effects (relative area forskolin + KN-62 = 6.50 ± 0.24 vs. forskolin + PD 128,907 + KN-62 = 6.42 ± 0.47 , $F = 22.17$; ns., $df = 4$; $n = 3$ experiments 4 replicates per experiment).

When signaling through the cAMP/PKA cascade was interrupted by using either the adenylyl cyclase blocker NKY80 (10 μ M, Onda et al., 2001) or the PKA blocker H89 (10 μ M, Chijiwa et al., 1990), the effects of both SKF 38393 and PD 128,907 were blocked (Fig. 5B, SKF 38393 + PD 128,907 + KN-62 = 10.12 ± 0.43 vs. SKF 38393 + PD 128,907 + KN-62 + NKY80 = 3.32 ± 0.49 , $F = 53.03$; $p < 0.001$; $df = 4$; $n = 3$ experiments 4 replicates. Fig. 5C, SKF 38393 + PD 128,907 + KN-62 = 11.36 ± 1.05 vs. SKF 38393 + PD 128,907 + KN-62 + H89 = 3.90 ± 0.18 , $F = 33.66$; $p < 0.001$; $df = 4$; $n = 4$ experiments 4 replicates). The slices treated with NKY80 or

H89 alone, GABA release was not significantly different from control.

3.5. KN-62 stimulates [3 H]-GABA release modulated by endogenous dopamine

Dendrites projecting from neurons in the substantia nigra pars compacta (SNc) provide dense dopaminergic innervation to the SNr (Wassef et al., 1981). In the depolarized slice, all the dopamine receptors are activated by release of dopamine from these structures modifying GABA release (Acosta-Garcia et al., 2009). The use of inhibitors in slices obtained from non-reserpinized animals reveals the presence of the modulatory processes activated by endogenous dopamine (Aceves et al., 1995; Radnikow and Misgeld, 1998; Ibanez-Sandoval et al., 2006; Acosta-Garcia et al., 2009; Aceves et al., 2011). In the non-reserpinized preparation perfusion with KN-62 enhanced K^+ -depolarization induced [3 H]-GABA release, indicating the presence of a CaMKII α sensitive component of GABA release (control = 3.36 ± 0.020 vs. KN-62 = 4.75 ± 0.21 , $F = 30.62$; $p < 0.05$; $df = 3$; $n = 4$ experiments four replicates, Fig. 6A). The selective D4 antagonist L 745,870 (100 nM) alone enhanced [3 H]-GABA release (control = 3.36 ± 0.020 vs. L 745,870 = 5.28 ± 0.018 , $F = 30.62$; $p < 0.01$; $df = 3$; $n = 4$ experiments four replicates). In the presence of the selective D4 antagonist L 745,870, the KN-62 stimulated component of [3 H]-GABA release was clearly evident (L 745,870 = 5.28 ± 0.18 vs. L 745,870 + KN-62 = 7.83 ± 0.75 , $F = 30.62$; $p < 0.001$; $df = 3$; $n = 4$ experiments, four replicates, Fig. 6A).

The selective D3R antagonist GR 103691 (100 nM) (Fig. 6B) blocked the KN-62 stimulated component in both control and L 745,870 treated tissues (control = 4.34 ± 0.21 vs. GR 103691 + KN-62 = 4.03 ± 0.27 , $F = 38.17$; $p < 0.05$; $df = 4$; $n = 3$ experiments, four replicates). The selective D1 antagonist SCH 23390 (100 nM)

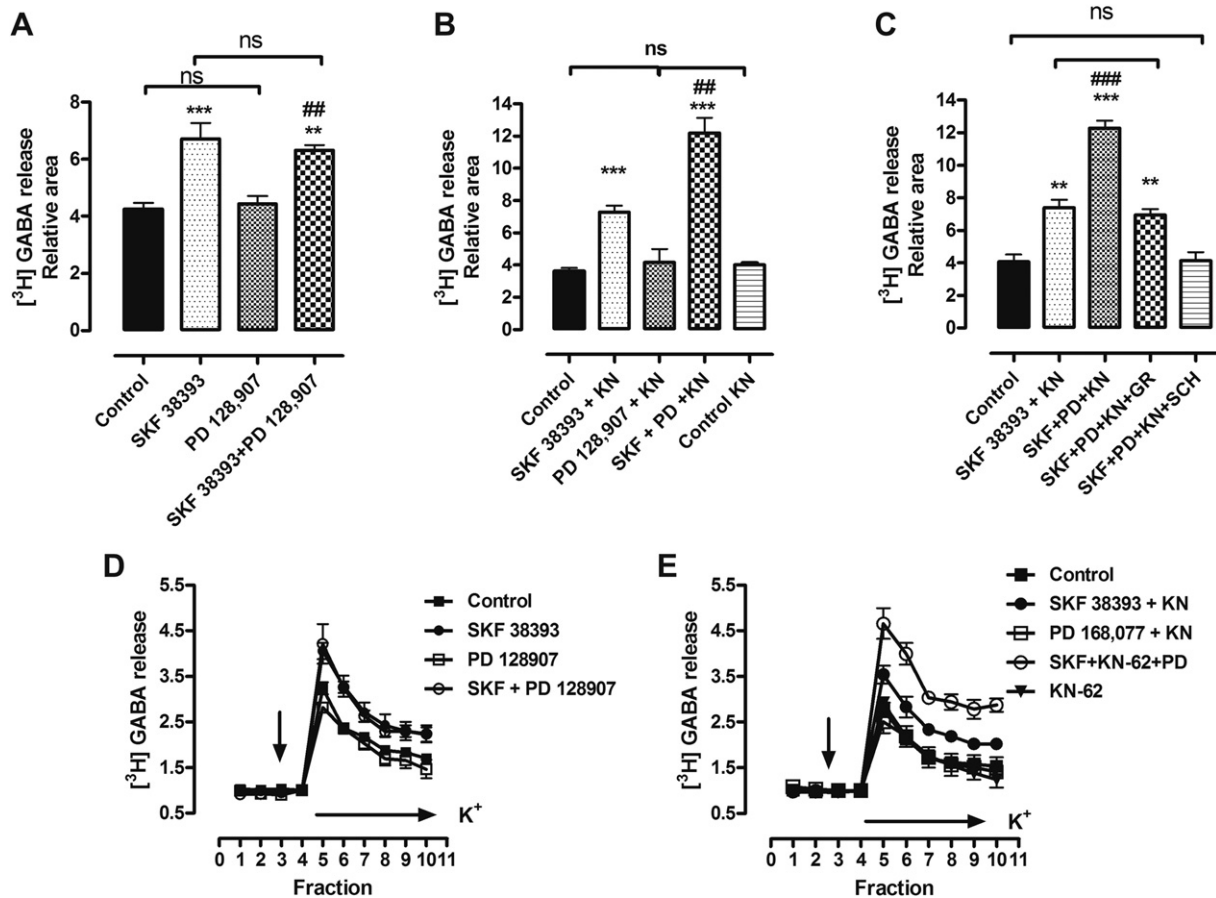


Fig. 3. A, B. Addition of D3R agonist does not potentiate the effect of D1R activation on K^+ -stimulated [3H]GABA release (A) unless the tissues are incubated with CaMKII α inhibitor KN-62 (B). C. When the two agonists were administered together with the D3 selective blocker GR 103691 (100 nM) the stimulation caused by PD 128,907 (100 nM) was blocked. The D1 blocker SCH 23390 blocked all the stimulatory response. D and E show the time courses of the responses of A and B. Vertical arrow indicates time when ligand perfusion was initiated; horizontal bar indicates initiation of perfusion with 15 mM K^+ solution. Significance of comparison of relative area of [3H]GABA release between control and treated tissues was expressed in all experiments as: ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Comparison of SKF + PD + KN-62 vs. SKF 38393 + KN-62, ### $p < 0.001$, ## $p < 0.01$. Comparison of SKF + PD + KN vs. PD 128,907 + KN, ns, not significant. Values: mean \pm standard error of the relative areas from [3H]GABA release, $n = 4-5$ experiments, 4–5 replicates per experiment. Samples obtained from reserpinized animals.

reduced K^+ -depolarization induced [3H]GABA release (Fig. 6C) (control, = 3.97 ± 0.02 vs. SCH 23390 = 2.17 ± 0.09 , $F = 52.16$; $p < 0.05$; $df = 4$; $n = 3$ experiments 4 replicates). SCH 23390 also prevented the increase produced by KN-62 (Fig. 6C) showing that an active D1 receptor is required for this stimulatory response (SCH 23390 = 2.17 ± 0.08 vs. SCH 23390 + KN-62 = 2.27 ± 0.10 , $F = 52.16$; ns., $df = 4$; $n = 3$ experiments four replicates).

4. Discussion

4.1. CaMKII α modulates D3R receptor function in striatonigral terminals

These experiments establish that CaMKII α modulates D3R function in the SNr. In this structure D3R activation potentiates the stimulation of GABA release and cAMP accumulation produced by stimulation of D1Rs (Cruz-Trujillo et al., 2013). Two procedures, ionomycin and K^+ depolarization, that increase cytoplasmic [Ca^{2+}] blocked D3R mediated stimulation of adenylyl cyclase. The selective CaMKII α inhibitor KN-62 reversed these blocking effects indicating that CaMKII α activation mediates this response. In further agreement with this conclusion we found that the depolarization effects are Ca^{2+} -dependent: they were reversed by both Ca^{2+} -free solutions and nifedipine (Fig. 1). Moreover, we showed that K^+

depolarization increases both CaMKII α phosphorylation in a KN-62-sensitive manner and binding of CaMKII α to D3 receptors (Fig. 2).

Activation of D3R was without effects on [3H]GABA release in K^+ depolarized slices unless binding of D3R to CaMKII α was prevented with KN-62 (Fig. 3), implying that activated CaMKII α blocks the effects of D3R stimulation. After CaMKII α inhibition, the effects of D3R activation in depolarized tissues were similar to those observed in non-depolarized tissues when GABA release was assayed by measuring mIPSCs (Cruz-Trujillo et al., 2013). In both cases, D3R stimulation enhanced GABA release only when coactivated with D1Rs. Taken together, these findings show that CaMKII α modulation occurs in the terminals of striatal spiny neurons because these are the only structures where D1Rs and D3Rs are coexpressed in a GABAergic terminal in the SNr (see Cruz-Trujillo et al., 2013). In agreement with this conclusion are the morphological observations of Fukunaga et al. (1988), showing that in the SNr neurites, but not cell somas, stain for CaMKII α .

The parallelism of the cellular effects described here and the behavioral studies of Marcellino et al. (2008), showing that D3Rs stimulate motor activity only when coactivated with D1Rs, is remarkable.

In the present study we did not detect effects of D1R and D3R agonists on basal [3H]GABA release (Fig. 3). In contrast, when we assayed resting GABA release measuring mIPSCs, D1/D3 interactions were clearly detected (Cruz-Trujillo et al., 2013). The

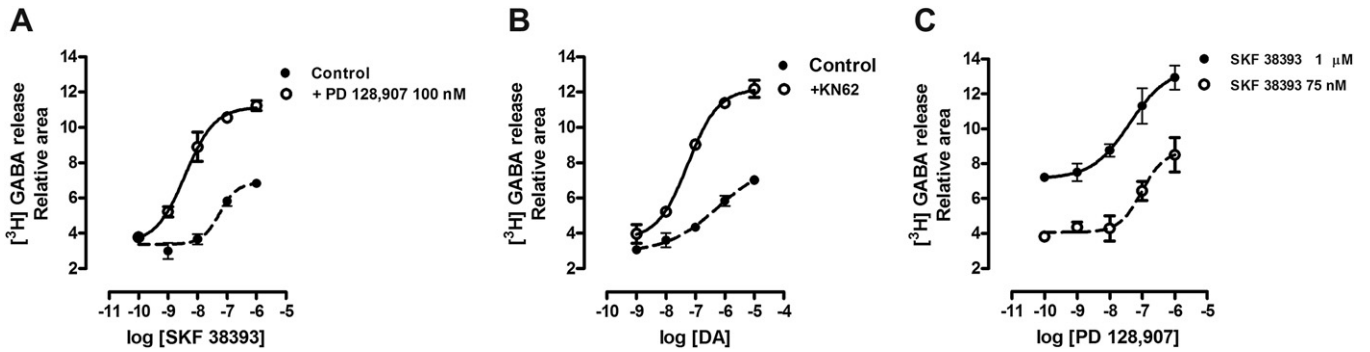


Fig. 4. Dose–response curve for SKF 38393, Dopamine and PD 128,907 on K^+ -stimulated [3H]GABA release. A. Dose–response curve of the selective D1 agonist SKF 38393 alone or in the presence of 10 nM of the D3 agonist PD 128,907 on [3H]GABA release (ED_{50} SKF 38393 alone 56.04 nM, CI = 158–19 nM, SKF 38393 in presence of PD 128,907 4.0, CI = 8.89–1.65 nM). B. Dose–response curve of dopamine alone or in the presence of CaMKII inhibitor KN-62 (4 μ M) on [3H]GABA release (ED_{50} dopamine alone 584 nM, CI = 8156–205 nM, dopamine determined in the presence of KN-62 56 nM, CI = 105–28 nM). C. Dose–response curve for the D3 selective agonist PD 128,907 determined in the presence of two doses of D1 agonist SKF 38393 1 μ M and 75 nM (ED_{50} PD 128,907 + SKF 38393 75 nM 98 nM, CI = 385–25 nM, PD 128,907 + SKF 38393 1 μ M, 71 nM, CI = 412–4 nM). Values mean \pm standard error of the relative areas from [3H]GABA release, $n = 5$ experiments per curve, 5 replicates per experiment.

difference in response using the two assay methods has been observed previously (compare Radnikow and Misgeld, 1998; Nava-Asbell et al., 2007). The failure to detect pharmacological effects on basal [3H]-GABA release may be explained because during the loading process labeled transmitter equilibrates with several compartments in the slice, including glia and GABAergic terminals that belong to several cell types with different pharmacological properties (Grofova, 1975; Ribak et al., 1980; Deniau et al., 1982). Since transmitter is released continuously from all these compartments, changes in release from a single compartment that contributes a small percentage of the total may be below the detection level.

Our experiments demonstrate that significant D3/CaMKII α interactions are more widespread than originally suggested by Liu et al. (2009). They proposed that D3/CaMKII α interaction were confined to the NAc because they did not observe it in other brain areas that they examined. The modulation of dopamine receptors by CaMKII α in the SNr is selective for D3Rs. KN-62 modified the effects PD 128,907 and of dopamine acting on D3Rs (Figs. 1, 3 and 4) but not the actions of D4 receptor antagonists L 745,870 or of D1R agonist SKF 38393 (Fig. 6).

4.2. Presynaptic effects of CaMKII α on D3 receptors

Liu et al. (2009) concluded that CaMKII α regulates postsynaptic D3R in the NAc because they found the receptors at a very high density in the purified postsynaptic density. Evidence showing that CaMKII α interacts with postsynaptic target proteins is abundant (Gardoni et al., 1998; Leonard et al., 1999; Strack et al., 1997; Merrill et al., 2005; Colbran and Brown, 2004; Bayer et al., 2006). Our experiments demonstrate that D3/CaMKII α interactions modulate presynaptic function because they inhibit Ca^{2+} -dependent depolarization-induced [3H]GABA release. Other findings also show that CaMKII α regulates presynaptic properties including excitability, development, vesicle dynamics, and neurosecretion (Griffith, 2004; Shakiryanova et al., 2007; Wang, 2008; de Jong and Verhage, 2009; Wong et al., 2009; Carrillo et al., 2010).

Several studies indicate that Ca^{2+} release from endoplasmic reticulum is determinant for CaMKII α regulation of release of neurotransmitters, neuropeptides, and neurotrophins (He et al., 2000; Jin and Hawkins, 2003; Kubota et al., 2005; Kolarow et al., 2007; Shakiryanova et al., 2007). In the present experiments we used procedures that produce large increases in Ca^{2+} entry

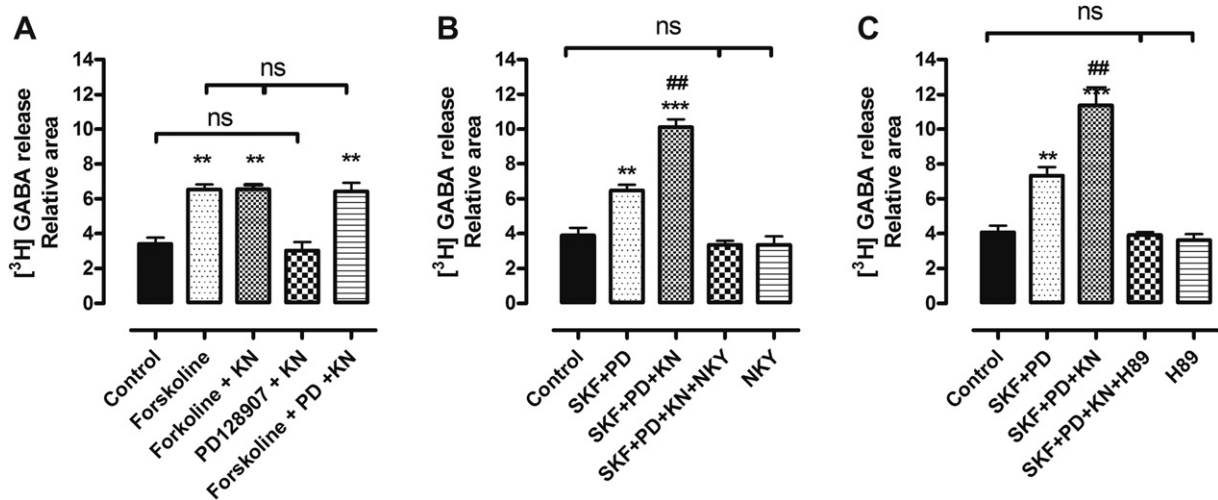


Fig. 5. Role of the cAMP signaling cascade in the response of K^+ -stimulated [3H]GABA release to D1/D3 receptor coactivation and CaMKII blockade. A. Effects of KN-62 (4 μ M) and PD 128,907 (100 nM) on forskolin (10 μ M) stimulated [3H]GABA release. B and C. Effects of the adenylyl cyclase V/VI inhibitor NKY80 (10 μ M) and the PKA inhibitor H89 (10 μ M) on D1/D3 stimulated [3H]GABA release in presence of KN-62. ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$; compared with control. ## $p < 0.01$ SKF + PD + KN vs. SKF + PD; ns, not significant. Values: mean \pm standard error of the relative areas from [3H]GABA release, $n = 3–4$ experiments, 4–5 replicates per experiment. Samples obtained from reserpinized animals.

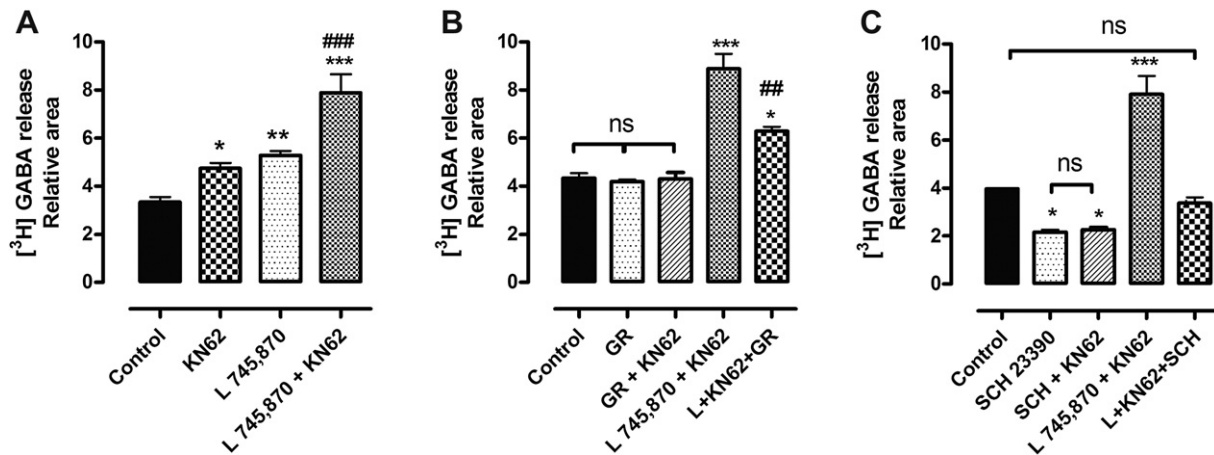


Fig. 6. Effects of KN-62 on [3 H]GABA release in slices of non-reserpinized animals and their modification by D4, D3 and D1 antagonists. A. KN-62 enhances release in both control and L 745,870 treated slices. B. The selective D3 antagonist GR 103691 prevents the effects of KN-62 on control and a fraction of L 745,870 treated slices. C. The selective D1 antagonist SCH 23390 prevents KN-62 enhancement of GABA release. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ compared with control; ## $p < 0.01$ with respect L 745,870 + KN-62; ### $p < 0.001$ compared with L 745,870 alone; ns, not significant. Values mean \pm standard error of the relative areas from [3 H]GABA release, $n = 3-4$ experiments, 4–5 replicates per experiment.

(Nachshen, 1985; Verhage et al., 1988, 1989). Evidently, subsequent Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release could be important in magnifying the changes in cytoplasmic [Ca^{2+}], however, its contribution was not experimentally examined in the present study.

4.3. D3 receptors, stimulation of GABA release and the cAMP/PKA cascade

In some brain structures activation of D1Rs and D3Rs have antagonistic effects; D3R interact with Gi proteins inhibiting D1R effects mediated by Gs proteins (Schwartz et al., 1998; Liu et al., 2009). In other areas D3R and D1R have synergistic effects: D3Rs enhance D1R mediated stimulation of adenylyl cyclase (SNr, Islands of Calleja, striatum and cultured cells). In these instances (Schwartz et al., 1998; Fiorentini et al., 2008; Marcellino et al., 2008; Cruz-Trujillo et al., 2013), as in our experiments (Figs. 1, 3 and 6), stimulation of D3Rs is effective only when D1Rs are activated concomitantly. Some of these investigators (Fiorentini et al., 2008; Marcellino et al., 2008) have studied these interactions in the striatum and in transfected cells and conclude that coactivation is necessary because the responses are generated through heterodimer formation. The lack of effects of D3R activation in slices where cAMP production was enhanced by forskolin (Fig. 5A) indicates that increased activity of adenylyl cyclase does not confer D3R sensitivity to the release process and indicates that D1/D3 interactions occur upstream in the signaling cascade.

The parallel effects of D3R stimulation on GABA release and on cAMP accumulation further support the concept that coactivation effects involve increased cytoplasmic cAMP levels. This conclusion is in agreement with evidence showing that activity of the cAMP/PKA cascade is a major determinant of GABA release in the SNr (Nava-Asbell et al., 2007). The suppression of the responses by inhibitors of adenylyl cyclase and cAMP-dependent kinase (Fig. 5) further support this point.

When D1R and D3R receptors were coactivated, the ED_{50} for SKF 38393 was shifted from 56.04 to 4.0 nM (Fig. 4) indicating that D3R increases the affinity of D1Rs for its ligands. The ED_{50} for dopamine was reduced by KN-62 from 584 to 56 nM. Since activation of D3Rs by dopamine is blocked by CaMKII α activation during K^+ depolarization, the effects of KN-62 are due to the reversal of D3R blockade by CaMKII α . These effects on receptor affinity imply that during D3R activation *in vivo*, D1R are responsive to much lower concentrations of dopamine than those that activate the latter receptor alone.

Other studies are in agreement with this finding. D3R stimulation increased the affinity of D1Rs in striatal proteins and in transfected cells (Marcellino et al., 2008; Fiorentini et al., 2008). In the transfected cells, D1-D3 coactivation modifies receptor traffic. D3R stimulation reduced agonist-induced D1R cytoplasmic sequestration (Fiorentini et al., 2008).

4.4. Activity dependent modulation of GABA release by D3 receptor/ CaMKII α interactions

Action potential firing can activate CaMKII α (Shakiryanova et al., 2011). The activation is slow and frequency dependent: at low frequencies no enzyme activation was detected, however, when neurons fired at high frequency, significant CaMKII α signaling was detected. These observations and our findings showing that depolarization induces Ca^{2+} -dependent CaMKII α activity that modulates D3R function in the SNr implies that the rate of target neuron firing can modulates dopamine receptor activity. The results of Shakiryanova et al. (2011) suggest that at low rates of action potential firing CaMKII α will be inactive and D3R would be fully functional while when bursts of high frequency discharges occur the enzyme will be active and turn D3Rs off.

The results of Shakiryanova et al. (2011) taken together with our findings could thus provide the basis of a complex regulation of neuronal function by D3/CaMKII α interactions. During low frequency of discharge of neurons where D1Rs and D3Rs have synergistic effects, D3R activation would sensitize D1Rs, magnifying their responses. In contrast, high frequencies would interfere with the synergistic interactions. In structures where D1R and D3R activation are antagonistic, D3R would act as a brake for D1R responses at low frequencies while high frequencies would activate CaMKII α and remove the braking effects.

Acknowledgments

The work was supported by a grant (152326) from CONACyT (México) to BF. We thank Dr. Mimi Halpern for correcting our manuscript.

References

- Aceves, J., Floran, B., Sierra, A., Mariscal, S., 1995. D-1 receptor mediated modulation of the release of gamma-aminobutyric acid by endogenous dopamine in the basal ganglia of the rat. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 19, 727–739.

- Aceves, J., Rueda-Orozco, P.E., Hernandez, R., Plata, V., Ibanez-Sandoval, O., Galarraga, E., Vargas, J., 2011. Dopaminergic presynaptic modulation of nigral afferents: its role in the generation of recurrent bursting in substantia nigra pars reticulata neurons. *Front. Syst. Neurosci.* 5, 6.
- Acosta-García, J., Hernandez-Chan, N., Paz-Bermudez, F., Sierra, A., Erlij, D., Aceves, J., Floran, B., 2009. D4 and D1 dopamine receptors modulate [3H] GABA release in the substantia nigra pars reticulata of the rat. *Neuropharmacology* 57, 725–730.
- Alexander, S.P., 1995. The measurement of cyclic AMP levels in biological preparations. *Methods Mol. Biol.* 41, 79–89.
- Arturo, A., Rangel, C., Isaac, S., Cruz, R., Aceves, J., Erlij, D., Floran, G.B., 2010. Intracellular Ca^{2+} regulates dopamine D3 receptor effects on GABA release by striatonigral terminals of the rat via activation of CaMKII. *Neuroscience. Abstr.* 741.12.
- Bayer, K.U., LeBel, E., McDonald, G.L., O'Leary, H., Schulman, H., De Koninck, P., 2006. Transition from reversible to persistent binding of CaMKII to postsynaptic sites and NR2B. *J. Neurosci.* 26, 1164–1174.
- Bernath, S., 1992. Calcium-independent release of amino acid neurotransmitters: fact or artifact? *Prog. Neurobiol.* 38, 57–91.
- Bouthenet, M.L., Souil, E., Martres, M.P., Sokoloff, P., Giros, B., Schwartz, J.C., 1991. Localization of dopamine D3 receptor mRNA in the rat brain using *in situ* hybridization histochemistry: comparison with dopamine D2 receptor mRNA. *Brain Res.* 564, 203–219.
- Carrillo, R.A., Olsen, D.P., Yoon, K.S., Keshishian, H., 2010. Presynaptic activity and CaMKII modulate retrograde semaphorin signaling and synaptic refinement. *Neuron* 68, 32–44.
- Chijiwa, T., Mishima, A., Hagiwara, M., Sano, M., Hayashi, K., Inoue, T., Hidaka, H., 1990. Inhibition of forskolin-induced neurite outgrowth and protein phosphorylation by a newly synthesized selective inhibitor of cyclic AMP-dependent protein kinase, N-[2-(p-bromocinnamylamino)ethyl]-5-isoquinolinesulfonamide (H-89), of PC12D pheochromocytoma cells. *J. Biol. Chem.* 265, 5267–5272.
- Colbran, R.J., Brown, A.M., 2004. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II and synaptic plasticity. *Curr. Opin. Neurobiol.* 14, 318–327.
- Cruz-Trujillo, R., Avalos-Fuentes, A., Rangel-Barajas, C., Paz-Bermudez, F., Sierra, A., Escartin-Perez, E., Aceves, J., Erlij, D., Floran, B., 2013. D3 dopamine receptors interact with dopamine D1 but not D4 receptors in the GABAergic terminals of the SNr of the rat. *Neuropharmacology* 67, 370–378.
- de Jong, A.P., Verhage, M., 2009. Presynaptic signal transduction pathways that modulate synaptic transmission. *Curr. Opin. Neurobiol.* 19, 245–253.
- Deniau, J.M., Kitai, S.T., Donoghue, J.P., Grofova, I., 1982. Neuronal interactions in the substantia nigra pars reticulata through axon collaterals of the projection neurons. An electrophysiological and morphological study. *Exp. Brain Res.* 47, 105–113.
- Everett, P.B., Senogles, S.E., 2010. D3 dopamine receptor signals to activation of phospholipase D through a complex with Rho. *J. Neurochem.* 112, 963–971.
- Fiorentini, C., Busi, C., Gorruso, E., Gotti, C., Spano, P., Missale, C., 2008. Reciprocal regulation of dopamine D1 and D3 receptor function and trafficking by heterodimerization. *Mol. Pharmacol.* 74, 59–69.
- Fukunaga, K., Goto, S., Miyamoto, E., 1988. Immunohistochemical localization of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II in rat brain and various tissues. *J. Neurochem.* 51, 1070–1078.
- García, M., Floran, B., Arias-Montano, J.A., Young, J.M., Aceves, J., 1997. Histamine H3 receptor activation selectively inhibits dopamine D1 receptor-dependent [3H] GABA release from depolarization-stimulated slices of rat substantia nigra pars reticulata. *Neuroscience* 80, 241–249.
- Gardoni, F., Caputi, A., Cimino, M., Pastorino, L., Cattabeni, F., Di Luca, M., 1998. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II is associated with NR2A/B subunits of NMDA receptor in postsynaptic densities. *J. Neurochem.* 71, 1733–1741.
- Griffith, L.C., 2004. Regulation of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II activation by intramolecular and intermolecular interactions. *J. Neurosci.* 24, 8394–8398.
- Grofova, I., 1975. The identification of striatal and pallidal neurons projecting to substantia nigra. An experimental study by means of retrograde axonal transport of horseradish peroxidase. *Brain Res.* 91, 286–291.
- He, X., Yang, F., Xie, Z., Lu, B., 2000. Intracellular Ca^{2+} and Ca^{2+} /calmodulin-dependent kinase II mediate acute potentiation of neurotransmitter release by neurotrophin-3. *J. Cell. Biol.* 149, 783–792.
- Huang, C.C., Hsu, K.S., 2012. Activation of NMDA receptors reduces metabotropic glutamate receptor-induced long-term depression in the nucleus accumbens via a CaMKII-dependent mechanism. *Neuropharmacology* 63, 1298–1307.
- Hudmon, A., Schulman, H., 2002. Neuronal Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II: the role of structure and autoregulation in cellular function. *Annu. Rev. Biochem.* 71, 473–510.
- Ibanez-Sandoval, O., Hernandez, A., Floran, B., Galarraga, E., Tapia, D., Valdiosera, R., Erlij, D., Aceves, J., Vargas, J., 2006. Control of the subthalamic innervation of substantia nigra pars reticulata by D1 and D2 dopamine receptors. *J. Neurophysiol.* 95, 1800–1811.
- Jin, L., Hawkins, R.D., 2003. Presynaptic and postsynaptic mechanisms of a novel form of homosynaptic potentiation at aplysia sensory-motor neuron synapses. *J. Neurosci.* 23, 7288–7297.
- Kelly, P.T., McGuinness, T.L., Greengard, P., 1984. Evidence that the major postsynaptic density protein is a component of a Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 81, 945–949.
- Kolarow, R., Brigadski, T., Lessmann, V., 2007. Postsynaptic secretion of BDNF and NT-3 from hippocampal neurons depends on calcium calmodulin kinase II signaling and proceeds via delayed fusion pore opening. *J. Neurosci.* 27, 10350–10364.
- Kubota, M., Narita, K., Murayama, T., Suzuki, S., Soga, S., Usukura, J., Oganawa, Y., Kuba, K., 2005. Type-3 ryanodine receptor involved in Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release and transmitter exocytosis at frog motor nerve terminals. *Cell Calcium* 38, 557–567.
- Leonard, A.S., Lim, I.A., Hemsworth, D.E., Horne, M.C., Hell, J.W., 1999. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II is associated with the N-methyl-D-aspartate receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 3239–3244.
- Lisman, J., Schulman, H., Cline, H., 2002. The molecular basis of CaMKII function in synaptic and behavioural memory. *Nat. Rev. Neurosci.* 3, 175–190.
- Liu, X.Y., Mao, L.M., Zhang, G.C., Papasian, C.J., Fibuch, E.E., Lan, H.X., Zhou, H., Xu, M., Wang, J.Q., 2009. Activity-dependent modulation of limbic dopamine D3 receptors by CaMKII. *Neuron* 61, 425–438.
- Marcellino, D., Ferre, S., Casado, V., Cortes, A., Le Foll, B., Mazzola, C., Drago, F., Saur, O., Stark, H., Soriano, A., Barnes, C., Goldberg, S., Lluís, C., Fuxe, K., Franco, R., 2008. Identification of dopamine D1–D3 receptor heteromers. Indications for a role of synergistic D1–D3 receptor interactions in the striatum. *J. Biol. Chem.* 283, 26016–26025.
- Merrill, M.A., Chen, Y., Strack, S., Hell, J.W., 2005. Activity-driven postsynaptic translocation of CaMKII. *Trends Pharmacol. Sci.* 26, 645–653.
- Nachshen, D.A., 1985. Regulation of cytosolic calcium concentration in presynaptic nerve endings isolated from rat brain. *J. Physiol.* 363, 87–101.
- Nava-Asbell, C., Paz-Bermudez, F., Erlij, D., Aceves, J., Floran, B., 2007. GABA(B) receptor activation inhibits dopamine D1 receptor-mediated facilitation of [(3)H]GABA release in substantia nigra pars reticulata. *Neuropharmacology* 53, 631–637.
- Neve, K.A., Seamans, J.K., Trantham-Davidson, H., 2004. Dopamine receptor signaling. *J. Recept. Signal Transduct. Res.* 24, 165–205.
- Onda, T., Hashimoto, Y., Nagai, M., Kuramochi, H., Saito, S., Yamazaki, H., Toya, Y., Sakai, I., Homey, C.J., Nishikawa, K., Ishikawa, Y., 2001. Type-specific regulation of adenylyl cyclase. Selective pharmacological stimulation and inhibition of adenylyl cyclase isoforms. *J. Biol. Chem.* 276, 47785–47793.
- Paxinos, G., Watson, C., 1997. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press, San Diego, CA.
- Radnikow, G., Misgeld, U., 1998. Dopamine D1 receptors facilitate GABA synaptic currents in the rat substantia nigra pars reticulata. *J. Neurosci.* 18, 2009–2016.
- Rangel-Barajas, C., Silva, I., Garcia-Ramirez, M., Sanchez-Lemus, E., Floran, L., Aceves, J., Erlij, D., Floran, B., 2008. 6-OHDA-induced hemiparkinsonism and chronic L-DOPA treatment increase dopamine D1-stimulated [(3)H]GABA release and [(3)H]-cAMP production in substantia nigra pars reticulata of the rat. *Neuropharmacology* 55, 704–711.
- Rangel-Barajas, C., Silva, I., Lopez-Santiago, L.M., Aceves, J., Erlij, D., Floran, B., 2011. L-DOPA-induced dyskinesia in hemiparkinsonian rats is associated with up-regulation of adenylyl cyclase type VI and increased GABA release in the substantia nigra reticulata. *Neurobiol. Dis.* 41, 51–61.
- Ribak, C.E., Vaughn, J.E., Roberts, E., 1980. GABAergic nerve terminals decrease in the substantia nigra following hemitransections of the striatonigral and pallidostriatal pathways. *Brain Res.* 192, 413–420.
- Schwartz, J.C., Diaz, J., Bordet, R., Griffon, N., Perachon, S., Pilon, C., Ridray, S., Sokoloff, P., 1998. Functional implications of multiple dopamine receptor subtypes: the D1/D3 receptor coexistence. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 26, 236–242.
- Shakiryanova, D., Klöse, M.K., Zhou, Y., Gu, T., Deitcher, D.L., Atwood, H.L., Hewes, R.S., Levitan, E.S., 2007. Presynaptic ryanodine receptor-activated calmodulin kinase II increases vesicle mobility and potentiates neuropeptide release. *J. Neurosci.* 27, 7799–7806.
- Shakiryanova, D., Morimoto, T., Zhou, C., Chouhan, A.K., Sigrist, S.J., Nose, A., Macleod, G.T., Deitcher, D.L., Levitan, E.S., 2011. Differential control of presynaptic CaMKII activation and translocation to active zones. *J. Neurosci.* 31, 9093–9100.
- Sokoloff, P., Giros, B., Martres, M.P., Bouthenet, M.L., Schwartz, J.C., 1990. Molecular cloning and characterization of a novel dopamine receptor (D3) as a target for neuroleptics. *Nature* 347, 146–151.
- Strack, S., Choi, S., Lovinger, D.M., Colbran, R.J., 1997. Translocation of autophosphorylated calcium/calmodulin-dependent protein kinase II to the postsynaptic density. *J. Biol. Chem.* 272, 13467–13470.
- Tao-Cheng, J.H., Dosemeci, A., Winters, C.A., Reese, T.S., 2006. Changes in the distribution of calcium calmodulin-dependent protein kinase II at the presynaptic bouton after depolarization. *Brain Cell Biol.* 35, 117–124.
- Tokumitsu, H., Chijiwa, T., Hagiwara, M., Mizutani, A., Terasawa, M., Hidaka, H., 1990. KN-62, 1-[N, O-bis(5-isoquinolinesulfonyl)-N-methyl-L-tyrosyl]-4-phenylpiperazine, a specific inhibitor of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II. *J. Biol. Chem.* 265, 4315–4320.
- Verhage, M., Besselsen, E., Lopes Da Silva, F.H., Ghijsen, W.E., 1988. Evaluation of the Ca^{2+} concentration in purified nerve terminals: relationship between Ca^{2+} homeostasis and synaptosomal preparation. *J. Neurochem.* 51, 1667–1674.
- Verhage, M., Besselsen, E., Lopes da Silva, F.H., Ghijsen, W.E., 1989. Ca^{2+} -dependent regulation of presynaptic stimulus-secretion coupling. *J. Neurochem.* 53, 1188–1194.
- Wang, Z.W., 2008. Regulation of synaptic transmission by presynaptic CaMKII and BK channels. *Mol. Neurobiol.* 38, 153–166.
- Wassef, M., Berod, A., Sotelo, C., 1981. Dopaminergic dendrites in the pars reticulata of the rat substantia nigra and their striatal input. Combined immunocytochemical localization of tyrosine hydroxylase and anterograde degeneration. *Neuroscience* 6, 2125–2139.
- Wong, M.Y., Shakiryanova, D., Levitan, E.S., 2009. Presynaptic ryanodine receptor-CaMKII signaling is required for activity-dependent capture of transiting vesicles. *J. Mol. Neurosci.* 37, 146–150.



Presynaptic CaMKII α modulates dopamine D3 receptor activation in striatonigral terminals of the rat brain in a Ca²⁺ dependent manner

Arturo Avalos-Fuentes^c, Santiago Loya-López^c, Aleida Flores-Pérez^a, Sergio Recillas-Morales^c, Hernán Cortés^d, Francisco Paz-Bermúdez^a, Jorge Aceves^a, David Erlj^b, Benjamín Florán^{a,*}

^a Department of Physiology, Biophysics and Neurosciences, CINVESTAV-IPN, Av. IPN # 2508, San Pedro Zacatenco, 07360 Mexico D.F., Mexico

^b Department of Physiology, SUNY Downstate Medical Center, NY, USA

^c Department of Pharmacology, CINVESTAV-IPN, Mexico

^d Genomic Medicine Laboratory, Department of Genetics, National Rehabilitation Institute, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 25 January 2013

Received in revised form

3 April 2013

Accepted 5 April 2013

Keywords:

CamKII

Substantia nigra

D1 presynaptic receptor

D3 presynaptic receptor

ABSTRACT

CaMKII α is expressed at high density in the nucleus accumbens where it binds to postsynaptic D3 receptors inhibiting their effects. In striatonigral projections, activation of presynaptic D3 receptors potentiates D1 receptor-induced stimulation of cAMP production and GABA release. In this study we examined whether the presynaptic effects of D3 receptor stimulation in the substantia nigra reticulata (SNr) are modulated by Ca²⁺ activation of CaMKII α . In SNr synaptosomes two procedures that increase cytoplasmic Ca²⁺, ionomycin and K⁺-depolarization, blocked the additional stimulation of cAMP accumulation produced by coactivating D3 and D1 dopamine receptors. The selective CaMKII α inhibitor KN-62 reversed the blockade produced by ionomycin and K⁺-depolarization. Incubation in either Ca²⁺-free solutions or with the selective Ca²⁺ blocker nifedipine, also reversed the blocking effects of K⁺-depolarization. Immunoblot studies showed that K⁺-depolarization increased CaMKII α phosphorylation in a KN-62 sensitive manner and promoted CaMKII α binding to D3 receptors. In K⁺-depolarized tissues, D3 receptors potentiated D1 receptor-induced stimulation of [³H]GABA release only when CaMKII α was blocked with KN-62. In the presence of this inhibitor, the selective D3 agonist PD 128,907 reduced the ED₅₀ for the D1 agonist SKF 38393 from 56 to 4 nM. KN-62 also enhanced the effects of dopamine on depolarization induced [³H]GABA release. KN-62 changed ED₅₀ for dopamine from 584 to 56 nM. KN-62 did not affect D1 and D4 receptor responses. These experiments show that in striatonigral projections, CaMKII α inhibits the action of D3 receptors in a Ca²⁺ dependent manner blocking their modulatory effects on GABA release. These findings suggest a mechanism through which the frequency of action potential discharge in presynaptic terminals regulates dopamine effects.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Dopamine modifies neuronal function by interacting with two classes of G protein-coupled receptor families, the D1 family (that includes D1 and D5 receptors) typically coupled to G_s proteins and the D2 family (D2, D3, and D4 receptors) typically couple to G_i proteins (Neve et al., 2004). The rat D3 receptor (D3R) messenger translates a 446 amino acid protein that has 52% homology with the rat D2 receptor; 75% of the homology is in the transmembrane-spanning domains. D3Rs are preferentially expressed in the mesolimbic dopaminergic projection areas, including the nucleus accumbens (NAc) (Sokoloff et al., 1990; Bouthenet et al., 1991). In

the nucleus accumbens D3Rs behave as typical D2 family receptors, i.e., they are coupled with G_i proteins inhibiting adenylyl cyclase (Schwartz et al., 1998). Recently it has been shown that D3R function in the NAc is markedly regulated by Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II α (CaMKII α). In this structure CaMKII α binds to D3Rs in a Ca²⁺-sensitive manner, phosphorylating the receptor and inhibiting its function (Liu et al., 2009).

D3Rs are also active in striatonigral nerve endings where they modulate GABA release (Cruz-Trujillo et al., 2013). In these structures the D3R signaling pathway is “atypical”. Instead of acting through coupling to G_i proteins; D3Rs enhance D1R-stimulated cAMP production and GABA release (Cruz-Trujillo et al., 2013). Since CaMKII α is an abundant enzyme in the brain, especially at synaptic sites (Kelly et al., 1984), we examined whether it also modulates D3Rs signaling localized in presynaptic endings where it is mediated by an “atypical” pathway.

* Corresponding author. Tel.: +52 55 5747 3800x5137; fax: +52 55 7473754.

E-mail addresses: bfloran@fisio.cinvestav.mx, bfloran@live.com.mx (B. Florán).

CaMKII α activity depends on the level of cytoplasmic Ca²⁺ (Lisman et al., 2002). As cytoplasmic Ca²⁺ increases, the enzyme is removed from its autoinhibitory state and becomes activated by the binding of Ca²⁺ and calmodulin (CaM). Activated CaMKII α phosphorylates its substrates as well as an autophosphorylation site within its autoregulatory domain. The autophosphorylation results in a Ca²⁺/CaM-independent kinase activity even after the initial Ca²⁺ stimulus subsides (Hudmon and Schulman, 2002; Colbran and Brown, 2004; Griffith, 2004).

In this study we evaluated whether procedures that markedly enhance cytoplasmic Ca²⁺ modify the effects of activating D3Rs in the striatal projections to the SNr via a CaMKII α -mediated process. We concentrated, mostly, on the effects of K⁺-induced depolarization because this procedure triggers Ca²⁺-dependent transmitter release that is akin to the naturally occurring process (Bernath, 1992). Furthermore, K⁺ depolarization of neuronal cultures leads to CaMKII α accumulation near active zones (AZs) (Tao-Cheng et al., 2006).

Regulation of dopaminergic receptors at presynaptic endings by CaMKII α is very likely of functional relevance since neural activity modifies presynaptic CaMKII α activity (see Shakiryanova et al., 2011). An account of our results has already been published in preliminary form (Arturo et al., 2010).

2. Methods

2.1. Animals

Male Wistar rats (180–200 g) housed together (five per cage) with water and food available ad libitum and kept under a natural light cycle were used throughout. All the procedures were carried out in accordance with the National Institutes of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals and were approved by the Institutional Animal Care Committee of the CINVESTAV.

2.2. Depletion of endogenous dopamine by reserpine

As indicated in the legends in most experiments rats were pretreated with reserpine (10 mg kg⁻¹, i.p.) 18 h before preparation of slices. Control animals were treated with the same volume (1 ml kg⁻¹) of vehicle (7% w/v lactic acid). This treatment causes more than 92% fall in dopamine content in the substantia nigra (Nava-Asbell et al., 2007).

2.3. Preparation of brain slices

After rapid sacrifice of the rat, the brain was immersed in oxygenated ice-cold artificial cerebrospinal fluid (ACSF) solution, and coronal brain slices (300 μ m thick) were obtained with a vibratome. The substantia nigra pars reticulata was microdissected under a stereoscopic microscope. The nucleus was identified according to the atlas of Paxinos and Watson (1997).

2.4. cAMP accumulation assay

cAMP accumulation assays were performed as previously described (Alexander, 1995; Rangel-Barajas et al., 2011). Synaptosomal fractions were isolated from SNr slices. The slices were homogenized in buffer (sucrose, 0.32 M; HEPES, 0.005 M, pH 7.4), and then homogenates were centrifuged at 800 \times g for 10 min. The resulting supernatant was further centrifuged at 20,000 \times g for 20 min. From this second centrifugation, the supernatant (S1) was discarded, and the pellet resuspended in a sucrose solution (composition: sucrose 0.8 M, HEPES 0.005 M, buffer, pH 7.4) and was newly centrifuged at 20,000 \times g for 20 min. Finally, the supernatant was discarded, and the new pellet containing synaptosomes was used. The pellet was suspended in Krebs–Henseleit buffer (composition: NaCl, 127; KCl, 1.75; MgSO₄, 1.18; KH₂PO₄, 1.25; CaCl₂, 1.8; HEPES, 20; glucose, 11; and 3-isobutyl-1-methylxanthine, 1; all in mM) and then was incubated with [³H]-adenine (130 nM) during 1 h at 37 °C. Aliquots of 10 μ l of drug containing solution were added to 250 μ l of the synaptosome samples. Incubation was continued for 10 min and stopped by adding 100 μ l of ice-cold trichloroacetic acid (15%) containing unlabeled ATP (2.5 mM) and cAMP (4.5 mM). After a period of 20 min on ice, the tubes were centrifuged (4000 rpm, 5 min, at 4 °C) and the supernatants loaded onto Dowex 50W-X4 columns (300 μ l per column). A fraction, containing [³H]-ATP, was eluted with 3 ml of distilled water. A second eluent, obtained with 5 ml of distilled water, was directly loaded onto neutral alumina columns. Alumina columns were finally eluted with 4 ml of 50 mM Tris–HCl buffer pH 7.4 to obtain [³H]-cAMP. Radioactivity was

determined by scintillation counting. The results were expressed as [³H]-cAMP \times 100/[³H]-cAMP + [³H]-ATP and were normalized to basal accumulation.

2.5. Protein preparation, immunoprecipitation, and western blot

The synaptosomal fraction was incubated with RIPA buffer (sodium orthovanadate 1 mM, sodium pyrophosphate 10 mM, sodium fluoride 100 mM, glycerol 10%, triton X-100, 1%, Tris–HCl 50 mM, NaCl 150 mM, MgCl₂ 1.5 mM, EGTA 1 mM, SDS 0.1% and sodium deoxycholate 1%) and a complete set of protease inhibitors (Roche Applied Science, México) for 15 min. To obtain the membranes, the synaptosomes were sonicated and protein was quantified by the Bradford method. A sample of 500 μ g of protein was incubated with antibody to phosphorylated CaMKII α (1:250) or antibody to D3Rs (1:250) for 6 h and then added to A-agarose beads (Roche Applied Science, México) for the next 12 h. Then samples were washed by centrifugation 3 times (10,000 rpm) for 5 min with 500 μ l of RIPA buffer. The resultant pellet of the third centrifugation was resuspended in sample buffer (Glycerol 50%, Tris–HCl 125 mM, SDS 4% Bromophenol blue 0.08%, β -mercaptoethanol 5%) and heated at 100 °C for 10 min.

To detect CaMKII α , phosphorylated CaMKII α and D3R the samples were resolved by SDS–PAGE, transferred onto PVDF membranes, and blotted for 1 h at room temperature in Tris buffered saline containing 0.2% Tween 20 and 5% nonfat powdered milk. Membranes were incubated overnight at 4 °C with either antibodies to CaMKII α (1:1000), phosphorylated CaMKII α antibody (1:2000 dilution) or D3Rs (1:2000 dilution). CaMKII α and phosphorylated CaMKII α monoclonal antibodies were obtained from Abcam C.O. Polyclonal antibodies for D3R were obtained from Santa Cruz Biotechnology Inc. The specificity of these antibodies has been reported by Fiorentini et al. (2008) and Everett and Senogles (2010). Detection of antibodies was performed by chemiluminescence (ECL-Plus Amersham) with HRP-conjugated secondary antibodies (1:5000 dilution for antibodies to CaMKII α and phosphorylated CaMKII α and 1:3000 for D3Rs).

2.6. Release studies

Once microdissected, the slices were incubated for 30 min at 37 °C in ACSF (composition in mM: NaCl 118.25, KCl 1.75, MgSO₄ 1, KH₂PO₄ 1.25, NaHCO₃ 25, CaCl₂ 2, and D-glucose 10) and gassed continuously with O₂/CO₂ (95:5, v/v). The tissues were then incubated for 30 min with 8 nM [³H]GABA in a 2 ml solution containing 10 μ M aminooxyacetic acid (to inhibit GABA transaminase, thus preventing degradation of the labeled GABA). At the end of this period, excess radiolabel was removed by washing twice with ACSF containing aminooxyacetic acid (10 μ M) and nipecotic acid (10 μ M) to prevent the reuptake of released [³H]GABA. Both compounds were present in the perfusion solution for the rest of the experiment.

Methods for measuring [³H]GABA release and data analysis used in the present work were the same as those described previously (Nava-Asbell et al., 2007). The slices were apportioned randomly between the chambers (usually four slices per chamber) of a superfusion system (volume of each chamber 80 μ l; 20 chambers in parallel) and perfused with the ACSF at a flow rate of 0.5 ml/min for 1 h. Basal release of [³H]GABA was measured by collecting 4 fractions of the superfusate (total volume 2 ml) before depolarizing the slices with a solution in which [K⁺] was raised to 15 mM. The composition of the high K⁺ solution was (mM): NaCl 106.25, KCl 13.75, MgSO₄ 1, KH₂PO₄ 1.25, NaHCO₃ 25, CaCl₂ 2 and D-glucose 10. Six more fractions were collected in the high K⁺ medium. To explore effects on basal release all drugs were added to the medium at fraction 2, that is before changing the superfusion to the high K⁺ medium. To determine the total amount of tritium remaining in the tissue, the slices were collected, treated with 1 ml of 1 M HCl and allowed to stand for 1 h before adding scintillator. [³H]GABA release was expressed initially as a fraction of the total amount of tritium remaining in the tissue. The effect of drugs on the basal release of [³H]GABA was assessed by comparing the fractional release in fraction 2 (immediately before exposure of the tissue to the drug) and fraction four (immediately prior to exposure to 15 mM of K⁺), using a paired *t*-test.

Changes in depolarization-induced [³H]GABA release by drugs and treatments, were assessed by comparing the area under the appropriate release curves between the first (fraction 5) and last fraction collected (fraction 10) after the change to high K⁺, making the assumption that the basal release of [³H]GABA remained unchanged at the level measured in the fraction immediately preceding K⁺ stimulation. In a previous paper (García et al., 1997) we found that when release was determined in fraction ten without any treatments it was 98 \pm 2% of that in fraction 4, indicating a minimal change in basal release.

2.7. Drugs

All drugs were obtained from Sigma (St. Louis, MO, USA): 4'-Acetyl-N-[4-[4-(2-methoxyphenyl)-1-piperazinyl]butyl]-[1,1'-biphenyl]-4-carboxamide (GR 103691), 2-Amino-7-(2-furanyl)-7,8-dihydro-5(6H)-quinazolinone (NKY80), N-[2-(p-Bromocinnamylamino)ethyl]-5-isoquinolinesulfonamide dihydrochloride (H89), R(-)-7-Chloro-8-hydroxy-3-methyl-1-phenyl-2,3,4, 5-tetrahydro-1H-3-benzazepine hydrochloride (SCH 23390), (3)-[4-(4-chlorophenyl)piperazin-1-yl]methyl]-1H-pyrrolo[2,3-b]pyridine hydrochloride (L-745,870), dopamine hydrochloride, ionomycin calcium salt, (S)-5-Isoquinolinesulfonic acid 4-[2-[(5-isoquinoliny)sulfonyl]

methylamino]-3-oxo-3-(4-phenyl-1-piperazinyl)propyl]phenyl ester, 1-[N,O-bis(5-Isoquinolinesulfonyl)-N-methyl-L-tyrosyl]-4-phenylpiperazine (KN-62), nifedipine, (RS)-2,3,4,5-tetrahydro-7,8-dihydroxy-1-phenyl-1H-3-epine hydrochloride (SKF 38393), (+)-(4aR,10bR)-3,4,4a,10b-Tetrahydro-4-propyl-2H,5H-[1]benzopyrano[4,3-b]-1,4-oxazin-9-ol hydrochloride (PD 128,907). The drugs were stored in a freezer as dry aliquots. Stock solutions were prepared just before each experiment and added to the perfusion solution at the final concentrations indicated below.

2.8. Statistics

All data were analyzed using Graph Pad Software, San Diego CA, USA. Except where indicated, one-way ANOVA combined with Tukey's test was used to compare differences between experimental groups. In the experiments on cAMP production, Dunnett's test was used to compare the effects of treatments with control data. Differences in densitometry of Western-blot were analyzed using One-Way ANOVA with Dunnett's posthoc or the single *t*-test. Concentration–response data were fitted by non-linear regression to obtain an unbiased estimate of ED₅₀ values and confidence interval using the same software.

3. Results

3.1. Increased cytoplasmic Ca²⁺ inhibits the potentiating effects of D3 receptor activation on D1 mediated cAMP production

Coactivation of D1Rs and D3Rs stimulate cAMP production and GABA release in SNr (Cruz-Trujillo et al., 2013). The effects of two treatments, ionomycin and K⁺-depolarization, that increase cytoplasmic Ca²⁺ in synaptosomes (Nachshen, 1985; Verhage et al., 1988, 1989) on the cAMP response are illustrated in Fig. 1A and B. D1R stimulation with the selective agonist SKF 38393 (1 μM) increased cAMP production (to 126.3 ± 0.3% in Fig. 1A and to 125.7 ± 1.20% in Fig. 1B, over the control; *p* < 0.001 for both groups. *F* = 145.8 in Fig. 1A and *F* = 242.6 in Fig. 1B; ANOVA followed by Dunnett's; *df* = 4; *n* = 3 experiments, 4 replicates per experiment). Concurrent D1R + D3R stimulation (by incubating also with the D3 agonist PD 128,907, 100 nM) further stimulated cAMP accumulation (to 150.0 ± 1.1% in Fig. 1A and to 147.3 ± 1.85% in Fig. 1B; *p* < 0.001 when compared with either control or SKF 38393 treated). When 50 nM ionomycin (Fig. 1A) and K⁺-depolarization (Fig. 1B) were tested, both reduced the effects of D1R + D3R stimulation to a value not significantly different from that observed when D1Rs were stimulated alone (Fig. 1A. SKF 38393 alone 126.3 ± 0.3%, vs. SKF + PD 128,907 + ionomycin 125.7 ± 2.96%. Fig. 1B. SKF 38393 alone 125.7 ± 1.20%, vs. SKF + PD 128,907 + KCl 125.0 ± 1.53%). PD 128,907 was without significant effects of its own on cAMP accumulation (101.0 ± 2.1%, *F* = 0.687, ANOVA followed by Dunnett's; *df* = 3; *n* = 3 experiments, 4 replicates, not illustrated).

In the same group of experiments, the CaMKIIα inhibitor KN-62 (4 μM), which acts by preventing calmodulin (CaM) binding to the enzyme (Tokumitsu et al., 1990; Huang and Hsu, 2012) reversed the blocking effects of both ionomycin and K⁺-depolarization (Fig. 1A: SKF 38393 + PD 128,907 + ionomycin + KN-62, 152.3 ± 2.33% vs. SKF 38393 + PD 128,907, 150 ± 1.15%. Fig. 1B: SKF 38393 + PD 128,907 + KCl + KN-62, 147.7 ± 0.88% vs. SKF 38393 + PD 128,907, 147.3 ± 1.86; both differences were not significant, ns.). In other experiments (not illustrated) we found that KN-62 of its own didn't modify cAMP production (100.7 ± 2.33%, *F* = 17.44; ns., ANOVA followed by Dunnett's; *df* = 3; *n* = 3 experiments 4 replicates). KN-62 also didn't significantly affect the increase produced by SKF 38393 of its own (SKF 38393 alone, 125 ± 3, 29%, SKF 38393 + KN-62, 123.7%, *F* = 17.44, ns., *df* = 3; *n* = 3 experiments, 4 replicates) nor the lack of effects of PD 128,907 given alone (PD 128,907 alone 101 ± 2.08%, PD 128,907 + KN-62 104.7 ± 3.75%, *F* = 0.689; ns., *df* = 3; *n* = 3 experiments 4 replicates).

We next determined whether the inhibitory effects of K⁺ depolarization are Ca²⁺-dependent (Fig. 1C and D). Two procedures that interfere with [Ca²⁺] increases in the cytoplasm were used: a) Incubation in low Ca²⁺ solutions that prevent the depolarization-

induced stimulation of [³H]GABA release (Nava-Asbell et al., 2007). b) Incubation with nifedipine (10 μM), a selective antagonist of L-type Ca²⁺ channels that prevents CaMKIIα activation in NAc (Liu et al., 2009). In these experiments SKF 38393 given together with PD 128,907 also enhanced cAMP accumulation. Both nifedipine and Ca²⁺-free solutions prevented the depression of the D1R + D3R response caused by K⁺ depolarization (SKF 38393 + PD 128,907 + KCl + Ca²⁺-free, 160.7 ± 2.96% vs. SKF 38393 + PD 128,907, 157.3 ± 2.40%, *F* = 189.7; ns., *df* = 4; *n* = 3 experiments 4 replicates. SKF 38393 + PD 128,907 + KCl + Nifedipine, 149.3 ± 5.24 vs. SKF 38393 + PD 128,907, 152.3 ± 2.96; *F* = 69.94; ns., *df* = 4; *n* = 3 experiments, 4 replicates).

3.2. Depolarization enhances CaMKIIα phosphorylation and CaMKIIα binding to the D3 receptor

Increases of cytoplasmic Ca²⁺ stimulate binding of Ca²⁺/CaM to the regulatory domain of CaMKIIα leading to phosphorylation of the enzyme. This interaction increases phosphorylation of both substrates and also of an autophosphorylation site within the autoregulatory domain of the enzyme (Griffith, 2004). Fig. 2A shows that K⁺-depolarization of synaptosomes for 10 min with 15 mM K⁺ markedly increased CaMKIIα phosphorylation (relative O.D. 1.59 ± 0.08, *p* < 0.001 compared with respect control, ANOVA followed by Dunnett's, *F* = 54.85; *n* = 3 experiments). This increase was prevented when the CaMKIIα inhibitor KN-62 was present in the incubation solution (relative O.D. 0.97 ± 0.16, ns. compared with control ANOVA followed by Dunnett's, *F* = 54.85; *n* = 3 experiments). Fig. 2A also shows that KN-62 did not modify significantly basal CaMKIIα phosphorylation suggesting a low level of constitutive CaMKIIα activity (relative O.D. 0.98 ± 0.08 ns. when compared to control, ANOVA followed by Dunnett's, *F* = 54.85; *n* = 3 experiments).

In the nucleus accumbens Ca²⁺ enhances the binding of CaMKIIα to D3Rs thus regulating receptor function (Liu et al., 2009). We determined whether K⁺-depolarization in SNr affects the capacity of CaMKIIα to bind to D3Rs. Fig. 2B shows that CaMKIIα binding to D3Rs was increased when K⁺ was elevated (relative O.D. D3-CaMKIIα = 1.34 ± 0.04, *p* < 0.01 when compared to control, *t*-test; *n* = 3 experiments; relative O.D. CaMKIIα-D3 = 1.31 ± 0.01, *p* < 0.001 when compared to control, *t*-test; *n* = 3 experiments).

3.3. Blockade of CaMKIIα is required for modulation of K⁺ depolarization-induced [³H]-GABA release by dopamine D3 receptors

The results of the previous sections indicate that K⁺-depolarization activates CaMKIIα and that the activated enzyme interferes with D3R enhancement of D1R-stimulated adenylyl cyclase activity. Since the cAMP/PKA signaling cascade is the major signaling pathway modulating GABA release in striatonigral GABAergic terminals (Nava-Asbell et al., 2007), we examined whether CaMKIIα also interferes with D3 effects on depolarization-induced [³H]-GABA release.

Fig. 3A shows that the D1-stimulation of GABA release in K⁺ depolarized slices was not further enhanced when the D3 agonist PD 128,907 was also added to the perfusion solution (relative area SKF 38393 = 6.72 ± 0.54 vs. SKF 38393 + PD 128,907 = 6.32 ± 0.18, *F* = 15.07; *df* = 3; ns., *n* = 3 experiments, 5 replicates).

To test whether the lack of effects of PD 128,907 was due to inhibition of D3R effects by CaMKIIα we performed similar experiments in the presence of the CaMKIIα inhibitor KN-62 (Fig. 3B). When CaMKIIα was blocked, PD 128,907 increased the SKF 38393 stimulated release in K⁺ depolarized slices (relative area SKF 38393 + KN-62 = 7.27 ± 0.40 vs. SKF 38393 + PD 128,907 + KN-

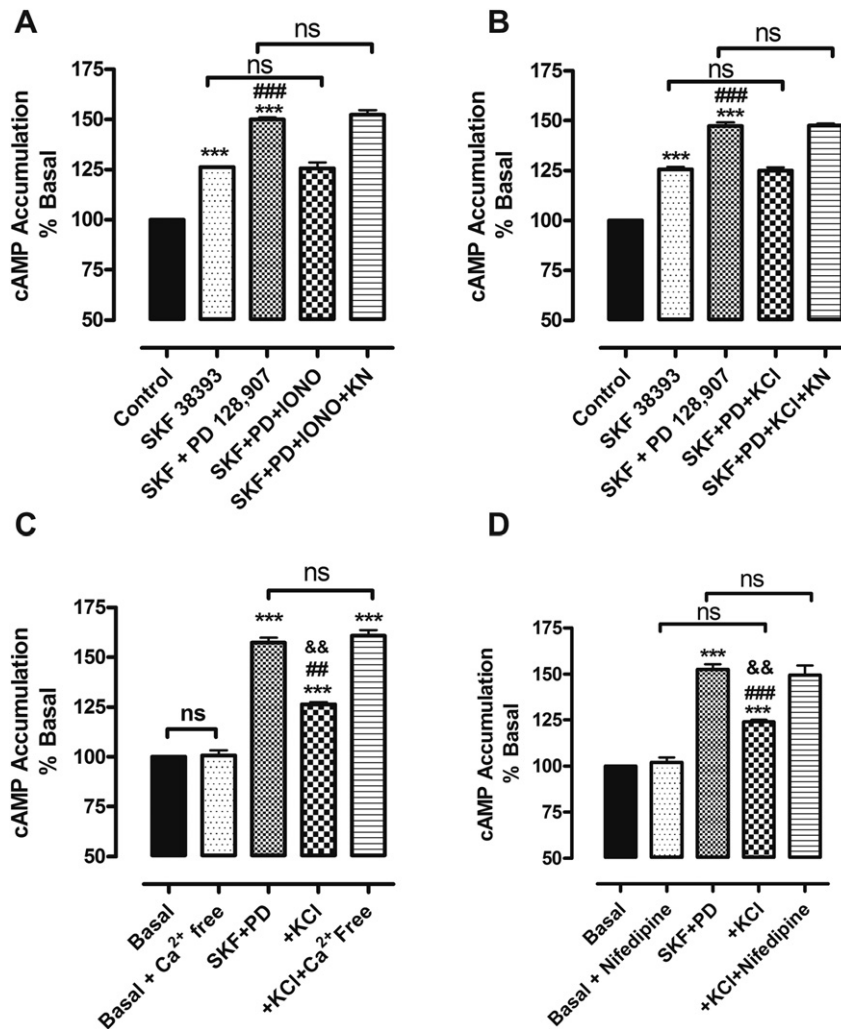


Fig. 1. A and B. Ionomycin and elevated K^+ block the potentiation of D1R stimulated cAMP accumulation produced by the D3R activation in a KN-62 dependent manner. A. Effects of D1 selective agonist SKF 38393 (1 μ M) administered alone and with D3 agonist PD 128,907 (100 nM), together with ionomycin (50 nM) and ionomycin plus KN-62 (4 μ M) on cAMP accumulation ($***p < 0.001$ compared with control, $###p < 0.001$ compared with SKF 38393 alone; ns. not significant). B. Effects of D1 receptor selective agonist SKF 38393 (1 μ M) on cAMP accumulation administered alone and with D3 agonist PD 128,907 (100 nM) incubated together in high K^+ (15 mM) solution and high K^+ plus KN-62 (4 μ M) ($***p < 0.001$ compared with control, $###p < 0.001$ compared with SKF 38393 alone; ns. not significant). C and D. Effects of Ca^{2+} -free solution and nifedipine (10 μ M) on the inhibitory effects of high K^+ solution on D3 receptor potentiation of D1 induced cAMP accumulation. $***p < 0.001$ compared with control, $###p < 0.001$ and $##p < 0.01$ compared with +KCl + Ca^{2+} -free or +KCl + nifedipine, ns. not significant. Values mean \pm standard error, $n = 3$ experiments, 4 replicates per experiment. Samples obtained from reserpinized animals.

$62 = 2.19 \pm 0.93$, $F = 45.33$; $p < 0.001$; $df = 4$; $n = 3$ experiments, 4 replicates). PD 128,907 had no effects of its own or in the presence of KN-62 (relative area PD 128,907 = 4.43 ± 0.29 vs. PD 128,907 + KN-62 = 4.16 ± 0.83 , $F = 15.07$; ns., $df = 3$; $n = 3$ experiments 4 replicates). KN-62 also did not modify the stimulation caused by SKF 38393 administered alone (SKF 38393 alone = 6.72 ± 0.54 vs. SKF 38393 + KN-62 = 7.27 ± 0.40 , $F = 45.33$; ns., $df = 3$; $n = 3$ experiments, 4 replicates). In the presence of KN-62 the selective D3R antagonist GR 103691 (100 nM) reduced the effects produced by concurrent administration of SKF 38393 + PD 128,907 to the level observed when SKF 38393 was administered alone (Fig. 3C, relative area SKF 38393 alone = 7.40 ± 0.47 vs. SKF 38393 + PD 128,907 + GR 103691 = 6.95 ± 0.35 , $F = 53.24$; ns., $df = 4$; $n = 3$ experiments 4 replicates per experiment) while in the absence of KN-62 administration of GR 103691 did not modify the effects of administering SKF 38393 + PD 128,907 (relative area SKF 38393 + PD 128,907 = 7.60 ± 0.62 vs. SKF 38393 + PD 128,907 + GR 103691 = 7.47 ± 0.33 , $F = 9.14$; ns., $df = 4$; $n = 3$

experiments, 4 replicates, not shown in graphs). The D1R antagonist SCH 23390 (10 nM) completely eliminated the response produced by the coadministration of SKF 38393 + PD 128,907 (relative area, control = 4.07 ± 0.45 vs. SKF 38393 + PD 128,907 + SCH 23390 + KN-62 = 4.14 ± 0.5 , $F = 53.24$; ns., $df = 4$; $n = 3$ experiments, 4 replicates).

Fig. 3D and E illustrates the time course of the experiments from which the average values shown in Fig. 3A and B were derived. Vertical arrow indicates time when drug perfusion was initiated; horizontal bar indicates perfusion with 15 mM K^+ solution.

Fig. 4A illustrates the dependence of [3H]-GABA release on the concentration of selective agonist SKF 38393 in the presence and absence of D3R activation by PD 128,907. ED_{50} for SKF 38393 was decreased by PD 128,907 (ED_{50} for SKF 38393 alone 56.04, $CI = 158-19$ nM; for SKF 38393 in presence of PD 128,907 4.0, $CI = 8.89-1.65$ nM). Fig. 4B shows the effects of dopamine in the presence and absence of KN-62. Experiments for dopamine were done in the presence of L 745,870 to prevent the activation of D4

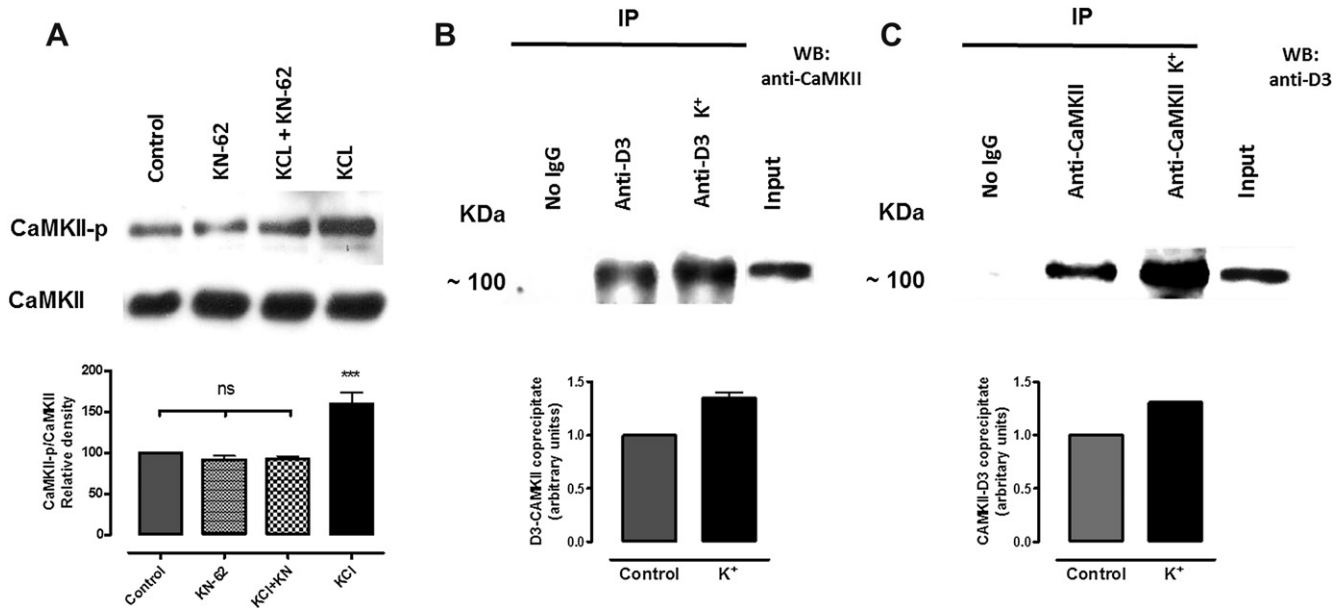


Fig. 2. A. Incubation in elevated K^+ solutions increases CaMKII α phosphorylation by. A. Representative images of immunoblots using antibodies to phosphorylated CaMKII α and CaMKII α from synaptosomes incubated for 10 min in different conditions: KN-62 (4 μ M) alone, KN-62 in a high K^+ (15 mM) solution and high K^+ solution alone. Lower graph: quantitative analyses of phosphorylated CaMKII α and CaMKII α (** $p < 0.001$, compared with control, ns. not significant). B and C. K^+ increases D3R binding to CaMKII α . B. Coimmunoprecipitation of CaMKII α and D3R in SNr synaptosomes: K^+ increases D3R binding to CaMKII α . Representative coIP of D3R by the antibody to phosphorylated CaMKII α . B (Left), Lane 1 was run in the absence of the precipitating antibody, control (lane 2) and high K^+ (15 mM) solutions (lane 3). B (Right), representative coIP of phosphorylated CaMKII α by the antibody to D3 in control (lane 2) and high K^+ (15 mM) solutions (lane 3). Lane 1 was run in the absence of the precipitating antibody. Lower graph: quantitative analyses of coIP experiments (** $p < 0.001$, compared with control). 500 μ g of proteins were used in each IP. Samples obtained from reserpinized animals.

receptors (Acosta-Garcia et al., 2009). The ED_{50} for dopamine was reduced from 584 nM (CI = 8156–205 nM) to 56 nM (CI = 105–28) by blocking CaMKII α with KN-62. The ED_{50} of PD 128,907 was not significantly changed by increasing SKF 38393 from 75 nM to 1 μ M (from 98 nM CI = 385–25 nM, to 71 nM CI = 412–4 nM) (Fig. 4C).

3.4. Stimulation of GABA release by D3 receptors and the cAMP/PKA signaling cascade

D3R stimulation of GABA release requires coactivation with D1Rs. These receptors in turn act by activating the cAMP/PKA cascade in the SNr (Nava-Asbell et al., 2007). To test whether activation of the cAMP/PKA cascade is sufficient to support the D3R potentiating effects we determined the effects of coactivating slices with PD 128,907 (100 nM) and forskolin (10 μ M) on [3 H]-GABA release (Fig. 5A). Forskolin had its typical stimulatory effects (Rangel-Barajas et al., 2008); however, coadministration with PD 128,907 either in the presence or absence of KN-62 was without any additional stimulatory effects (relative area forskolin + KN-62 = 6.50 ± 0.24 vs. forskolin + PD 128,907 + KN-62 = 6.42 ± 0.47 , $F = 22.17$; ns., $df = 4$; $n = 3$ experiments 4 replicates per experiment).

When signaling through the cAMP/PKA cascade was interrupted by using either the adenylyl cyclase blocker NKY80 (10 μ M, Onda et al., 2001) or the PKA blocker H89 (10 μ M, Chijiwa et al., 1990), the effects of both SKF 38393 and PD 128,907 were blocked (Fig. 5B, SKF 38393 + PD 128,907 + KN-62 = 10.12 ± 0.43 vs. SKF 38393 + PD 128,907 + KN-62 + NKY80 = 3.32 ± 0.49 , $F = 53.03$; $p < 0.001$; $df = 4$; $n = 3$ experiments 4 replicates. Fig. 5C, SKF 38393 + PD 128,907 + KN-62 = 11.36 ± 1.05 vs. SKF 38393 + PD 128,907 + KN-62 + H89 = 3.90 ± 0.18 , $F = 33.66$; $p < 0.001$; $df = 4$; $n = 4$ experiments 4 replicates). The slices treated with NKY80 or

H89 alone, GABA release was not significantly different from control.

3.5. KN-62 stimulates [3 H]-GABA release modulated by endogenous dopamine

Dendrites projecting from neurons in the substantia nigra pars compacta (SNc) provide dense dopaminergic innervation to the SNr (Wassef et al., 1981). In the depolarized slice, all the dopamine receptors are activated by release of dopamine from these structures modifying GABA release (Acosta-Garcia et al., 2009). The use of inhibitors in slices obtained from non-reserpinized animals reveals the presence of the modulatory processes activated by endogenous dopamine (Aceves et al., 1995; Radnikow and Misgeld, 1998; Ibanez-Sandoval et al., 2006; Acosta-Garcia et al., 2009; Aceves et al., 2011). In the non-reserpinized preparation perfusion with KN-62 enhanced K^+ -depolarization induced [3 H]-GABA release, indicating the presence of a CaMKII α sensitive component of GABA release (control = 3.36 ± 0.020 vs. KN-62 = 4.75 ± 0.21 , $F = 30.62$; $p < 0.05$; $df = 3$; $n = 4$ experiments four replicates, Fig. 6A). The selective D4 antagonist L 745,870 (100 nM) alone enhanced [3 H]-GABA release (control = 3.36 ± 0.020 vs. L 745,870 = 5.28 ± 0.018 , $F = 30.62$; $p < 0.01$; $df = 3$; $n = 4$ experiments four replicates). In the presence of the selective D4 antagonist L 745,870, the KN-62 stimulated component of [3 H]-GABA release was clearly evident (L 745,870 = 5.28 ± 0.18 vs. L 745,870 + KN-62 = 7.83 ± 0.75 , $F = 30.62$; $p < 0.001$; $df = 3$; $n = 4$ experiments, four replicates, Fig. 6A).

The selective D3R antagonist GR 103691 (100 nM) (Fig. 6B) blocked the KN-62 stimulated component in both control and L 745,870 treated tissues (control = 4.34 ± 0.21 vs. GR 103691 + KN-62 = 4.03 ± 0.27 , $F = 38.17$; $p < 0.05$; $df = 4$; $n = 3$ experiments, four replicates). The selective D1 antagonist SCH 23390 (100 nM)

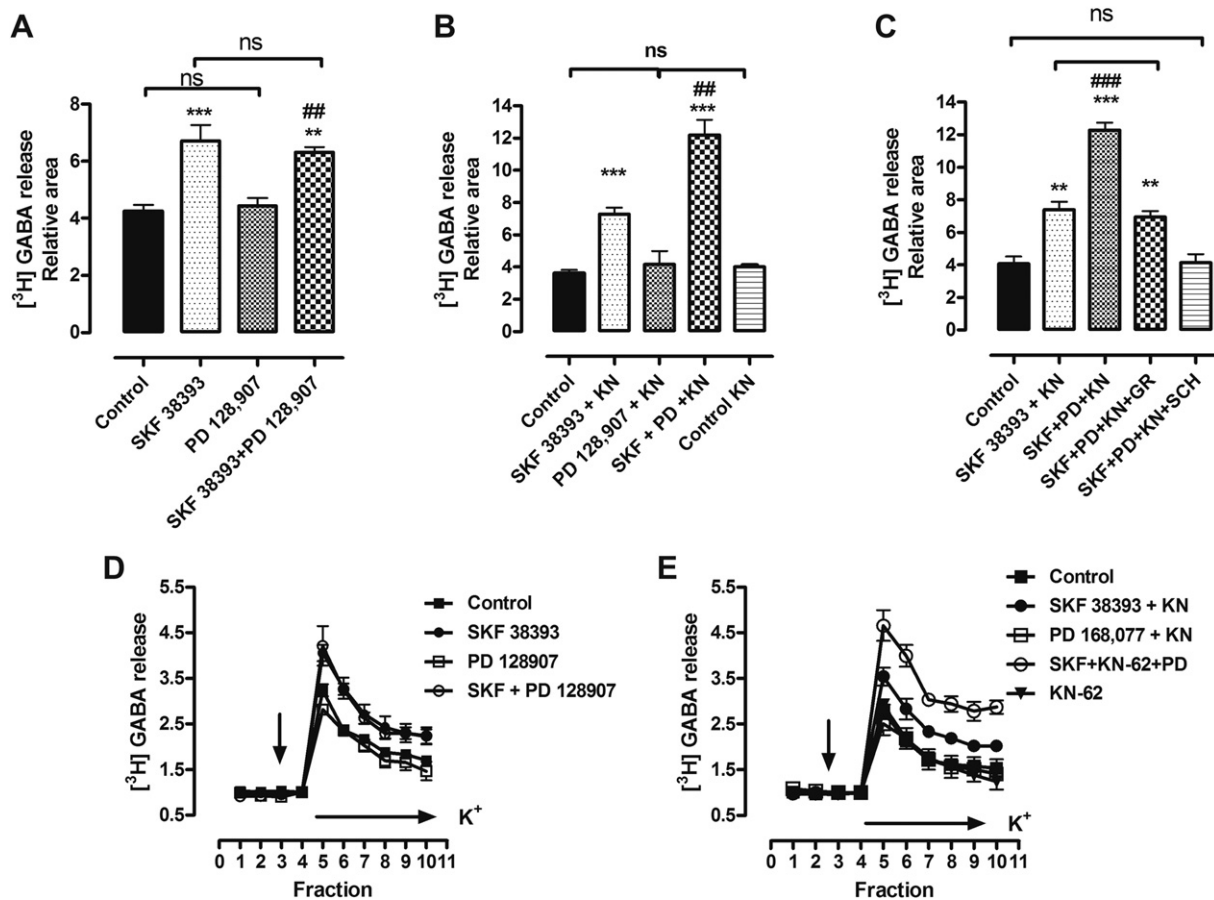


Fig. 3. A, B. Addition of D3R agonist does not potentiate the effect of D1R activation on K^+ -stimulated [3H]GABA release (A) unless the tissues are incubated with CaMKII α inhibitor KN-62 (B). C. When the two agonists were administered together with the D3 selective blocker GR 103691 (100 nM) the stimulation caused by PD 128,907 (100 nM) was blocked. The D1 blocker SCH 23390 blocked all the stimulatory response. D and E show the time courses of the responses of A and B. Vertical arrow indicates time when ligand perfusion was initiated; horizontal bar indicates initiation of perfusion with 15 mM K^+ solution. Significance of comparison of relative area of [3H]GABA release between control and treated tissues was expressed in all experiments as: ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Comparison of SKF + PD + KN-62 vs. SKF 38393 + KN-62, ### $p < 0.001$, ## $p < 0.01$. Comparison of SKF + PD + KN vs. PD 128,907 + KN, ns, not significant. Values: mean \pm standard error of the relative areas from [3H]GABA release, $n = 4-5$ experiments, 4–5 replicates per experiment. Samples obtained from reserpinized animals.

reduced K^+ -depolarization induced [3H]-GABA release (Fig. 6C) (control, = 3.97 ± 0.02 vs. SCH 23390 = 2.17 ± 0.09 , $F = 52.16$; $p < 0.05$; $df = 4$; $n = 3$ experiments 4 replicates). SCH 23390 also prevented the increase produced by KN-62 (Fig. 6C) showing that an active D1 receptor is required for this stimulatory response (SCH 23390 = 2.17 ± 0.08 vs. SCH 23390 + KN-62 = 2.27 ± 0.10 , $F = 52.16$; ns., $df = 4$; $n = 3$ experiments four replicates).

4. Discussion

4.1. CaMKII α modulates D3R receptor function in striatonigral terminals

These experiments establish that CaMKII α modulates D3R function in the SNr. In this structure D3R activation potentiates the stimulation of GABA release and cAMP accumulation produced by stimulation of D1Rs (Cruz-Trujillo et al., 2013). Two procedures, ionomycin and K^+ depolarization, that increase cytoplasmic [Ca^{2+}] blocked D3R mediated stimulation of adenylyl cyclase. The selective CaMKII α inhibitor KN-62 reversed these blocking effects indicating that CaMKII α activation mediates this response. In further agreement with this conclusion we found that the depolarization effects are Ca^{2+} -dependent: they were reversed by both Ca^{2+} -free solutions and nifedipine (Fig. 1). Moreover, we showed that K^+

depolarization increases both CaMKII α phosphorylation in a KN-62-sensitive manner and binding of CaMKII α to D3 receptors (Fig. 2).

Activation of D3R was without effects on [3H]-GABA release in K^+ depolarized slices unless binding of D3R to CaMKII α was prevented with KN-62 (Fig. 3), implying that activated CaMKII α blocks the effects of D3R stimulation. After CaMKII α inhibition, the effects of D3R activation in depolarized tissues were similar to those observed in non-depolarized tissues when GABA release was assayed by measuring mIPSCs (Cruz-Trujillo et al., 2013). In both cases, D3R stimulation enhanced GABA release only when coactivated with D1Rs. Taken together, these findings show that CaMKII α modulation occurs in the terminals of striatal spiny neurons because these are the only structures where D1Rs and D3Rs are coexpressed in a GABAergic terminal in the SNr (see Cruz-Trujillo et al., 2013). In agreement with this conclusion are the morphological observations of Fukunaga et al. (1988), showing that in the SNr neurites, but not cell somas, stain for CaMKII α .

The parallelism of the cellular effects described here and the behavioral studies of Marcellino et al. (2008), showing that D3Rs stimulate motor activity only when coactivated with D1Rs, is remarkable.

In the present study we did not detect effects of D1R and D3R agonists on basal [3H]-GABA release (Fig. 3). In contrast, when we assayed resting GABA release measuring mIPSCs, D1/D3 interactions were clearly detected (Cruz-Trujillo et al., 2013). The

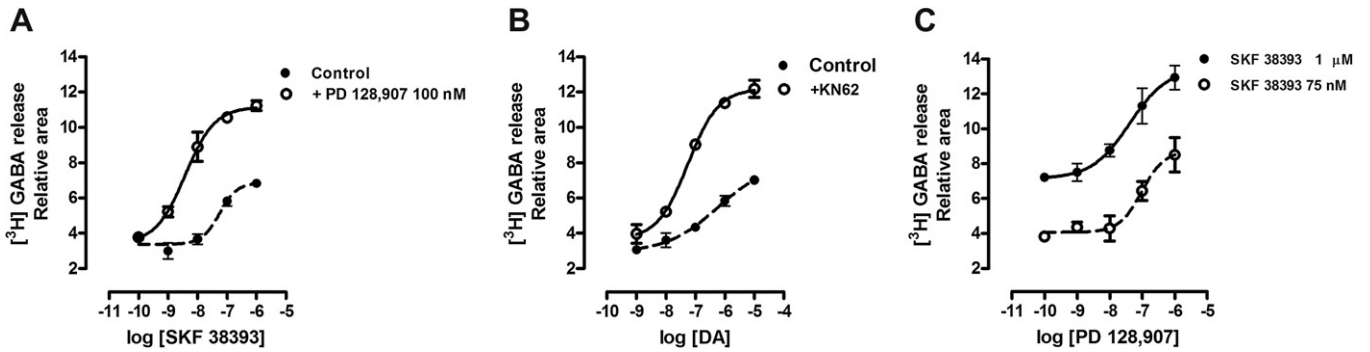


Fig. 4. Dose–response curve for SKF 38393, Dopamine and PD 128,907 on K^+ -stimulated [3H]GABA release. A. Dose–response curve of the selective D1 agonist SKF 38393 alone or in the presence of 10 nM of the D3 agonist PD 128,907 on [3H]GABA release (ED_{50} SKF 38393 alone 56.04 nM, $CI = 158–19$ nM, SKF 38393 in presence of PD 128,907 4.0, $CI = 8.89–1.65$ nM). B. Dose–response curve of dopamine alone or in the presence of CaMKII inhibitor KN-62 (4 μ M) on [3H]GABA release (ED_{50} dopamine alone 584 nM, $CI = 8156–205$ nM, dopamine determined in the presence of KN-62 56 nM, $CI = 105–28$ nM). C. Dose–response curve for the D3 selective agonist PD 128,907 determined in the presence of two doses of D1 agonist SKF 38393 1 μ M and 75 nM (ED_{50} PD 128,907 + SKF 38393 75 nM 98 nM, $CI = 385–25$ nM, PD 128,907 + SKF 38393 1 μ M, 71 nM, $CI = 412–4$ nM). Values mean \pm standard error of the relative areas from [3H]GABA release, $n = 5$ experiments per curve, 5 replicates per experiment.

difference in response using the two assay methods has been observed previously (compare Radnikow and Misgeld, 1998; Nava-Asbell et al., 2007). The failure to detect pharmacological effects on basal [3H]-GABA release may be explained because during the loading process labeled transmitter equilibrates with several compartments in the slice, including glia and GABAergic terminals that belong to several cell types with different pharmacological properties (Grofova, 1975; Ribak et al., 1980; Deniau et al., 1982). Since transmitter is released continuously from all these compartments, changes in release from a single compartment that contributes a small percentage of the total may be below the detection level.

Our experiments demonstrate that significant D3/CaMKII α interactions are more widespread than originally suggested by Liu et al. (2009). They proposed that D3/CaMKII α interaction were confined to the NAc because they did not observe it in other brain areas that they examined. The modulation of dopamine receptors by CaMKII α in the SNr is selective for D3Rs. KN-62 modified the effects PD 128,907 and of dopamine acting on D3Rs (Figs. 1, 3 and 4) but not the actions of D4 receptor antagonists L 745,870 or of D1R agonist SKF 38393 (Fig. 6).

4.2. Presynaptic effects of CaMKII α on D3 receptors

Liu et al. (2009) concluded that CaMKII α regulates postsynaptic D3R in the NAc because they found the receptors at a very high density in the purified postsynaptic density. Evidence showing that CaMKII α interacts with postsynaptic target proteins is abundant (Gardoni et al., 1998; Leonard et al., 1999; Strack et al., 1997; Merrill et al., 2005; Colbran and Brown, 2004; Bayer et al., 2006). Our experiments demonstrate that D3/CaMKII α interactions modulate presynaptic function because they inhibit Ca^{2+} -dependent depolarization-induced [3H]GABA release. Other findings also show that CaMKII α regulates presynaptic properties including excitability, development, vesicle dynamics, and neurosecretion (Griffith, 2004; Shakiryanova et al., 2007; Wang, 2008; de Jong and Verhage, 2009; Wong et al., 2009; Carrillo et al., 2010).

Several studies indicate that Ca^{2+} release from endoplasmic reticulum is determinant for CaMKII α regulation of release of neurotransmitters, neuropeptides, and neurotrophins (He et al., 2000; Jin and Hawkins, 2003; Kubota et al., 2005; Kolarow et al., 2007; Shakiryanova et al., 2007). In the present experiments we used procedures that produce large increases in Ca^{2+} entry

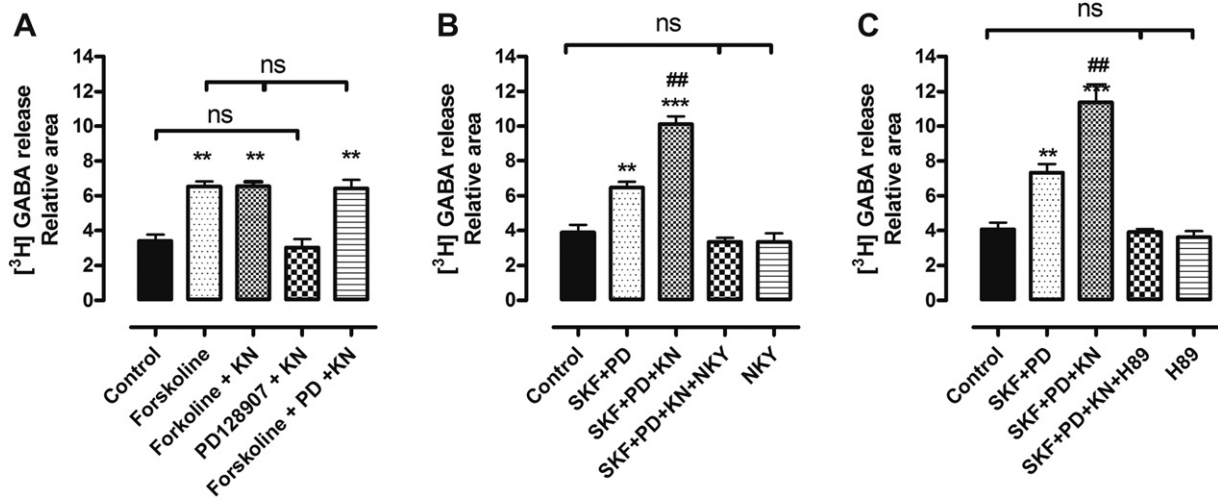


Fig. 5. Role of the cAMP signaling cascade in the response of K^+ -stimulated [3H]GABA release to D1/D3 receptor coactivation and CaMKII blockade. A. Effects of KN-62 (4 μ M) and PD 128,907 (100 nM) on forskolin (10 μ M) stimulated [3H]GABA release. B and C. Effects of the adenylyl cyclase V/VI inhibitor NKY80 (10 μ M) and the PKA inhibitor H89 (10 μ M) on D1/D3 stimulated [3H]GABA release in presence of KN-62. $**p < 0.01$ and $***p < 0.001$; compared with control. $##p < 0.01$ SKF + PD + KN vs. SKF + PD; ns, not significant. Values: mean \pm standard error of the relative areas from [3H]GABA release, $n = 3–4$ experiments, 4–5 replicates per experiment. Samples obtained from reserpinized animals.

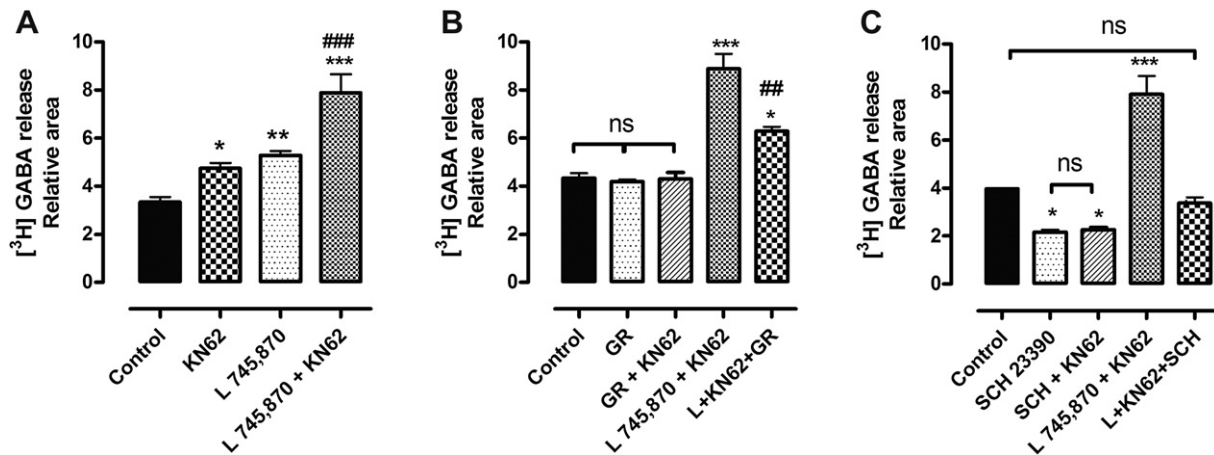


Fig. 6. Effects of KN-62 on [³H]GABA release in slices of non-reserpinized animals and their modification by D4, D3 and D1 antagonists. A. KN-62 enhances release in both control and L 745,870 treated slices. B. The selective D3 antagonist GR 103691 prevents the effects of KN-62 on control and a fraction of L 745,870 treated slices. C. The selective D1 antagonist SCH 23390 prevents KN-62 enhancement of GABA release. **p* < 0.05, ***p* < 0.01 and ****p* < 0.001 compared with control; ##*p* < 0.01 with respect L 745,870 + KN-62; ###*p* < 0.001 compared with L 745,870 alone; ns, not significant. Values mean ± standard error of the relative areas from [³H]GABA release, *n* = 3–4 experiments, 4–5 replicates per experiment.

(Nachshen, 1985; Verhage et al., 1988, 1989). Evidently, subsequent Ca²⁺-induced Ca²⁺ release could be important in magnifying the changes in cytoplasmic [Ca²⁺], however, its contribution was not experimentally examined in the present study.

4.3. D3 receptors, stimulation of GABA release and the cAMP/PKA cascade

In some brain structures activation of D1Rs and D3Rs have antagonistic effects; D3R interact with Gi proteins inhibiting D1R effects mediated by Gs proteins (Schwartz et al., 1998; Liu et al., 2009). In other areas D3R and D1R have synergistic effects: D3Rs enhance D1R mediated stimulation of adenylyl cyclase (SNr, Islands of Calleja, striatum and cultured cells). In these instances (Schwartz et al., 1998; Fiorentini et al., 2008; Marcellino et al., 2008; Cruz-Trujillo et al., 2013), as in our experiments (Figs. 1, 3 and 6), stimulation of D3Rs is effective only when D1Rs are activated concomitantly. Some of these investigators (Fiorentini et al., 2008; Marcellino et al., 2008) have studied these interactions in the striatum and in transfected cells and conclude that coactivation is necessary because the responses are generated through heterodimer formation. The lack of effects of D3R activation in slices where cAMP production was enhanced by forskolin (Fig. 5A) indicates that increased activity of adenylyl cyclase does not confer D3R sensitivity to the release process and indicates that D1/D3 interactions occur upstream in the signaling cascade.

The parallel effects of D3R stimulation on GABA release and on cAMP accumulation further support the concept that coactivation effects involve increased cytoplasmic cAMP levels. This conclusion is in agreement with evidence showing that activity of the cAMP/PKA cascade is a major determinant of GABA release in the SNr (Nava-Asbell et al., 2007). The suppression of the responses by inhibitors of adenylyl cyclase and cAMP-dependent kinase (Fig. 5) further support this point.

When D1R and D3R receptors were coactivated, the ED₅₀ for SKF 38393 was shifted from 56.04 to 4.0 nM (Fig. 4) indicating that D3R increases the affinity of D1Rs for its ligands. The ED₅₀ for dopamine was reduced by KN-62 from 584 to 56 nM. Since activation of D3Rs by dopamine is blocked by CaMKIIα activation during K⁺ depolarization, the effects of KN-62 are due to the reversal of D3R blockade by CaMKIIα. These effects on receptor affinity imply that during D3R activation *in vivo*, D1R are responsive to much lower concentrations of dopamine than those that activate the latter receptor alone.

Other studies are in agreement with this finding. D3R stimulation increased the affinity of D1Rs in striatal proteins and in transfected cells (Marcellino et al., 2008; Fiorentini et al., 2008). In the transfected cells, D1-D3 coactivation modifies receptor traffic. D3R stimulation reduced agonist-induced D1R cytoplasmic sequestration (Fiorentini et al., 2008).

4.4. Activity dependent modulation of GABA release by D3 receptor/ CaMKIIα interactions

Action potential firing can activate CaMKIIα (Shakiryanova et al., 2011). The activation is slow and frequency dependent: at low frequencies no enzyme activation was detected, however, when neurons fired at high frequency, significant CaMKIIα signaling was detected. These observations and our findings showing that depolarization induces Ca²⁺-dependent CaMKIIα activity that modulates D3R function in the SNr implies that the rate of target neuron firing can modulates dopamine receptor activity. The results of Shakiryanova et al. (2011) suggest that at low rates of action potential firing CaMKIIα will be inactive and D3R would be fully functional while when bursts of high frequency discharges occur the enzyme will be active and turn D3Rs off.

The results of Shakiryanova et al. (2011) taken together with our findings could thus provide the basis of a complex regulation of neuronal function by D3/CaMKIIα interactions. During low frequency of discharge of neurons where D1Rs and D3Rs have synergistic effects, D3R activation would sensitize D1Rs, magnifying their responses. In contrast, high frequencies would interfere with the synergistic interactions. In structures where D1R and D3R activation are antagonistic, D3R would act as a brake for D1R responses at low frequencies while high frequencies would activate CaMKIIα and remove the braking effects.

Acknowledgments

The work was supported by a grant (152326) from CONACyT (México) to BF. We thank Dr. Mimi Halpern for correcting our manuscript.

References

- Aceves, J., Floran, B., Sierra, A., Mariscal, S., 1995. D-1 receptor mediated modulation of the release of gamma-aminobutyric acid by endogenous dopamine in the basal ganglia of the rat. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 19, 727–739.

- Aceves, J., Rueda-Orozco, P.E., Hernandez, R., Plata, V., Ibanez-Sandoval, O., Galarraga, E., Vargas, J., 2011. Dopaminergic presynaptic modulation of nigral afferents: its role in the generation of recurrent bursting in substantia nigra pars reticulata neurons. *Front. Syst. Neurosci.* 5, 6.
- Acosta-García, J., Hernandez-Chan, N., Paz-Bermudez, F., Sierra, A., Erlij, D., Aceves, J., Floran, B., 2009. D4 and D1 dopamine receptors modulate [3H] GABA release in the substantia nigra pars reticulata of the rat. *Neuropharmacology* 57, 725–730.
- Alexander, S.P., 1995. The measurement of cyclic AMP levels in biological preparations. *Methods Mol. Biol.* 41, 79–89.
- Arturo, A., Rangel, C., Isaac, S., Cruz, R., Aceves, J., Erlij, D., Floran, G.B., 2010. Intracellular Ca^{2+} regulates dopamine D3 receptor effects on GABA release by striatonigral terminals of the rat via activation of CaMKII. *Neuroscience. Abstr.* 741.12.
- Bayer, K.U., LeBel, E., McDonald, G.L., O'Leary, H., Schulman, H., De Koninck, P., 2006. Transition from reversible to persistent binding of CaMKII to postsynaptic sites and NR2B. *J. Neurosci.* 26, 1164–1174.
- Bernath, S., 1992. Calcium-independent release of amino acid neurotransmitters: fact or artifact? *Prog. Neurobiol.* 38, 57–91.
- Bouthenet, M.L., Souil, E., Martres, M.P., Sokoloff, P., Giros, B., Schwartz, J.C., 1991. Localization of dopamine D3 receptor mRNA in the rat brain using in situ hybridization histochemistry: comparison with dopamine D2 receptor mRNA. *Brain Res.* 564, 203–219.
- Carrillo, R.A., Olsen, D.P., Yoon, K.S., Keshishian, H., 2010. Presynaptic activity and CaMKII modulate retrograde semaphorin signaling and synaptic refinement. *Neuron* 68, 32–44.
- Chijiwa, T., Mishima, A., Hagiwara, M., Sano, M., Hayashi, K., Inoue, T., Hidaka, H., 1990. Inhibition of forskolin-induced neurite outgrowth and protein phosphorylation by a newly synthesized selective inhibitor of cyclic AMP-dependent protein kinase, N-[2-(p-bromocinnamylamino)ethyl]-5-isoquinolinesulfonamide (H-89), of PC12D pheochromocytoma cells. *J. Biol. Chem.* 265, 5267–5272.
- Colbran, R.J., Brown, A.M., 2004. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II and synaptic plasticity. *Curr. Opin. Neurobiol.* 14, 318–327.
- Cruz-Trujillo, R., Avalos-Fuentes, A., Rangel-Barajas, C., Paz-Bermudez, F., Sierra, A., Escartin-Perez, E., Aceves, J., Erlij, D., Floran, B., 2013. D3 dopamine receptors interact with dopamine D1 but not D4 receptors in the GABAergic terminals of the SNr of the rat. *Neuropharmacology* 67, 370–378.
- de Jong, A.P., Verhage, M., 2009. Presynaptic signal transduction pathways that modulate synaptic transmission. *Curr. Opin. Neurobiol.* 19, 245–253.
- Deniau, J.M., Kitai, S.T., Donoghue, J.P., Grofova, I., 1982. Neuronal interactions in the substantia nigra pars reticulata through axon collaterals of the projection neurons. An electrophysiological and morphological study. *Exp. Brain Res.* 47, 105–113.
- Everett, P.B., Senogles, S.E., 2010. D3 dopamine receptor signals to activation of phospholipase D through a complex with Rho. *J. Neurochem.* 112, 963–971.
- Fiorentini, C., Busi, C., Gorruso, E., Gotti, C., Spano, P., Missale, C., 2008. Reciprocal regulation of dopamine D1 and D3 receptor function and trafficking by heterodimerization. *Mol. Pharmacol.* 74, 59–69.
- Fukunaga, K., Goto, S., Miyamoto, E., 1988. Immunohistochemical localization of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II in rat brain and various tissues. *J. Neurochem.* 51, 1070–1078.
- García, M., Floran, B., Arias-Montano, J.A., Young, J.M., Aceves, J., 1997. Histamine H3 receptor activation selectively inhibits dopamine D1 receptor-dependent [3H] GABA release from depolarization-stimulated slices of rat substantia nigra pars reticulata. *Neuroscience* 80, 241–249.
- Gardoni, F., Caputi, A., Cimino, M., Pastorino, L., Cattabeni, F., Di Luca, M., 1998. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II is associated with NR2A/B subunits of NMDA receptor in postsynaptic densities. *J. Neurochem.* 71, 1733–1741.
- Griffith, L.C., 2004. Regulation of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II activation by intramolecular and intermolecular interactions. *J. Neurosci.* 24, 8394–8398.
- Grofova, I., 1975. The identification of striatal and pallidal neurons projecting to substantia nigra. An experimental study by means of retrograde axonal transport of horseradish peroxidase. *Brain Res.* 91, 286–291.
- He, X., Yang, F., Xie, Z., Lu, B., 2000. Intracellular Ca^{2+} and Ca^{2+} /calmodulin-dependent kinase II mediate acute potentiation of neurotransmitter release by neurotrophin-3. *J. Cell. Biol.* 149, 783–792.
- Huang, C.C., Hsu, K.S., 2012. Activation of NMDA receptors reduces metabotropic glutamate receptor-induced long-term depression in the nucleus accumbens via a CaMKII-dependent mechanism. *Neuropharmacology* 63, 1298–1307.
- Hudmon, A., Schulman, H., 2002. Neuronal Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II: the role of structure and autoregulation in cellular function. *Annu. Rev. Biochem.* 71, 473–510.
- Ibanez-Sandoval, O., Hernandez, A., Floran, B., Galarraga, E., Tapia, D., Valdiosera, R., Erlij, D., Aceves, J., Vargas, J., 2006. Control of the subthalamic innervation of substantia nigra pars reticulata by D1 and D2 dopamine receptors. *J. Neurophysiol.* 95, 1800–1811.
- Jin, L., Hawkins, R.D., 2003. Presynaptic and postsynaptic mechanisms of a novel form of homosynaptic potentiation at aplysia sensory-motor neuron synapses. *J. Neurosci.* 23, 7288–7297.
- Kelly, P.T., McGuinness, T.L., Greengard, P., 1984. Evidence that the major postsynaptic density protein is a component of a Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 81, 945–949.
- Kolarow, R., Brigadski, T., Lessmann, V., 2007. Postsynaptic secretion of BDNF and NT-3 from hippocampal neurons depends on calcium calmodulin kinase II signaling and proceeds via delayed fusion pore opening. *J. Neurosci.* 27, 10350–10364.
- Kubota, M., Narita, K., Murayama, T., Suzuki, S., Soga, S., Usukura, J., Oganawa, Y., Kuba, K., 2005. Type-3 ryanodine receptor involved in Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release and transmitter exocytosis at frog motor nerve terminals. *Cell Calcium* 38, 557–567.
- Leonard, A.S., Lim, I.A., Hemsworth, D.E., Horne, M.C., Hell, J.W., 1999. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II is associated with the N-methyl-D-aspartate receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 3239–3244.
- Lisman, J., Schulman, H., Cline, H., 2002. The molecular basis of CaMKII function in synaptic and behavioural memory. *Nat. Rev. Neurosci.* 3, 175–190.
- Liu, X.Y., Mao, L.M., Zhang, G.C., Papasian, C.J., Fibuch, E.E., Lan, H.X., Zhou, H., Xu, M., Wang, J.Q., 2009. Activity-dependent modulation of limbic dopamine D3 receptors by CaMKII. *Neuron* 61, 425–438.
- Marcellino, D., Ferre, S., Casado, V., Cortes, A., Le Foll, B., Mazzola, C., Drago, F., Saur, O., Stark, H., Soriano, A., Barnes, C., Goldberg, S., Lluís, C., Fuxe, K., Franco, R., 2008. Identification of dopamine D1–D3 receptor heteromers. Indications for a role of synergistic D1–D3 receptor interactions in the striatum. *J. Biol. Chem.* 283, 26016–26025.
- Merrill, M.A., Chen, Y., Strack, S., Hell, J.W., 2005. Activity-driven postsynaptic translocation of CaMKII. *Trends Pharmacol. Sci.* 26, 645–653.
- Nachshen, D.A., 1985. Regulation of cytosolic calcium concentration in presynaptic nerve endings isolated from rat brain. *J. Physiol.* 363, 87–101.
- Nava-Asbell, C., Paz-Bermudez, F., Erlij, D., Aceves, J., Floran, B., 2007. GABA(B) receptor activation inhibits dopamine D1 receptor-mediated facilitation of [(3)H]GABA release in substantia nigra pars reticulata. *Neuropharmacology* 53, 631–637.
- Neve, K.A., Seamans, J.K., Trantham-Davidson, H., 2004. Dopamine receptor signaling. *J. Recept. Signal Transduct. Res.* 24, 165–205.
- Onda, T., Hashimoto, Y., Nagai, M., Kuramochi, H., Saito, S., Yamazaki, H., Toya, Y., Sakai, I., Homey, C.J., Nishikawa, K., Ishikawa, Y., 2001. Type-specific regulation of adenylyl cyclase. Selective pharmacological stimulation and inhibition of adenylyl cyclase isoforms. *J. Biol. Chem.* 276, 47785–47793.
- Paxinos, G., Watson, C., 1997. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press, San Diego, CA.
- Radnikow, G., Misgeld, U., 1998. Dopamine D1 receptors facilitate GABA synaptic currents in the rat substantia nigra pars reticulata. *J. Neurosci.* 18, 2009–2016.
- Rangel-Barajas, C., Silva, I., Garcia-Ramirez, M., Sanchez-Lemus, E., Floran, B., Aceves, J., Erlij, D., Floran, B., 2008. 6-OHDA-induced hemiparkinsonism and chronic L-DOPA treatment increase dopamine D1-stimulated [(3)H]GABA release and [(3)H]-cAMP production in substantia nigra pars reticulata of the rat. *Neuropharmacology* 55, 704–711.
- Rangel-Barajas, C., Silva, I., Lopez-Santiago, L.M., Aceves, J., Erlij, D., Floran, B., 2011. L-DOPA-induced dyskinesia in hemiparkinsonian rats is associated with up-regulation of adenylyl cyclase type VI and increased GABA release in the substantia nigra reticulata. *Neurobiol. Dis.* 41, 51–61.
- Ribak, C.E., Vaughn, J.E., Roberts, E., 1980. GABAergic nerve terminals decrease in the substantia nigra following hemitransections of the striatonigral and pallidostriatal pathways. *Brain Res.* 192, 413–420.
- Schwartz, J.C., Diaz, J., Bordet, R., Griffon, N., Perachon, S., Pilon, C., Ridray, S., Sokoloff, P., 1998. Functional implications of multiple dopamine receptor subtypes: the D1/D3 receptor coexistence. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 26, 236–242.
- Shakiryanova, D., Klöse, M.K., Zhou, Y., Gu, T., Deitcher, D.L., Atwood, H.L., Hewes, R.S., Levitan, E.S., 2007. Presynaptic ryanodine receptor-activated calmodulin kinase II increases vesicle mobility and potentiates neuropeptide release. *J. Neurosci.* 27, 7799–7806.
- Shakiryanova, D., Morimoto, T., Zhou, C., Chouhan, A.K., Sigrist, S.J., Nose, A., Macleod, G.T., Deitcher, D.L., Levitan, E.S., 2011. Differential control of presynaptic CaMKII activation and translocation to active zones. *J. Neurosci.* 31, 9093–9100.
- Sokoloff, P., Giros, B., Martres, M.P., Bouthenet, M.L., Schwartz, J.C., 1990. Molecular cloning and characterization of a novel dopamine receptor (D3) as a target for neuroleptics. *Nature* 347, 146–151.
- Strack, S., Choi, S., Lovinger, D.M., Colbran, R.J., 1997. Translocation of autophosphorylated calcium/calmodulin-dependent protein kinase II to the postsynaptic density. *J. Biol. Chem.* 272, 13467–13470.
- Tao-Cheng, J.H., Dosemeci, A., Winters, C.A., Reese, T.S., 2006. Changes in the distribution of calcium calmodulin-dependent protein kinase II at the presynaptic bouton after depolarization. *Brain Cell Biol.* 35, 117–124.
- Tokumitsu, H., Chijiwa, T., Hagiwara, M., Mizutani, A., Terasawa, M., Hidaka, H., 1990. KN-62, 1-[N, O-bis(5-isoquinolinesulfonyl)-N-methyl-L-tyrosyl]-4-phenylpiperazine, a specific inhibitor of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II. *J. Biol. Chem.* 265, 4315–4320.
- Verhage, M., Besselsen, E., Lopes Da Silva, F.H., Ghijsen, W.E., 1988. Evaluation of the Ca^{2+} concentration in purified nerve terminals: relationship between Ca^{2+} homeostasis and synaptosomal preparation. *J. Neurochem.* 51, 1667–1674.
- Verhage, M., Besselsen, E., Lopes da Silva, F.H., Ghijsen, W.E., 1989. Ca^{2+} -dependent regulation of presynaptic stimulus-secretion coupling. *J. Neurochem.* 53, 1188–1194.
- Wang, Z.W., 2008. Regulation of synaptic transmission by presynaptic CaMKII and BK channels. *Mol. Neurobiol.* 38, 153–166.
- Wassef, M., Berod, A., Sotelo, C., 1981. Dopaminergic dendrites in the pars reticulata of the rat substantia nigra and their striatal input. Combined immunocytochemical localization of tyrosine hydroxylase and anterograde degeneration. *Neuroscience* 6, 2125–2139.
- Wong, M.Y., Shakiryanova, D., Levitan, E.S., 2009. Presynaptic ryanodine receptor-CaMKII signaling is required for activity-dependent capture of transiting vesicles. *J. Mol. Neurosci.* 37, 146–150.