

ACTIVITY-DEPENDENT MODULATION OF HIPPOCAMPAL SYNAPTIC PLASTICITY VIA PirB AND ENDOCANNABINOIDS

Presentado por:

•David Villaltamartín; Carrera de Biomedicina.
•Sofía Sánchez-Izquierdo; Carrera de Farmacia
Universidad Francisco de Vitoria, Madrid.

Autores:

Maja Djurisić¹, Barbara K. Brott¹, Nay L. Saw², Mehrdad Shamloo^{2,3}, Carla J. Shatz¹

Maja Djurisić, Barbara K. Brott, Carla J. Shatz; Departments of Biology and Neurobiology and Bio-X, Stanford University, Stanford, CA 94305, USA.

Nay L. Saw, Mehrdad Shamloo; Behavioral and Functional Neuroscience Laboratory, Stanford University School of Medicine, Stanford, CA 94305, USA.

Mehrdad Shamloo; Behavioral and Functional Neuroscience Laboratory and Department of Neurosurgery, Stanford University School of Medicine, Stanford, CA 94305, USA.



INTRODUCCIÓN

El umbral de plasticidad sináptica Hebbiana del SNC está modulada por la actividad sináptica anterior. A su vez, la transmisión sináptica entre las regiones CA3-CA1 del hipocampo está regulada por la señalización retrógrada endocannabinoide, que mantiene un balance LTP/LTD.

PirB es un receptor del sistema inmune innato de MHC-I que se expresa en neuronas piramidales excitatorias del cerebro frontal de ratones. En modelos de ratón que carecen de este receptor, se produce un aumento del 50% en la densidad de espinas dendríticas y en la sinapsis glutamatérgica frente a ratones WT. Tiene lugar un descenso de LTD en las sinapsis CA3-CA1, acompañado de un aumento de LTP.

OBJETIVOS

El objetivo de este estudio consiste en averiguar cómo los receptores PirB (Paired Immunoglobulin-like Receptor-B) influyen en la plasticidad Hebbiana mediante la modulación de la actividad de señalización retrógrada endocannabinoide, y si esto puede derivar en una mejora del aprendizaje. Para ello se van a llevar a cabo distintos estudios en cortes de cerebro de ratones sanos con el receptor PirB funcional en la sinapsis CA3-CA1 hipocampal (Pyr-WT) y ratones knock out del receptor PirB (Pyr-KO).

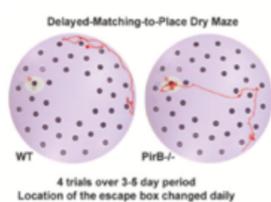
MATERIAL Y MÉTODOS

Experimentos llevados a cabo de acuerdo con la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de los Institutos Nacionales de Salud, y aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de la Universidad de Stanford. Cumplen también con las políticas de la Sociedad de Neurociencia en el uso de animales y humanos en investigación de neurociencia.

1. DELAYED MATCH-TO-PLACE TASK (DMPT)

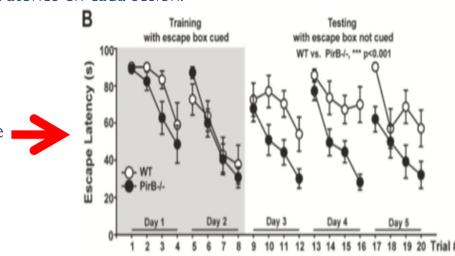
Modelo experimental: línea germinal de ratones Pir^{-/-} con delección condicional postnatal de Pir y ratones WT. Ratones machos, adultos, o rodajas del día postnatal 90 o posterior.

Método: evaluación del aprendizaje y la memoria empleando el laberinto seco de Barnes. Cada ratón realiza 4 ensayos en un período de 3-5 días. En cada ensayo el ratón busca la caja de escape, cuya posición cambia diariamente de forma que los animales tienen que adquirir información adicional que se va a emplear sólo para un período de tiempo. El cuarto día de ensayo se superponen las imágenes de los recorridos realizados por los ratones en cada sesión.



RESULTADO:

Al inicio del entrenamiento, ambos genotipos tuvieron el mismo comportamiento. Sin embargo, entre los días 3 y 5 de ensayos en los que se emplearon las mismas señales visuales, pero sin marcar la caja de escape, PirB^{-/-} obtuvo unos resultados significativamente mejores con latencias de escape más cortas. También se midieron los "ahorros" de tiempo y distancia que hacen los dos modelos en cada ensayo, siendo mayores en Pir^{-/-}.



2. CONDITIONAL DELETION OF PirB IN EXCITATORY PYRAMIDAL CELLS:

Modelo experimental: consta de una serie de ratones (entre 3 y 6), de dos tipos: PirB fl/fl (Pyr-KO) y PirB^{+/+} (Pyr-WT). En el caso A se induce LTP con 4 x 100 Hz, en el B se induce LTD con 900 pulsos a 1 Hz, el C es igual que el B solo que se induce con 0,5 Hz, el D es un resumen de LTP y LTD contrastado con la frecuencia de inducción en Pyr-KO comparada con Pyr-WT y por último el E se trata de una gráfica de barras de las relaciones medias de PPR.

Método: se induce una cantidad de LTP o LTD a una frecuencia determinada en cada una de las pruebas a dos tipos de ratones: unos WT y otros KO. Los resultados se recogen en una gráfica donde se represente el tiempo (eje X) y variabilidad de los potenciales en cada uno de los ratones.

RESULTADO:

(A) Con la inducción de LTP se observa un incremento del 145% en fEPSP con respecto a la línea base en los Pyr-WT. En las Pyr-KO la misma inducción genera un aumento del 180% y más persistente.

(B) Cuando se induce LTD en Pyr-KO o en Pyr-WT, se detecta la presencia de LTD en las WT pero en las KO el LTD está ausente aunque se observa una pequeña cantidad de LTP. LTP y LDP en CA3-CA1 en animales WT son dependientes de los receptores NMDA porque en presencia del bloqueador de NMDA, D-AP5, ambos fueron abolidos.

En ausencia de PirB, el LTD debe seguir estando presente, se examina esa posibilidad se realiza de nuevo el test pero a una frecuencia menor, y se observa un aumento, pero mucho menor que cuando se realizó antes.

Así sabemos que la expresión de PirB en las neuronas excitadas del hipocampo es necesario para los cambios bidireccionales en la actividad sináptica dependiente de NMDAR.

4. ACTIVACIÓN DE CB1R Y mGluR (COMPONENTES OBLIGATORIOS DEL SISTEMA ENDOCANABINOIDE):

5. Estudios de la funcionalidad del sistema de señalización endocannabinoide CA3-CA1 en ausencia de PirB (en ratones Pyr-KO)

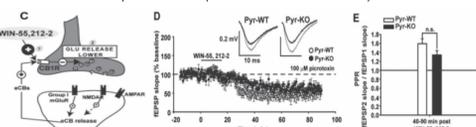
Procedimiento: Anova de 2 vías RM. Insets: fEPSP traza ejemplos de cortes Pyr-WT y Pyr-KO antes (línea gris) y tras la inducción (línea negra) de WIN-LTD (d) o DHPG-LTD (g); cada trazo es un promedio de 30 trazados individuales tomados al inicio o a los 75-90 minutos después de la inducción.

A) ACTIVACIÓN DE LOS RECEPTORES CB1R MEDIANTE EL AGONISTA WIN-55,212-2.

Gráfico C: Representación del efecto del agonista WIN-55,212-2 sobre los receptores CB1 que resulta en una menor liberación de glutamato y, por tanto, la reducción de la sinapsis excitatoria.

Gráfico D: La aplicación de un baño de 5 µM del agonista WIN-55,212-2 durante 15 minutos induce un LTD persistente en Pyr-WT (8 rodajas/4 ratones) y en Pyr-KO respecto a sus líneas de base.

Gráfico E: PPR promedio para WIN-LTD en Pyr-WT frente a Pyr-KO.



RESULTADO

El agonista genera un LTD químico en un grado similar tanto en Pyr-WT como en Pyr-KO por la reducción de la liberación de glutamato al espacio sináptico. La PPR también aumenta en ambos genotipos. Estos resultados sugieren que los receptores CB1R son completamente funcionales en Pyr-KO, y que la señalización de CB1R también es normal.

3. BLOCKADE OF CB1R IN Pyr-WT PHENOCOPIES LTP ALTERNATIONS IN Pyr-KO.

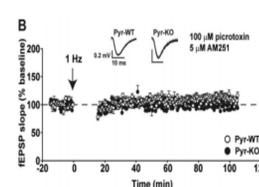
Base teórica del método: síntesis y liberación retrógrada de endocannabinoides en respuesta a un estímulo de plasticidad inducida, el agonista inverso AM251.

La estimulación sináptica desencadena la liberación de glutamato desde la neurona presináptica para su unión a los receptores postsinápticos AMPAR, NMDAR y mGluR Grupo I. La activación de los dos últimos promueve la síntesis y liberación de los endocannabinoides, que se van a unir a sus receptores CB1 de la neurona presináptica. Esta unión conlleva la inhibición de liberación de neurotransmisores.

Se emplea un agonista inverso, AM251 que reduce la activación de los CB1R por debajo de su nivel basal, con lo que se consigue una liberación de glutamato superior a la normal.

Procedimiento: 2 vías RM Anova. Los promedios son promedios de 20 a 90 min post-inducción.

Insets: fEPSP traza ejemplos de cortes Pyr-WT e Pyr-KO antes (línea gris) o después inducción (línea negra) de LTD (b) o LTP (c); cada trazo es promedio de 30 trazas individuales tomadas al inicio del estudio o a los 75-90 minutos después de la inducción.



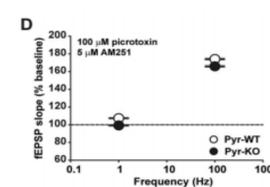
(B) Sinapsis LTD:

En Pyr-WT se suministran 5 µM de AM251. En ellos las sinapsis LTD (1 Hz) quedan suspendidas.

En Pyr-KO la adición de la misma cantidad del agonista inverso resulta en una pendiente post-inducción fEPSP del 99.2% ± 0.63%.

(C) Sinapsis LTP:

En ratones Pyr-WT se administran 5 µM de AM251. En ellos las sinapsis LTP aumentan en relación con el grupo control, e incluso supera ligeramente las medidas obtenidas del grupo Pyr-KO en presencia de la misma cantidad de AM251.



(D) Resumen y representación de las medidas obtenidas de LTP y LTD frente a la frecuencia de inducción en Pyr-WT y Pyr-KO tras haber administrado 5 µM AM251.

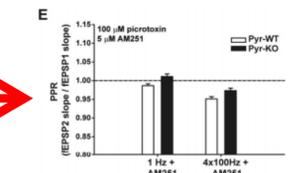
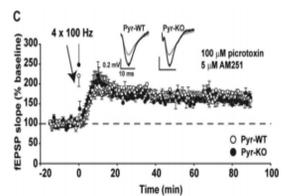
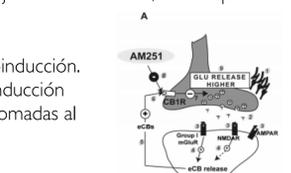
Se hace visible la ausencia de LTD en ambos grupos de ratones.

(E) Estudio de los pulsos pareados (PPR) en ambos grupos en presencia del agonista inverso.

Las diferencias en PPR en Pyr-WT y Pyr-KO observadas en el grupo control tras la inducción de LTD y LTP son eliminadas.

PPR tras inducción de 1 Hz: Pyr-WT: 0.99 ± vs. Pyr-KO: 1.01 ± 0.01; p = 0.02.

PPR tras inducción de 4 x 100Hz: Pyr-WT: 0.95 ± 0.01 vs. Pyr-KO: 0.97 ±



RESULTADO:

Estos resultados en conjunto sugieren que en el modelo Pyr-KO, la liberación de endocannabinoides y la posterior inducción de señalización de sus receptores CB1 están inhibidos. Esto tiene su explicación en la importante función que desempeña PirB en la señalización de endocannabinoides, tanto LTP como LTD, en las sinapsis CA3-CA1.

B) ACTIVACIÓN DE LOS RECEPTORES mGluR DEL GRUPO I MEDIANTE EL AGONISTA DHPG.

Gráfico F: Representación del efecto de DHPG, agonista de los receptores mGluR del grupo I. Se une a estos receptores, inducen la liberación de endocannabinoides y su posterior unión a los receptores CB1 induciendo la disminución de la liberación de glutamato y, por tanto, de la sinapsis excitatoria.

Gráfico G: La aplicación de un baño de 100µM del agonista DHPG durante 15 minutos induce un LTD prominente tanto en Pyr-WT como en Pyr-KO en relación a sus líneas base.

Gráfico H: Promedio de PPR tras la aplicación de DHPG. Enfrentamiento de los resultados obtenidos en Pyr-WT y Pyr-KO durante LTD inducida por DHPG (30-90 minutos post DHPG).

RESULTADO

La activación de mGluR del grupo I DHPG genera DHPG-LTD sostenido similar en las sinapsis CA3-CA1 tanto de Pyr-WT como de Pyr-KO.

PPR aumentó +/- 2,5 veces durante DHPG-LTD en ambos genotipos.

