

# ASTROCYTIC p38 $\alpha$ MAPK DRIVES NMDA RECEPTOR-DEPENDENT LONG-TERM DEPRESSION AND MODULATES LONG-TERM MEMORY

## Presentado por:

Sara Amigo Guillén<sup>1</sup>, Martina Marsino<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Carrera de Biomedicina, Universidad Francisco de Vitoria, Madrid

## Autores:

Marta Navarrete<sup>1,2</sup>, María I. Cuartero<sup>1</sup>, Rocío Palenzuela<sup>1,3</sup>, Jonathan E. Draffin<sup>1</sup>, Ainoa Konomi<sup>1</sup>, Irene Serra<sup>2</sup>, Sandra Colié<sup>4</sup>, Sergio Castaño-Castaño<sup>5</sup>, Mazahir T. Hasan<sup>5,6</sup>, Ángel R. Nebreda<sup>4</sup>, José A. Esteban<sup>1</sup>

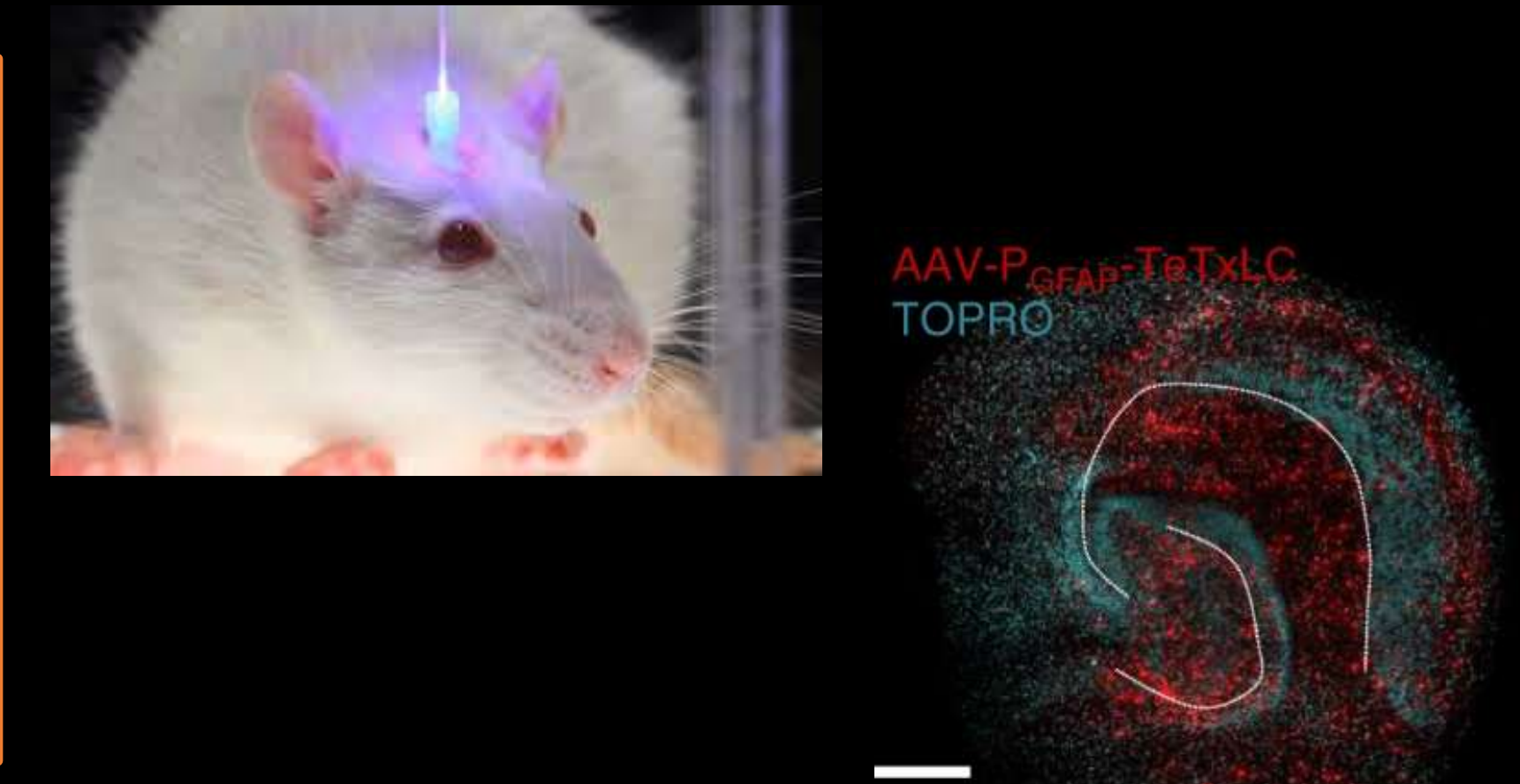
<sup>1</sup>Department of Neurobiology, Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa" (CSIC-UAM), 28049 Madrid, Spain. <sup>2</sup> Instituto Cajal (CSIC), 28002 Madrid, Spain. <sup>3</sup> Faculty of Experimental Sciences, Universidad Francisco de Vitoria, Pozuelo de Alarcón, 28223 Madrid, Spain. <sup>4</sup> Institute for Research in Biomedicine (IRB Barcelona), Barcelona Institute of Science and Technology, 08028 Barcelona, Spain. <sup>5</sup> Achucarro Basque Center for Neuroscience, 48940 Leioa, Spain. <sup>6</sup> Ikerbasque-Basque Foundation for Science, 48013 Bilbao, Spain. <sup>7</sup> ICREA, Pg. Lluís Companys, 08010 Barcelona, Spain. Correspondence and requests for materials should be addressed to M.N. (email: mllinas@cajal.csic.es) or to J.A.E. (email: jaesteban@cbm.csic.es)

## INTRODUCCIÓN

Se pretende demostrar que la depresión a largo plazo (LTD) en el hipocampo es dependiente del receptor NMDA y que al inducirla se potencia la comunicación mediante glutamato entre astrocito y neurona. Además, la expresión de LTD requiere de la señalización de Ca<sup>2+</sup> y de la liberación de vesículas dependientes de SNARE. Por último, descubren que p38 alfa MAPK astrocitario es necesario para la comunicación neurona-astrocito y que su eliminación inhibe la expresión de la LTD.

## MATERIALES Y MÉTODOS

- Ratones.
- Electrofisiología.
- Estimulación optogenética.
- Inmunohistoquímica.
- AAVs.



### 1. La inducción de LTD suscita la comunicación entre neurona y astrocito

Las señales de Ca<sup>2+</sup> suscitan la comunicación entre astrocito y neurona en forma de corrientes lentas internas neuronales (SICs) mediado por la liberación de glutamato de los astrocitos y la activación de los receptores NMDA. La estimulación a baja frecuencia (LFS) causó un incremento de estas corrientes, apoyando el hecho de que un incremento de la concentración de Ca<sup>2+</sup> astrocitario intracelular durante la inducción de LTD va acompañada de la liberación de glutamato de los astrocitos.

### 2. La LTD requiere de la actividad de Ca<sup>2+</sup> astrocitario y de la liberación de vesículas

Vieron si las señales de Ca<sup>2+</sup> en el astrocito modulaban la LTD en la sinapsis CA3-CA1. Analizaron las consecuencias de la infusión del quelante de calcio BAPTA en el hipocampo de los astrocitos. BAPTA se difunde a través de las uniones GAP al sincitio de los astrocitos, interfiriendo con la señalización del Ca<sup>2+</sup> astrocitario. Bajo sus condiciones experimentales, el llenado intracelular de BAPTA fue suficiente para reducir significativamente la LTD sin afectar a LTP. Finalmente, ninguna de estas manipulaciones alteraron la transmisión sináptica en esta ruta.

### 3. La activación optogenética de los astrocitos induce LTD

Investigaron si la actividad del astrocito, sin la participación de la neurona presináptica, era suficiente para inducir la LTD dependiente de NMDAR. Para explorar esta idea, la actividad del astrocito fue aumentada usando herramientas optogenéticas. Esta fotoestimulación a baja frecuencia en los astrocitos del hipocampo incrementaron significativamente la frecuencia de la señalización de calcio en el astrocito. A continuación, investigaron si el incremento de la actividad del Ca<sup>2+</sup> astrocítico era suficiente para suscitar las corrientes lentas (SICs) mediadas por glutamato en las neuronas CA1. La fotoestimulación selectiva de los astrocitos indujo un incremento en la frecuencia de estas corrientes lentas (SICs). Estos resultados indicaron que la fotoestimulación de los astrocitos elevaba su Ca<sup>2+</sup> intracelular e inducía la transmisión mediada por glutamato dando lugar a la activación de NMDA en las neuronas piramidales.

### 4. La LTD mediada por astrocitos implica mecanismos postsinápticos

La estimulación directa de los gliotransmisores mediado por glutamato son suficientes para inducir LTD dependiente de receptores NMDA en el hipocampo, en los cuales estos receptores actúan como "detectores" de la salida de glutamato y de la despolarización postsináptica. La LTD se indujo por fotoestimulación de los astrocitos. Como se esperaba, la depresión se observaba en las neuronas control (tanto estimuladas eléctricamente como por luz). Las neuronas que poseían MK-801 (bloquean los receptores NMDA) no fueron capaces de expresar LTD. Estos resultados apoyan fuertemente la interpretación de que los receptores NMDA localizados en la neurona postsináptica son requeridos para la inducción de LTD en los astrocitos. La expresión de la LTD mediada por receptores NMDA en el hipocampo involucra la eliminación endocítica de los receptores AMPA de la membrana postsináptica, se sobreexpresó EGFP-GluA2 y se analizó la acumulación del receptor en las espinas de las dendritas basado en la intensidad de la fluorescencia de EGFP. Descubrieron que el ratio de la intensidad de fluorescencia de EGFP en las dendritas disminuía según se estimulaba más el astrocito, confirmando la eliminación de los receptores AMPA de las espinas dendríticas de las membranas postsinápticas en la LTD mediada por astrocito.

### 5. p38 $\alpha$ MAPK en los astrocitos es necesaria para la sinapsis CA3-CA1 en LTD

Tanto p38 $\alpha$  y p38beta se expresan en neuronas y células e la glía. En el experimento con un ratón doble knockout para p38 $\beta$  y que presentaba además una delección condicional de p38 $\alpha$  en las neuronas seguía expresando LTD. Por ello ni p38 $\beta$  ni p38 $\alpha$  neuronal son necesarios para LTD dependiente de NMDAR en el hipocampo. Por el otro lado se ha demostrado que la eliminación completa de p38 $\alpha$  astrocitario lleva a la inhibición de la expresión de LTD.

### 6. p38 $\alpha$ MAPK es necesaria para el incremento de la liberación de glutamato en el astrocito tras LFS

Al emplear una sonda con un sensor para glutamato en los astrocitos, infectados por AAV bajo el promotor de GFAP, durante la LFS se ha detectado que la expresión del neurotransmisor es mas lenta. Por ello se lleva a cabo un experimento control tras expresar Cre en aquellos astrocitos con una delección en p38 $\alpha$ . Se observó que el aumento de los potenciales de glutamato durante LFS desaparecen cuando Cre se expresaba en las células de estos animales con una delección en p38 $\alpha$ .

### 7. La eliminación de p38 $\alpha$ de los astrocitos fomenta la memoria a largo plazo

Se ha podido demostrar que la delección de p38 $\alpha$  tiene consecuencias cognitivas en vivo: la LTD se ve disminuida en aquellos cortes tras la delección in vivo de p38 $\alpha$  de los astrocitos del hipocampo. Sin embargo, la LTD se preservaba en vehicle-injected y en los ratones que expresaban CRE. Se observa como la delección específica de p38 $\alpha$  en los astrocitos muestran una respuesta al frío significativamente mayor en el día 30 respecto al día 2. Estos experimentos control sugieren que un incremento en la respuesta al frío en aquellos ratones con una delección de p38 $\alpha$  en los astrocitos muestran una mejora de la memoria a largo plazo en el condicionamiento por miedo. Para asegurarse del resultado se analizan los astrocitos infectados de cada ratón, por lo que se ha concluido que la memoria a largo plazo es mediada por p38 $\alpha$ .

## CONCLUSIONES

- Los resultados revelan que los astrocitos son los intermediarios obligatorios en la expresión de la LTD en el hipocampo, donde dicha señal se basa en la expresión de p38 $\alpha$  MAPK en los astrocitos. Además, el glutamato astrocitario es un conductor intrínseco de este mecanismo. Por otra parte, para que pueda darse la liberación del neurotransmisor es necesaria la presencia de Ca<sup>2+</sup> y vesículas SNARE.
- La eliminación genética de p38 $\alpha$  MAPK inhibe la depresión a largo plazo (LTD) en los astrocitos pero no en las neuronas. El mecanismo de señalización de p38 $\alpha$  es desconocido.
- Se ha podido observar la importancia de las neuronas y los astrocitos en las distintas fases de la plasticidad sináptica inducida por estimulación a baja frecuencia (low frequency stimulation o LFS). La liberación de glutamato de la neurona presináptica es responsable de la depresión sináptica inicial, mientras que la liberación lenta de glutamato desde los astrocitos es responsable de la depresión sináptica a largo plazo.
- Se ha demostrado que la eliminación de p38 $\alpha$  desde los astrocitos del hipocampo puede aumentar el efecto de la memoria a largo plazo *in vivo*: se refuerza la respuesta al miedo en animales.
- El glutamato liberado por los astrocitos es capaz de reducir la plasticidad sináptica específica, de modo que únicamente las sinapsis activadas durante la inducción de LTD producen depresión.
- La plasticidad de la sinapsis del receptor NMDA en el hipocampo es un repetidor obligatorio para la neurona presináptica y postsináptica para los cambios en la fuerza sináptica relacionada con funciones cognitivas.