

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**

**DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA  
MOLECULAR**

**FACULTAD DE CIENCIAS**



**Papel de la proteína efectora Rab11-FIP2 en el  
transporte de los receptores AMPA durante  
plasticidad sináptica**

**Tesis Doctoral**

**María Royo Cantabrana**

**Madrid, 2013**



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**

**DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA  
MOLECULAR**

**FACULTAD DE CIENCIAS**



**Papel de la proteína efectora Rab11-FIP2 en el  
transporte de los receptores AMPA durante  
plasticidad sináptica**

Memoria presentada por María Royo Cantabrana,  
Licenciada en Biología para optar al grado de Doctora en  
Ciencias por la Universidad Autónoma de Madrid.

Director:

**José Antonio Esteban García**

Tutor:

**Fco. Javier Díez-Guerra**



La realización de esta tesis ha sido posible gracias a la concesión de una ayuda predoctoral de Formación de Investigación en Salud (FIS) del Instituto de Salud Carlos III (FI08/00510). Su desarrollo ha tenido lugar en el laboratorio del Doctor José Antonio Esteban García bajo su supervisión y dentro de las instalaciones del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CBMSO), centro mixto de la Universidad Autónoma de Madrid (UAM) y del Centro Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).





**José Antonio Esteban García, Profesor de Investigación del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CBMSO) centro mixto CSIC-UAM, y director de esta Tesis Doctoral,**

**Hace constar:**

Que el trabajo descrito en la presente memoria, titulado “Papel de la proteína efectora Rab11-FIP2 en el transporte de los receptores AMPA durante plasticidad sináptica”, ha sido realizado bajo su dirección y supervisión por María Royo Cantabrana dentro del programa de doctorado del Departamento de Biología Molecular de la Universidad Autónoma de Madrid. Esta tesis reúne los requisitos de rigor científico, aportaciones novedosas y aplicación de una metodología adecuada, por lo que doy mi Visto Bueno a la presentación de dicha Tesis Doctoral.

Madrid, a 28 de noviembre de 2013

Fdo: José Antonio Esteban García





## **SUMMARY**

Long Term Potentiation (LTP) is a well-known form of synaptic plasticity that relies on the capacity to regulate the insertion of AMPA-type glutamate receptors (AMPA) into the postsynaptic membrane, in response to neuronal activity. This highly regulated process of intracellular membrane trafficking is controlled by the small GTPase Rab11, and the motor protein MyosinV along the actin cytoskeleton present in the spine. One member of the Rab11-family interacting proteins (FIPs), FIP2, was proposed to participate in this process by its association to recycling endosomes after activation of MyosinV upon LTP induction.

We used a combination of different approaches such as molecular biology, biochemistry, electrophysiology, and fluorescence imaging, in order to elucidate the mechanism by which FIP2 participates in this process. Surprisingly, using shRNA and protein overexpression, we found that FIP2 does not participate in AMPAR synaptic delivery during LTP; instead, FIP2 traps AMPARs in extrasynaptic compartments different from recycling endosomes, in a Rab11 independent way. This retention is mediated by an interaction between FIP2 and GluA1 under basal conditions, and this complex dissociates after LTP induction. Moreover, we found that removal of endogenous FIP2 dramatically decreases AMPAR-mediated synaptic responses during basal transmission. This result indicates that FIP2 regulates the constitutive recycling of AMPARs at synapses. We propose a model in which FIP2 is part of a retention-release mechanism that controls AMPAR synaptic delivery during regulated transport, and it plays a dual role acting as a positive regulator of constitutive transport of AMPARs during basal transmission.

Interestingly we demonstrate that FIP2 is endogenously phosphorylated in hippocampal slices, and this phosphorylation is a potential regulatory mechanism implicated in the establishment of different functions of FIP2.



## RESUMEN

La inserción de los receptores de glutamato de tipo AMPA, en la membrana post-sináptica de las neuronas en respuesta a cambios en la actividad neuronal, constituye un mecanismo fundamental de plasticidad sináptica, conocido como potenciación a largo plazo (LTP). Se trata de un proceso altamente regulado de tráfico intracelular y está controlado por la proteína GTPasa de la familia Rab, Rab11, y por la proteína motora MiosinaV; y tiene lugar a través del citoesqueleto de actina presente en las espinas dendríticas. Uno de los miembros de la familia de proteínas de unión a Rab11 (familia FIP), FIP2, ha sido propuesto como candidato a participar en estos procesos, debido a su asociación con los endosomas de reciclaje tras la activación de MiosinaV durante procesos de LTP.

En este trabajo, hemos empleado una combinación de herramientas de biología molecular, bioquímica, electrofisiología y microscopía de fluorescencia, para evaluar la función de FIP2 en estos procesos. La sobreexpresión de proteínas recombinantes y el uso de shRNAs nos han permitido demostrar que FIP2 no participa en la inserción en membrana de receptores AMPA durante LTP. Por el contrario, hemos encontrado que FIP2 retiene los receptores en compartimentos extra-sinápticos diferentes de los endosomas de reciclaje, de manera independiente de su interacción con Rab11. Esta retención está mediada por una interacción entre FIP2 y la subunidad GluA1 de los receptores AMPA en condiciones basales y dicho complejo se disocia tras la inducción de LTP. Además hemos encontrado que la eliminación de FIP2 endógeno reduce drásticamente las respuestas mediadas por receptores AMPA durante transmisión sináptica basal. Este resultado indica que FIP2 regula además, el reciclaje constitutivo de los receptores. Basándonos en estos datos proponemos un modelo en el que FIP2 forma parte de un mecanismo de retención-liberación, siendo un regulador negativo para la inserción de los receptores durante el transporte regulado por LTP, y con una doble función como regulador positivo del tráfico constitutivo de receptores AMPA durante transmisión basal.

Además, nuestros datos nos han permitido demostrar que FIP2 es fosforilado de manera endógena en cultivos organotípicos de hipocampo, y esta fosforilación es un mecanismo regulador potencialmente implicado en el establecimiento de las distintas funciones de FIP2 en neuronas.



---

<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
1. Las neuronas y las sinapsis.....	3
2. Plasticidad de las sinapsis y los circuitos maduros .....	4
2.1 Contexto histórico.....	4
2.2 El Hipocampo como modelo de plasticidad.....	6
2.3 Estructura de las sinapsis excitatorias en el hipocampo .....	8
2.4 Dos formas de plasticidad sináptica: LTP Y LTD .....	9
3. Receptores de glutamato.....	12
3.1 Receptores de NMDA.....	12
3.2 Receptores de AMPA .....	13
3.2.1 Síntesis de receptores AMPA y transporte dendrítico .....	16
3.2.2 Transporte local de receptores AMPA en espinas dendríticas de hipocampo. ...	17
3.2.2.1 Transporte Constitutivo .....	18
3.2.2.2 Transporte regulado durante la LTD .....	18
3.2.2.3 Transporte regulado durante la LTP: GluA1/GluA2 .....	19
4. Papel de las proteínas GTPasas en potenciación a largo plazo (LTP) .....	21
4.1 Proteínas Ras.....	21
4.1.1 Proteínas Rab .....	22
5. Familia de proteínas de interacción con Rab11 (Rab11-FIPs) .....	24
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>27</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>31</b>
1. Material.....	33
1.1 Tabla de Soluciones y Medios.....	33
1.2 Tabla de anticuerpos primarios .....	35
1.3 Tabla de anticuerpos secundarios .....	36
1.4 Tabla de enzimas de restricción.....	36
1.5 Tabla de oligonucleotidos .....	37
2. Métodos .....	38
2.1 Manipulación de DNA .....	38
2.1.1 Clonaje de DNA para sobreexpresión de proteínas de fusión a GFP (Green fluorescence protein).....	38
2.1.2 Clonaje de DNA para silenciamiento génico.....	39

---

2.1.3	Clonaje de DNA para expresión de proteínas de fusión a GST .....	40
2.2	Producción de virus para infección de cultivos .....	41
2.2.1	Virus Sindbis .....	41
2.2.2	Lentivirus .....	41
2.3	Cultivos celulares y tisulares.....	42
2.3.1	Cultivos organotípicos de hipocampo.....	42
2.3.2	Cultivos primarios de neuronas de hipocampo .....	42
2.4	Infección de cultivos primarios y organotípicos con vectores virales.....	42
2.5	Tratamientos .....	43
2.5.1	Inducción química de la LTP .....	43
2.5.2	Tratamientos con inhibidores de kinasas y fosfatasas .....	43
2.6	Preparación de homogeneizados de proteínas.....	43
2.7	Inmunodetección.....	43
2.8	Ensayos de <i>Pull-down</i> .....	44
2.8.1	Expresión y purificación de proteínas de fusión a GST .....	44
2.8.2	Ensayos de <i>pull-down</i> sobre rodajas de hipocampo.....	45
2.9	Inmunoprecipitación .....	45
2.10	Fraccionamiento subcelular en gradiente de sacarosa .....	45
2.11	Ensayos de fosforilación <i>in vitro</i> .....	46
2.12	Inmunofluorescencia .....	46
2.12.1	Inmunohistoquímica.....	46
2.12.2	Inmunofluorescencia en cultivo primario .....	47
2.13	Microscopía <i>ex vivo</i> y experimentos de FRAP .....	47
2.14	Adquisición y análisis de imágenes de microscopía .....	48
2.15	Electrofisiología.....	48
2.16	Análisis estadísticos .....	50
<b>RESULTADOS</b>	.....	<b>51</b>
1.	Análisis de la expresión y distribución de FIP2 en neuronas de hipocampo. ....	55
1.1	Generación y caracterización de herramientas de biología molecular y bioquímica para el estudio de la distribución de FIP2. ....	55
1.2	Análisis de la distribución de FIP2 en cultivos organotípicos de hipocampo.....	58

---

2. FIP2 se encuentra localizado junto a GluA1 en compartimentos subcelulares extra-sinápticos, distintos de los endosomas de reciclaje .....	61
2.1 Estudios de colocalización mediante la sobreexpresión de GFP-FIP2 en cultivos primarios de neuronas de hipocampo.....	61
2.2 Análisis de la distribución de FIP2 endógeno mediante fraccionamiento subcelular en gradiente de sacarosa .....	65
3. Estudios de las propiedades dinámicas de GFP-FIP2. Las distintas poblaciones subcelulares de FIP2 se caracterizan por distintas propiedades dinámicas .....	66
4. FIP2 interacciona con receptores AMPA en condiciones basales y está sujeto a redistribuciones dinámicas durante la inducción de la LTP .....	71
4.1 Evaluación de las interacciones de FIP2 con la maquinaria de transporte de receptores AMPA.....	71
4.2 Estudio del comportamiento dinámico de FIP2 durante plasticidad sináptica mediante experimentos de microscopía <i>ex vivo</i> .....	73
5. FIP2 es un regulador negativo de la inserción sináptica de receptores AMPA durante la LTP .....	76
5.1 Análisis funcional de FIP2 durante plasticidad sináptica mediante el silenciamiento de la expresión de la proteína endógena .....	76
5.2 Análisis funcional de FIP2 durante plasticidad sináptica mediante la sobreexpresión de proteínas recombinantes.....	77
6. FIP2 regula positivamente el tráfico basal de receptores AMPA .....	83
7. FIP2 es susceptible de fosforilación en neuronas de hipocampo.....	89
7.1 Estudios <i>in vitro</i> de fosforilación de FIP2.....	89
7.2 1.2 Análisis del estado de fosforilación endógeno de FIP2 .....	89
8. La fosforilación de FIP2 en la serina 227 no afecta a la expresión de la LTP.....	93
9. La fosforilación de FIP2 en la serina 227 está implicada en el reciclaje constitutivo de receptores AMPA.....	95
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>101</b>
1. Rab11-FIP2 como regulador del tráfico de proteínas en neuronas.....	104
2. Rab11-FIP2 se encuentra en compartimentos de membrana distintos de los endosomas de reciclaje asociados a Rab11 .....	105
3. Rab11-FIP2 interacciona con la subunidad GluA1 de los receptores AMPA y se disocia tras la inducción de la LTP .....	107
4. Rab11-FIP2 no es necesario para la movilización de los receptores AMPA durante la LTP	

5. Rab11-FIP2 es un regulador positivo del reciclaje constitutivo de los receptores en transmisión basal .....	114
6. Rab11-FIP2 se encuentra regulado por fosforilación en neuronas.....	116
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>121</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>125</b>
<b>ANEXO .....</b>	<b>149</b>
1. Artículos publicados durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral:.....	151
1.1 Arendt, K. L., Royo, M., Fernández-Monreal, M., Knafo, S., Petrok, C. N., Martens, J. R., & Esteban, J. A. 2010. PIP3 controls synaptic function by maintaining AMPA receptor clustering at the postsynaptic membrane. <i>Nature neuroscience</i> , 13(1): 36–44. ....	151
1.2 Fernández-Monreal, M., Brown, T. C., Royo, M., & Esteban, J. A. 2012. The balance between receptor recycling and trafficking toward lysosomes determines synaptic strength during long-term depression. <i>The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience</i> , 32(38): 13200–5.....	151



**ACSF:** artificial cerebrospinal fluid

**AMPA:** ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico

**AP2:** adaptor protein 2

**AP-V:** ácido 2-amino-5-fosfonovaleriánico

**Arf-GTPasas:** ADP ribosylation factor-GTPasa

**ATP:** adenosine triphosphate

**BHK:** baby hamster kidney

**BiP:** binding immunoglobulin protein

**BSA:** bovin serum albumin

**CaMKII:** Ca<sup>2+</sup>/calmodulina proteína kinasa

**cAMP:** cyclic adenosine monophosphate

**cDNA:** complementary deoxyribonucleic acid

**CREB:** cAMP response element-binding

**CTD:** carboxiterminal domain

**dNTP's:** deoxynucleotide triphosphates

**DTT:** ditioneitol

**EDTA:** ethylenediaminetetraacetic acid

**EGFR:** epidermal growth factor receptor

**EGTA:** ethylene glycol tetraacetic acid

**EHD1:** EHdomain-containing protein 1

**EHD3:** EHdomain-containing protein 3

**EPSC:** excitatory postsynaptic current

**EPSP:** excitatory postsynaptic potential

**FRAP:** fluorescence recovery after photobleaching

**GAP:** GTPase activation protein

**GDF:** GDI-displacement factor

**GDI:** guanosine nucleotide dissociation inhibitors

**GDP:** guanosine diphosphate

**GEF:** GTPase exchange factor

**GFP:** green fluorescence protein

**GST:** glutathione S-transferase

**GTP:** guanosine triphosphate

**GTPasa:** guanosine triphosphatase

**HBSS:** Hank's buffered salt solution

**HEPES:** N-2-hydroxyethylpiperazine-N-2-ethanesulfonic acid.

**HRP:** horseradish peroxidase

**Hsp90:** heat shock protein 90

**IPTG:** isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranósido

**LB:** lysogeny broth medium

**LBD:** ligand binding domain

**LTP:** long term potentiation

**LTD:** long term depression

**MAGUK:** membrane-associated guanylate kinase

**MAPK:** microtubule associated protein kinase

**MARK2:** MAP/microtubule affinity-regulating kinase 2

**MDCK:** Madin-Darby canine kidney

**MEM:** minimum essential medium

**mRNA:** messenger ribonucleic acid

**NPC1L1:** Niemann-Pick C1-Like 1

**NMDA:** N-metil-D-aspartato

**NSF:** N-ethylmaleimide sensitive fusion protein

**PBS:** phosphate buffered saline

**PDZ:** post synaptic density protein (PSD95), drosophila disc large tumor suppressor (Dlg1), and zonula occludens-1 protein (zo-1)

**PI3K:** phosphoinositide 3-kinase

**PI(4,5)P2:** fosfolipidilinositol 4,5-bisfosfato

**PI(3,4,5)P3:** fosfolipidilinositol 3,4,5-trisfosfato

**PICK1:** PRKCA- binding protein

**PKA:** proteína kinasa A

**PKC:** proteína kinasa C

**PSD:** postsynaptic density

**PSD95:** postsynaptic density protein 95

**PSD93:** postsynaptic density protein 93

**PVDF:** polivinilidene fluoride

**RBD:** Rab11 binding domain

**Rab11-FIP:** Rab11-family interacting protein

**Reps1:** RALBP1 associated Eps domain containing 1

**RNA:** ribonucleic acid

**RT-PCR:** reverse transcription polymerase chain reaction

**SDS:** sodium dodecyl sulfate

**SDS-PAGE:** sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel

**shRNA:** small hairpin RNA

**SNC:** sistema nervioso central

**TARP:** transmembrane AMPA receptor regulatory proteins

**TBS:** tris-buffered saline

# INTRODUCCIÓN



## 1. Las neuronas y las sinapsis

Las neuronas son las unidades celulares, morfológicas y funcionales del sistema nervioso. Este principio que hoy conocemos como la “Teoría Neuronal”, fue postulado por primera vez por Santiago Ramón y Cajal a finales del siglo XIX y ampliamente discutido hasta principios del siglo XX por numerosos histólogos, anatomistas y fisiólogos (Cowan et al., 2001).

La característica principal de las neuronas es la excitabilidad de su membrana plasmática, siendo de este modo células altamente especializadas para la comunicación intercelular, capaces de recibir estímulos y conducir impulsos nerviosos en forma de potenciales de acción.

Dicha especialización se pone de manifiesto en varios niveles:

- **En su morfología general**, que comprende un soma o cuerpo celular y dos tipos de ramificaciones denominadas axones y dendritas.
- **En la organización específica** de sus orgánulos subcelulares.
- **En la complejidad** de las estructuras y las funciones de los contactos entre neuronas.

El más claro ejemplo de esta especialización lo encontramos en las espinas dendríticas, unas pequeñas prolongaciones citoplasmáticas que aparecen a lo largo de las dendritas, con una cabeza ovoidea unida a través de un pedúnculo de longitud variable (Hammond, 2008). Estas estructuras constituyen puntos físicos de aferencia de estímulos desde los terminales axónicos. En ellas se produce la sinapsis, término acuñado por primera vez en 1897 por el neurofisiólogo Charles Scott Sherrington (Cowan et al., 2001), que se define como la unión funcional entre las neuronas que permite la transmisión del impulso nervioso. Según el mecanismo de propagación, existen dos tipos de sinapsis: eléctrica y química (Nicholls et al., 2011).

La **sinapsis eléctrica** ocurre por el paso de iones y otras sustancias químicas entre dos células estrechamente adheridas (2-3 nm) a través de uniones en hendidura o uniones *gap*; pequeños canales formados por el acoplamiento de complejos proteicos basados en conexinas. Son más rápidas que las sinapsis químicas pero menos plásticas, menos propensas a alteraciones o modulación y son además mucho menos frecuentes. En los vertebrados son comunes en el corazón y en el hígado.

La **sinapsis química** se establece entre células que están separadas entre sí por un espacio de unos 20-30 nm, la llamada hendidura sináptica. En el terminal nervioso pre-sináptico, las vesículas que contienen neurotransmisores permanecen ancladas y preparadas junto a la membrana. La llegada de un potencial de acción permite la entrada de iones calcio a través de canales de calcio dependientes de voltaje y esto inicia una cascada de reacciones que permiten la fusión de las membranas vesiculares con la membrana pre-sináptica, liberando su contenido a la hendidura sináptica. Estos neurotransmisores se unen a sus receptores correspondientes en el terminal post-sináptico forzando así la apertura de los canales iónicos de la membrana post-sináptica, y haciendo que los iones fluyan hacia o desde el interior, cambiando el potencial de membrana local. El resultado es excitatorio en caso de flujos de despolarización, o inhibitorio en caso de flujos de hiperpolarización. El que una sinapsis sea excitatoria o inhibitoria depende del tipo o tipos de iones que se canalizan en los flujos post-sinápticos, que a su vez es función del tipo de receptores y neurotransmisores que intervienen en la sinapsis.

## **2. Plasticidad de las sinapsis y los circuitos maduros**

Una de las propiedades más importantes de las sinapsis, así como de los circuitos neuronales complejos, es su capacidad para ser modificadas. Las conexiones entre las neuronas no son elementos rígidos, la actividad neuronal puede conducir a alteraciones sinápticas a corto plazo así como a cambios permanentes en la eficiencia sináptica (Cowan et al., 2001). Este tipo de cambios están englobados en un fenómeno conocido como neuroplasticidad que constituye la base de la memoria y el aprendizaje, así como de todos aquellos procesos cerebrales implicados en comportamiento, consciencia e inteligencia (Andersen & Lomo, 1967; Lømo, 2003; Rudy, 2008). De hecho, las alteraciones en plasticidad han sido asociadas a múltiples enfermedades cognitivas, como la enfermedad de Alzheimer (Esteban, 2004) la esquizofrenia (Stephan et al., 2006), el autismo y varias formas de retraso mental (Galdzicki & Siarey, 2003; Newey et al., 2005).

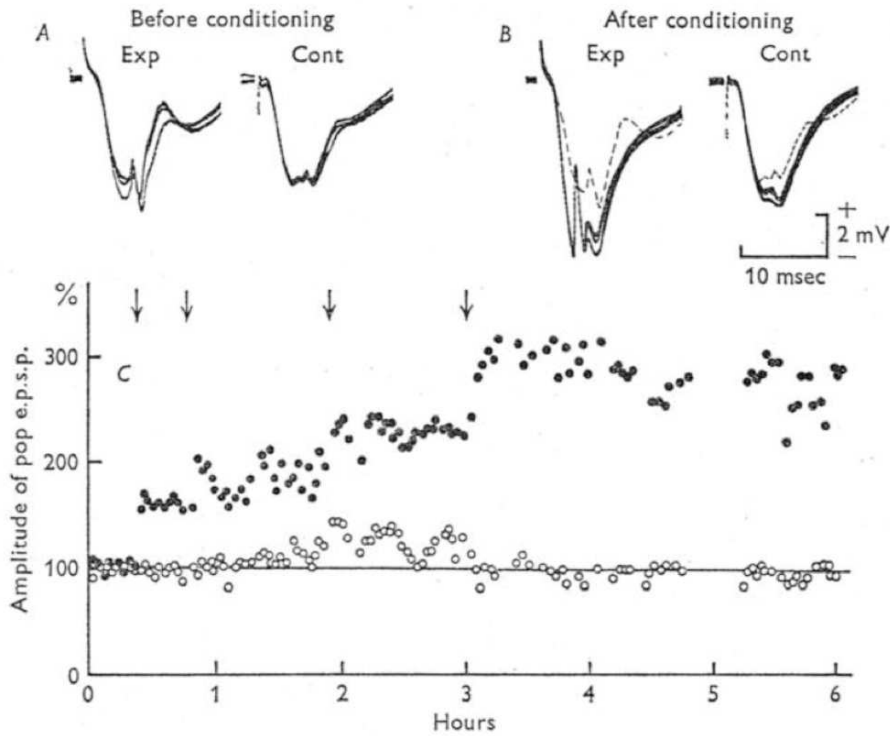
### **2.1 Contexto histórico**

La idea de que la plasticidad sináptica podría ser el mecanismo a partir del cual la experiencia genere cambios persistentes en el cerebro y que estos sean la base que soporta la formación de memoria, fue propuesto ya, por el neuroanatomista español Santiago Ramón y Cajal (Rudy, 2008). A mediados del siglo XX, numerosos fisiólogos comienzan a estudiar las



propiedades eléctricas en las membranas porosas de las células mediante el uso de microelectrodos y técnicas electrofisiológicas (Andersen, 1956).

Estudios del doctor en Medicina Eric Kandel durante la década de los 70, mediante el uso de un sistema muy simple basado en un invertebrado marino *Aplysia californica*, permitieron constatar que la presencia de una causa (experiencia) modifica las sinapsis, y que estos cambios permanecen en el tiempo una vez que la causa que los produce desaparece (memoria) (Kandel et al., 1961; Kandel & Spencer, 1961a, 1961b). Eric Kandel recibió el Premio Nobel de Fisiología y Medicina en el año 2000 por dichos estudios. De manera simultánea, Timothy Bliss y Terje Lomo utilizaron el hipocampo de conejo para determinar si efectivamente era posible modificar la fuerza de las sinapsis. Para ello aplicaron estímulos débiles seguidos de estímulos fuertes en las fibras de la vía perforante del hipocampo y registraron la actividad sináptica que esto producía en el giro dentado. Estos experimentos demostraron que las conexiones sinápticas entre las neuronas del hipocampo son dinámicamente modificadas en respuesta a cambios en la actividad neuronal (Bliss & Lomo, 1973). Este fue el descubrimiento de la potenciación a largo plazo (LTP), que abrió las puertas a la investigación sobre aquellos mecanismos sinápticos que producen cambios duraderos en la fuerza sináptica (Fig. 1).



**Figura 1.** Primer ejemplo de la potenciación a largo plazo en hipocampo de conejo. Extraído de Bliss & Lomo 1973.

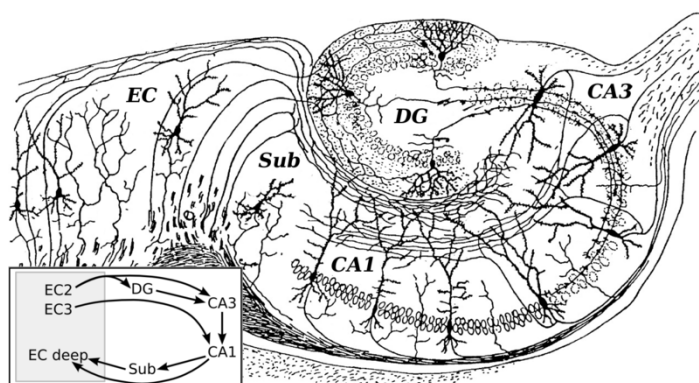
## 2.2 El Hipocampo como modelo de plasticidad

El hipocampo es una región encefálica situada en la parte medial del lóbulo temporal, bajo la superficie cortical. Es una estructura pareada con dos mitades que son imágenes especulares en ambos hemisferios cerebrales. Tiene su origen en una estructura del cerebro de los vertebrados denominada palio, que comprendía funciones olfativas en sus orígenes, por lo que se creía que estaba relacionado con el olfato; sin embargo en su actual diseño en los mamíferos desempeña principalmente funciones importantes en la memoria explícita y memoria espacial. La organización anatómica del hipocampo es hoy día bien conocida, y su esquema general se mantiene a lo largo de todo el rango de especies de mamíferos. Contiene capas celulares bien organizadas y conectadas entre sí, formando un complejo circuito que lo convierte en un interesante modelo para el estudio de conexiones neuronales.

El hipocampo está compuesto por dos estructuras estrechamente interconectadas: el cuerno de Ammon o hipocampo propiamente dicho y el giro dentado. Se caracteriza por presentar una capa principal de neuronas, la capa de las células piramidales, que hace una trayectoria en forma de C invertida y en la cual se distinguen tres regiones llamadas CA1, CA2 y CA3. El giro dentado en cambio está compuesto por una capa de células granulares.

El circuito de la formación hipocámpica (Fig. 2) se inicia en las neuronas de la capa II de la corteza entorrinal. Los axones de estas neuronas inician la vía perforante, que pasa por el subiculum y termina en el giro dentado y en la región CA3 del hipocampo. Sin embargo, las neuronas ubicadas en la capa III de la corteza entorrinal proyectan directamente a CA1 y al subiculum. Las neuronas del giro dentado envían sus axones (fibras musgosas) a las dendritas de las células piramidales de CA3. Estas células presentan un claro árbol dendrítico y emiten un axón. Las dendritas se dirigen al centro del hipocampo hacia el giro dentado, donde son inervadas por las fibras musgosas y los axones emiten fibras, llamadas colaterales de *Schaffer*, que van a inervar a las células piramidales de CA1. Las células de CA1 envían sus axones al subiculum y a las capas profundas de la corteza entorrinal. Es decir, retorna la información al circuito original (Andersen et al., 2006).

Esta estructura tan característica, permite estudiar las conexiones entre unas regiones y otras mediante una estrategia muy simple: estimulando las fibras que conectan con una región concreta y registrando las respuestas en dicha región.

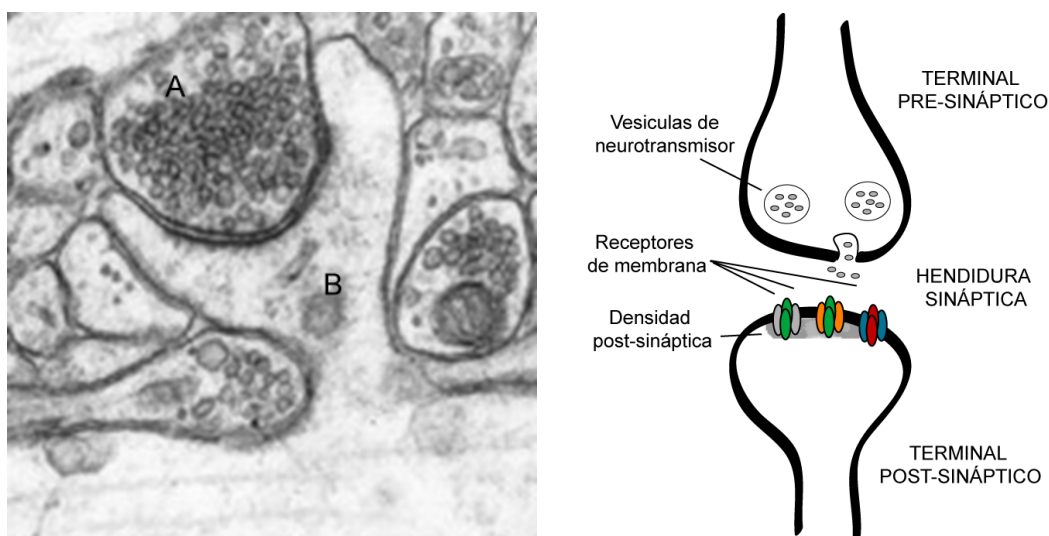


**Figura 2.** Circuito básico del hipocampo, según un dibujo de Santiago Ramón y Cajal. Siglas: DG: giro dentado (circunvolución dentada). Sub: subiculum. EC: corteza entorrinal.

### 2.3 Estructura de las sinapsis excitatorias en el hipocampo

Lionel Hamlyn identificó dos tipos de sinapsis a nivel ultraestructural en el hipocampo: las sinapsis de Tipo1, llamadas sinapsis asimétricas debido a la baja densidad de proteínas encontradas en el elemento pre-sináptico en comparación con la alta densidad del elemento post-sináptico; y las sinapsis Tipo2, que en cambio mostraban una distribución simétrica en los elementos pre y post-sinápticos (Hamlyn, 1961, 1963). Estudios simultáneos de Eric Kandel, permitieron analizar las propiedades fisiológicas de las neuronas piramidales de hipocampo, y encontraron que las sinapsis Tipo1 exhibían transmisión sináptica excitatoria y las sinapsis Tipo2 eran responsables de la transmisión inhibitoria (Kandel & Spencer, 1961c).

Las sinapsis excitatorias de hipocampo (Fig. 3), responsables de su capacidad plástica, están mediadas por glutamato (Rosenmund & Stevens, 1996), un neurotransmisor que provoca la apertura de canales glutamatérgicos que permiten el paso de cationes al interior de la neurona, provocando la despolarización de la membrana plasmática y generando un potencial excitatorio post-sináptico (EPSP). El glutamato es liberado por el terminal pre-sináptico en la hendidura sináptica, en un proceso de exocitosis regulado por  $Ca^{2+}$  (Wyllie et al., 1994). En el terminal post-sináptico, los receptores de glutamato se encuentran anclados a la membrana y conectados al citoesqueleto así como a diversos componentes de vías de señalización intracelulares, en una estructura densamente empaquetada conocida como la densidad post-



**Figura 3.** Izda. Imagen ultraestructural de una sinapsis excitatoria de hipocampo. **A.** Terminal pre-sináptico **B.** Terminal post-sináptico. Adaptado de Synapses web, on line por cortesía de Kristen Harris. Dcha. Representación esquemática de la composición básica de la sinapsis.

sináptica (PSD) (Gundelfinger & tom Dieck, 2000; Hering & Sheng, 2001; Sheng, 2001).

Los receptores de glutamato presentes mayoritariamente en los elementos post-sinápticos de las células piramidales de hipocampo son:

- **Receptores Ionotrópicos:** canales iónicos activados por ligando.
- **Receptores Metabotrópicos:** receptores acoplados a proteínas G.

Los **receptores ionotrópicos** de glutamato son estructuras oligoméricas, formadas por distintas subunidades que forman un poro transmembrana con permeabilidad selectiva a distintos cationes, que se activan en respuesta a la unión de su ligando extracelular. El flujo de iones a través del poro es un proceso altamente regulado que controla el potencial de membrana. Existen tres familias de receptores ionotrópicos de glutamato, cuya nomenclatura se basa en los agonistas sintéticos a los que se unen: receptores de NMDA (N-metil-D-aspartato), receptores de AMPA (ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico) (Hollmann & Heinemann, 1994; Scannevin & Huganir, 2000); y receptores de kainato (Contractor et al., 2011; Dingledine et al., 1999; Lerma, 2006).

Los **receptores metabotrópicos**, son proteínas transmembrana acopladas a proteínas G. La unión a glutamato en este caso conduce a la activación de vías de señalización intracelular y a la modificación de la respuesta de los canales de membrana (Alagarsamy et al., 2001; Anwyl, 1999).

## 2.4 Dos formas de plasticidad sináptica: LTP Y LTD

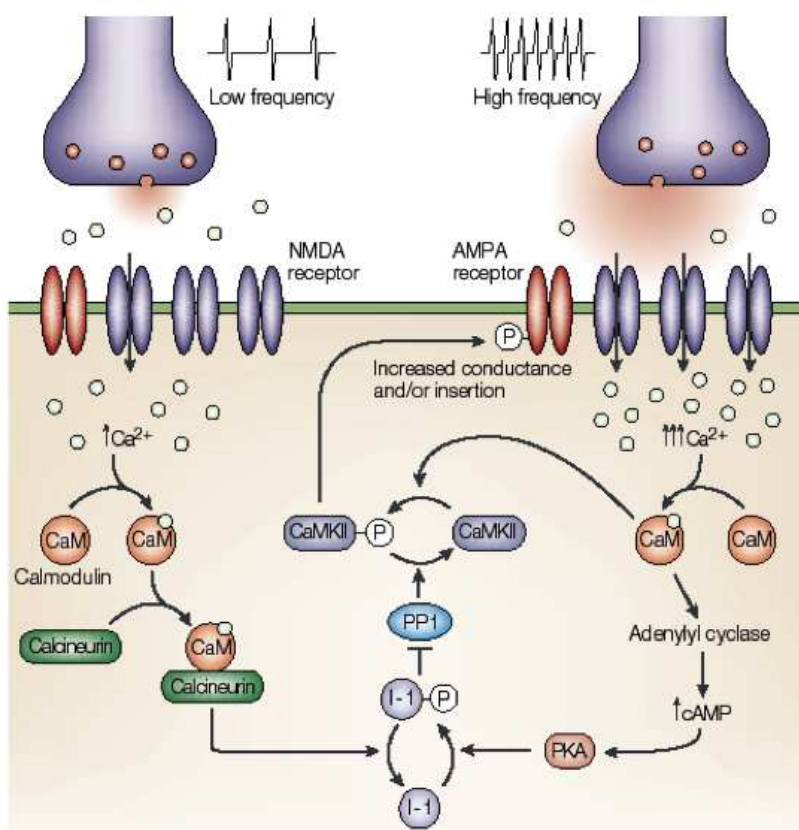
Desde que la plasticidad sináptica fue descrita por primera vez en los primeros experimentos de Bliss y Lomo, lo que ellos denominaron “potenciación a largo plazo” ha sido detectada en todas las vías excitatorias de hipocampo así como en varias regiones cerebrales. A lo largo de las últimas décadas se han descrito numerosos mecanismos de plasticidad, que implican cambios a nivel del terminal pre-sináptico (Lisman & Harris, 1993) y a nivel post-sináptico, normalmente mediante la regulación del número de receptores funcionales que se insertan en la membrana plasmática o mediante cambios en la eficiencia con la que un ligando activa determinados receptores. Así mismo, dicha regulación a nivel post-sináptico puede ser dependiente de la activación de distintos tipos de receptores (Citri & Malenka, 2008; Malenka &

Bear, 2004). En el caso concreto de las neuronas piramidales del hipocampo, una de las formas de plasticidad más estudiadas, implica regulación coordinada de receptores tipo NMDA y AMPA (Fig. 4) (Bortolotto et al., 1999; Collingridge et al., 1988; Collingridge, 1987; Herron et al., 1986).

Los receptores de NMDA se unen a sus ligandos, glutamato y glicina (Henderson et al., 1990) y se caracterizan por permitir la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  además de los cationes monovalentes  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ . El papel clave de estos receptores en procesos de plasticidad reside fundamentalmente en una importante característica: su actividad es dependiente de voltaje debido a que se hallan bloqueados por  $\text{Mg}^{2+}$  extracelular en condiciones de hiperpolarización (Mayer et al., 1984; Nowak et al., 1984). Así, la apertura del poro depende no solo de la liberación de glutamato, sino también de la despolarización de la membrana; ya sea por la activación de un gran número de estímulos excitatorios o por la descarga repetitiva de potenciales de acción sobre la célula post-sináptica. Es decir, una aferencia débil puede liberar glutamato, pero no despolariza lo suficiente la célula post-sináptica como para eliminar el bloqueo por  $\text{Mg}^{2+}$ .

Durante la LTP la activación de estos receptores permite el incremento del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, que actúa como segundo mensajero activando cascadas de transducción de señales (Alford et al., 1993). Se activan proteínas quinasas como la  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulina proteína quinasa II (CaMKII), la proteína quinasa C (PKC) y la proteína quinasa A (PKA). Estas enzimas fosforilan múltiples sustratos, entre ellos receptores de glutamato de tipo AMPA, que permiten el paso de iones  $\text{Na}^+$  produciendo despolarización parcial, que hace a la neurona post-sináptica más sensible a nuevos estímulos nerviosos (Madison et al., 1991; Sheng & Kim, 2002). Numerosos estudios han demostrado que las sinapsis excitatorias no solo regulan la actividad de sus receptores glutamatérgicos, sino que además promueven la incorporación de nuevos receptores AMPA a la membrana contribuyendo éstos a la excitabilidad de la membrana (Hayashi et al., 2000; Lu et al., 2001; Shi et al., 1999).

La depresión a largo plazo (LTD) se desencadena cuando las neuronas reciben estímulos de baja frecuencia durante periodos prolongados. Al igual que en la LTP, se requiere la activación de receptores tipo NMDA con la consecuente entrada de  $\text{Ca}^{2+}$ . El determinante principal para que se produzca potenciación o depresión es la cantidad de  $\text{Ca}^{2+}$  en la célula post-sináptica: pequeños aumentos de  $\text{Ca}^{2+}$  conducen a depresión (Cummings et al., 1996). Se activan en este caso fosfatasa dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$ , como la calcineurina, que llevan a la defosforilación y eliminación de receptores AMPA de los terminales post-sinápticos (Carroll et al., 1999a, 1999b; Mulkey et al., 1993).



**Figura 4.** Esquema simplificado de los procesos de potenciación y depresión a largo plazo. La entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  tras la activación de los receptores de NMDA determina la activación de rutas de señalización de LTP o LTD. Extraído de Winder & Sweatt, 2001.

### 3. Receptores de glutamato

#### 3.1 Receptores de NMDA

Los receptores de glutamato de tipo NMDA (GluN) son canales iónicos permeables a  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  y deben su nombre al agonista sintético NMDA, que se une específicamente a dichos receptores y no a otros receptores glutamatérgicos. En la última década han sido identificadas varias subunidades: GluN1, una familia de cuatro variantes de la subunidad GluN2 (A, B, C, y D), y dos subunidades GluN3 (A y B) (Cull-Candy et al., 2001; Paoletti et al., 2013). Los receptores funcionales son heterotetrámeros (Fig. 5), generalmente integrados por dos dímeros conformados por las subunidades GluN1/GluN2A-D. La subunidad GluN3 tampoco forma receptores funcionales por sí sola, pero puede ensamblarse en complejos con GluN1/GluN2 (Perez-Otano et al., 2001). Las diferencias entre las distintas subunidades residen principalmente en la longitud de la región intracelular implicada en el transporte del receptor y en su acoplamiento a cascadas de señalización intracelular.

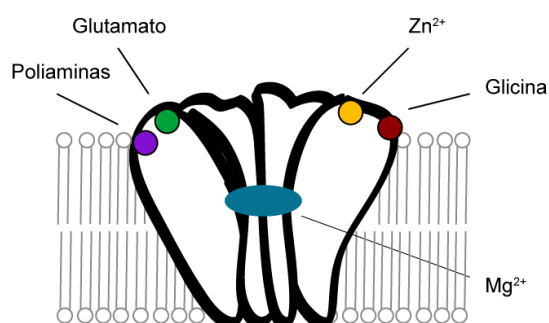
La subunidad GluN1 se expresa de manera ubicua y se encuentra codificada por un solo gen con distintas variantes de *splicing* (Vance et al., 2012; Zukin & Bennett, 1995) que pueden dar lugar a 8 isoformas que determinan propiedades del canal como su sensibilidad al pH, al Zinc, afinidad por agonistas, sensibilidad hacia antagonistas como AP-5 (ácido 2-Amino-5-fosfonovaleriánico) (Traynelis et al., 1995) o incluso su localización y regulación en la membrana plasmática mediante fosforilaciones o interacciones con otras moléculas (Okabe et al., 1999; Tingley et al., 1993). Ninguna de las isoformas une glutamato, pero en su lugar poseen un sitio de unión a glicina o D-serina que actúa como co-agonista.

Las subunidades GluN2A-D están codificadas por cuatro genes distintos y todas ellas contienen el sitio de unión a glutamato y difieren en la estructura de su dominio intracelular carboxilo terminal, donde poseen sitios de unión para ligandos endógenos como poliaminas, sitios de óxido-reducción para protones o Zinc, así como secuencias determinantes en su localización, internalización y reciclaje (Barria & Malinow, 2002). Como en el caso de las subunidades GluN1, esto va a determinar sus propiedades biofísicas y cinéticas.

La variante GluN3A se expresa en todo el sistema nervioso central (SNC) y la expresión de la variante GluN3B se restringe exclusivamente a las neuronas motoras. La subunidad GluN3 al



igual que la subunidad GluN2 es una subunidad reguladora, cuya presencia disminuye las corrientes iónicas generadas. Estudios recientes han demostrado que la co-expresión de GluN1/GluN3B forma receptores de glicina excitadores, insensibles al glutamato, al NMDA, y al bloqueo por  $Mg^{2+}$ , debido a esto se ha propuesto que este tipo de receptores podría intervenir en la formación de las llamadas sinapsis silenciosas de NMDA (Henson et al., 2010).



**Figura 5.** Representación esquemática de la estructura general de los receptores de NMDA.

La expresión de las distintas variantes está determinada por el tipo celular así como por el momento del desarrollo tanto durante el periodo embrionario, como después del nacimiento. Así, durante las primeras etapas del desarrollo postnatal se expresan de manera predominante las subunidades GluN2B, GluN2D y GluN3A indicando su importancia en la regulación de procesos de sinaptogénesis y maduración de espinas; mientras que en el cerebro adulto abundan las subunidades GluN2A y GluN2B importantes para transmisión sináptica y plasticidad (Akazawa et al., 1994; Monyer et al., 1994; Watanabe et al., 1992). Además el hecho de que las distintas combinaciones de subunidades presenten distintas propiedades electrofisiológicas, tiene una implicación en su expresión diferencial a través de las distintas regiones cerebrales y los diferentes tipos celulares y es un fenómeno de enorme importancia durante procesos de plasticidad sináptica (Erreger et al., 2005; Lester et al., 1990). En general la presencia de GluN2A y GluN2B produce receptores más sensibles al bloqueo por  $Mg^{2+}$ , es decir requieren valores de despolarización más elevados para su activación; con menos afinidad por los agonistas, valores de conductancia mayores y cinéticas más rápidas que GluN2C y GluN2D; características que han sido relacionadas con la habilidad de los circuitos neuronales para mostrar plasticidad. Se ha demostrado que es la subunidad GluN2A la que está preferentemente dirigida a sinapsis, o que se ensambla con GluN2B para formar receptores con cinéticas más rápidas (Gladding & Raymond, 2011; Harris & Pettit, 2007; Petralia, 2012; Tovar & Westbrook, 2002).

### 3.2 Receptores de AMPA

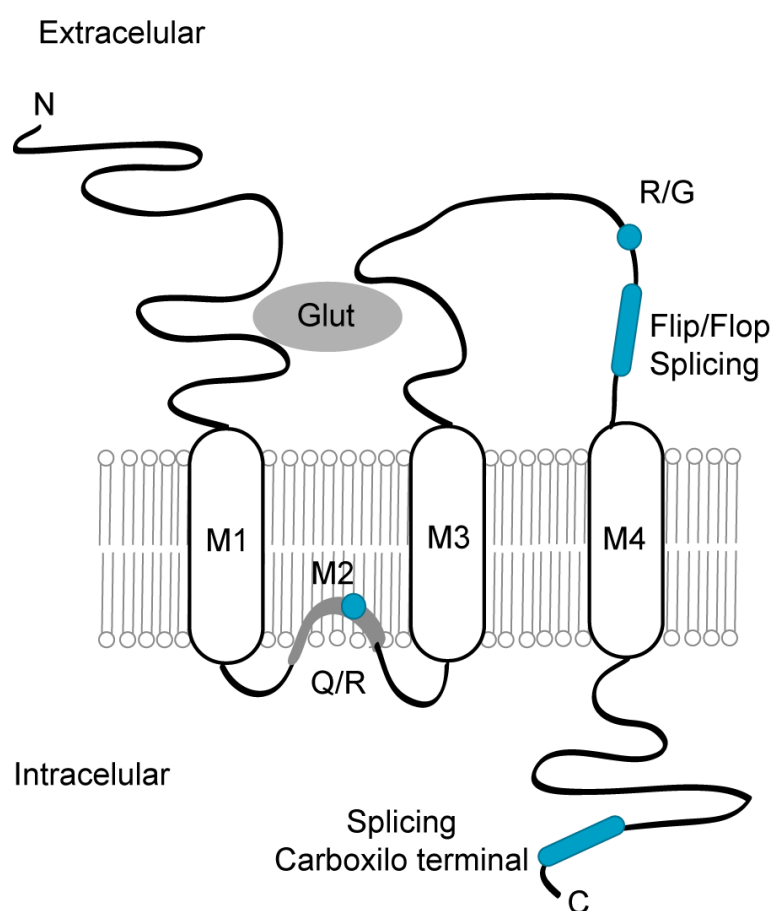
Los receptores de glutamato de tipo AMPA (GluA) son canales iónicos permeables a  $\text{Na}^+$  cuyo nombre se deriva de su habilidad para ser activados por el análogo sintético del glutamato conocido como AMPA. Estos receptores son tetrámeros compuestos por la combinación de cuatro subunidades distintas GluA1, GluA2, GluA3 y GluA4, codificadas por cuatro genes (Dingledine et al., 1999; Hollmann & Heinemann, 1994; Rosenmund et al., 1998). La diversidad de receptores formados no va a depender solo de la combinación de subunidades sino también de dos procesos genéticos: *splicing* alternativo, y edición (Fig. 6). El *splicing* alternativo afecta a una región que precede al dominio transmembrana carboxilo terminal de cada una de las cuatro subunidades. Dicha secuencia puede aparecer en dos versiones denominadas “flip” y “flop” codificadas por exones adyacentes (Sommer et al., 1990). La presencia de una u otra isoforma afecta la amplitud de la corriente que pasa a través del receptor en respuesta a glutamato (Coleman et al., 2006; Pei et al., 2009). Otra región susceptible de *splicing* alternativo se encuentra en el dominio carboxilo terminal. Este fenómeno afecta a las subunidades GluA2 y GluA4 que son procesadas de manera diferencial, generando isoformas cortas o largas. GluA1 presenta la forma más larga, con alta homología con las formas largas de GluA2 y GluA4; y GluA3 presenta la forma corta con alta homología con las versiones cortas de GluA2 y GluA4 (Gallo et al., 1992; Köhler et al., 1994). Esta región contribuye a regular el transporte de los receptores al mediar interacciones con múltiples proteínas efectoras (Braithwaite et al., 2000; Dev et al., 1999).

El proceso de edición afecta al residuo 743 situado en la región de unión a ligando (LBD) de las subunidades GluA2-4. Se conoce como sitio de edición R/G debido al cambio de una arginina por una glicina. Este proceso está controlado durante el desarrollo de manera que ambas formas coexisten en el cerebro maduro y determinan las propiedades cinéticas del canal (Greger et al., 2006; Monyer et al., 1991).

Otro proceso de edición, en este caso en el residuo 607 situado en la región transmembrana del receptor y conocido como sitio Q/R, es específico de la subunidad GluA2 (Greger & Esteban, 2007). Mientras que en el resto de subunidades dicho residuo es una glutamina, en la subunidad GluA2 aparece una arginina que no está presente originalmente en la secuencia del gen, sino que el codón original (CGG) es editado en el pre-RNA (CAG). Este cambio en la secuencia de RNA, está altamente regulado durante el desarrollo y tiene lugar en el 99% de las subunidades GluA2 durante el desarrollo postnatal. Esta modificación afecta a la

permeabilidad del canal, de manera que su presencia genera receptores impermeables al  $\text{Ca}^{2+}$  y de este modo determina las propiedades del flujo iónico a través de los receptores (Seeburg et al., 1998).

Los receptores funcionales se forman por la combinación de cuatro subunidades preferentemente formadas por dos heterómeros iguales. En el hipocampo maduro la mayoría de los receptores están formados por dímeros GluA1/GluA2 o GluA2/GluA3 (Wenthold et al., 1996), mientras que los receptores que contienen la subunidad GluA4 se expresa principalmente en etapas tempranas del desarrollo postnatal (Zhu et al., 2000).



**Figura 6.** Representación topológica de la estructura general de receptores AMPA.

Además la familia de proteínas TARP (transmembrane AMPA regulatory proteins), interacciona con todas las subunidades de los receptores AMPA (Tomita et al., 2003; Ziff, 2007) y actúan como subunidades auxiliares (Fukata et al., 2005), formando parte integral del canal. Son críticas para su expresión en membrana ya que se unen a proteínas MAGUK (membrane-associated guanylate kinase) de la densidad post-sináptica como PSD95 y PSD93 a través de

dominios PDZ, (*Drosophila disc large tumor suppressor (Dlg1)*, zonula occludens-1 protein (zo-1)) que estabilizan los receptores en la membrana sináptica e intervienen en la determinación de sus propiedades cinéticas (Bedoukian et al., 2006; Cho et al., 2007; Priel et al., 2005; Turetsky et al., 2005)

Dado que la activación de receptores NMDA durante procesos de plasticidad sináptica supone la inserción o eliminación de receptores AMPA en la membrana post-sináptica, y que este hecho va a repercutir en la expresión y mantenimiento de la plasticidad a largo plazo, los procesos de transporte de receptores AMPA constituyen un objeto de estudio muy amplio.

### **3.2.1 Síntesis de receptores AMPA y transporte dendrítico**

En las neuronas, los receptores AMPA son fundamentalmente sintetizados y modificados en el retículo endoplasmático y el aparato de Golgi presente en regiones perinucleares del soma celular; y al igual que otras células polarizadas, requieren un sistema de transporte de proteínas capaz de asegurar la correcta distribución de estas en la región axonal o dendrítica, manteniendo así su polaridad (Kennedy & Ehlers, 2006; Shepherd & Huganir, 2007).

Numerosos estudios han demostrado que las dendritas contienen ambos sistemas de síntesis y modificación de proteínas, y que numerosos mensajeros son transportados a lo largo de las dendritas permitiendo la síntesis local de proteínas (Jiang & Schuman, 2002; Sutton & Schuman, 2005; Tang & Schuman, 2002). De hecho se ha demostrado que la síntesis de proteínas en dendritas puede producirse de manera regulada durante la plasticidad sináptica (Ju et al., 2004)

De manera general la síntesis y el ensamblaje de las subunidades de receptores AMPA está sometida a diferentes sistemas de control basados específicamente en su composición de subunidades. Los oligómeros formados por GluA1/GluA2, son dirigidos rápidamente hacia el aparato de Golgi donde son glicosilados, mientras que GluA2/GluA3 son retenidos en el retículo endoplasmático. Esta retención está regulada por el proceso de edición de la subunidad GluA2, de modo que las formas inmaduras permanecen en el retículo endoplasmático unidas a chaperonas como BiP (binding immunoglobulin protein) y calnexina (Fukata et al., 2005; Greger et al., 2002). Además existen determinadas secuencias en la región carboxilo terminal implicadas en esta retención: GluA2 contiene una secuencia PDZ (SVKI) que interacciona con la

proteína PICK1 (protein kinase C alpha binding protein), que determina su salida del retículo endoplasmático (Dev et al., 1999; Perez et al., 2001; Xia et al., 1999).

El transporte a lo largo de las dendritas es dependiente del citoesqueleto de microtúbulos y requiere del ensamblaje de las vesículas de transporte mediante proteínas motoras como las dineínas y kinesinas (Setou et al., 2004), que se unen a determinadas secuencias presentes en los receptores, como el caso de KIF5 que regula el transporte a través de su unión con la proteína de unión a GluA2, GRIP1 (glutamate receptor interacting protein) (Hoogenraad et al., 2005; Setou et al., 2002). Las dendritas también contienen en menor medida un citoesqueleto de actina por lo que proteínas motoras asociadas a actina como la Miosina V o Miosina VI también están implicadas en el transporte dendrítico de receptores AMPA (Lisé et al., 2006; Osterweil et al., 2005).

### **3.2.2 Transporte local de receptores AMPA en espinas dendríticas de hipocampo.**

En el interior de las espinas dendríticas el citoesqueleto microtubular es mayoritariamente sustituido por un citoesqueleto de actina (Ehlers, 1999; Halpain, 2000; Tashiro & Yuste, 2003), por tanto moléculas motoras asociadas a actina, como Miosina V dirigen el tráfico de los endosomas hacia el interior de las espinas dendríticas (Correia et al., 2008; Wang et al., 2008). A través de este citoesqueleto se produce un reciclaje continuo de receptores que son movilizados hacia la membrana plasmática o internalizados, de manera constitutiva, o de manera regulada dependiente de la actividad sináptica (LTD o LTP).

La inserción de los receptores AMPA en la membrana post-sináptica es un proceso que también depende de la combinación de subunidades que los formen. Así, experimentos basados en la sobreexpresión de distintas subunidades han mostrado como los heterotetrámeros formados por GluA2/GluA3 son insertados en la membrana de manera constitutiva, independientemente de la actividad sináptica (Passafaro et al., 2001; Shi et al., 2001). Mientras que los heterotetrámeros GluA1/GluA2 (Bagal et al., 2005) o homotetrámeros GluA1/GluA1 (Plant et al., 2006) son insertados en la membrana tras la inducción de procesos de plasticidad sináptica, dependientes de los receptores de NMDA.

### **3.2.2.1 Transporte Constitutivo**

La regulación de la inserción de los receptores GluA2 en la membrana sináptica está controlado por su región carboxilo terminal. Esta región interacciona con NSF (N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein) (Nishimune et al., 1998; Song et al., 1998), una proteína implicada en exocitosis cuya unión es fundamental para la expresión de GluA2 en la membrana (Beretta et al., 2005). Pese a que no se conoce bien el mecanismo que media esta interacción, se ha propuesto que esta unión produce la disociación del complejo GluA2/PICK1 y esto a su vez permite la inserción y estabilización de GluA2 en la densidad post-sináptica (Hanley et al., 2002). En este proceso de exocitosis están también implicados componentes del exocisto como Exo70 y Sec8, la chaperona hsp90 (heat shock protein 90) y Rab8, una GTPasa (guanosine triphosphatase) que controla el tráfico de los endosomas desde el aparato de Golgi (Gerges et al., 2004b, 2004a, 2006, 2005).

La internalización de los receptores es un proceso de endocitosis mediada por clatrina que requiere de proteínas adaptadoras como AP2 (adaptor protein 2) o GTPasas como la dinamina (Carroll et al., 1999a). Por otro lado interacciones que también dependen del extremo carboxilo terminal regulan la internalización y estabilización de reservorios intracelulares de GluA2, como es el caso de PICK1 (Hanley & Henley, 2005; Lu & Ziff, 2005) o su entrada en endosomas tempranos como GRIP1 (Steiner et al., 2005)(Fig. 7A).

### **3.2.2.2 Trasporte regulado durante la LTD**

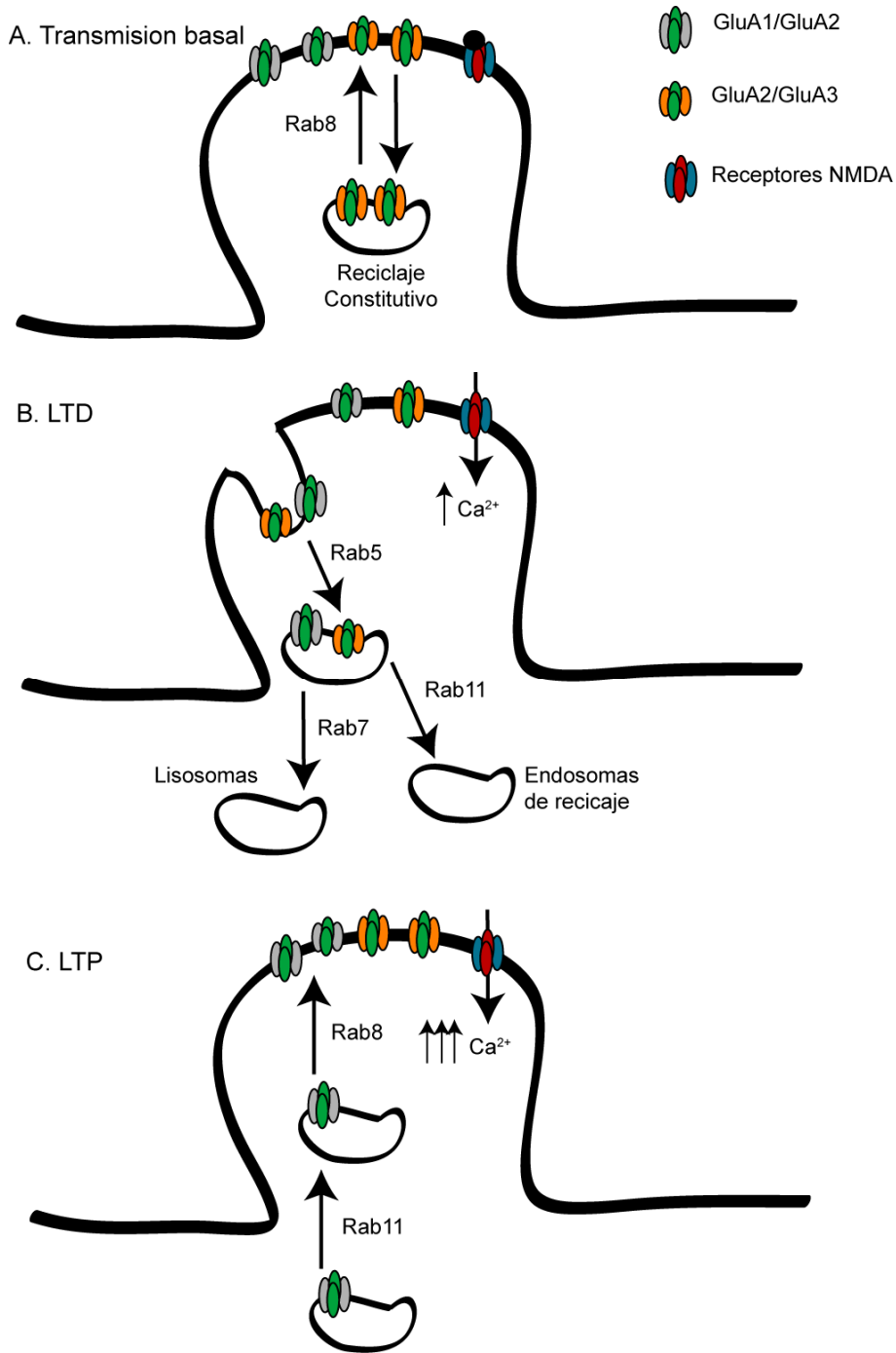
La internalización de los receptores AMPA (Fig. 7B) además de formar parte de un proceso de reciclaje constitutivo, puede tener lugar de manera regulada dependiente de la activación de los receptores de NMDA (Carroll et al., 1999b). Este fenómeno es también un proceso de endocitosis mediada por clatrina (Beattie et al., 2000; Wang & Linden, 2000) que comparte la maquinaria molecular implicada en procesos de reciclaje constitutivo como la proteína adaptadora AP2 cuya interacción con GluA2 es necesaria para la LTD (Lee et al., 2002; Lüscher et al., 1999). Este solapamiento ha complicado la identificación de las vías de señalización específicas implicadas, sin embargo se ha demostrado que se requieren flujos de  $Ca^{2+}$ , activación de calcineurina y defosforilación de los receptores (Lee et al., 2000, 2003).

Tras la internalización, dependiente de Rab5 (Brown et al., 2005), los receptores podrían ir a degradación en lisosomas o regresar a la sinapsis entrando en los endosomas de reciclaje dependientes de Rab11 (Ehlers, 2000; Fernández-Monreal et al., 2012; Lin et al., 2000).

### **3.2.2.3 Transporte regulado durante la LTP: GluA1/GluA2**

La inserción de receptores AMPA formados por las subunidades GluA1/GluA2 se produce de manera regulada durante procesos de LTP que requieren la activación de los receptores de NMDA y el aumento de  $Ca^{2+}$  intracelular (Hayashi et al., 2000; Malinow & Malenka, 2002; Passafaro et al., 2001; Shi et al., 1999, 2001). Pese a que se conoce muy poco acerca de la maquinaria de transporte implicada, numerosos estudios a lo largo de la última década han permitido un gran avance en el conocimiento de estos procesos. Son los endosomas de reciclaje, los que proporcionan una reserva de receptores en la proximidad de las espinas que permite la rápida movilización de estos para su inserción en la membrana durante la inducción de la LTP (Park et al., 2004). De hecho es Rab11, principal marcador de los endosomas de reciclaje en células eucariotas, la responsable de la movilización de los endosomas desde la base de las espinas hasta el interior de éstas, tal y como han demostrado los estudios basados en la sobreexpresión de dominantes negativos (Brown et al., 2007; Gerges et al., 2005; Park et al., 2004). Otra GTPasa, Rab8 ha sido relacionada con el transporte de los receptores de manera dependiente de la actividad sináptica. Ambas son indispensables para la expresión de la LTP, sin embargo actúan a distintos niveles (Fig. 7C). Mientras que Rab11 está localizada en la base de las espinas y controla el mantenimiento y la movilización de los endosomas al interior de la espina, Rab8 se encuentra en la proximidad de la membrana post-sináptica y dirige la inserción de los receptores en la membrana (Brown et al., 2007).

La inserción de los receptores resulta en un aumento de la transmisión sináptica excitatoria, al aumentar el número de receptores en la densidad post-sináptica, pero también contribuyen a este aumento de la excitabilidad otros factores, como el aumento de la liberación de glutamato en el terminal pre-sináptico, el incremento en el tamaño de las espinas, la aparición de nuevas espinas, el aumento de la conductancia de los canales o los cambios en su actividad (Lisman & Raghavachari, 2006).



**Figura 7.** Esquema representativo de los distintos eventos de transporte de los receptores AMPA en el interior de las espinas dendríticas. **A.** Durante transmisión basal tiene lugar un continuo reciclaje de los receptores mediante exocitosis específica para los heterotetrámeros formados por las subunidades GluR2/GluR3 mediada por Rab8. **B.** La inducción de la LTD produce internalización de los receptores por endocitosis dependiente de clatrina y mediada por Rab5. **C.** La inducción de la LTP produce movilización de heterotetrámeros GluA1/GluA2 mediada por Rab11 y Rab8.



Los cambios en la actividad de los receptores AMPA están controlados por fosforilación directa. La activación de la proteína CaMKII, resulta en la fosforilación de GluA1 (serina 831) (Barria et al., 1997a, 1997b; Mammen et al., 1997) lo cual conlleva un aumento en la conductancia de los receptores. Sin embargo este sitio de fosforilación no es necesario para la incorporación de los receptores a la membrana, sino para la posterior expresión y mantenimiento de la LTP (Benke et al., 1998; Derkach et al., 1999; Hayashi et al., 2000; Malenka et al., 1989). El aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular activa también la adenilato ciclasa lo cual aumenta los niveles de AMPc (cyclic adenosine monophosphate) que actúa como segundo mensajero activando la PKA. Esta kinasa es a su vez, responsable de la fosforilación de GluA1 (serina 845) (Roche et al., 1996) favoreciendo así la inserción de los receptores en la membrana (Esteban et al., 2003; Huang & Kandel, 1994). La PKC también fosforila la subunidad GluA1 (serina 818) siendo esta fosforilación un paso clave para el transporte de receptores (Boehm et al., 2006). Se ha propuesto que actúa favoreciendo interacciones con dominios PDZ. Y por último, modificaciones en la composición lipídica de la membrana post-sináptica a través de la activación de PI3K (phosphoinositide 3-kinase), que convierte  $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$  en  $\text{PI}(3,4,5)\text{P}_3$ , también colabora en la estabilización de los receptores en la membrana (Arendt et al., 2010; Man et al., 2003).

#### **4. Papel de las proteínas GTPasas en potenciación a largo plazo (LTP)**

Las proteínas monoméricas GTPasas, constituyen una familia con actividad hidrolasa que funcionan como interruptores moleculares para una gran variedad de rutas de transducción de señales, al alternar entre un estado activo unidas a GTP (guanosine triphosphate) y un estado inactivo unidas a GDP (guanosine diphosphate), estableciendo interacciones específicas en uno u otro estado. Numerosos estudios han revelado la participación de GTPasas, incluyendo miembros de las subfamilias Ras, Rap, Rab y Rho en transmisión sináptica y en procesos de plasticidad (Sheng & Kim, 2002; Tada & Sheng, 2006).

##### **4.1 Proteínas Ras**

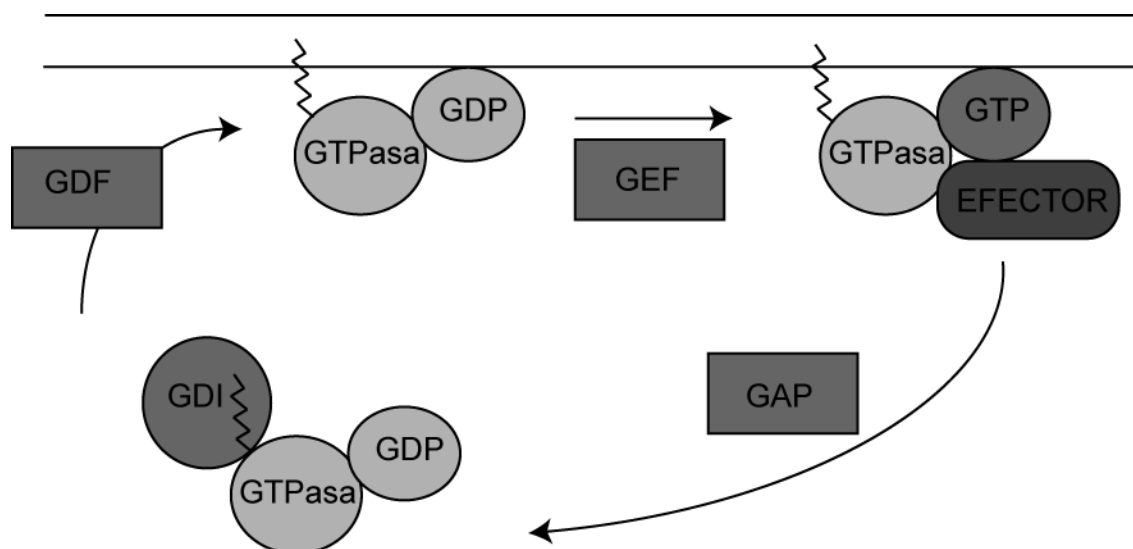
Los miembros de la familia Ras, regulan importantes funciones neuronales, como la diferenciación neuronal o el desarrollo de espinas. En hipocampo adulto se ha descrito como Ras se activa durante la LTP dependiente de receptores de NMDA y controla cascadas de transducción de señales a través de la activación de la vía de las MAPKs (microtubule associated

protein kinase) (Thomas & Huganir, 2004), que permite cambios en la morfología de las espinas, así como regulación génica mediante activación de factores de transcripción como la proteína CREB (cAMP response element-binding) (Adams & Sweatt, 2002).

#### **4.1.1 Proteínas Rab**

Los miembros de la familia de proteínas Rab se encargan de la regulación del sistema de tráfico de membranas intracelular. El sistema de tráfico intracelular está compuesto por una amplia red de cuerpos vesiculares, diferenciados en función del proceso de transporte en el que participan. De manera esquematizada las vesículas procedentes de la internalización de los componentes de la membrana son transportadas a través de los endosomas tempranos, para su posterior reciclaje en los endosomas de reciclaje o para su degradación en los lisosomas. Además, las proteínas procedentes de nueva síntesis que abandonan el aparato de Golgi pueden unirse a alguno de estos compartimentos antes de su inserción en la membrana plasmática. Este sistema compartimentado, es posible gracias a la localización de las proteínas Rab y sus efectores en orgánulos específicos, que se encargan de dirigir el transporte de los componentes de la membrana a su destino ya sea para almacenaje formando reservas intracelulares, para su reciclaje o para su degradación (Fukuda, 2008; Zerial & McBride, 2001).

Al igual que el resto de las GTPasas, las proteínas Rab alternan entre un estado inactivo y un estado activo. En su estado inactivo se encuentran unidas a GDP y forman complejos con proteínas GDI (guanosine nucleotide dissociation inhibitors), que enmascaran sus grupos prenilo y evitan así, su unión a las membranas lipídicas. La activación de rutas de señalización específicas permite reclutar proteínas GDF (GDI-displacement factor) a las membranas diana, las cuales catalizan la disociación de las proteínas Rab y GDI, permitiendo la unión a la membrana a través de la interacción de los grupos prenilo con la bicapa lipídica. Una vez unidas a la membrana intercambian GDP por GTP en un proceso catalizado por efectores llamados GEF (GTPase exchange factor). La unión a GTP produce un cambio conformacional en las proteínas Rab, que permite su unión a proteínas efectoras, así como también hace posible la hidrólisis de GTP para lo que requieren de proteínas GAP (GTPase activation protein) que facilitan la actividad enzimática de las proteínas Rab. La conversión de GTP en GDP permite de nuevo el reclutamiento de proteínas GDI y el retorno de la proteína Rab inactiva al citosol (Barr & Lambright, 2010; Grosshans et al., 2006) (Fig. 8).



**Figura 8.** Ciclo de activación/desactivación de las GTPasas. En su estado inactivo unidas a GDP permanecen en el citosol con su grupo prenilo enmascarado por la unión a factores GDI. Su unión a GTP permite su activación y el reclutamiento de otras proteínas efectoras. Adaptado de Grosshans et al., 2006.

Mediante este mecanismo de acción general las proteínas Rab controlan en las neuronas multitud de procesos relacionados con la transmisión sináptica (Baskys et al., 2007), como es el caso de Rab5 que participa en procesos de endocitosis durante la LTD dependiente de receptores de NMDA (Brown et al., 2005), Rab8 que está implicada en exocitosis durante la transmisión basal y la LTP (Brown et al., 2007; Gerges et al., 2004a), Rab7 que está relacionada con degradación en lisosomas; y Rab11 que dirige el reciclaje y retorno a la membrana plasmática de los receptores internalizados durante la LTD (Fernández-Monreal et al., 2012), así como la inserción de los endosomas en las espinas dendríticas de manera dependiente de la activación de receptores de NMDA (Brown et al., 2007).

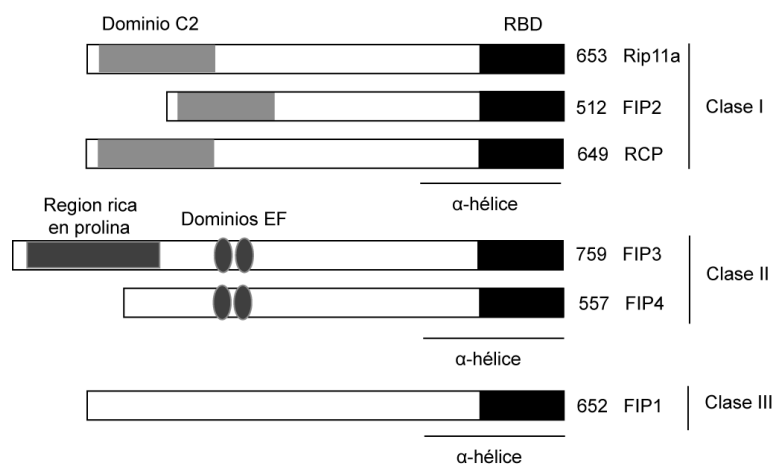
El hecho de que tanto en la vía constitutiva de transporte de los receptores AMPA como en la sujeta a regulación, la inserción de receptores en la membrana esté controlada por Rab8, sugiere que es un factor clave en el tráfico local de receptores AMPA en el interior de las espinas. Rab11, por otro lado controla el tráfico de aquellos endosomas que son movilizados bajo la inducción de la LTP. Esto pone de manifiesto la existencia de unas reservas intracelulares de receptores sometidas a una fina regulación. Sin embargo, el modo en que Rab11 controla y mantiene dicha reserva, así como la maquinaria de transporte específica que permite su entrada

en las espinas dendríticas tras la inducción de la LTP, son aún desconocidas. El descubrimiento de una familia de proteínas efectoras de unión a Rab11, que podría regular su localización y funcionamiento y que además tiene la capacidad de dirigir vesículas de transporte hacia determinadas poblaciones de endosomas, abre un nueva vía de regulación de la actividad de Rab11.

### 5. Familia de proteínas de interacción con Rab11 (Rab11-FIPs)

La familia de proteínas Rab11-FIP (Rab11-family interacting protein) constituyen un grupo de efectores de Rab11 que modulan el tráfico de vesículas dependientes de dichas GTPasas. Hasta la fecha han sido identificadas seis proteínas, todas ellas caracterizadas por la presencia de una región altamente conservada en su dominio carboxilo terminal de unión a Rab11 (RBD), y divididas en tres clases distintas basadas en la presencia de otros dominios estructurales conservados (Fig. 9) (Prekeris, 2003).

- **Clase I:** Formada por Rip11, FIP2 y RCP. Todas ellas contienen un dominio amino terminal llamado dominio C2 (200 aa) de unión a membranas. Fundamentalmente une PI(3,4,5)P<sub>3</sub> y ácido fosfatídico.
- **Clase II:** Formada por FIP3 y FIP4. Contiene en la región amino terminal dominios llamados *EF-hands*, típicamente de unión a Ca<sup>2+</sup> y regiones ricas en prolina.
- **Clase III:** FIP1 no comparte homología estructural con ningún miembro de la familia.



**Figura 9.** Estructura y clasificación de la familia de proteínas efectoras de Rab11, Rab11-FIPs. Adaptado de Prekeris, 2003.

Todas ellas fueron aisladas por su capacidad para interactuar con Rab11 en ensayos de doble híbrido y *pull-down* (Hales et al., 2001; Prekeris et al., 2001, 2000). La clase I puede interactuar con Rab14 (Kelly et al., 2010), RCP además es capaz de unir Rab4; y FIP3 y FIP4 han sido identificadas como proteínas de unión a Arf-GTPasas (ADP ribosylation factor-GTPasa) (Lindsay et al., 2002; Shin et al., 1999, 2001; Wallace et al., 2002). Todas ellas tienen una alta afinidad por Rab11 en su estado activo unida a GTP (Junutula et al., 2004b).

La región de alta homología es un dominio de unos 70 aa de la región carboxilo terminal con estructura hidrófoba  $\alpha$ -hélice enrollada, que contiene una secuencia de 20 aa implicada en la unión a Rab11 (RBD) y una región implicada en la dimerización. Estas secuencias solapan parcialmente. El dominio de dimerización permite la formación de homodímeros y en el caso de algunos miembros de la familia también es posible la formación de heterodímeros (Junutula et al., 2004b; Meyers & Prekeris, 2002), un mecanismo que podría generar variabilidad funcional y permite la interconexión de diferentes rutas de señalización.

Rab11-FIP2, una proteína de 512 aa perteneciente a la clase I, resulta especialmente interesante debido a la presencia de dominios únicos en su secuencia. La presencia de su dominio de interacción con membranas permite su asociación directa con bicapas lipídicas, siendo dicho dominio suficiente y necesario para mediar estas uniones (Lindsay & McCaffrey, 2002).

Es el único miembro de la familia capaz de unir de manera directa MiosinaV, gracias a una secuencia situada en la región central que comprende los residuos 129-356 (Ducharme et al., 2005; Hales et al., 2001, 2002). De hecho, se ha descrito la participación de FIP2 en procesos reciclaje de la membrana apical a través de los endosomas de reciclaje mediante la formación de complejos con Rab11 y MiosinaV, que regulan el tráfico de una amplia variedad de receptores de membrana como el receptor de transferrina (Lindsay & McCaffrey, 2002), el receptor de quimioquinas CXCR2 (Fan et al., 2004), el canal de aquaporinas (Nedvetsky et al., 2007), el transportador de glucosa GLUT4 (Schwenk et al., 2007), receptores de norepinefrina (Matthies et al., 2010), receptor  $\beta$ -adrenérgico (Gardner et al., 2011), o el transporte de la proteína NPC1L1(Niemann-Pick C1-like 1) encargada de la absorción de colesterol (Chu et al., 2009). Su interacción con MiosinaV parece ser dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  como han mostrado trabajos en neuronas de hipocampo, en los que se ha propuesto que FIP2 actúa como nexo en el

proceso en ensamblaje de los endosomas de reciclaje con la maquinaria de transporte durante plasticidad sináptica (Wang et al., 2008).

Además de esta región de interacción con MiosinaV, han sido descritas en FIP2 tres secuencias NPF, formadas por tres aminoácidos Asn-Pro-Phe (323-325, 406-408, 439-441). Estas secuencias están implicadas en el reconocimiento de dominios EH, presentes en proteínas relacionadas con procesos de endocitosis y transporte de vesículas. Así se ha encontrado que FIP2 interacciona con Reeps1 (RALBP1 associated Eps domain containing 1) y  $\alpha$ -adaptina para llevar a cabo la internalización de EGFR (epidermal growth factor receptor) (Cullis et al., 2002), así como interacciones con EHD1 (EH domain containing protein 1) y EHD3 (EH domain containing protein 3), implicadas en el transporte de vesículas desde los endosomas tempranos (Naslavsky et al., 2006).

A nivel de desarrollo se ha encontrado que FIP2 participa también en procesos de establecimiento de polaridad en células epiteliales, siendo este proceso regulado por una fosforilación en el residuo serina227 por la kinasa MARK2 (MAP/microtubule affinity-regulating kinase 2), de manera independiente de Rab11 y MiosinaV (Ducharme et al., 2006; Lapierre et al., 2012).

Estas características junto con las numerosas funciones en las que se haya implicada FIP2, indican que es un regulador multifuncional, capaz de controlar el proceso de reciclaje en varios niveles. Estudios recientes han señalado que las distintas interacciones que establece con otros FIPs están implicadas en el control espacio-temporal del proceso de tráfico intracelular no solo a nivel de los endosomas de reciclaje, sino también durante endocitosis y transporte hacia los endosomas tempranos (Baetz & Goldenring, 2013; Ducharme et al., 2011).

Pese a que se conoce muy poco sobre la expresión y funcionamiento de FIP2 en neuronas (Wang et al., 2008), es un candidato excelente para mediar el tráfico de receptores AMPA durante los procesos de plasticidad sináptica (LTP), controlando el transporte de los endosomas de reciclaje en los que se encuentra Rab11 y su correcto ensamblaje con la maquinaria de transporte. Es por ello que el objetivo principal de este trabajo será la caracterización de FIP2 en neuronas de hipocampo así como la determinación de su función en el transporte de los receptores AMPA durante procesos de plasticidad sináptica.

# OBJETIVOS





## **OBJETIVOS**

**Objetivo general: determinación del papel de FIP2 en la regulación de la función sináptica mediada por receptores de glutamato tipo AMPA.**

1. Caracterización de la expresión de FIP2 en neuronas de hipocampo.
2. Identificación de las interacciones moleculares establecidas por FIP2 en neuronas de hipocampo.
3. Determinar la función de FIP2 en el tráfico intracelular de receptores AMPA durante transmisión basal y durante procesos de plasticidad sináptica (LTP).
4. Descripción de los mecanismos reguladores de la actividad de FIP2.



# **MATERIAL Y MÉTODOS**



## 1. Material

### 1.1 Tabla de Soluciones y Medios

Solución	Composición
ACSF	119 mM NaCl 2.5 mM KCl 1 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 11 mM Glucosa 26 mM NaHCO <sub>3</sub> 4 mM MgCl <sub>2</sub> 4 mM CaCl <sub>2</sub>
Medio de disección para cultivos organotípicos de hipocampo	10 mM D-Glucosa 4 mM KCl 26 mM NaHCO <sub>3</sub> 233.7 mM Sacarosa 5 mM MgCl <sub>2</sub> 1mM CaCl <sub>2</sub> Rojo fenol
Medio de disección para cultivos primarios de neuronas de hipocampo	Medio de Hanks (Gibco) 10 mM HEPES pH 7.3
Medio de cultivo para cultivos organotípicos de hipocampo	MEM (Sigma) 20% Suero de caballo (Invitrogen) 1 mM L-Glutamina 1 mM CaCl <sub>2</sub> 2 mM MgSO <sub>4</sub> 1 mg/ml Insulina 0.0012% Ácido Ascórbico 30 mM HEPES 13 mM D-Glucosa 5.2 mM NaHCO <sub>3</sub>
Medio de cultivo para cultivos primarios de neuronas de hipocampo	MEM (Gibco) 20% D-Glucosa 10% Suero de Caballo
Medio LB	1% Triptona 0.5% Extracto de levadura 171 mM NaCl
Medio LB-Agar	LB +1.5% Agar
PBS (1X)	137 mM NaCl 2.7 mM KCl 10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1.75 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 7.4

<b>Solución</b>	<b>Composición</b>
Solución de Borato	0.05 M Ácido Bórico 0.01 M Na-Borato pH 8.5
Solución de bloqueo para cultivos organotípicos de hipocampo	PBS pH 7.4 2% Suero de caballo (Invitrogen) 0.3% TritonX-100
Solución de bloqueo para cultivos primarios de neuronas de hipocampo	PBS pH 7.4 0.22% Gelatina 0.1% TritonX-100
Solución de fijación	PBS pH 7.4 4% paraformaldehído 4% Sacarosa
Solución interna para registros electrofisiológicos	115 mM CsMeSO <sub>3</sub> 20 mM CsCl 10 mM HEPES 2.5 mM MgCl <sub>2</sub> 4 mM Na <sub>2</sub> -ATP 0.4 mM Na-GTP 10 mM Na-Fosfocreatina 0.6 mM EGTA
Solución de resuspensión para bacterias	50 mM Tris-HCl pH 7.5 500 mM NaCl 5 mM MgCl <sub>2</sub> 1 mM DTT Inhibidores de proteasas (Roche)
Solución de Transferencia	0.2 M Tris base 1.5 M Glicina 20% Metanol (v/v)
Tampón de carga de proteínas (5X)	125 mM Tris-HCl 20% (v/v) Glicerol 4% SDS 0.02% DTT
Tampón de carga de DNA (5X)	1.5 M Sacarosa 1 mM EDTA 38% Glicerol
Tampón de electroforesis	0.25 M Tris base 2 M Glicina 1% SDS
Tampón de lisis de cultivos organotípicos de hipocampo	10 mM HEPES pH 7.4 150 mM NaCl 10 mM EDTA 1% TritónX-100 Inhibidores de proteasas (Roche) Inhibidores de fosfatasa (Roche)

Solución	Composición
Tampón de lisis para ensayos de <i>pull-down</i>	10 mM HEPES pH 7.4 150 mM NaCl 5 mM MgCl <sub>2</sub> 1 mM DTT 1% TritonX-100 5% Glicerol Inhibidores de proteasas (Roche) Inhibidores de fosfatasa (Roche)
Tampón RIPA	50 mM Tris HCl pH 7.4 150 mM NaCl 10 mM EDTA 1% TritonX-100 0.1 % SDS 0.5 % Na-Deoxicolato Inhibidores de proteasas (Roche) Inhibidores de fosfatasa (Roche)
TBS (10x)	0.1 M Tris base 1.5 M NaCl pH 7.4 con HCl concentrado
TBS-Tween (10x)	0.1 M Tris base 1.5 M NaCl 0.5% Tween-20 pH 8.0 con HCl concentrado
Tinción de Ponceau	1% Ponceau 1% Ácido Acético

## 1.2 Tabla de anticuerpos primarios

Los anticuerpos primarios se emplearon de acuerdo con las instrucciones proporcionadas por el proveedor. De manera general fueron usados a concentraciones de 1:2000 a 1:500 para experimentos de *western blot* y entre 1:200 a 1:100 para inmunofluorescencia.

Antígeno	Referencia	Casa comercial	Especie
FIP	AB76892	ABCAM	Rb
GFP	11814460001	Roche	Ms
GluA1	AB31232	ABCAM	Rb
Rab11	610656	BD Biosciences	Ms
mCherry	GTX59788	Genetex	Rb
Actina	MAB1501R	Milipore	Ms
P-Ser	0701/PSER-KIT	Nanotools	Rb

### 1.3 Tabla de anticuerpos secundarios

Antígeno	Referencia	Casa comercial	Dilución
Alexa 488 Donkey anti-rabbit IgGs	A-21206	Invitrogen	1:500
Alexa 594 Donkey anti-rabbit IgGs	A-21207	Invitrogen	1:500
Alexa 594 Donkey anti-rabbit IgGs	A-21203	Invitrogen	1:500
Anti-Rabbit IgG-HRP	A6154	Sigma	1:10000
Anti-Mouse IgG-HRP	A4416	Sigma	1:10000

### 1.4 Tabla de enzimas de restricción

Las enzimas de restricción fueron empleadas de acuerdo a las instrucciones proporcionadas por el proveedor.

Enzima	Casa Comercial
BamHI	New England Biolab
BbvCI	New England Biolab
Bgl II	New England Biolab
BspEI	New England Biolab
BsrGI	New England Biolab
EcoRI	New England Biolab
HindIII	New England Biolab
KpnI	New England Biolab
NheI	New England Biolab
PacI	New England Biolab
PmlI	New England Biolab
PspOMI	New England Biolab
PstI	New England Biolab
SacII	New England Biolab
XbaI	New England Biolab
XmnI	New England Biolab



### 1.5 Tabla de oligonucleotidos

Nombre	Secuencia 5'-3'
FIPantisense	GGACGGGAATTCTAGCTATTGGTAAACTTGCCAGCTTTCC
FIPsense	GGACGGGGATCCATGATGCTGTCTGAGCAAGCCCAAAGTG
FIP2-I481E-sense	GAAGCACAAGAAGACTCCTTCGGAGGAAGGACACCCACATCCGGGAGCTCGAGG ACTACGAGGACAACCTCCTTGTCAGGGTGATGG
FIP2-Ala	CTGGGTCTCAGCGGCTCTTCTGCGCATGCGATGTCTGATTTAACTGGGTCCC
FIP2-Asp	CTGGGTCTCAGCGGCTCTTCTGCCCATGACATGTCTGATTTAACTGGGTCCC
shFIP2	GGAACAACATGACAGCAAGCATTCAAGAGATGCTTGCTGTCATGT TGTTCTTTTTTGT
shScrambled	GGAACAACATGACAGCAAGCATTCAAGAGATACTTTCTTGCGCTTGGTTCTTTT TTGT

## 2. Métodos

### 2.1 Manipulación de DNA

#### 2.1.1 Clonaje de DNA para sobreexpresión de proteínas de fusión a GFP (Green fluorescence protein)

El cDNA para Rab11-FIP2 de rata (accession number NM-001107447) fue obtenido mediante RT-PCR (reverse transcription polymerase chain reaction) a partir de mRNA extraído y purificado de un homogeneizado de hipocampo de rata, mediante un kit comercial (Quiagen, RNAeasy kit 74104). Para la reacción de RT-PCR se emplearon los oligonucleotidos FIP2sense y FIP2antisense en los que además se insertaron las secuencias de corte para las enzimas de restricción BamHI y EcoRI. El vector pEGFP-C1 (Clontech) fue digerido con las enzimas de restricción Bgl II y EcoRI. La ligación del inserto generado y el plásmido se llevó a cabo mediante un kit comercial de ligación (Takara kit).

Para la amplificación del DNA se transformaron bacterias *E.coli* DH5 $\alpha$  con el producto de la ligación anterior por choque térmico 42°C 30 segundos. La suspensión de bacterias se incubó 1 hora a 37°C en medio LB. Posteriormente se cultivaron las bacterias en placas de LB-Agar + Kanamicina (100  $\mu$ gr/ $\mu$ l). Para la confirmación de la inserción se inocularon colonias aisladas en medio LB + Kanamicina (100  $\mu$ gr/ $\mu$ l), se purificó el DNA plasmídico mediante un kit comercial (Promega) y se digirió con la enzima de restricción HindIII. La confirmación del tamaño de los fragmentos de DNA se llevó a cabo mediante electroforesis en gel de agarosa 1% con SYBR-Green (Life technologies). Las muestras de DNA fueron cargadas en el gel tras la adición de tampón de carga. Los fragmentos fueron visualizados en el gel a través de una transiluminador UV.

A partir de esta construcción se generaron los mutantes de delección: GFP-FIP2- $\Delta$ C2 mediante corte de la región amino-terminal con las enzimas de restricción BsrGI y BspEI y GFP-FIP2- $\Delta$ RBD mediante corte de la región carboxilo terminal con las enzimas de restricción PstI y SacII. El análisis del tamaño de los fragmentos de DNA se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa 1%. En ambos casos se generaron extremos romos mediante incubación con T4-DNA polimerasa en presencia de dNTP's (desoxirribonucleótidos trifosfato) y se llevó a cabo la religación del vector. Para la amplificación del DNA se transformaron bacterias competentes y

se siguió el mismo protocolo anteriormente detallado. La confirmación de las deleciones se evaluó a través de digestión con enzimas de restricción (EcoRI y NheI para GFP-FIP2- $\Delta$ RBD y PmlI y NheI para GFP-FIP2- $\Delta$ C2).

Los mutantes puntuales, para el sitio de unión a Rab11, GFP-FIP2-I481E, así como para el sitio de fosforilación serina227, GFP-FIP2-S227A y GFP-FIP2-S227D se obtuvieron a partir de la construcción GFP-FIP2, por mutagénesis dirigida mediante el diseño de oligonucleótidos que contienen la mutación deseada (FIP2Ala-sense, FIP2Asp-sense y FIP2-I481Esense). Se llevó a cabo una reacción de PCR optimizando las condiciones en cada uno de los casos, y el producto de esta PCR fue purificado en gel de agarosa y reemplazado mediante digestión enzimática en el vector original y posterior ligación. Las enzimas empleadas fueron XmnI y EcoRI para GFP-FIP2-I481E y BbvCI y EcoRI para los mutantes para la serina227. La amplificación del DNA se llevó a cabo por transformación de bacterias competentes y se siguió el mismo protocolo anteriormente detallado.

Todas las construcciones fueron posteriormente subclonadas en el vector viral pSinRep5, por digestión enzimática con las enzimas NheI y PspOMI. Se llevó a cabo la ligación del DNA y su amplificación siguiendo el mismo protocolo anteriormente detallado.

### 2.1.2 Clonaje de DNA para silenciamiento génico

Se diseñó una secuencia de shRNA (small hairpin RNA) de 21 nucleótidos (5'-GGAACAACATGACAGCAAGCA-3') específicamente para el silenciamiento génico de FIP2, así como una secuencia control *scrambled* (5'-GGAACAACATGACAGCAAGCA-3') mediante el uso de una herramienta *on line* con la siguiente dirección de acceso: <http://www.genelink.com/sirna/shrnai.asp>. Los oligonucleótidos diseñados, deben contener la secuencia de interés seguida de una región llamada "horquilla" que formará un bucle necesario para el procesamiento de los shRNA, y de nuevo la secuencia complementaria y una secuencia cohesiva XbaI. Este oligonucleótido y su secuencia complementaria fueron hibridados después de su desnaturalización a 100°C. El vector lentiviral KH1-LV fue digerido con XbaI y se llevó a cabo la ligación para la inserción de la secuencia en el plásmido viral. La comprobación de la inserción de las secuencias se realizó a cabo por digestión enzimática con PacI y la amplificación

del DNA se llevó a cabo por transformación de bacterias competentes y se siguió el mismo protocolo anteriormente detallado.

### **2.1.3 Clonaje de DNA para expresión de proteínas de fusión a GST**

El cDNA para Rab11-FIP2 fue digerido con las enzimas de restricción BamHI y EcoRI y se insertó en el vector pGEX a continuación del cuadro de lectura de GST (glutathione S-transferase), previa digestión del plásmido con las mismas enzimas de digestión. La ligación del inserto generado y el plásmido se llevó a cabo mediante un kit comercial de ligación (Takara kit).

Para la amplificación del DNA se transformaron bacterias *E.coli* DH5 $\alpha$  con el producto de la ligación anterior por choque térmico 42°C 30 segundos. La suspensión de bacterias se incubó 1 hora a 37°C en medio LB. Posteriormente se cultivaron las bacterias en placas de LB-Agar + Ampicilina (100  $\mu$ gr/ $\mu$ l). Para la confirmación de la inserción se inocularon colonias aisladas en medio LB + Ampicilina (100  $\mu$ gr/ $\mu$ l), se purificó el DNA plasmídico mediante un kit comercial (Promega) y se digirió con la enzima de restricción PstI. La confirmación del tamaño de los fragmentos de DNA se llevó a cabo mediante electroforesis en gel de agarosa 1% con SYBR-Green (Life technologies). Las muestras de DNA fueron cargadas en el gel tras la adición de tampón de carga. Los fragmentos fueron visualizados en el gel a través de una transiluminador UV.

A partir de esta construcción se generaron dos mutantes para el dominio de RBD. El mutante de delección GST-FIP2- $\Delta$ RBD se obtuvo mediante corte de la región carboxilo terminal con las enzimas de restricción KpnI y EcoRI. El análisis del tamaño de los fragmentos de DNA se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa 1%. Se generaron extremos romos mediante incubación con T4-DNA polimerasa en presencia de dNTP's y se llevó a cabo la religación del vector. Para la amplificación del DNA se transformaron bacterias competentes y se siguió el mismo protocolo anteriormente detallado.

La generación del mutante puntual para la interacción con Rab11, GST-FIP2-I481E, se llevó a cabo mediante la sustitución de un fragmento del plásmido GST-FIP2 por el mismo fragmento conteniendo la mutación extraído de la construcción previamente generada en GFP. Para ello ambos plásmidos, GFP-FIP2-I481E y GST-FIP2 fueron digeridos con HindIII y EcoRI. Los fragmentos correspondientes al vector digerido GST-FIP2 y a la secuencia conteniendo la

mutación puntual fueron purificados en gel de agarosa y ligados mediante un kit comercial (Takara kit). Para la amplificación del DNA se transformaron bacterias competentes y se siguió el mismo protocolo anteriormente detallado.

## **2.2 Producción de virus para infección de cultivos**

### **2.2.1 Virus Sindbis**

La producción de partículas virales para la sobreexpresión de proteínas de fusión de GFP se llevó a cabo mediante el uso del sistema de expresión viral Sindbis (Invitrogen #K750-01), formado por el plásmido pSinRep5 que contendrá las construcciones clonadas y genes codificantes para las replicasas de los RNAs subgenómicos; y el plásmido auxiliar DH-BB, que contiene los genes necesarios para la síntesis de la cápside vírica. Una vez clonadas las construcciones de interés en el plásmido pSinRep5, se linearizaron ambos plásmidos (pSinRep5 y DH-BB) y se llevó a cabo una reacción de transcripción para obtener las secuencias de mRNA. Estas secuencias serán introducidas mediante electroporación en células BHK (baby hamster kidney), donde se producirá la síntesis de proteínas, la encapsulación de las partículas virales y su liberación al medio de cultivo. Todo ello se llevó a cabo siguiendo protocolos descritos previamente (Gerges et al., 2005).

Este medio de cultivo será recogido y ultracentrifugado (30.000 rpm) 48 horas después de la electroporación para la concentración de las partículas virales infecciosas y defectivas. Los virus son almacenados a -80°C en alícuotas.

### **2.2.2 Lentivirus**

La producción de partículas virales para el silenciamiento génico de FIP2 se llevó a cabo mediante un sistema de expresión lentiviral basado en el plásmido KHI-mCherry que contendrá las secuencias de interés, así como dos plásmidos auxiliares que contendrán los genes estructurales necesarios para la síntesis de las partículas virales: pCMVdR8.74 y pMD2G (Salmon & Trono, 2006). Estas construcciones fueron prestadas generosamente por el laboratorio de la Dra. María S. Soengas (CNIO, Madrid). Estas construcciones fueron introducidas en células 293-FT mediante transfección con fosfato cálcico. Estas células producen y liberan las partículas virales infecciosas y defectivas al medio de cultivo, donde serán recogidas y ultracentrifugadas

(30.000 rpm) 48 horas después de la transfección para su concentración. Los virus son almacenados a -80°C en alícuotas.

## **2.3 Cultivos celulares y tisulares**

### **2.3.1 Cultivos organotípicos de hipocampo**

Los cultivos organotípicos de hipocampo se llevaron a cabo a partir de ratas *Wistar* (5-7 días post-natal) mediante extracción de los hipocampos en medio de disección. Se obtuvieron rodajas transversales de alrededor de 400 µm de grosor que fueron emplazados en membranas porosas (Millipore). Estos cultivos fueron mantenidos con medio de cultivo a 35.5°C durante periodos de tiempo variables de entre 5-12 días en función de los experimentos realizados (Fuller & Dailey, 2007).

### **2.3.2 Cultivos primarios de neuronas de hipocampo**

Se llevaron a cabo cultivos mixtos de neuronas de hipocampo de embriones de rata *wistar* E-18. La disección se llevó a cabo en medio HBSS (Hank's buffered salt solution) frío, y los hipocampos fueron disgregados mediante adición de Tripsina (0.2%) y tracción mecánica. La densidad de células se calculó mediante el uso de una cámara de Neubauer, y se plaquearon 250.000 células en placas petri de 60 mm de diámetro conteniendo cubreobjetos previamente tratados con poli-lisina (1 mg/ml en solución de Borato) para facilitar la adhesión de las células a la superficie de los cristales. Se incubaron a 37°C durante 3-4 horas con medio de cultivo que fue después sustituido por Neurobasal (Gibco) enriquecido con B27 (Gibco) y L-Glutamina (2 mM) para favorecer el desarrollo de las neuronas. Estos cultivos se mantuvieron *in vitro* durante 21 días antes de su uso (Kaech & Banker, 2006).

## **2.4 Infección de cultivos primarios y organotípicos con vectores virales**

La infección de cultivos organotípicos de hipocampo con virus Sindbis o Lentivirus se llevó a cabo por micro-inyección con pipetas de cristal que se introducen en el interior del tejido y liberan su contenido gracias a pulsos de aire comprimido. En el caso de cultivos primarios la infección se llevó a cabo por la adición directa de las partículas virales en el medio de cultivo celular (Malinow et al., 2010).

## 2.5 Tratamientos

### 2.5.1 Inducción química de la LTP

Las rodajas de hipocampo de 7-10 días *in vitro* son sumergidas en ACSF (artificial cerebrospinal fluid) para el caso de experimentos bioquímicos o bien sometidas a un flujo constante de ACSF mediante un sistema de perfusión, en el caso de experimentos de microscopía. Se mantienen a una temperatura de 25-29°C, y con aporte continuo de oxígeno gracias al burbujeo del medio con gas carbógeno (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>). La inducción química de la LTP se produce al sumergir las rodajas o bien al aplicar perfusión de ACSF modificado, en ausencia de Mg<sup>2+</sup>, y conteniendo Picrotoxina (100 μM), Rolipram (0.1 μM) y Forskolina (50 μM), durante un periodo de 15 minutos (Otmakhov et al., 2004).

### 2.5.2 Tratamientos con inhibidores de kinasas y fosfatasas

El tratamiento de cultivos organotípicos de hipocampo de 5-7 días *in vitro* con el inhibidor de fosfatasas, se realizó añadiendo Caliculina A (1 μM) en el medio de cultivo de rodajas durante 2 horas (35.5°C) antes de realizar los homogeneizados de proteínas

El inhibidor de kinasas K-252a, se añadió en el medio de cultivo de rodajas (200 nM) durante 1 hora (35.5°C) antes de realizar los homogeneizados de proteínas.

## 2.6 Preparación de homogeneizados de proteínas

Para preparar homogeneizados de proteínas se resuspendieron las rodajas de hipocampo en cultivo, en tampón de lisis frío (100 μl/inserto). Los homogeneizados fueron centrifugados en micro-centrífuga a 4°C (14.000 rpm) y se recogió la fracción sobrenadante para su análisis por inmunodetección. La concentración de proteína de las muestras fue determinada mediante la adición de reactivo de Bradford y lectura de la absorbancia en espectrofotómetro a 595 nm. Se determinó la concentración con respecto a la absorbancia de diluciones de BSA (bovine serum albumin) de concentración conocida. De manera general se emplearon entre 30-50 μgr de proteína total para *western blot*, y 200-500 μgr de proteína en ensayos de inmunoprecipitación y *pull-down*.

## 2.7 Inmunodetección

Los extractos de proteínas se resuspendieron en tampón de carga y fueron separados mediante electroforesis en geles de poliacrilamida SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel) de 8-12% con buffer de electroforesis. En el caso de geles poliacrilamida (SDS-PAGE) con phos-tag (Wako Phos-tag Acrylamide AAL-107) los geles se preparan añadiendo 50  $\mu\text{M}$  phos-tag y 200  $\mu\text{M}$   $\text{MnCl}_2$ , y tras la electroforesis deberán ser lavados antes de ser transferidos, con solución de transferencia a la que se le añade 1 mM EDTA para eliminar el  $\text{Mn}^{2+}$ , que podría interferir con la transferencia a membrana. Tras la electroforesis, las proteínas fueron transferidas a una membrana de PVDF (polyvinylidene fluoride) mediante transferencia húmeda en solución de transferencia, cuya eficiencia fue evaluada por tinción de la membrana con solución Ponceau, que fue posteriormente lavada con TBS-Tween. Las membranas se bloquearon con TBS-Tween suplementado con leche (5%) a temperatura ambiente o con *phospho-blocker* (Cell Biolabs AKR-104) en el caso de detección de proteínas fosforiladas. Posteriormente se incubaron con anticuerpo primario (1:500-1:1000) en TBS-Tween suplementado con leche (5%) durante 1 hora a temperatura ambiente o alternativamente 12 horas a 4°C en función de la calidad del anticuerpo. Se lavaron las membranas tres veces durante 10 minutos con TBS-Tween y se incubaron 1 hora a temperatura ambiente con anticuerpos secundarios unidos a HRP (horseradish peroxidase) diluidos en TBS-Tween suplementado con leche (5%), tras lo cual se volvieron a repetir tres lavados durante 10 minutos con TBS-Tween. Los anticuerpos secundarios unidos a las proteínas en la membrana fueron detectados con ECL (Enhanced ChemiLuminiscence) de Millipore y películas Agfa.

## **2.8 Ensayos de *Pull-down***

### **2.8.1 Expresión y purificación de proteínas de fusión a GST**

Para la expresión de proteínas de fusión a GST se empleó la cepa *E.coli BL21star* que fue transformada por electroporación y crecida en placas de Agar-Ampicilina (100  $\mu\text{gr/ml}$ ) a 37°C durante 12 horas. Se inoculó una colonia aislada en 5 ml de LB con antibiótico y glucosa (40 mM). Este pre-inóculo se creció a 37°C durante 12 horas y fue inoculado en 500 ml de medio LB-Ampicilina (100  $\mu\text{gr/ml}$ ) a 37°C hasta que la densidad óptica a 600nm ( $\text{OD}_{600}$ ) alcanzó valores entre 0.6-0.8. Entonces se induce la expresión de proteínas por adición de IPTG (isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido) (0.5 M) y se cambia la temperatura a 25°C durante 4-6 horas.



Una vez obtenido un pellet bacteriano se resuspende en solución de resuspensión para bacterias y se hace pasar por *French-press* para producir la lisis celular. Se centrifuga durante 20 minutos (15.000-20.000 rpm) para descartar las membranas celulares y se recoge el sobrenadante. Este sobrenadante se incuba en agitación constante durante 1 hora a 4°C, con 2 ml de bolas de Glutación-Sefarosa equilibradas en el mismo buffer al 50%. Tras la incubación, se lavan tres veces durante 10 minutos y finalmente se resuspenden en 1 ml de tampón de lisis para *pull-down*, que será el tampón en el que se llevaran a cabo los experimentos de precipitación.

### **2.8.2 Ensayos de *pull-down* sobre rodajas de hipocampo**

Se homogenizan los hipocampos o las rodajas de hipocampo en tampón de lisis para *pull-down*. Se centrifuga 5 minutos a 4°C (14.000 rpm) y se recoge el sobrenadante. Dicho sobrenadante se pondrá en contacto con las de bolas de sefarosa (100 µl/500 µgr de proteína) obtenidas tras la purificación de las proteínas expresadas en bacterias durante 1 hora a 4°C en agitación constante. Tras esta incubación las bolas se lavan tres veces con el mismo tampón de lisis y finalmente se resuspenden en 20 µl de tampón de lisis junto con tampón de carga y se analizan por inmunodetección.

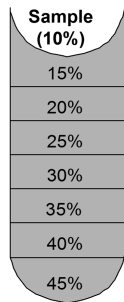
### **2.9 Inmunoprecipitación**

Para los experimentos de inmuprecipitación las rodajas de hipocampo fueron homogeneizadas en tampón RIPA, tras lo cual se centrifugaron las muestras 2 minutos a 4°C (14.000 rpm). El sobrenadante se puso en contacto con anticuerpo anti-GFP (1-2 µgr/200 µgr de proteína) durante 1 hora a 4°C en constante agitación y después se añadió a esta mezcla 50 µl de bolas de agarosa-proteína G (Amersham) que se incubó en agitación constante durante 2-4 horas a 4°C. Tras lavar las muestras en tampón RIPA se resuspenden las muestras en 20 µl junto con tampón de carga para su análisis en gel de acrilamida.

### **2.10 Fraccionamiento subcelular en gradiente de sacarosa**

Rodajas de hipocampo 5-7 días *in vitro* fueron homogeneizadas por tracción mecánica con un homogeneizador en tampón HEPES (10 mM pH 7.4) con sacarosa (10%) con inhibidores de proteasas y fosfatasas. Se llevó a cabo una primera centrifugación (3000rpm a 4°C 10 minutos)

en la que se descartó el material más pesado, núcleos y restos celulares, y se recupera el sobrenadante que es sometido a otra centrifugación a mayor velocidad (10000 rpm a 4°C 10 minutos) en la que descartamos las membranas celulares pesadas y sinaptosomas. El sobrenadante de esta centrifugación se carga en el gradiente de sacarosa, compuesto por HEPES 10mM pH 7.4 a distintas concentraciones de sacarosa de mayor a menor: 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, cada una de ellas con un volumen de 200  $\mu$ l. Este gradiente es centrifugado a 38.500 rpms entre 5-12 horas a 4°C. Tras esta última ultracentrifugación se recogen las fracciones desde las menos densas hasta las más densas en volúmenes de 100  $\mu$ l. A estas fracciones se les añadió tampón de carga para su análisis en gel de acrilamida y posterior inmunodetección.



### 2.11 Ensayos de fosforilación *in vitro*

Para llevar a cabo los experimentos de fosforilación *in vitro* se emplearon rodajas de hipocampo en cultivo de entre 5-7 días, que fueron homogeneizados en tampón de lisis sin EDTA. Se emplearon unos 200  $\mu$ gr de proteína total en un volumen final de 100  $\mu$ l, que se completó por la adición de ATP (adenosine triphosphate) (10  $\mu$ M), [ $\gamma^{32}$ ]-ATP (50 $\mu$ Cu/ $\mu$ l) en todas las muestras y además EDTA (10mM) para los controles negativos y MgCl<sub>2</sub> (5 mM) para las muestras a testar. En estas condiciones fueron incubadas las muestras durante 30 minutos a 30°C. Posteriormente se llevó a cabo sobre dichas muestras una reacción de inmunoprecipitación con anticuerpo anti-GFP y después se analizaron en gel de acrilamida (SDS-PAGE) que fue secado y revelado por autorradiografía.

### 2.12 Inmunofluorescencia

#### 2.12.1 Inmunohistoquímica

Para realizar los experimentos de inmunohistoquímica, se fijaron rodajas de hipocampo con solución de fijación durante 12 horas a 4°C. Tras exhaustivos lavados con PBS, se bloquean las rodajas con solución de bloqueo de cultivos organotípicos de hipocampo durante 1 hora a temperatura ambiente, se le añade anticuerpo primario (1:100-1:500, en función del anticuerpo) en solución de bloqueo fresca y se incuba durante 6-12 horas a 4°C. Se lava con PBS y se incuba con anticuerpo secundario (1:200) en solución de bloqueo 1 hora a temperatura

ambiente. Tras estas incubaciones se lavan las muestras con PBS y finalmente se montan sobre un portaobjetos con solución de montaje comercial.

### **2.12.2 Inmunofluorescencia en cultivo primario**

Para realizar los experimentos de inmunofluorescencia en cultivos primarios de neuronas de hipocampo, se fijaron los cubres en los que se cultivaron las neuronas a 21 días de cultivo, con solución de fijación durante 15-20 minutos. Tras exhaustivos lavados con PBS, se bloquean con solución de bloqueo de cultivos primarios de neuronas durante 1 hora, se le añade anticuerpo primario (1:100-1:500, en función del anticuerpo) en solución de bloqueo fresca y se incuba durante 1 hora. Se lava con PBS y se incuba con anticuerpo secundario (1:200) en solución de bloqueo 1 hora. Tras estas incubaciones se lavan las muestras con PBS y finalmente se montan sobre un portaobjetos con solución de montaje comercial. Todo el proceso se llevó a cabo a temperatura ambiente.

### **2.13 Microscopía *ex vivo* y experimentos de FRAP**

Todos los experimentos de microscopía *ex vivo* se desarrollaron manteniendo las rodajas bajo perfusión continua de ACSF con control de temperatura a 37°C y con aporte continuo de oxígeno por burbujeo del medio de perfusión con gas carbógeno (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>).

Los experimentos de inducción de la LTP se llevaron a cabo mediante la adquisición continua de imágenes cada 2 minutos durante periodos de tiempo de alrededor de 20 minutos. Se tomaron imágenes estableciendo unas condiciones basales durante 5-10 minutos tras lo cual se aplica sobre las rodajas de hipocampo la perfusión de ACSF modificado, en ausencia de Mg<sup>2+</sup>, y conteniendo Picrotoxina (100 μM), Rolipram (0.1 μM) y Forskolina (50 μM), durante un periodo de 15 minutos. Las imágenes generadas son la proyección de secciones de alrededor de 7.5 μm, ya que se tomaron 15 imágenes en planos separados una distancia mínima de 0.5 μm.

Los experimentos de FRAP se llevaron a cabo mediante la adquisición de imágenes de un solo plano cada 2 segundos durante 2 minutos. Se tomaron entre 3-5 imágenes previas al foto-blanqueamiento. El foto-blanqueamiento se llevó a cabo optimizando las condiciones en cada caso particular, para lograr disminuciones en la fluorescencia de la región seleccionada de al menos 50%. Para ello, de manera general se seleccionaron regiones de 1 μm<sup>2</sup> en las que se

concentró el láser aumentando la potencia de éste con respecto a la potencia de adquisición 20-50%, 3-5 iteraciones durante menos de 2 segundos.

#### **2.14 Adquisición y análisis de imágenes de microscopía**

La adquisición de todas las imágenes de microscopía se realizó con dos equipos: Microscopio de Barrido Láser confocal LSM510 acoplado a un microscopio invertido Axiovert200 Mv(Zeiss) y un Microscopio de Barrido Láser confocal y multifotón LSM710 y LSM510 acoplados a un microscopio invertido AxioObserver y uno vertical AxioImager M1 (Zeiss), respectivamente.

El análisis y procesamiento de las imágenes se llevó a cabo con el software ImageJ. Los análisis de correlación de intensidad para estudios de colocalización en cultivos primarios de neuronas de hipocampo se llevó a cabo mediante el uso del *plugin* de ImageJ, ICA (Tony Collins Wright Cell Imaging Facility, Toronto, Canada) (Li et al., 2004).

El análisis de los experimentos de microscopía *ex vivo* para la inducción de la LTP se realizó mediante el establecimiento de un umbral de intensidad para la discriminación automática de los cúmulos formados por la sobreexpresión de cada una de las proteínas recombinantes. Dicho umbral fue establecido mediante el cálculo de la media de los umbrales de cada uno de los experimentos realizados. Se cuantificaron de esta manera los cúmulos hallados a lo largo de una misma dendrita como densidad de cúmulos (número de cúmulos/ $\mu\text{m}$ ) en imágenes obtenidas antes y después de la inducción de la LTP.

Los experimentos de FRAP fueron cuantificados mediante la medida de la fluorescencia en la región seleccionada para foto-blanqueo en cada tiempo antes y después del foto-blanqueo. Esta medida de la fluorescencia fue normalizada con respecto a una región control dentro de la misma neurona para corregir el error debido al foto-blanqueo general provocado por la propia adquisición de las imágenes. En ambas regiones (control y foto-blanqueada) se sustrajo previamente la fluorescencia del fondo.

#### **2.15 Electrofisiología**

Llevamos a cabo registros electrofisiológicos en cultivos organotípicos de hipocampo mediante la perfusión constante de ACSF en presencia de 2-Cloroadenosina (200  $\mu\text{M}$ ) y Picrotoxina (0.1mM), agonista de receptores de adenosina y antagonista de receptores GABA<sub>A</sub>,

respectivamente. La activación de receptores de adenosina es importante para reducir la función pre-sináptica y compensar la hiperexcitabilidad de las rodajas en cultivo debido a su gran conectividad. Se emplea control de temperatura a 29°C y aporte constante de oxígeno mediante el burbujeo del medio de perfusión con gas carbógeno (95% O<sub>2</sub>, 5%CO<sub>2</sub>). Las pipetas empleadas para los registros de células enteras tienen una resistencia de 3-6 MΩ y contienen solución interna para registros electrofisiológicos en configuración de voltaje fijo (*voltage-clamp*), lo que significa que fijamos el voltaje de la membrana plasmática mediante inyección de corriente. Los registros se llevaron a cabo con amplificadores *Multiclamp 700* (Molecular Devices, Union City, California USA), mediante estimulación con electrodos bipolares usando pulsos de voltaje únicos de 200μs y un máximo de 20V. Estos estimuladores se sitúan a 300-500 μm de distancia de las células que registradas, en la región donde se sitúan las fibras pre-sinápticas (colaterales de *Schaffer*).

Los cultivos organotípicos de hipocampo permiten la expresión de proteínas recombinantes fusionadas a marcadores fluorescentes mediante infección viral, únicamente en la capa CA1 de modo que solo los terminales post-sinápticos se encuentran afectados. Esto asegura el estudio de la función exclusivamente post-sináptica de las proteínas de interés. Además los marcadores fluorescentes nos permiten la detección de las células infectadas y el registro simultáneo de células no infectadas que constituyen un control interno. Tras 1-2 días de expresión, llevamos a cabo registros intracelulares de forma simultánea en células control no infectadas y en células infectadas.

Los análisis electrofisiológicos de transmisión basal se realizaron mediante el registro simultáneo de una célula infectada y una no infectada, fijando el voltaje de la membrana celular a -60mV para receptores AMPA y a +40mV para receptores NMDA.

Los estudios de la LTP se llevaron a cabo a -60mV de potencial de membrana para la medida de la respuesta mediada por los receptores AMPA. Se establecieron registros en condiciones basales, antes de la inducción de la LTP, con una duración de 2-5 minutos. La inducción de la LTP se llevó a cabo mediante estimulación con una frecuencia de 3Hz (300 pulsos) con 0 mV de despolarización post-sináptica, para asegurar la activación de receptores de NMDA.

La edad de las rodajas en cultivo empleadas vario desde los 5 hasta los 10 días en función de los experimentos que se llevaron a cabo.

### **2.16 Análisis estadísticos**

Todas las gráficas representan los valores medios y el error estándar ( $\pm$ sem). Las diferencias estadísticas se calcularon mediante el uso de test no paramétricos, *Mann-Whitney* para datos no pareado y *Wilcoxon* para datos pareados.

# RESULTADOS





---

## **Bloque I: Caracterización de la expresión de Rab11-FIP2 en neuronas de hipocampo.**

En el comienzo de esta tesis doctoral, FIP2 había sido identificada como una proteína efectora de Rab11 gracias a su dominio RBD, principalmente caracterizada en estudios basados en líneas celulares en cultivo HeLa, o MDCK (Madin-Darby canine kidney) (Hales et al., 2001). Estos estudios determinaron no solo su capacidad de unión específicamente a Rab11 y no a otras proteínas Rab mediante ensayos de *pull-down* y doble híbrido, sino también su colocalización total o parcial mediante inmunofluorescencia. Así mismo se identificó por *pull-down* su interacción con MiosinaV, y su presencia en los endosomas de reciclaje (Hales et al., 2002; Lindsay & McCaffrey, 2002). El único trabajo previo en células neuronales había mostrado también dicha interacción con MiosinaV mediante experimentos de inmunoprecipitación en homogeneizados de cerebro (Wang et al., 2008). Sin embargo muy poco se conoce sobre su expresión en regiones concretas del cerebro, como el hipocampo.

Puesto que la función de Rab11 y MiosinaV son determinantes durante procesos de plasticidad sináptica, nos propusimos abordar un estudio que nos permitiera determinar la expresión, distribución y localización de FIP2 en neuronas de hipocampo, así como establecer su relación con la maquinaria de transporte de receptores AMPA.



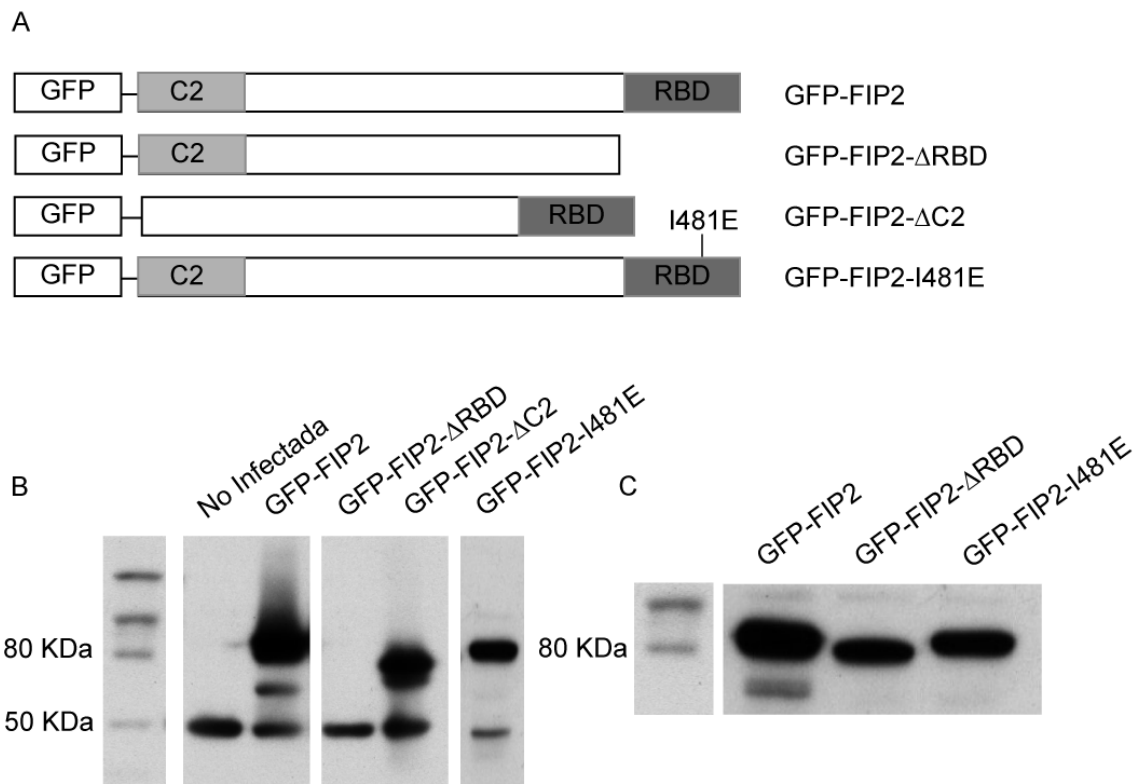
## 1. Análisis de la expresión y distribución de FIP2 en neuronas de hipocampo.

### 1.1 Generación y caracterización de herramientas de biología molecular y bioquímica para el estudio de la distribución de FIP2.

La caracterización inicial de FIP2 en neuronas de hipocampo, se llevó a cabo combinando el uso de un anticuerpo anti-FIP2, con el uso de proteínas recombinantes generadas mediante técnicas de biología molecular. Estas herramientas nos permiten identificar los niveles y el patrón de expresión de la proteína endógena, manipular sus niveles de expresión y determinar el papel de los dominios de interacción de FIP2.

Para ello, como muestra la figura 10A, llevamos a cabo el diseño de una proteína recombinante que contiene la secuencia codificante para FIP2 (512 aa) a continuación del extremo carboxilo terminal de GFP (green fluorescence protein). A partir de esta construcción se generaron dos mutantes de delección: uno para la región  $\alpha$ -hélice que incluye el dominio de unión a Rab11 y parte del dominio implicado en formación de dímeros (1-458) y otro mutante para su región de unión a fosfoinosítidos de membrana (76-512). Se generó además un mutante puntual para la isoleucina 481 que es sustituida por glutámico (I481E), en el que se pierde la capacidad de unión a Rab11 manteniendo íntegra el resto de su secuencia (Junutula et al., 2004b).

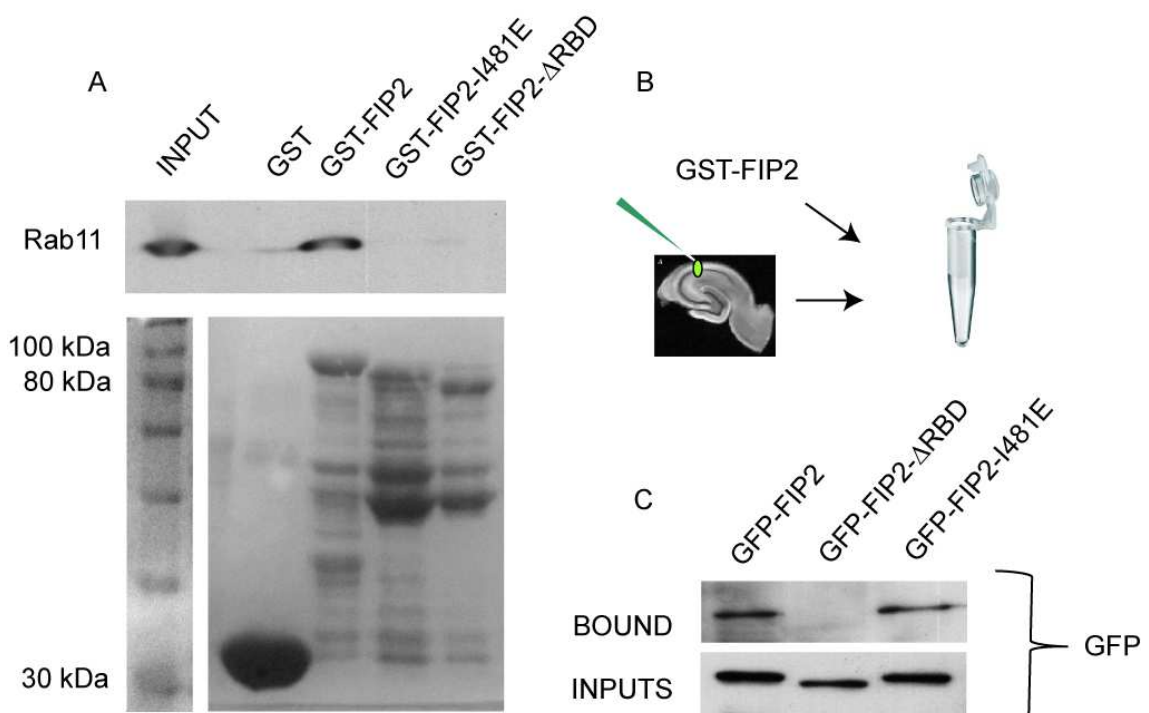
El anticuerpo anti-FIP2 nos permitió la detección en *western blot* de la proteína endógena, así como de las proteínas recombinantes, excepto el mutante de delección GFP-FIP2- $\Delta$ RBD (Fig. 10B). Esto se debe a que el epítipo reconocido por este anticuerpo se encuentra en la región RBD por lo que la detección de dicho mutante solo será posible con un anticuerpo anti-GFP (Fig. 10C).



**Figura 10. A)** Esquema del diseño de proteínas de fusión a GFP para su expresión a través de vectores de expresión viral. **B)** *Western blot* en rodajas de hipocampo no infectadas o infectadas con las construcciones señaladas con el anticuerpo anti-FIP2. Se muestra de izquierda a derecha FIP2 endógeno (56 KDa) GFP-FIP2 (86 KDa), GFP-FIP2- $\Delta$ RBD (78 KDa) que no es reconocido por el anticuerpo, GFP-FIP2- $\Delta$ C2 (74 KDa) y GFP-FIP2-I481E (86 KDa). **C)** *Western blot* en rodajas de hipocampo infectadas con las construcciones indicadas, con el anticuerpo anti-GFP.

Además de las construcciones mencionadas, se generaron proteínas de fusión al extremo carboxilo terminal de GST (glutación S-transferasa) para FIP2, FIP- $\Delta$ RBD, y FIP2-I481E. Estas herramientas nos han permitido llevar a cabo experimentos de *pull-down* para confirmar *in vitro* la capacidad de las proteínas recombinantes generadas para interactuar con Rab11 y su capacidad para formar dímeros. En primer lugar, utilizamos homogeneizados de hipocampo de rata que pusimos en contacto con cada una de las construcciones fusionadas con GST y llevamos a cabo un *western blot* para comprobar la unión a Rab11 mediante el uso de un anticuerpo anti-Rab11 (Fig. 11A). Como esperábamos la proteína completa GST-FIP2 interacciona de manera muy eficiente con Rab11 mientras que ambos mutantes para el RBD, GST-FIP2- $\Delta$ RBD y GST-FIP2-I481E, han perdido la capacidad de unión a Rab11.

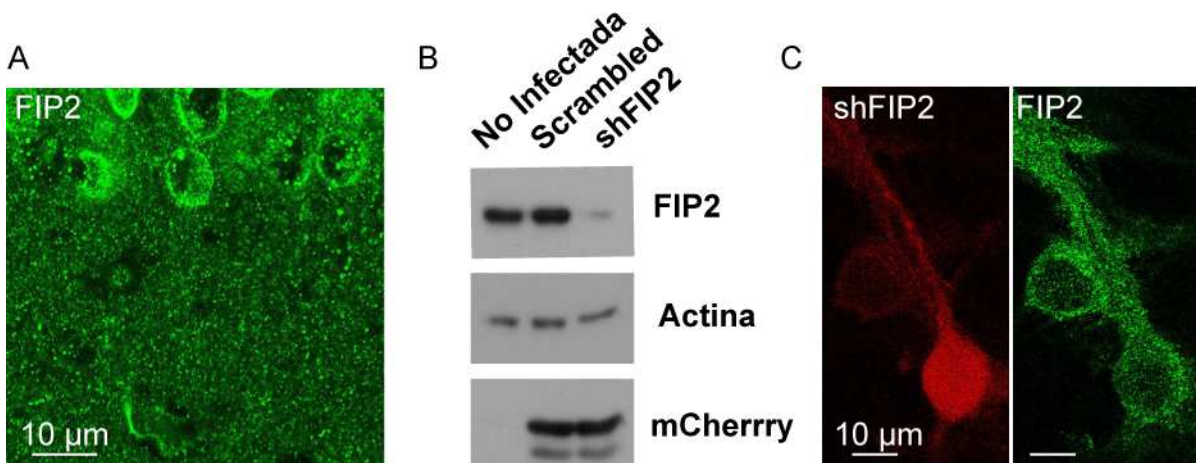
Para testar su capacidad para formar dímeros, infectamos rodajas de hipocampo con cada una de las construcciones fusionadas a GFP (GFP-FIP2, GFP-FIP2-I481E, GFP-FIP2- $\Delta$ RBD) que expresamos durante 24 horas. A continuación hicimos homogeneizados de cada una de ellas que pusimos en contacto con la construcción GST-FIP2 para llevar a cabo un ensayo de *pull-down* (Fig. 11B). Análisis por *western blot* de cada una de las condiciones mediante un anticuerpo anti-GFP nos permitió comprobar que tanto GFP-FIP2 como GFP-FIP2-I481E son capaces de formar dímeros, mientras que el mutante de delección en el que se eliminó parte de la región  $\alpha$ -hélice, ha perdido también su habilidad para formar dímeros (Fig. 11C).



**Figura 11. A)** Análisis en *western blot* de experimentos de *pull-down* en rodajas de hipocampo con las construcciones indicadas, que muestran la interacción de Rab11 con FIP2 y no con los mutantes para el RBD. **B)** Esquema explicativo del experimento realizado para comprobar la capacidad de dimerización de las distintas construcciones. **C)** Análisis en *western blot* con un anticuerpo anti-GFP de los homogeneizados de hipocampo infectados con las construcciones arriba indicadas (INPUTS) y de la fracción unida a las bolas de sefarosa que contienen GST-FIP2 (BOUNDS).

## 1.2 Análisis de la distribución de FIP2 en cultivos organotípicos de hipocampo

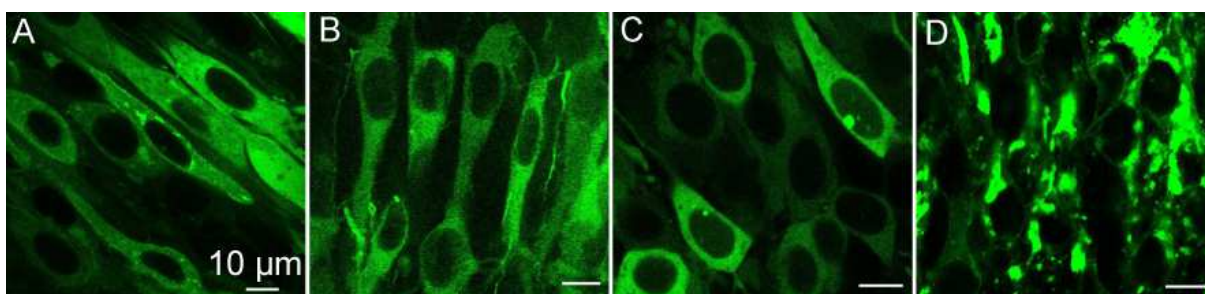
Con el objetivo de analizar el patrón de expresión de FIP2 en nuestro modelo, testamos el anticuerpo anti-FIP2 mediante inmunofluorescencias en cultivos organotípicos de hipocampo. La señal obtenida con este anticuerpo es punteada y se encuentra excluida del núcleo, tal y como se ha descrito la distribución de FIP2 en otros tipos celulares (Fig. 12A). Sin embargo, la generación de una construcción formada por pequeños RNAs de interferencia (shRNA) en un vector lentiviral, con el objetivo de bloquear la expresión de la proteína endógena FIP2 (shFIP2), nos permitió descartar este anticuerpo para su uso en inmunofluorescencia debido a su comportamiento inespecífico. Como control para evaluar el efecto de la propia infección viral generamos una secuencia formada por las mismas bases pero mezcladas de manera aleatoria de forma que no se dirigen contra ninguna secuencia génica (*scrambled*). Ambas construcciones fueron testadas en cultivos de neuronas de hipocampo. Tras 7-10 días de expresión se llevó a cabo un *western blot* para confirmar el bloqueo en la expresión de FIP2 endógeno específicamente en células infectadas con shFIP2 y no en células no infectadas o infectadas con la secuencia control (Fig. 12B). Estas herramientas nos permitieron constatar como las células que expresaban la construcción lentiviral que contenía las secuencias shFIP2, mostraban marcaje en inmunofluorescencia con el anticuerpo anti-FIP2 del mismo modo que las células no infectadas (Fig. 12C).



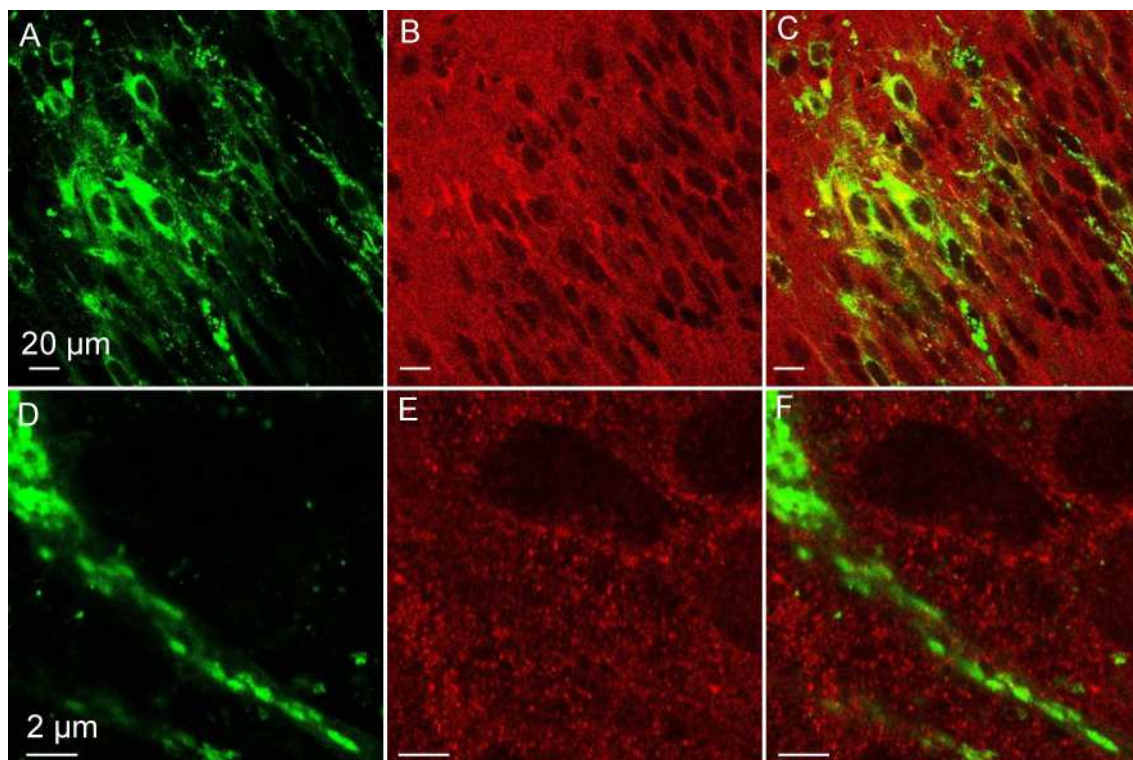
**Figura 12.** **A)** Inmunohistoquímica en rodajas de hipocampo para FIP2 endógeno con un anticuerpo anti-FIP2. **B)** *Western blot* que muestra los niveles de expresión de FIP2 endógeno en cultivos primarios para células no infectadas, células infectadas con una secuencia control (*scrambled*) y células infectadas con shFIP2. **C)** Inmunohistoquímica para FIP2 en cultivos primarios infectados con la construcción lentiviral mCherry-shFIP2.

Ante esta importante limitación técnica y como aproximación alternativa al estudio de la distribución de FIP2, se empleó el mismo modelo de rodajas organotípicas de hipocampo de rata para sobreexpresar las construcciones recombinantes generadas. Utilizando un sistema de expresión viral las neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo fueron infectadas, fijadas tras 24 horas de expresión y analizadas mediante microscopía confocal.

Como se puede observar en la Fig. 13A, GFP-FIP2 se halla completamente excluida del núcleo y tiene una distribución variable en neuronas, donde encontramos una fracción de la proteína más o menos difusa y formando pequeñas vesículas de cuyo interior se halla excluida, mientras que otra fracción forma pequeñas acumulaciones en regiones perinucleares y a lo largo de las dendritas en lo que podrían ser compartimentos intracelulares. Esta distribución varía de unas células a otras siendo más o menos prominente la aparición de cúmulos. La ausencia del dominio de interacción con Rab11 (Fig. 13B), provoca un desplazamiento hacia una distribución totalmente homogénea en la célula, desapareciendo cualquier tipo de agregado, cúmulo o incluso cuerpos vesiculares, mientras que el mutante puntal GFP-FIP2-I481E (Fig. 13C) también más difuso y sin agregados intracelulares, aún contiene pequeños cuerpos vesiculares al igual que la proteína completa (ver también cuantificación en Fig. 22). La eliminación del dominio C2 (Fig. 13D) de unión a membrana, cambia drásticamente la distribución de la proteína originando un patrón fuertemente punteado, formando enormes agregados principalmente en el soma. De hecho, apenas se observa su presencia a lo largo de los axones o dendritas.



**Figura 13.** Imágenes de microscopía confocal. **A)** GFP-FIP2, **B)** GFP-FIP2- $\Delta$ RBD, **C)** GFP-FIP2-I481E, **D)** GFP-FIP2- $\Delta$ C2. Estas proteínas recombinantes se expresaron durante 24 horas en cultivos organotípicos de rodajas de hipocampo, utilizando vectores virales.



**Figura 14.** Ausencia de colocalización entre Rab11 y GFP-FIP2- $\Delta$ C2. Rodajas de hipocampo fueron infectadas con el virus que expresa GFP-FIP2- $\Delta$ C2. 24 horas después las rodajas fueron procesadas para inmunohistoquímica contra Rab11 endógeno (ver “Materiales y Métodos”). GFP-FIP2- $\Delta$ C2 se muestra en verde (A) y Rab11 en rojo (B). C) Superposición de ambos canales. En el panel inferior se representa a mayor aumento. D) GFP- FIP2, E) Rab11, F) Superposición de ambos canales.

Estos resultados confirman la importancia de los dominios de interacción de FIP2 para su distribución en neuronas y encajan con las observaciones realizadas en otros tipos celulares, en los que de la misma manera, la eliminación del dominio de unión a Rab11 provoca la difusión de la proteína por lo que se propuso que su presencia es necesaria para la localización en las membranas; y la delección de su dominio C2, produce una fuerte agregación además de un colapso en el tráfico de transferrina, indicando que este dominio es imprescindible para el correcto funcionamiento de FIP2 (Hales et al., 2002; Lindsay & McCaffrey, 2002). Pese a que sería esperable que dichos agregados fueran el producto de un secuestro de Rab11 en compartimentos subcelulares, dado que conserva su dominio RBD, inmunohistoquímicas realizadas con Rab11 en rodajas que expresan el mutante de delección GFP-FIP2- $\Delta$ C2 (Fig. 14), mostraron una escasa localización entre ambas proteínas por lo que podemos concluir que la formación de estos agregados no depende de la interacción con Rab11.



## **2. FIP2 se encuentra localizado junto a GluA1 en compartimentos subcelulares extra-sinápticos, distintos de los endosomas de reciclaje**

### **2.1 Estudios de colocalización mediante la sobreexpresión de GFP-FIP2 en cultivos primarios de neuronas de hipocampo**

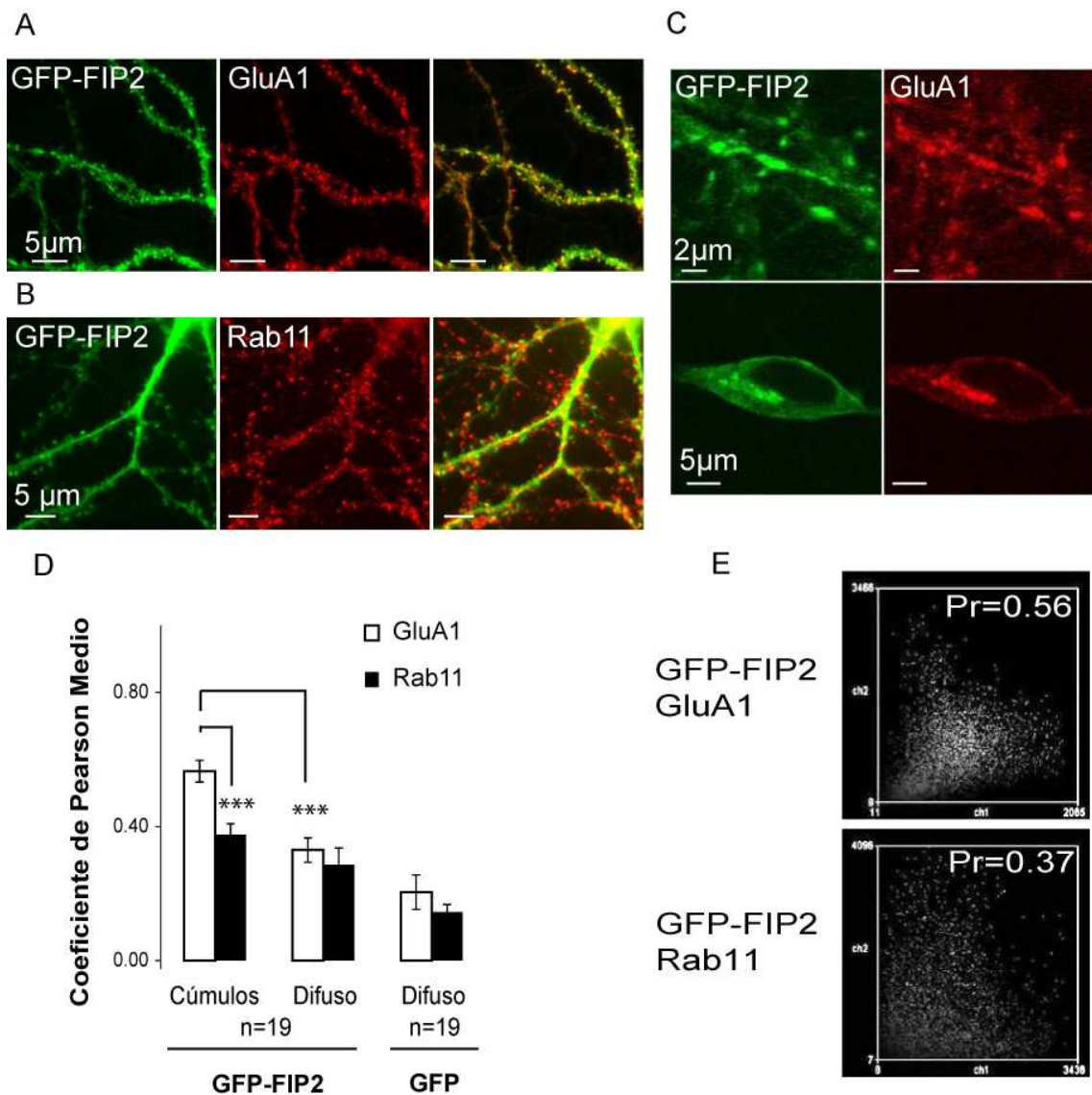
Para determinar si FIP2 se encuentra unida a la maquinaria de transporte de receptores AMPA, y establecer su relación con Rab11 y GluA1, decidimos utilizar un modelo más sencillo para realizar estudios de inmunolocalización, debido a la dificultad que suponen este tipo de análisis en cultivos organotípicos.

Llevamos a cabo inmunofluorescencias en cultivos primarios de hipocampo de rata contra Rab11 y GluA1 endógenos, previa expresión de GFP-FIP2 (Fig. 15A y B) y GFP como control. Dada la heterogeneidad que encontramos en la expresión de GFP-FIP2, cuantificamos de manera separada aquellas regiones en las que se encuentra difusa de aquellas en las que forma acumulaciones, mediante el establecimiento de un umbral medio de intensidad a partir del cual consideramos que se halla formando agregados. Sobre estas regiones, se cuantificó la intensidad de cada pixel en ambos canales para determinar el solapamiento existente, generando un valor de Pr (coeficiente de Pearson) como medida de correlación (Fig. 15D y E). Para el caso de Rab11 existe correlación positiva, tanto en las regiones difusas como en las acumulaciones, con valores significativamente mayores a los que encontramos al expresar GFP. GFP-FIP2 y GluA1 también correlacionan positivamente en regiones difusas en comparación con GFP, mostrando valores de correlación similares a los observados para Rab11, pero sorprendentemente encontramos una diferencia muy significativa en regiones de cúmulos de GFP-FIP2, donde GluA1 se encuentra fuertemente concentrado.

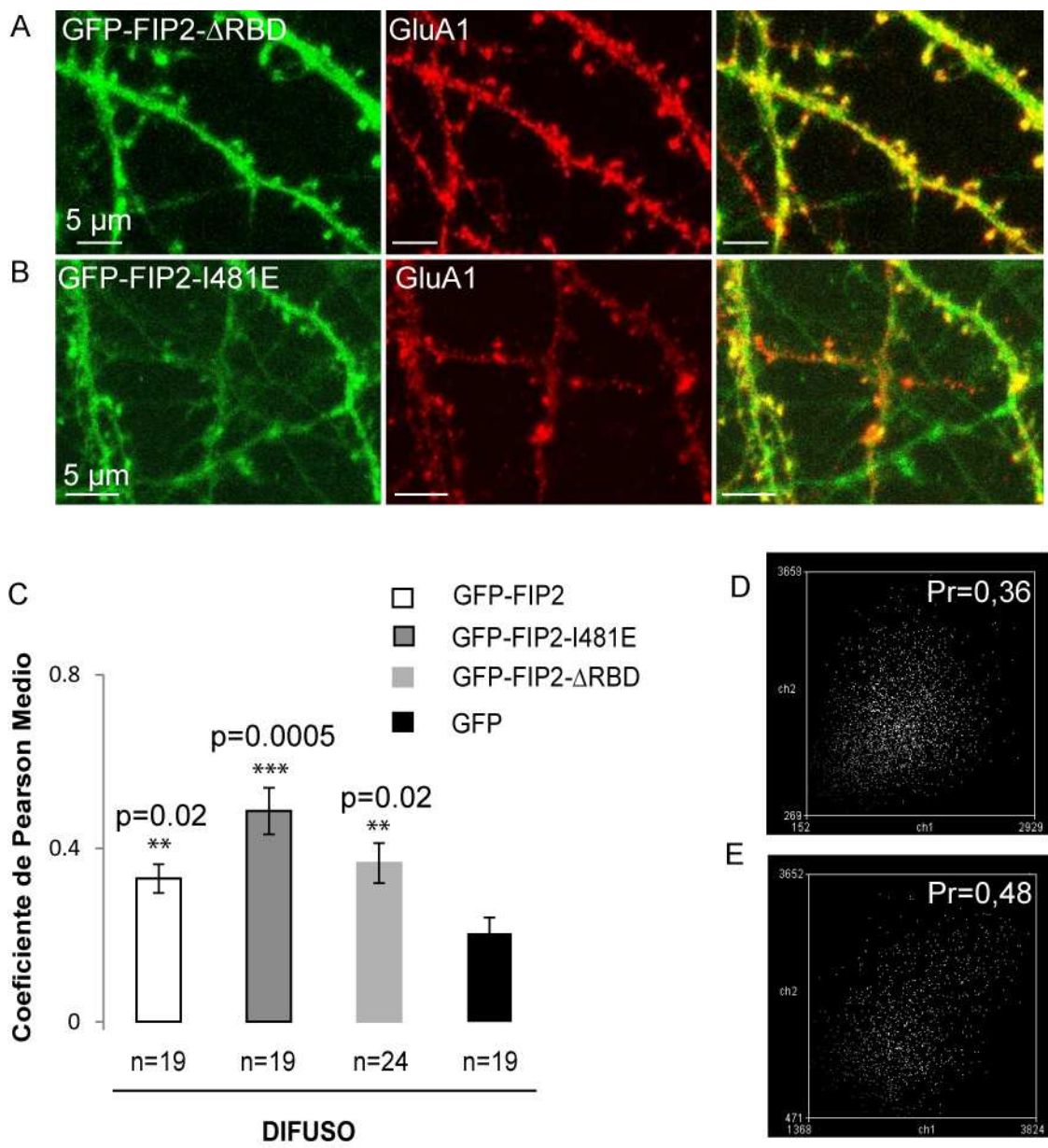
Rab11 colocaliza parcialmente con GFP-FIP2 a lo largo de las dendritas y en las espinas dendríticas mientras GluA1, que también colocaliza en espinas, aparece fundamentalmente concentrado en regiones extra-sinápticas como acumulaciones perinucleares y a lo largo de las dendritas (Fig. 15C). Estos resultados sugieren una alteración en el transporte de receptores AMPA bajo la sobreexpresión de GFP-FIP2 de manera independiente de Rab11.

Llevamos a cabo el mismo tipo de análisis con inmunofluorescencias contra GluA1 en cultivos de neuronas que sobreexpresan GFP-FIP2- $\Delta$ RBD (Fig. 16A) o GFP-FIP-I481E (Fig. 16B). En

este caso, como se indicó anteriormente no aparecen cúmulos, la distribución es más o menos homogénea y aparentemente difusa, por lo que no fue necesario el establecimiento de un umbral de intensidad. También encontramos valores de correlación significativamente positivos muy similares a los encontrados para GFP-FIP2 en las regiones difusas, que aparecen representados en la gráfica 16C y en los gráficos de dispersión 16D y E, lo cual indica que dicha localización es independiente de la interacción de FIP2 con Rab11, y por tanto su papel en la regulación de receptores AMPA podría ser desarrollada de manera independiente de su unión a Rab11.



**Figura 15. A) B)** GFP-FIP2 fue sobrepresado durante 24 horas en cultivos primarios de neuronas de hipocampo que fueron posteriormente fijadas y marcadas con anticuerpo primario contra Rab11 (A) o GluA1 (B). **C)** Sobrexpresión de GFP-FIP2 e inmunomarcaje que muestra la retención de GluA1 producida por las acumulaciones de GFP-FIP2 tanto en regiones dendríticas como en el soma. **D)** Cuantificaciones realizadas a través de Análisis de Correlación de Intensidad (ICA). Se representa el coeficiente de Pearson medio para la sobrexpresión de GFP-FIP2 con Rab11 o con GluA1 de manera separada en cúmulos o regiones difusas y la sobrexpresión de GFP con Rab11 y GluA1 como control. ICA mostro correlación positiva para GFP-FIP2 y Rab11 en regiones punteadas ( $Pr=0.37 \pm 0.049$ ) y en regiones difusas ( $Pr=0.28 \pm 0.051$ ) siendo esta significativamente distinta ( $p=0.02$ ) de la correlación encontrada para la sobrexpresión de GFP con Rab11 ( $Pr=0.1 \pm 0.02$ ). GFP-FIP2 y GluA1 también correlacionan positivamente en regiones difusas ( $Pr=0.32 \pm 0.033$ ) en comparación con la sobrexpresión de GFP con GluA1 ( $Pr=0.2 \pm 0.03$ ;  $p=0.02$ ) y en regiones punteadas ( $Pr=0.56 \pm 0.032$ ), donde el coeficiente de correlación se ve significativamente aumentado en comparación con regiones difusas de GFP-FIP2 con GluA1 ( $p < 0.0001$ ) o con regiones punteadas para la tinción con Rab11 ( $p \leq 0.005$ ). La n representa regiones cuantificadas en un total de 5 experimentos independientes. **E)** Gráficos de dispersión de la intensidad de pixel en cada canal para ambas tinciones en regiones de acumulación de GFP-FIP2 y los valores medios de coeficiente de Pearson (Pr).

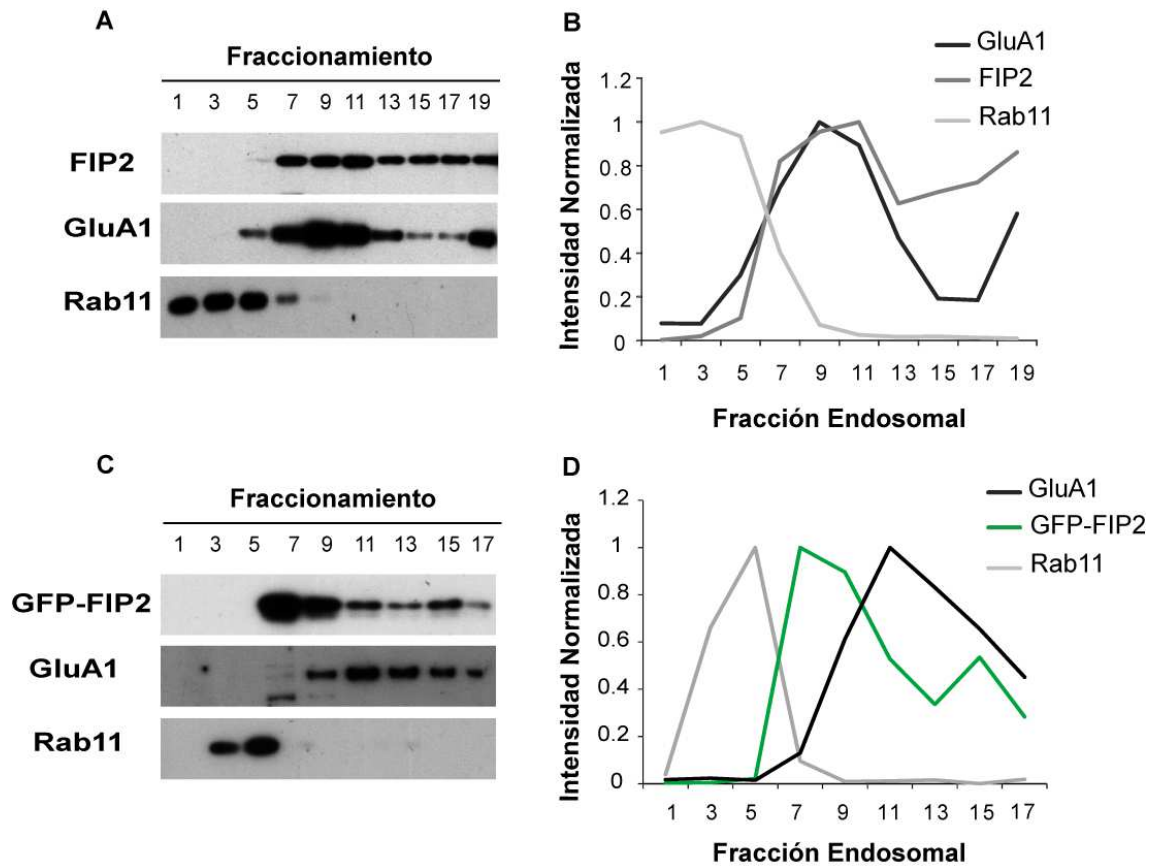


**Figura 16.** GFP-FIP2-ΔRBD (A) y GFP-FIP2-I481E (B) fueron sobrexpresados durante 24 horas en cultivos primarios de neuronas de hipocampo que fueron posteriormente fijadas y marcadas con anticuerpo primario contra GluA1. C) Cuantificaciones realizadas a través de Análisis de Correlación de Intensidad (ICA). Se representa el coeficiente de Pearson medio para la sobrexpresión de GFP-FIP2, GFP-FIP2-ΔRBD, GFP-FIP2-I481E o GFP con GluA1 como se indica. ICA mostró correlación significativamente positiva para todas las construcciones en comparación con la expresión de GFP. Los paneles de la derecha son gráficos de dispersión de la intensidad de pixel en cada canal para las tinciones con GluA1 y los valores medios de coeficiente de Pearson (Pr) para GFP-FIP2-ΔRBD (D) y para GFP-FIP2-I481E (E). La n representa el número de regiones cuantificadas en un total de 5 experimentos independientes

## **2.2 Análisis de la distribución de FIP2 endógeno mediante fraccionamiento subcelular en gradiente de sacarosa**

Con el objetivo de determinar si la distribución de FIP2 endógeno sigue un patrón similar al detectado para la proteína sobrepresada, llevamos a cabo un fraccionamiento subcelular en gradiente de sacarosa en cultivos organotípicos de hipocampo. Este tipo de ensayos nos permiten aislar distintas poblaciones de compartimentos de membrana intracelulares, manteniendo su integridad y por tanto manteniendo las proteínas de membrana (tanto integrales como unidas covalentemente). Estos experimentos mostraron como efectivamente Rab11 se halla distribuido en endosomas de baja densidad, mientras que FIP2 y GluA1 aparecen juntos en compartimentos de mayor densidad y distintos de los endosomas de reciclaje en los que típicamente encontraríamos Rab11 (Fig. 17A y B). De la misma manera que FIP2 endógeno, el fraccionamiento subcelular en rodajas que sobrepresan la proteína de fusión, muestra como Rab11 segrega en fracciones subcelulares diferentes de aquellas en las que están presentes GFP-FIP2 y GluA1 (Fig. 17C y D). En este caso, las fracciones en las que encontramos GFP-FIP2 se hallan algo desplazadas con respecto al experimento anterior realizado con la proteína endógena, de manera que encontramos el pico de abundancia más alto para GFP-FIP2 en una fracción que no se encuentra enriquecida en Rab11 ni en GluA1. Este efecto es probablemente una consecuencia de la propia sobrepresión de la proteína recombinante, pero sin embargo de manera general, el patrón se mantiene en ambos ensayos por lo que podemos concluir que la proteína sobrepresada se comporta de modo similar al de la proteína endógena, correlacionando bien estos datos con los obtenidos a través de inmunofluorescencias.

Estos datos indican, en primer lugar que FIP2 se halla localizado en los mismos compartimentos subcelulares que GluA1, lo cual confirma la hipótesis de que sea una pieza importante en su transporte a través de la red de endosomas, y por otro lado que dichos compartimentos no son los endosomas de reciclaje en los que típicamente encontraríamos Rab11. Por tanto podemos concluir que FIP2 en neuronas, no es un componente permanente de los endosomas de reciclaje, sino que podría desarrollar funciones que no dependen de su interacción con Rab11.



**Figura 17.** FIP2 no es un componente permanente de los endosomas de reciclaje en neuronas de hipocampo. **A)** Fraccionamiento en gradiente de sacarosa a partir de homogeneizados de rodajas de hipocampo, analizados por inmunodetección **B)** Perfil de expresión de FIP2, Rab11 o GluA1 a lo largo de las diferentes fracciones aisladas en el gradiente de sacarosa. **C)** Fraccionamiento en gradiente de sacarosa a partir de homogeneizados de rodajas de hipocampo infectadas con GFP-FIP2, analizados por inmunodetección **D)** Perfil de expresión de GFP-FIP2, Rab11 o GluA1 a lo largo de las diferentes fracciones aisladas en el gradiente de sacarosa.

### 3. Estudios de las propiedades dinámicas de GFP-FIP2. Las distintas poblaciones subcelulares de FIP2 se caracterizan por distintas propiedades dinámicas

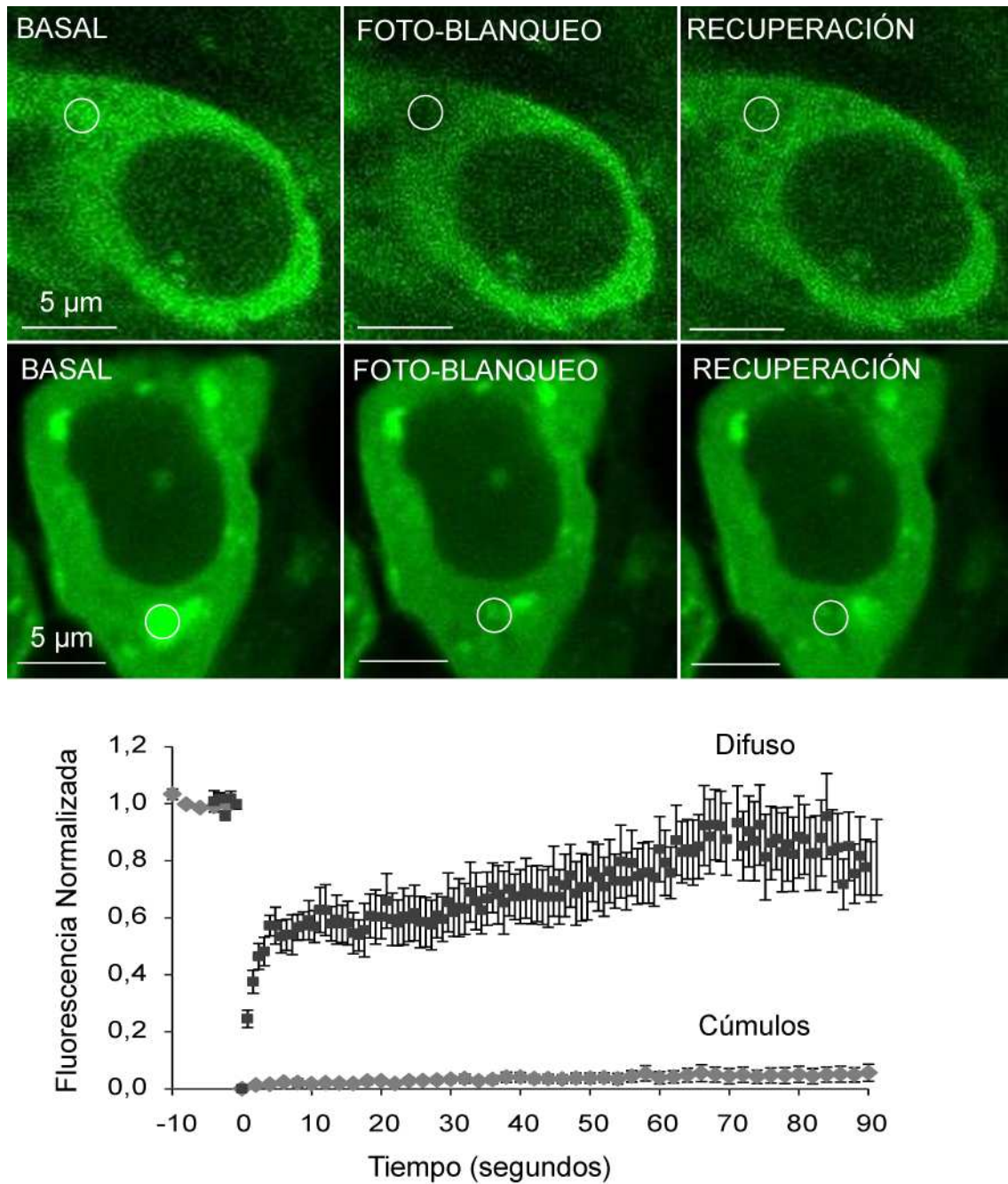
La concentración de GluA1 en regiones en las que GFP-FIP2 se acumula, nos llevó a preguntarnos si las propiedades dinámicas de estos cúmulos difieren de las de aquellas regiones en las que se encuentra más difuso. Para responder a estas preguntas realizamos experimentos de FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching).

Estos experimentos se basan en el foto-blanqueo irreversible de proteínas acopladas a marcadores fluorescentes (como GFP), mediante pulsos de luz de alta intensidad procedentes de un láser. La recuperación de la fluorescencia en la región de interés será consecuencia del

movimiento de las moléculas fluorescentes hacia la misma. Así mismo, la no recuperación de la fluorescencia indicará inmovilidad de las proteínas. En base a los tiempos de recuperación y las distancias recorridas podríamos calcular los coeficientes de difusión (Reits & Neefjes, 2001; White & Stelzer, 1999).

Para ello empleamos rodajas de hipocampo que sobrepresan la construcción GFP-FIP2. Se seleccionaron regiones de aproximadamente  $1\mu^2$  en zonas difusas y en zonas en las que se observaron acumulaciones. Tras el foto-blanqueamiento se recogieron imágenes cada 2 segundos durante unos 2 minutos. Estos experimentos mostraron que las regiones difusas recuperan en torno al 80% de la fluorescencia después de dos minutos, mientras que en las zonas en las que GFP-FIP2 queda acumulada no se produce recuperación de la fluorescencia en la misma ventana temporal (Fig. 18).

De acuerdo con estos datos, la distribución heterogénea que hemos observado en GFP-FIP2 se corresponde con dos componentes dinámicas distintas. Una de ellas está caracterizada por un coeficiente de difusión más alto, mientras que la otra es prácticamente inmóvil. Esta última es además, la fracción en la que encontramos una mayor concentración de GluA1, por lo que podemos concluir que GFP-FIP2 mantiene GluA1 secuestrado en compartimentos extra-sinápticos inmóviles.



**Figura 18.** Imágenes de microscopía confocal representativas de los experimentos de FRAP. Los paneles superiores corresponden a experimentos de FRAP en regiones difusas y los inferiores a experimentos de FRAP en regiones de acumulación en rodajas de hipocampo infectadas con GFP-FIP2. A la izquierda (basal) se muestra la expresión en el soma neuronal. Una pequeña región (círculo blanco) fue fotoblanqueada y tras 90 segundos la fluorescencia se recuperó al 90% en regiones difusas o se mantuvo sin recuperación para las regiones acumuladas. La gráfica muestra los análisis cuantitativos para los experimentos de FRAP. Se representan los valores medios de intensidad de fluorescencia  $\pm$  sem.



---

## **Bloque II: Papel de Rab-FIP2 en transporte intracelular de endosomas durante la LTP**

Los datos obtenidos sobre la distribución y localización de FIP2 en neuronas de hipocampo constituyen una novedad con respecto a lo publicado anteriormente ya que hemos hallado FIP2 en compartimentos diferentes de aquellos en los que se localiza Rab11, tanto en el caso de la proteína endógena como en el de la sobreexpresión de la proteína recombinante fusionada a GFP. En dichos compartimentos, encontramos FIP2 junto a la subunidad GluA1 de los receptores AMPA. Además, la sobreexpresión de la proteína de fusión GFP-FIP2 produce una acumulación de receptores AMPA en regiones extra-sinápticas formando cúmulos inmóviles. Estos datos indican que FIP2 desempeña un papel en el transporte de receptores AMPA y que dicha función en condiciones basales es independiente de su interacción con Rab11.

A partir de estos resultados se nos plantean cuestiones críticas como qué tipo de interacciones establece FIP2 con los receptores AMPA en condiciones basales, si dicha interacción se halla regulada durante la LTP, y si es así, cuál es el papel de FIP2 tanto en transmisión basal como durante LTP.

Para responder a estas preguntas hemos llevado a cabo experimentos de inmunoprecipitación que nos permitan definir qué tipo de interacciones establece FIP2 con la maquinaria de reciclaje de receptores AMPA, tanto en condiciones basales como tras la inducción de la LTP, así como estudios de microscopía *ex vivo* y registros electrofisiológicos, que nos permitan comprender la función global de FIP2 en neuronas de hipocampo.

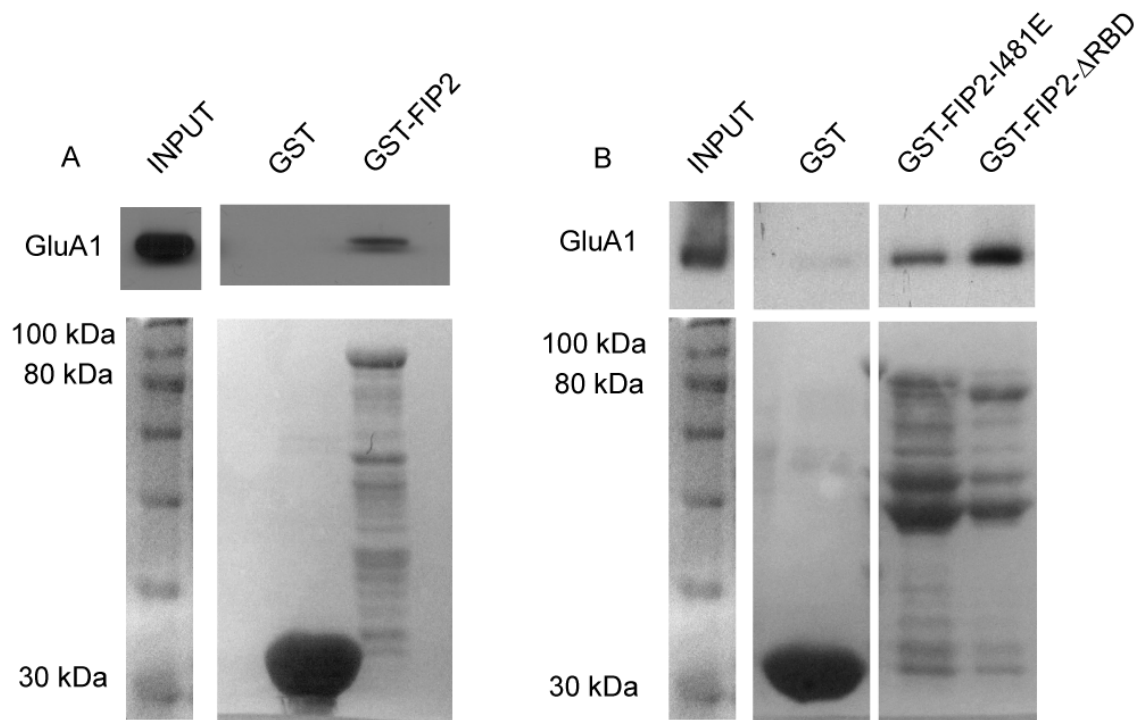


#### **4. FIP2 interacciona con receptores AMPA en condiciones basales y está sujeto a redistribuciones dinámicas durante la inducción de la LTP**

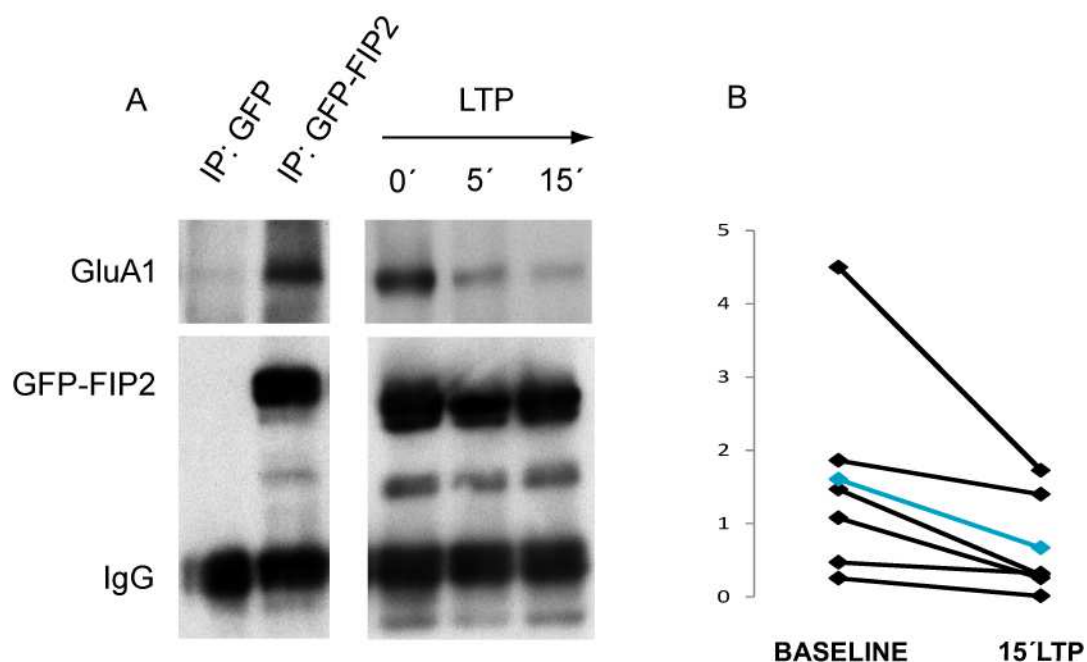
##### **4.1 Evaluación de las interacciones de FIP2 con la maquinaria de transporte de receptores AMPA**

Con el objetivo de evaluar si la localización de FIP2 y GluA1 en compartimentos de membrana, tal y como mostraron nuestros experimentos de inmunofluorescencia y fraccionamiento subcelular, está mediada por la formación de un complejo proteico, decidimos testar la capacidad de FIP2 para interactuar con GluA1 en un ensayo de *pull-down*. Llevamos a cabo este tipo de ensayos *in vitro* poniendo en contacto homogeneizados de hipocampo de rata con GST-FIP2. El análisis posterior por *western blot* de la fracción unida a las bolas de sefarosa, mostró un precipitado de GluA1 (Fig. 19A) específicamente para FIP2 y no para el control con GST. De la misma manera llevamos a cabo ensayos de *pull-down* para determinar si dicha capacidad de interacción depende del dominio de unión a Rab11, mediante las construcciones GST-FIP2- $\Delta$ RBD y GST-FIP2-I481E (Fig. 19B). Ambos mutantes para el dominio RBD son capaces de interactuar con GluA1, lo cual confirma que la unión no se produce a través de dicho dominio.

Para contrastar este resultado y testar la capacidad de FIP2 para interactuar con GluA1 en neuronas, se emplearon cultivos organotípicos de hipocampo que sobrexpresaron la construcción GFP-FIP2 durante 24 horas. A continuación se utilizó un anticuerpo anti-GFP para inmunoprecipitar GFP-FIP2. En la fracción unida a GFP-FIP2 fuimos capaces de detectar GluA1 co-inmunoprecitado en condiciones basales. Al realizar el mismo experimento de inmunoprecipitación, tras la inducción química de la LTP mediante el uso de un cóctel de drogas, observamos como dicho complejo se disocia tras 15 minutos de tratamiento (Fig. 20A y B). Estos resultados confirman que FIP2 y GluA1 forman parte de un complejo proteico en condiciones basales que se halla regulado durante la inducción de la LTP.



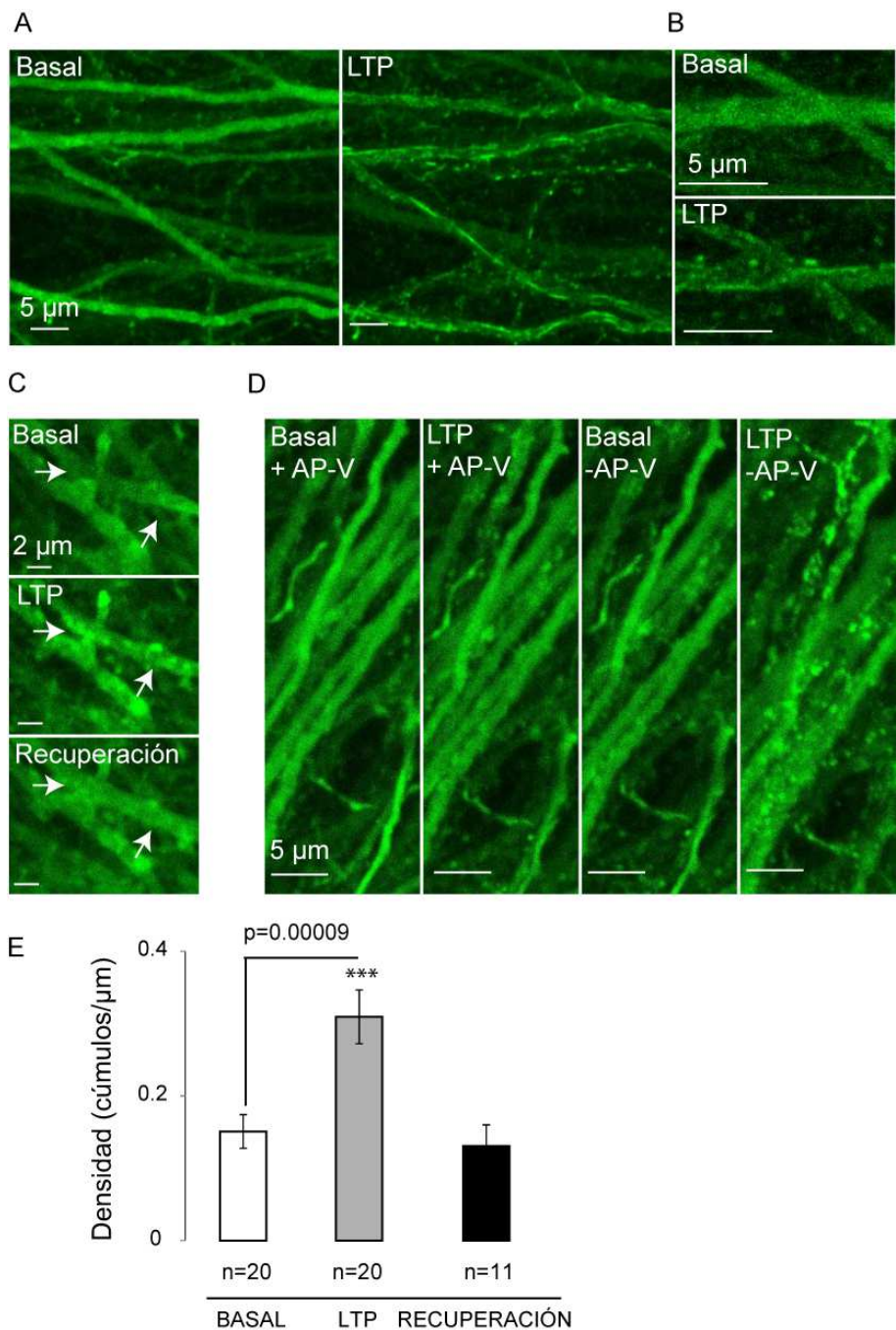
**Figura 19. A)** Pull-down con la construcción GST-FIP2 y GST como control a partir de homogeneizados de rodajas de hipocampo y análisis por *western blot*. **B)** Pull-down con las construcciones GST-FIP2-I481E, GST-FIP2-ΔRBD y GST como control a partir de homogeneizados de rodajas de hipocampo y análisis por *western blot*.



**Figura 20. A)** Inmunoprecipitación de GFP-FIP2 en condiciones basales y tras la inducción química de la LTP. Análisis de *western blot* para GluA1 en la fracción unida. **B)** Cuantificación de seis experimentos independientes de inmunoprecipitación que muestra una disminución de GluA1 unido a FIP2 tras la inducción de la LTP ( $p \leq 0.03$ ). La media se representa con color azul.

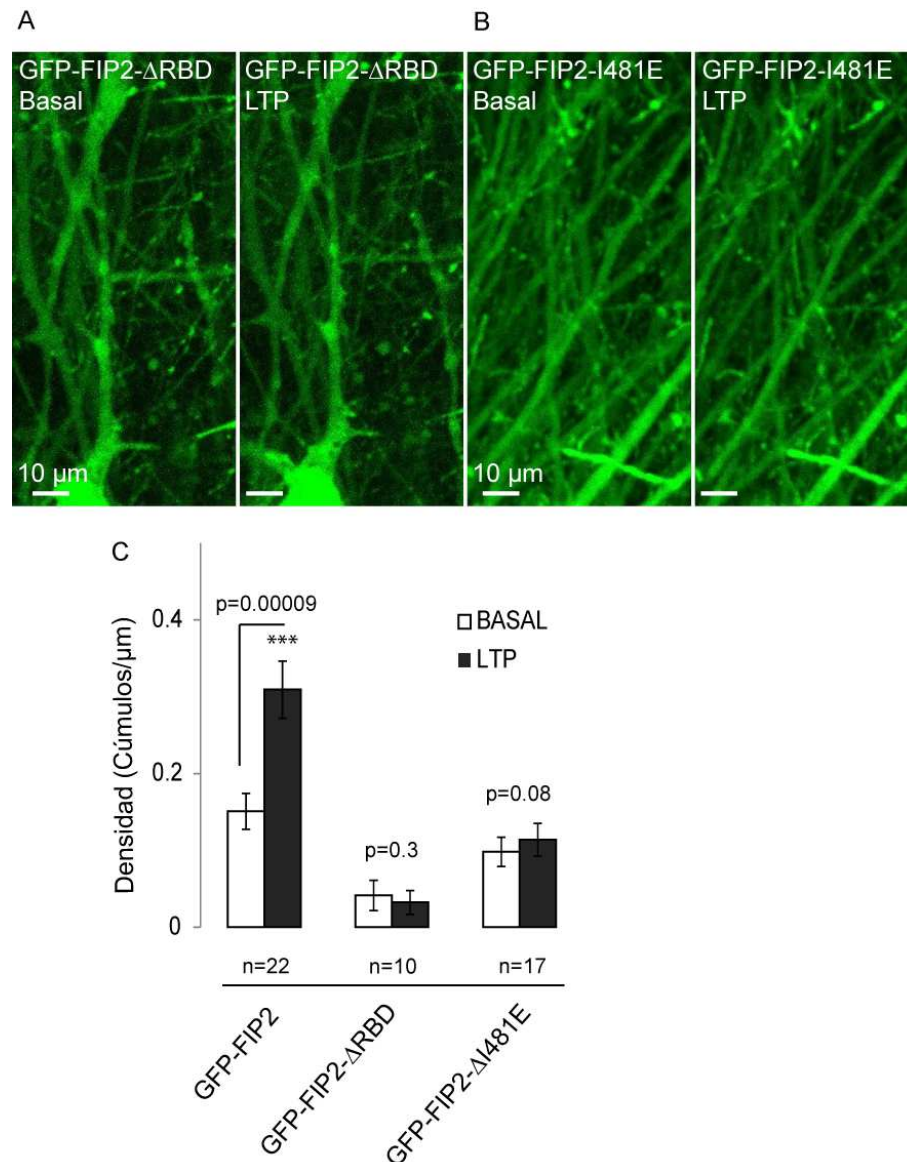
#### **4.2 Estudio del comportamiento dinámico de FIP2 durante plasticidad sináptica mediante experimentos de microscopía *ex vivo***

Para determinar si la inducción de la LTP produce cambios en la distribución o en el comportamiento dinámico de FIP2 que puedan estar implicados en la disociación observada, llevamos a cabo estudios de microscopía confocal sobre neuronas vivas, durante la inducción química de la LTP. Para llevar a cabo estos experimentos, se tomaron imágenes a lo largo del tiempo (cada 2 minutos) de rodajas de hipocampo infectadas con la construcción GFP-FIP2, que fueron mantenidas en perfusión con ACSF (artificial cerebrospinal fluid) y se indujo la LTP mediante la adición de un cóctel de drogas en el líquido de perfusión durante 15 minutos. Observamos que dicha inducción provoca la formación de un patrón de distribución punteado, en el que la proteína parece formar pequeñas acumulaciones a lo largo de las dendritas (Fig. 21A y B), que desaparecen tras unos minutos de recuperación (Fig. 21C y E). Como control llevamos a cabo la inducción de la LTP bloqueando simultáneamente receptores de NMDA mediante la aplicación en la solución de perfusión del agonista selectivo AP-V, y constatamos que en esta situación no hay formación de cúmulos ni cambio alguno en la distribución de FIP2 (Fig. 21D) por lo que podemos decir que dichos cambios son dependientes de NMDA.



**Figura 21. A)** Imágenes de microscopía confocal sobre rodajas de hipocampo en cultivo para la sobreexpresión de GFP-FIP2 en condiciones basales y tras la inducción de la LTP. **B)** Representación con mayor aumento del experimento de inducción de la LTP. **C)** Imágenes antes, durante y después de la Inducción de la LTP. Tras 15 minutos de lavado de la solución de la LTP las regiones punteadas desaparecen y se recobra la distribución basal. **D)** El experimento de inducción de la LTP en presencia del agonista reversible de receptores de NMDAR, AP-V, no produce ninguna redistribución de GFP-FIP2; tras la eliminación de AP-V de la solución de perfusión una nueva inducción de la LTP, produce la aparición de regiones punteadas. **E)** Cuantificación en condiciones basales, tras 15 minutos de inducción de la LTP y tras 20 minutos de recuperación. Se cuantificó el número de cúmulos encontrados a lo largo de una dendrita antes y después de la inducción química de la LTP, con respecto a la longitud de dicha dendrita (densidad=número de cúmulos/ $\mu\text{m}$ ). La n corresponde al número de dendritas cuantificadas en un total de tres experimentos independientes.

Al realizar estos experimentos con los mutantes para los dominios de interacción con Rab11, GFP-FIP2- $\Delta$ RBD (Fig. 22A) y GFP-FIP2-I481E (Fig. 22B), esta capacidad para formar cúmulos desaparece y tras la inducción química de la LTP no apreciamos cambio alguno para ninguno de los dos mutantes (Fig. 22C).



**Figura 22.** Imágenes de microscopía confocal sobre rodajas de hipocampo en cultivo para la sobreexpresión de GFP-FIP2- $\Delta$ RBD (**A**) y GFP-FIP2-I481E (**B**) en condiciones basales y tras la inducción de la LTP. **C**) Cuantificación en condiciones basales y tras 15 minutos de inducción de la LTP para cada una de las construcciones sobreexpresadas. Se cuantificó el número de cúmulos encontrados a lo largo de una dendrita en cada condición con respecto a la longitud de dicha dendrita. La n representa número de dendritas analizadas en un total de 3 experimentos independientes.

Estos datos avalan la idea de que FIP2 está implicado en la regulación de la función sináptica, ya que está sujeto a redistribuciones dependientes de receptores de NMDA durante plasticidad sináptica. Dichos cambios son reversibles, de manera que desaparecen tras terminar la inducción y además dependen de la capacidad de unión a Rab11 ya que no se producen cuando realizamos estos experimentos con los mutantes de unión a Rab11.

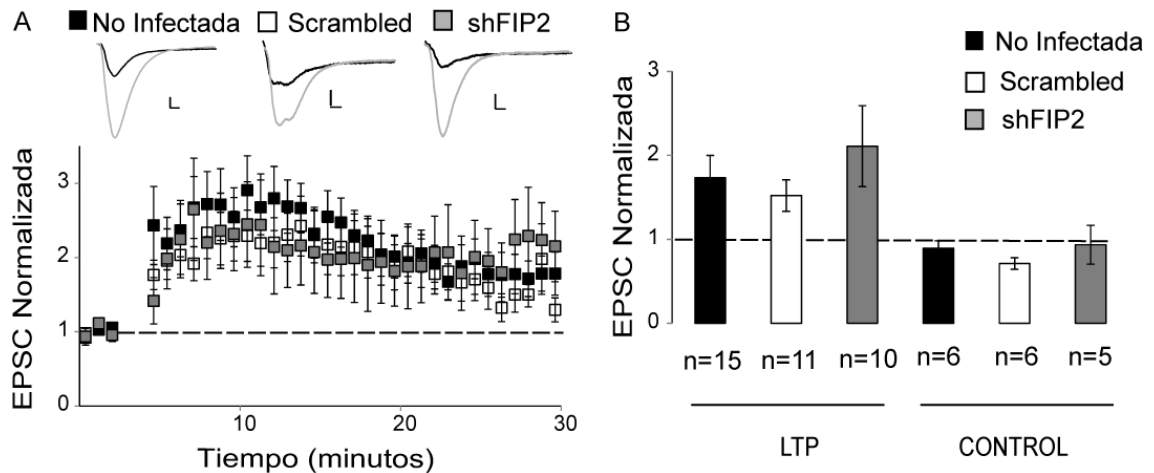
## **5. FIP2 es un regulador negativo de la inserción sináptica de receptores AMPA durante la LTP**

### **5.1 Análisis funcional de FIP2 durante plasticidad sináptica mediante el silenciamiento de la expresión de la proteína endógena**

Para evaluar el papel de FIP2 en la inserción de receptores AMPA en las sinapsis durante plasticidad, llevamos a cabo registros electrofisiológicos en cultivos organotípicos de hipocampo infectados con la construcción lentiviral generada para producir el silenciamiento de la proteína endógena (shFIP2). En estos experimentos estimulamos las fibras pre-sinápticas de las células de CA3 (colaterales de *Schaffer*) y registramos la respuesta post-sináptica mediada por receptores AMPA en las neuronas piramidales de la capa CA1 antes y después de la inducción eléctrica de la LTP. Para evaluar la función de FIP2 en estas sinapsis expresamos la construcción lentiviral shFIP2 únicamente en la capa CA1, de modo que solo los terminales post-sinápticos se encuentran afectados por el silenciamiento. Tras 7-10 días de expresión, llevamos a cabo registros intracelulares de forma simultánea en células control no infectadas y en células infectadas. Como control para evaluar el efecto de la propia infección viral llevamos a cabo el mismo tipo de experimentos bajo la infección lentiviral con la secuencia control *scrambled* (Fig. 23A y B).

Los registros electrofisiológicos indicaron que tras la supresión de la expresión de FIP2, la respuesta de AMPA bajo inducción de la LTP no presenta cambios con respecto a células control, indicando que la presencia de FIP2 y por tanto su unión a Rab11 no participa directamente en la movilización de receptores durante la LTP.



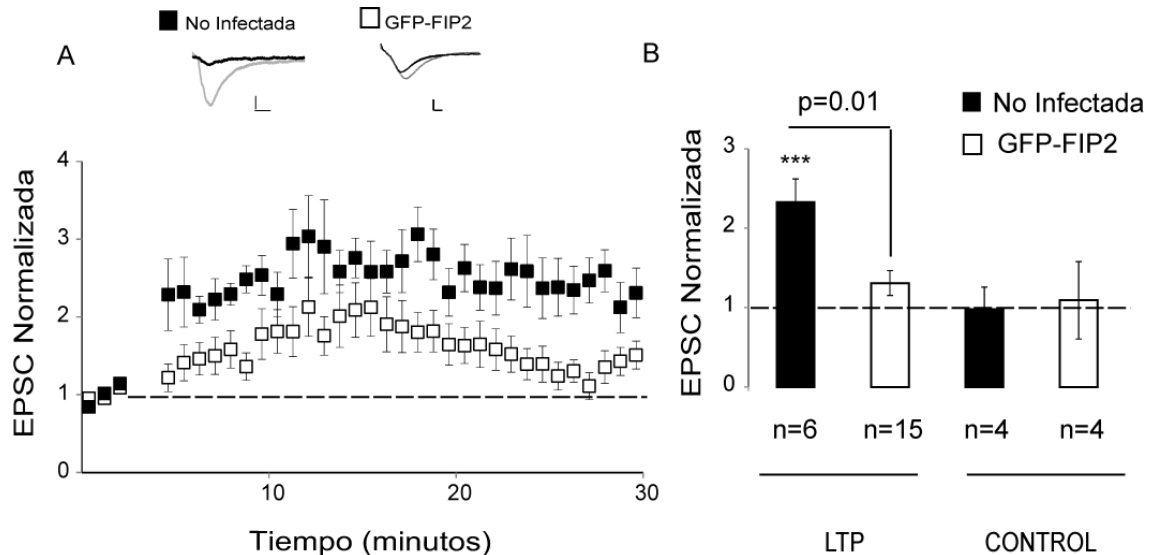


**Figura 23. A)** Cultivos organotípicos de hipocampo fueron infectados con lentivirus conteniendo la secuencia shFIP2, o la secuencia control *scrambled*. Se llevaron a cabo registros electrofisiológicos en configuración de célula entera en neuronas que expresan una u otra secuencia y en células no infectadas y se indujo la LTP mediante estimulación pre-sináptica con una frecuencia de 3Hz durante 2,5 minutos con 0 mV de despolarización post-sináptica. La gráfica representa el incremento en las respuestas mediadas por receptores AMPA tras la inducción de la LTP, con respecto al estado basal en células no infectadas ( $p=0.01$ ), células infectadas con la secuencia control *scrambled* ( $p=0.02$ ), y células infectadas con la secuencia shFIP2 ( $p=0.04$ ). Se muestran ejemplos representativos para las condiciones basales (Negro) o tras la inducción de la LTP (gris) para cada una de las condiciones. Barras de escala 20 pA (vertical) y 5ms (horizontal). **B)** Valores medios de las respuestas mediadas por receptores AMPA en la ventana temporal de 25-30 minutos, normalizados con respecto a los valores basales, para el canal en el que se indujo la LTP y para el canal control en el que no se produjo estimulación pre-sináptica durante la despolarización. No se encontraron diferencias en la expresión de la LTP en células infectadas con la secuencia shFIP2 ( $2.1 \pm 0.4$ ) con respecto a células no infectadas ( $1.7 \pm 0.2$ ) con un p valor de 0.8, ni en células infectadas con la secuencia control ( $1.5 \pm 0.1$ ) con respecto a células no infectadas con un p valor de 0.6

## 5.2 Análisis funcional de FIP2 durante plasticidad sináptica mediante la sobrexpresión de proteínas recombinantes

Sin embargo, dado que FIP2 se encuentra unido a GluA1 en condiciones basales, y que esta interacción está sujeta a regulación dependiente de la LTP, decidimos abordar estos estudios utilizando una estrategia alternativa para evaluar la función de dicha interacción y de la consecuente disociación durante la LTP. Llevamos a cabo registros electrofisiológicos equivalentes, bajo la sobrexpresión de la construcción GFP-FIP2. Expresamos dicha construcción en la región CA1 de rodajas de hipocampo durante 24 horas.

Estos experimentos en cambio, mostraron una reducción significativa en la potenciación de la respuesta de AMPA bajo inducción de la LTP, con respecto a células control (Fig. 24A y B). Estos resultados, junto con los datos obtenidos en experimentos de microscopía y bioquímica sugieren que la sobreexpresión de GFP-FIP2 produce una retención de los endosomas que contienen GluA1 impidiendo el correcto reciclaje e inserción de receptores en la membrana post-sináptica durante la LTP.



**Figura 24. A)** Cultivos organotípicos de hipocampo fueron infectados con virus Sindbis conteniendo la construcción GFP-FIP2 que fue expresada durante 24 horas. Se llevaron a cabo registros electrofisiológicos en configuración de célula entera en neuronas infectadas y no infectadas y se indujo la LTP mediante estimulación pre-sináptica con una frecuencia de 3Hz durante 2,5 minutos con 0 mV de despolarización post-sináptica. La gráfica representa el incremento en las respuestas mediadas por receptores AMPA tras la inducción de la LTP, con respecto al estado basal en células no infectadas ( $p=0.03$ ) y células infectadas ( $p=0.1$ ). Se muestran ejemplos representativos para las condiciones basales (negro) o tras la inducción de la LTP (gris) para cada una de las condiciones. Barras de escala 20 pA (vertical) y 5ms (horizontal). **B)** Valores medios de las respuestas mediadas por receptores AMPA en la ventana temporal de 25-30 minutos, normalizados con respecto a los valores basales, para el canal en el que se indujo la LTP y para el canal control en el que no se produjo estimulación pre-sináptica durante la despolarización. Se encontraron diferencias significativas en la expresión de la LTP en células infectadas ( $1.3 \pm 0.2$ ) con respecto a células no infectadas ( $2.2 \pm 0.2$ ) con un p valor de 0.02.

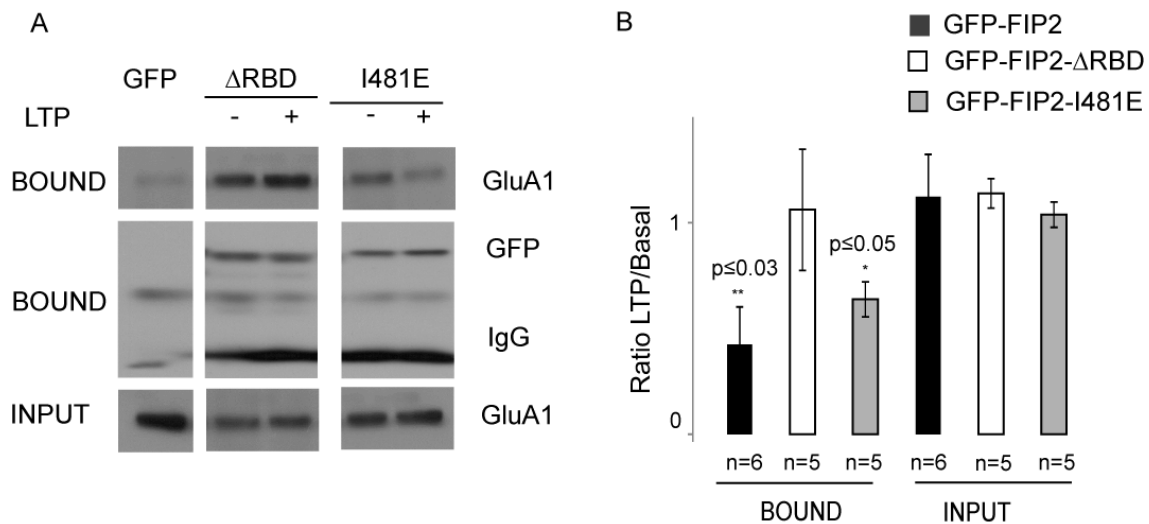
Por tanto FIP2, a pesar de no ser un componente necesario durante el transporte regulado de receptores AMPA, estaría actuando como un regulador negativo que impide la liberación continua de las subunidades GluA1 en condiciones basales, en las que fundamentalmente

dímeros GluA2/GluA3 y no GluA1/GluA2 son insertados en la membrana post-sináptica como parte del reciclaje constitutivo de los receptores AMPA. La inducción de la LTP permitirá la disociación de este complejo y la inserción de receptores GluA1 en la membrana post-sináptica.

Sin embargo, nos encontramos que la sobreexpresión de GFP-FIP2, a pesar de mostrar disociación de GluA1 (Fig. 20) reduce la expresión normal de la LTP. Por ello nos preguntamos si la disminución de la LTP observada durante los registros electrofisiológicos es un efecto producido por la sobreexpresión de una proteína con una elevada afinidad por Rab11 activo, de manera que la disociación de GluA1, permite su interacción con Rab11 e impide la necesaria participación de ésta en la LTP.

Para evaluar el papel de la interacción con Rab11 en la reducción de la LTP observada para GFP-FIP2, decidimos emplear los mutantes para el dominio de interacción con Rab11 y evaluar el efecto funcional de su sobreexpresión. Dado que ambas construcciones GST-FIP2- $\Delta$ RBD y GST-FIP2-I481E, fueron capaces de unir GluA1 en ensayos *in vitro* de *pull-down*, decidimos comprobar previamente si, como en el caso de GFP-FIP2, esta interacción tiene lugar en las neuronas y si ambos mutantes son también capaces de disociarse de GluA1 durante la LTP. Para ello, sobreexpresamos ambas construcciones GFP-FIP2- $\Delta$ RBD y GFP-FIP2-I481E en rodajas de hipocampo durante 24 horas, y llevamos a cabo experimentos de inmunoprecipitación en condiciones basales y tras 15 minutos de inducción química de la LTP.

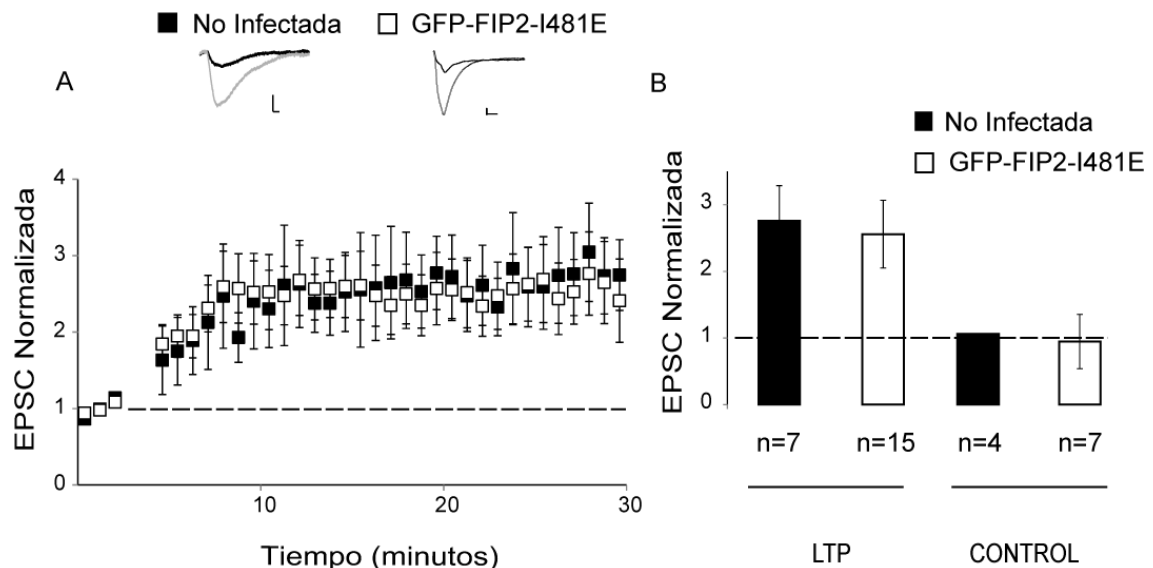
Como muestra la figura 25, al inmunoprecipitar GFP-FIP2-I481E en condiciones basales, detectamos GluA1 co-inmunoprecipitado en la fracción unida y la inducción de la LTP produce, al igual que se observó para GFP-FIP2, la disociación del complejo. Al llevar a cabo estos ensayos de inmunoprecipitación en rodajas que sobreexpresan el mutante de delección para la región  $\alpha$ -hélice, GFP-FIP2- $\Delta$ RBD encontramos que dicho mutante interactúa con GluA1 en condiciones basales, sin embargo ha perdido la capacidad de disociarse tras la inducción química de la LTP y permanece unido a GluA1. En estos momentos desconocemos los mecanismos que impiden la disociación de GluA1 en este mutante, pero podrían estar relacionados con la pérdida de su capacidad de dimerización (Fig. 11C). En cambio, la interacción con Rab11 no parece un factor determinante en la habilidad de FIP2 para disociarse de GluA1, ya que ambos mutantes, FIP2- $\Delta$ RBD y FIP2-I481E carecen de unión a Rab11 (Fig. 11A).



**Figura 25. A)** Inmunoprecipitación de GFP-FIP2 $\Delta$ RBD y GFP-FIP2-I481E en condiciones basales y tras la inducción química de LTP con un anticuerpo anti-GFP. Análisis de *western blot* para GluA1 y GFP en la fracción unida (BOUND) y de GluA1 en los extractos totales (INPUT). **B)** Cuantificación de los experimentos de inmunoprecipitación que muestra una disminución en la cantidad de GluA1 unido a GFP-FIP2 tras la inducción de LTP comparable a la observada para el mutante GFP-FIP2-I481E. En cambio, en el mutante GFP-FIP2 $\Delta$ RBD, no se observa disociación de GluA1 tras la inducción de LTP. La n representa el número de experimentos independientes realizados.

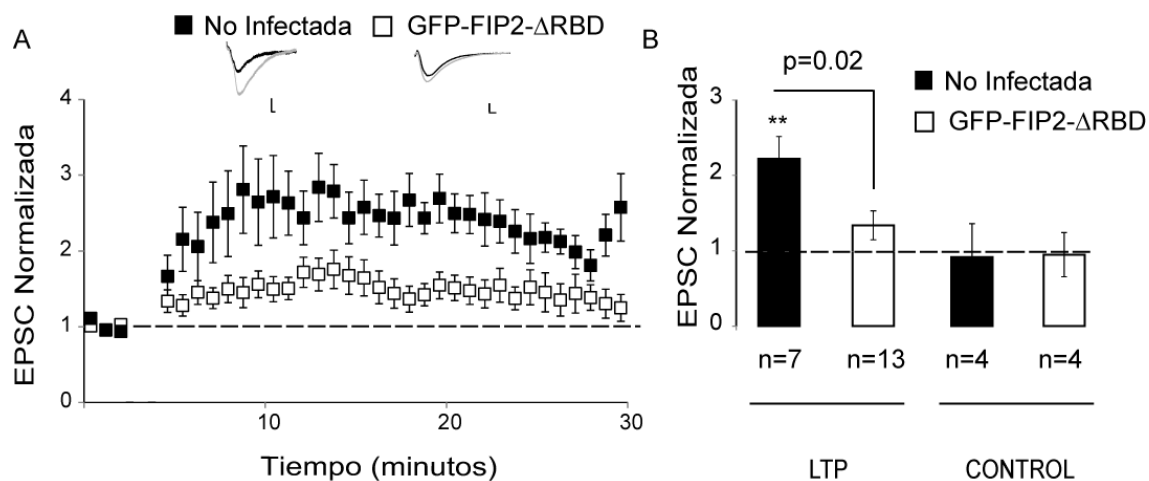
Llevamos a cabo registros electrofisiológicos de rodajas que sobrexpresaron durante 24 horas la construcción GFP-FIP2-I481E, y observamos en este caso, que la potenciación de la respuesta de los receptores AMPA tras la inducción de la LTP, muestra valores similares a los obtenidos para células control (Fig. 26).

Este resultado en primer lugar, confirma junto con los registros electrofisiológicos en presencia de shFIP2 que la interacción Rab11/Rab11-FIP2, no es necesaria para la inserción sináptica de receptores AMPA durante la LTP. Por otro lado, pone de manifiesto que la capacidad de interactuar con Rab11 es un factor importante en la reducción de la LTP al sobrexpresar FIP2. Es decir, el secuestro de Rab11 por GFP-FIP2 limitaría la disponibilidad de Rab11 para actuar durante la LTP. En cambio, el mutante FIP2-I481E no es capaz de interactuar con Rab11, y se disocia de GluA1 al inducir la LTP, con lo que no supone ningún impedimento para la inserción de los receptores AMPA durante la LTP.



**Figura 26. A)** Cultivos organotípicos de hipocampo fueron infectados con virus Sindbis conteniendo la construcción GFP-FIP2-I481E que fue expresada durante 24 horas. Se llevaron a cabo registros electrofisiológicos en configuración de célula entera en neuronas infectadas y no infectadas y se indujo la LTP mediante estimulación pre-sináptica con una frecuencia de 3Hz durante 2.5 minutos con 0 mV de despolarización post-sináptica. La gráfica representa el incremento en las respuestas mediadas por receptores AMPA tras la inducción de la LTP, con respecto al estado basal en células no infectadas ( $p=0.03$ ) y células infectadas ( $p=0.001$ ). Se muestran ejemplos representativos para las condiciones basales (negro) o tras la inducción de la LTP (gris) para cada una de las condiciones. Barras de escala 20 pA (vertical) y 5ms (horizontal). **B)** Valores medios de las respuestas mediadas por receptores AMPA en la ventana temporal de 25-30 minutos, normalizados con respecto a los valores basales, para el canal en el que se indujo la LTP y para el canal control en el que no se produjo estimulación pre-sináptica durante la despolarización. No se encontraron diferencias ( $p=0.2$ ) en la expresión de la LTP en células infectadas ( $2.5\pm 0.5$ ) con respecto a células no infectadas ( $2.7\pm 0.5$ ).

¿Significa esto que la interacción de FIP2 y GluA1 no desempeña ningún papel durante la LTP? Para responder a esta pregunta llevamos a cabo registros electrofisiológicos con el mutante de delección, GFP-FIP2- $\Delta$ RBD, que no une Rab11, pero presenta una interacción persistente con GluA1 que no desaparece con la inducción de la LTP (Fig. 25). En estos experimentos comprobamos que a pesar de no unir Rab11 la sobreexpresión de este mutante, también produce una disminución en la potenciación de la respuesta de los receptores AMPA tras la inducción de la LTP, en comparación con células control (Fig. 27). En este caso la reducción observada en la plasticidad sináptica, no se debe a un secuestro de Rab11, sino a su



incapacidad para disociarse de GluA1 tras la inducción de la LTP, como mostraron los experimentos de inmunoprecipitación.

En resumen estos datos sugieren, que el papel de FIP2 durante plasticidad sináptica se desarrolla de manera independiente de Rab11. Su capacidad para interactuar con GluA1 en condiciones basales, es independiente de su dominio de unión a Rab11, pues ambos mutantes son capaces de co-inmunoprecipitar GluA1. Por otro lado el transporte de GluA1 durante la LTP no requiere de la participación de FIP2 sino de la disociación del complejo FIP2/GluA1, pues la pérdida de esta capacidad (mutante FIP2-ΔRBD) lleva a la disminución de la expresión de la LTP. FIP2 por tanto, contrariamente a lo que hubiéramos esperado, participa en plasticidad sináptica como un mecanismo de retención-liberación de receptores, y no como parte de la maquinaria de transporte propiamente dicha.

## 6. FIP2 regula positivamente el tráfico basal de receptores AMPA

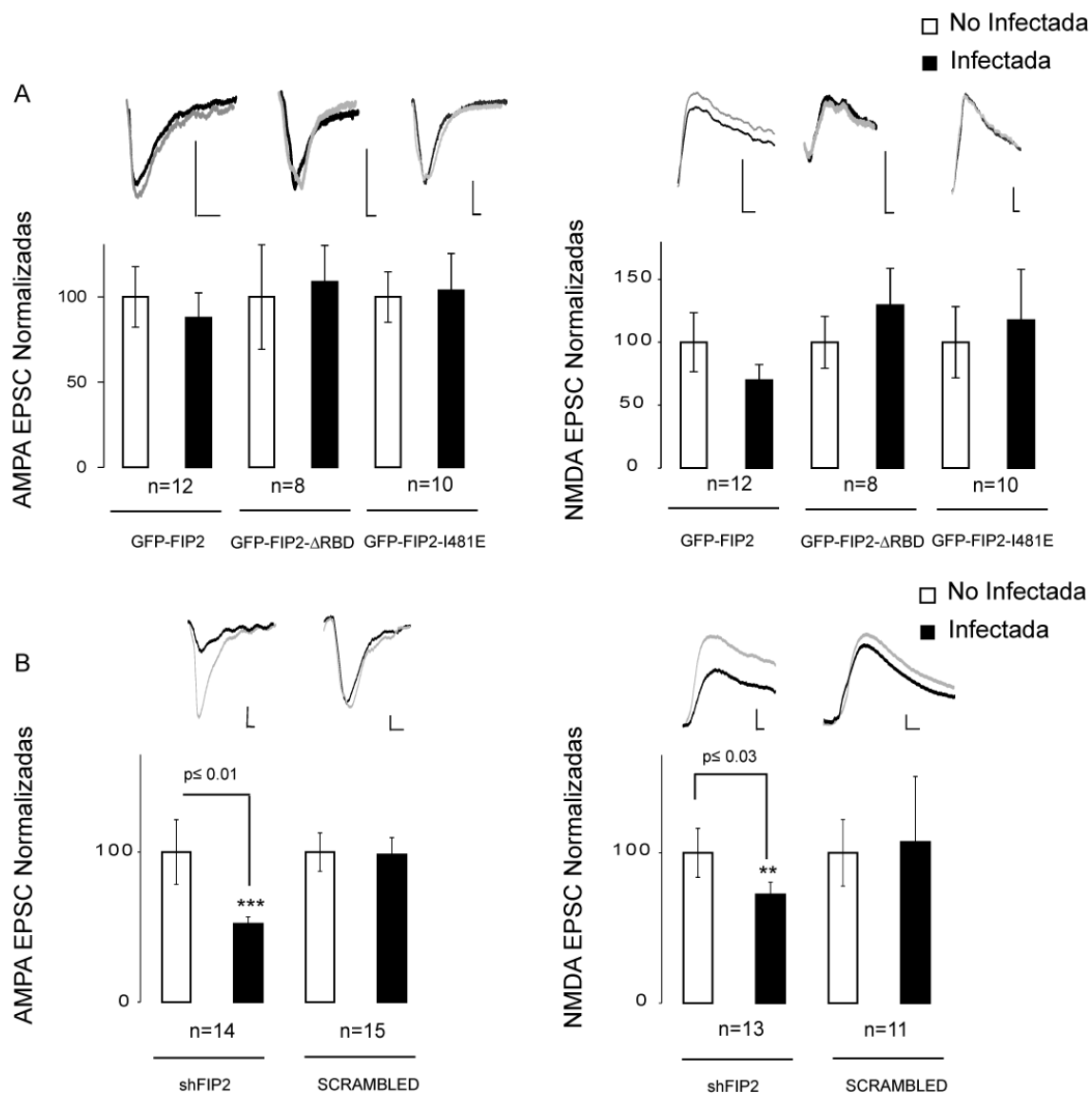
El papel de FIP2 en transmisión sináptica basal ha sido evaluado mediante registros electrofisiológicos en los que se estimulan las fibras pre-sinápticas de las células de CA3 (colaterales de *Schaffer*) y registramos la respuesta post-sináptica mediada por receptores AMPA (-60mV) y por receptores NMDA (+40mV) simultáneamente en pares de células infectadas y no infectadas que se encuentren próximas en la capa CA1.

Para ello se infectaron cultivos organotípicos de hipocampo con las construcciones GFP-FIP2, GFP-FIP2- $\Delta$ RBD y GFP-FIP2-I481E durante 24 horas. La sobreexpresión de estas construcciones no produjo alteraciones en las respuestas de receptores AMPA o NMDA en comparación con las respuestas obtenidas en células control no infectadas (Fig. 28A, B). Estos resultados sugieren que la interacción FIP2-Rab11 no participa en el reciclaje constitutivo de receptores AMPA.

Llevamos a cabo estos registros expresando también las construcciones lentivirales shFIP2 y *scrambled* durante 7-10 días. El bloqueo en la expresión de FIP2 produce una disminución de un 50% en la respuesta basal mediada por receptores AMPA y un 25% en las respuestas mediadas por receptores NMDA en comparación con células control no infectadas (Fig. 28C, D). Esta disminución es específica para la construcción shFIP2 y no un resultado de la infección viral como muestran los valores normales obtenidos tras la infección con la construcción *scrambled*.

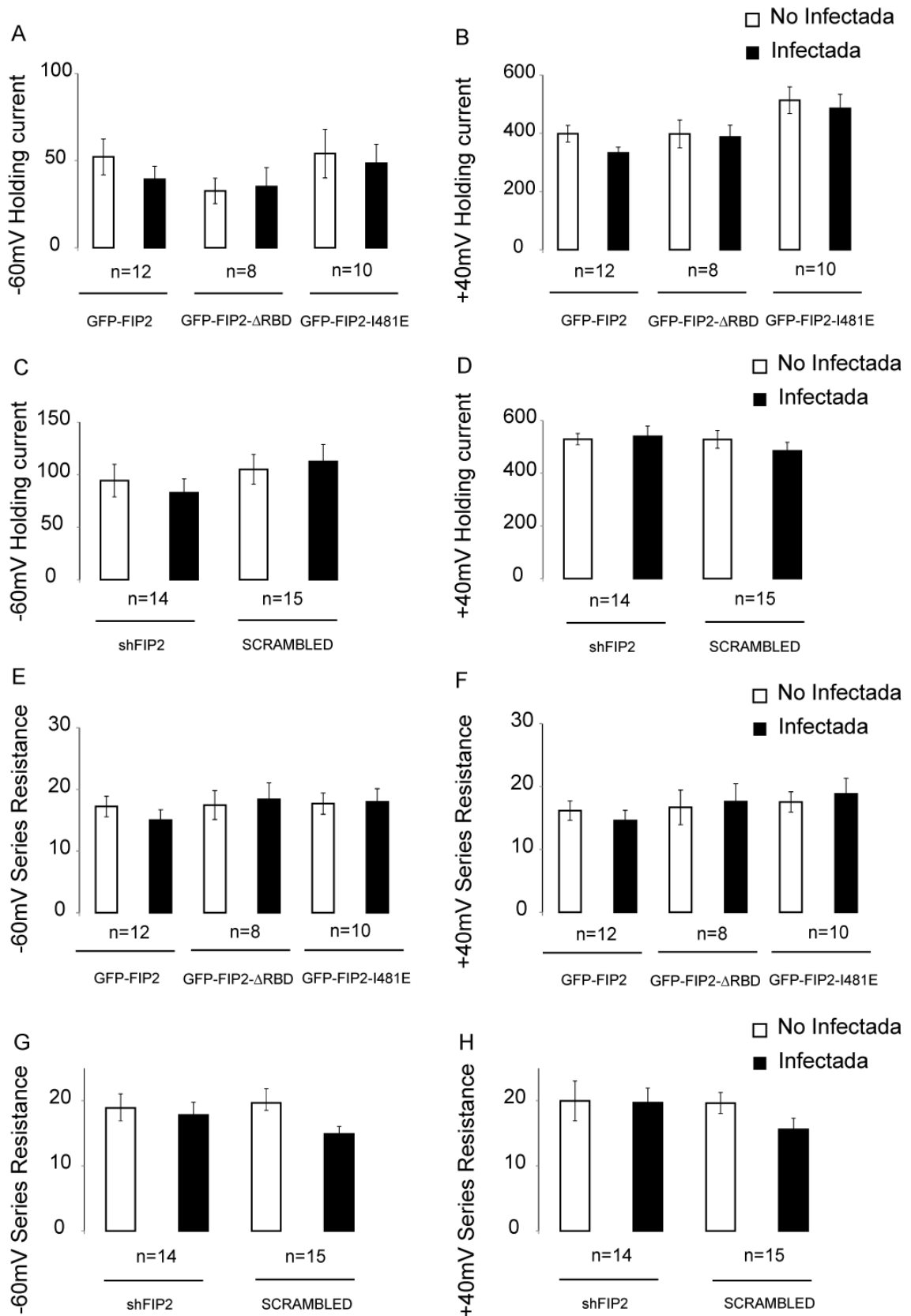
Este efecto sugiere un papel para FIP2 en el reciclaje constitutivo de receptores AMPA, que afecta principalmente a las subunidades GluA2/GluA3. La ausencia de FIP2 en este caso produce un reciclaje defectuoso de receptores que sin embargo no se halla afectado por la sobreexpresión de GFP-FIP2, por lo que en este caso FIP2 estaría actuando como un regulador positivo. Estos resultados indican que FIP2 tiene una función en el mantenimiento del reciclaje de receptores de la membrana post-sináptica a través de un mecanismo distinto del mostrado en plasticidad sináptica.

Como control, comprobamos que la sobreexpresión de proteínas recombinantes y shRNAs no altera las propiedades pasivas de las neuronas ni la calidad de los registros electrofisiológicos (Fig. 29).



**Figura 28. A)** Cultivos organotípicos de hipocampo fueron infectados con virus Sindbis conteniendo las construcciones GFP-FIP2, GFP-FIP2-ΔRBD y GFP-FIP2-I481E que fueron expresadas durante 24 horas. Se llevaron a cabo registros electrofisiológicos en configuración de célula entera simultáneamente en neuronas infectadas y no infectadas a -60mV para medir respuestas mediadas por receptores AMPA y a +40mV para medir respuestas mediadas por receptores NMDA. **B)** Cultivos organotípicos de hipocampo fueron infectados con lentivirus conteniendo las construcciones shFIP2 y *scrambled*, que fueron expresadas durante 7-10 días. Se llevaron a cabo registros electrofisiológicos en configuración de célula entera simultáneamente en neuronas infectadas y no infectadas a -60mV para medir respuestas mediadas por receptores AMPA y a +40mV para medir respuestas mediadas por receptores NMDA. Se muestran ejemplos representativos para las células no infectadas (gris) o infectadas (negro) para cada una de las condiciones. Barras de escala 50 pA (vertical) y 5ms (horizontal).





**Figura 29.** La sobreexpresión de las proteínas recombinantes GFP-FIP2, GFP-FIP2-ΔRBD, GFP-FIP2-I481E no afectó propiedades pasivas de la membrana, reflejadas en “holding current” (A y B), ni el acceso a la célula con la pipeta de registro, reflejado en “series resistance” (E y F). Los mismos resultados se obtuvieron con la expresión de shFIP2 y shscrambled (C y D, G y H).



---

### **Bloque III: Regulación de Rab11-FIP2 por fosforilación**

La implicación de FIP2 en el transporte de receptores AMPA tanto a nivel basal, durante el reciclaje constitutivo de receptores, como a nivel de transporte regulado durante la inducción de la LTP, parece indicar que está funcionando en varios niveles de manera independiente de Rab11 como un organizador del tráfico de membrana en dendritas y espinas dendríticas.

Todo ello implicaría una fina regulación en la actividad de FIP2, por lo que nos interesamos por los posibles mecanismos de regulación que podrían mediar las distintas funciones que FIP2 desempeña. Ha sido descrito como FIP2 se encarga de regular el establecimiento de polaridad en células MDCK a través de la fosforilación de su residuo S227 por la kinasa MARK2/EMK/Par1B $\alpha$  (Ducharme et al., 2006; Lapierre et al., 2012). Estos estudios también demostraron que la fosforilación podría afectar exclusivamente a una subpoblación de FIP2 que no colocaliza con Rab11 ni con MiosinaV, por ello proponen que estas funciones de FIP2 se desarrollan de manera independiente de su interacción con ambas.

Por ello y dado que la fosforilación es un mecanismo de regulación de gran importancia durante procesos de plasticidad sináptica, decidimos investigar la capacidad de FIP2 para ser fosforilado en neuronas y su posible implicación en transmisión basal y plasticidad sináptica.



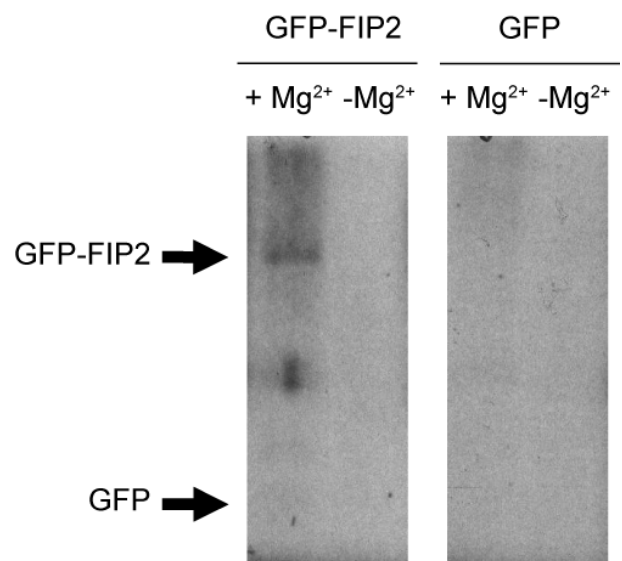
## 7. FIP2 es susceptible de fosforilación en neuronas de hipocampo

### 7.1 Estudios *in vitro* de fosforilación de FIP2

Dado que la fosforilación de FIP2 ha sido descrita en líneas celulares inmortalizadas, decidimos investigar la posible fosforilación de FIP2 en neuronas partiendo de estudios *in vitro* sobre cultivos organotípicos de hipocampo infectados con las construcciones GFP-FIP2 y GFP como control. Los homogeneizados procedentes de estos cultivos fueron incubados con [ $\gamma$ - $^{32}$ P]-ATP en presencia y en ausencia de  $Mg^{2+}$ , y posteriormente se llevó a cabo una inmunoprecipitación con un anticuerpo anti-GFP.

Este ensayo nos permitió detectar, tras el revelado mediante autorradiografía, la aparición de una banda específicamente en los lisados procedentes de rodajas infectadas con GFP-FIP2 en presencia de  $Mg^{2+}$ , lo cual indica que es el resultado de una reacción enzimática (Fig. 30). Este resultado sugiere que GFP-FIP2 puede ser fosforilado *in vitro* por kinasas presentes en las rodajas de hipocampo.

**Figura 30.** Ensayo de fosforilación *in vitro* en rodajas infectadas con la construcción GFP-FIP2 y GFP como control mediante incubación con [ $\gamma$ - $^{32}$ P] ATP en ausencia o presencia de  $Mg^{2+}$ . Posteriormente se llevó a cabo una inmunoprecipitación con un anticuerpo anti-GFP y se reveló en un gel de acrilamida mediante autorradiografía. Se muestra la aparición de una banda en el peso molecular esperado para GFP-FIP2 en presencia de  $Mg^{2+}$  y no para GFP.

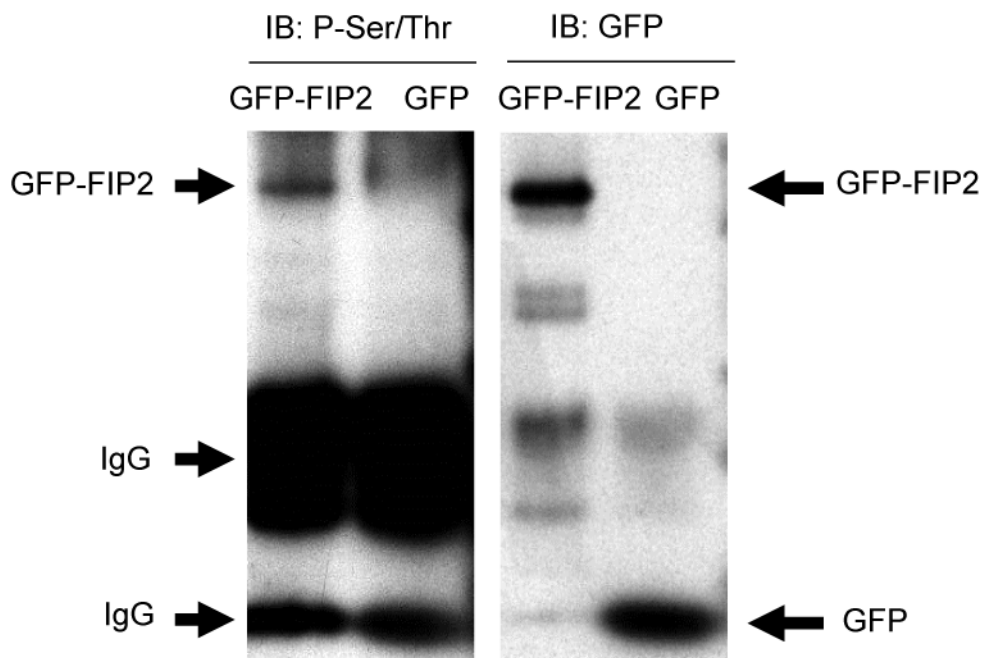


### 7.2 1.2 Análisis del estado de fosforilación endógeno de FIP2

A pesar de este dato positivo, este tipo de experimentos *in vitro* tienen algunas limitaciones importantes. Se llevaron a cabo sobre cultivos organotípicos, lo cual implica que los

homogeneizados contienen una variedad de kinasas procedentes no solo de las neuronas infectadas, sino también de otros tipos celulares como células gliales e interneuronas, que podrían ser las responsables de la fosforilación de FIP2. Además la activación de las kinasas en un homogeneizado podría estar produciendo fosforilaciones sobre sustratos, que no tendrían lugar en condiciones fisiológicas. Todo ello nos llevó a un diseño experimental que nos permitiera detectar si la fosforilación de FIP2 ocurre de manera endógena fisiológicamente, mediante dos aproximaciones diferentes: el uso de anticuerpos anti-P-Ser para la detección de los residuos de serina fosforilados, y el uso de un compuesto denominado *phos-tag* para la separación en geles de acrilamida de proteínas fosforiladas.

Empleamos rodajas de hipocampo infectadas con las construcciones GFP-FIP2 y GFP como control, sobre las cuales llevamos a cabo una inmunoprecipitación con un anticuerpo anti-GFP. Posteriormente utilizamos un cóctel de anticuerpos para inmunodetección de las serinas fosforiladas, compuesto por un conjunto de 6 clones diferentes para el reconocimiento de distintos sitios de fosforilación por serin/treonin-kinasas. Estos ensayos mostraron una banda en el carril correspondiente a las rodajas que expresan GFP-FIP2, que se corresponde con el peso molecular esperado y que no aparece en el carril de las rodajas que expresan GFP (Fig. 31), lo cual es una fuerte indicación de que la fosforilación de FIP2 tiene lugar de manera endógena cuando llevamos a cabo la sobreexpresión de la proteína.

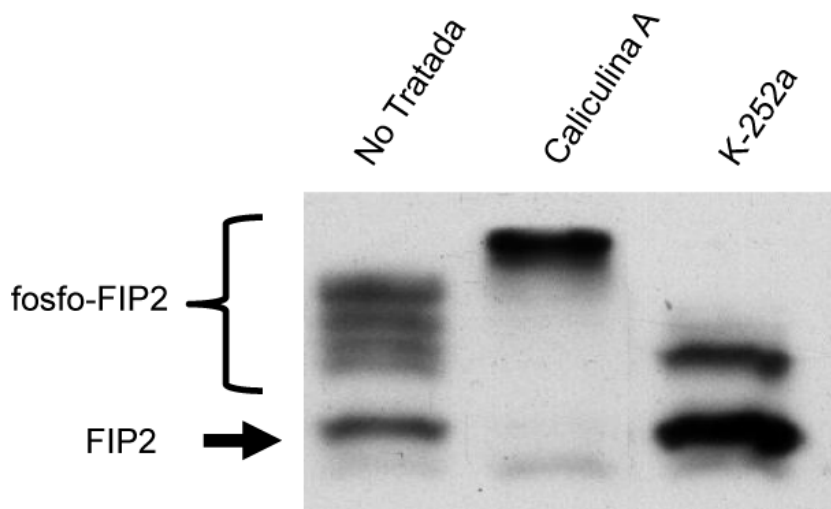


**Figura 31.** Inmunoprecipitación con anticuerpo anti-GFP en rodajas de hipocampo infectadas con las construcciones GFP-FIP2 y GFP como control. La inmunodetección con un anticuerpo anti-P-Ser/Thr permitió la detección de una banda en el peso molecular esperado para GFP-FIP2 que no aparece en el control negativo para GFP.

Para determinar si FIP2 endógeno es también sustrato de reacciones de fosforilación en rodajas de hipocampo, empleamos un reactivo denominado *phos-tag*. Este compuesto en combinación con iones metálicos como zinc o manganeso tiene una elevada afinidad por grupos fosfato. Empleamos uno de los formatos comerciales, que permite la adición de *phos-tag* junto con  $MnCl_2$  directamente en los geles de acrilamida. Durante la electroforesis con este tipo de geles, las proteínas fosforiladas unirán a través de sus grupos fosfatos el complejo formado por los iones metálicos y el *phos-tag*, lo cual producirá una disminución en la velocidad de migración de la proteína fosforilada con respecto a la no fosforilada, de manera proporcional al grado de fosforilación.

Realizamos un experimento muy sencillo en el que homogeneizamos cultivos organotípicos de hipocampo y llevamos a cabo una electroforesis en un gel de acrilamida/*phos-tag*. En paralelo y como control, utilizamos rodajas de hipocampo en cultivo previamente tratadas con Caliculina A, un potente inhibidor de fosfatasa (PP1 y PP2) que impide la

defosforilación de la muestra. También empleamos un control tratando rodajas con K-225, un inhibidor de kinasas (incluyendo PKA, PKC y PKG). Tras realizar un experimento de *western-blot* mediante el uso de un anticuerpo anti-FIP2, pudimos detectar la banda de FIP2 endógeno en su peso molecular esperado (56 KDa), así como hasta cuatro bandas por encima de esta, que podrían corresponder a distintos niveles de fosforilación de FIP2 (Fig. 32). Estas bandas de peso molecular superior, se concentran en una sola situada por encima de todas las demás, cuando tratamos la muestra con inhibidor de fosfatasa; mientras que desaparecen, quedando solamente una de ellas, la de menor peso molecular, cuando tratamos con el inhibidor de kinasas K-252a. Esto podría indicarnos que FIP2 contiene no uno, sino al menos 4 estados de fosforilación distintos. El tratamiento con caliculina A, lleva toda la proteína a su forma totalmente fosforilada, por ello solo detectamos una banda, de alto peso molecular, mientras que el tratamiento con K-252a elimina todos estos sitios de fosforilación dejando solamente una banda por encima del peso molecular esperado de la proteína no fosforilada, que tal vez corresponda a un sitio que aparece constitutivamente fosforilado.



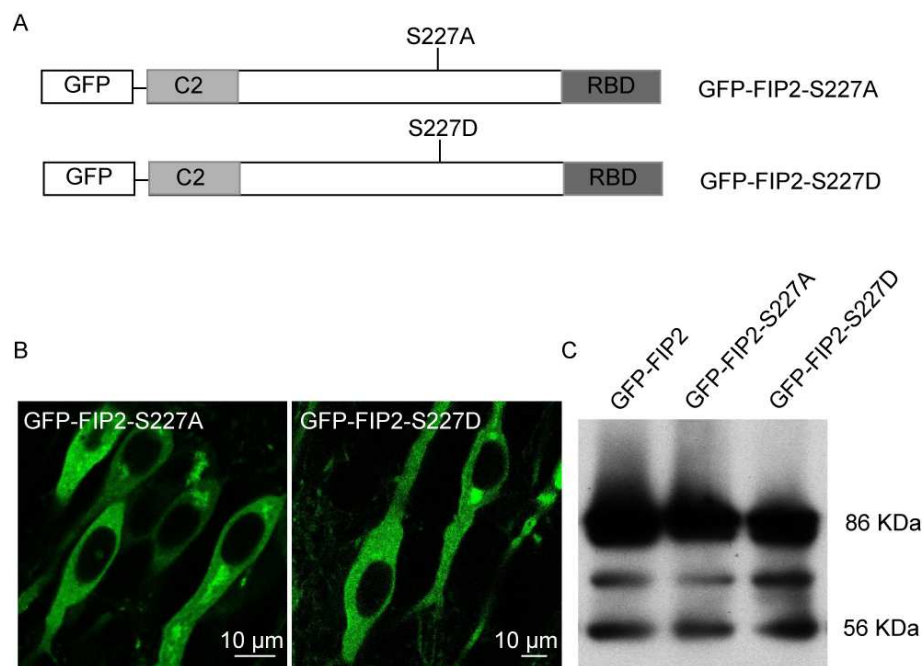
**Figura 32.** Experimento de electroforesis en gel de acrilamida/phos-tag para cultivos organotípicos de hipocampo, cultivos tratados con Caliculina A y cultivos tratados con K-252a, como se indica. La banda inferior detectada en el carril de rodajas no tratadas corresponde al peso molecular de FIP2, 56KDa, las bandas superiores (fosfo-FIP2) corresponderían a distintos grados de fosforilación de FIP2. Así lo demuestra el tratamiento con Caliculina A, que desplaza toda la señal a una banda superior, mientras que el tratamiento con K-252a elimina las bandas de tamaños superiores dejando solo la correspondiente a FIP2 así como una banda por encima que podría corresponder a residuos constitutivamente fosforilados de FIP2.



Todos estos resultados en conjunto, indican que FIP2 endógeno es susceptible de fosforilación en condiciones fisiológicas en cultivos organotípicos de hipocampo. Podemos concluir también que FIP2 se encuentra sometido a un ciclo dinámico de fosforilación-defosforilación en condiciones basales.

### 8. La fosforilación de FIP2 en la serina 227 no afecta a la expresión de la LTP

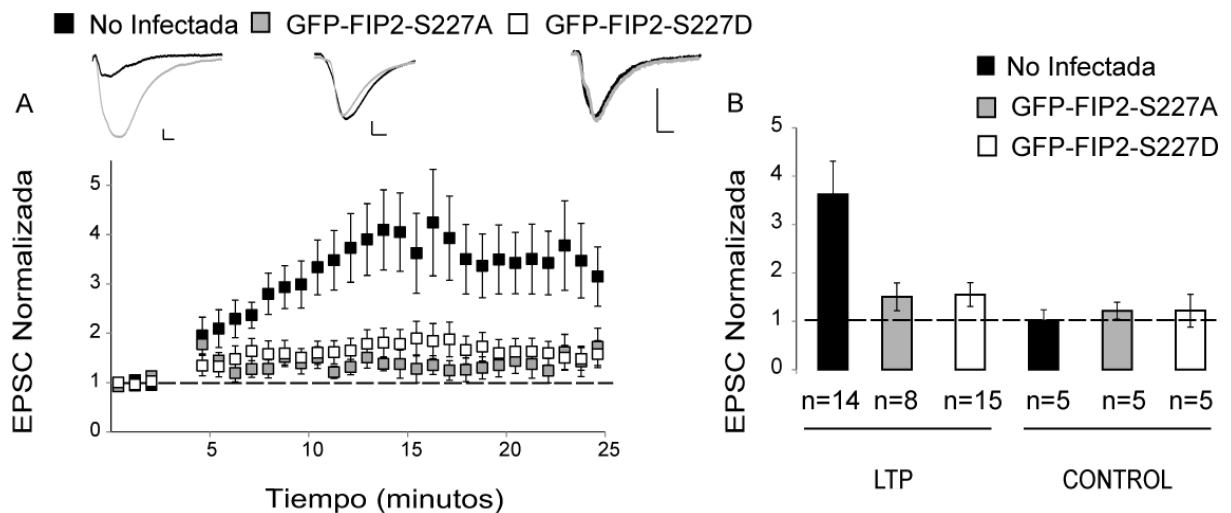
Basándonos en los análisis de la fosforilación de FIP2 llevados a cabo en nuestro modelo y en los datos anteriormente publicados, decidimos diseñar a partir de la construcción GFP-FIP2, dos mutantes para el sitio de fosforilación detectado en células MDCK, la serina227. Para ello procedimos a la sustitución de dicho residuo por una alanina(A) generando un mutante que mimetiza la forma no fosforilada de FIP2, así como la sustitución por aspártico(D), generando un mutante que mimetiza la forma constitutivamente fosforilada de FIP2 (Fig. 33A). Ambos mutantes tienen un patrón de expresión muy similar al de GFP-FIP2, con distribución homogénea, excluida del núcleo y con cúmulos prominentes con localización perinuclear (Fig. 33B), y ambos son reconocidos por inmunodetección con un anticuerpo anti-FIP2 (Fig. 33C).



**Figura 33. A)** Esquema del diseño de los mutantes para la serina 227, GFP-FIP2-S227A y GFP-FIP2-S227D para su expresión a través de vectores de expresión virales. **B)** Imágenes de microscopía confocal para la sobreexpresión en cultivos organotípicos de hipocampo para los mutantes en serina 227. **C)** WB en rodajas de hipocampo infectadas con las construcciones señaladas con el anticuerpo anti-FIP2. Se muestra de izquierda a derecha GFP-FIP2 (86 KDa), GFP-FIP2-S227A (86 KDa) y GFP-FIP2-S227D (86 KDa). La banda a 56KDa corresponde a la proteína endógena FIP2.

Para evaluar el papel de esta fosforilación en el transporte de receptores AMPA durante plasticidad sináptica, llevamos a cabo registros electrofisiológicos en cultivos organotípicos de hipocampo infectados con ambas construcciones. De la misma manera que en experimentos anteriores, estimulamos las fibras pre-sinápticas de las células de CA3 (colaterales de *Schaffer*) y registramos la respuesta post-sináptica mediada por receptores AMPA en las neuronas piramidales de la capa CA1 antes y después de la inducción eléctrica de la LTP. Para evaluar la función de la fosforilación a nivel post-sináptico, expresamos las construcciones únicamente en la capa CA1 de modo que solo los terminales post-sinápticos se encuentran afectados por la sobreexpresión. Tras 24 horas de expresión llevamos a cabo registros intracelulares de forma simultánea en células control no infectadas y en células infectadas.

Los registros electrofisiológicos indicaron que ambas construcciones presentan una reducción en las respuestas de receptores AMPA tras la inducción de la LTP, con respecto a células control no infectadas (Fig. 34A y B). Este comportamiento mimetiza el de la construcción GFP-FIP2, por lo que podemos concluir que no hay cambios con respecto a la proteína salvaje, y por tanto esta fosforilación no estaría implicada en el funcionamiento de FIP2 durante plasticidad sináptica.



**Figura 34. A)** Cultivos organotípicos de hipocampo fueron infectados con virus Sindbis conteniendo las construcciones GFP-FIP2-S227A y GFP-FIP2-S227D que fueron expresadas durante 24 horas. Se llevaron a cabo registros electrofisiológicos en configuración de célula entera en neuronas infectadas y no infectadas y se indujo LTP mediante estimulación pre-sináptica con una frecuencia de 3Hz durante 2.5 minutos con 0 mV de despolarización post-sináptica. La gráfica representa el incremento en las respuestas mediadas por receptores AMPA tras la inducción de LTP, con respecto al estado basal en células no infectadas ( $p=0.001$ ), células infectadas con GFP-FIP2-S227A ( $p=0.1$ ) y con GFP-FIP2-S227D ( $p=0.1$ ). Se muestran ejemplos representativos para las condiciones basales (negro) o tras la inducción de LTP (gris) para cada una de las condiciones. Barras de escala 20 pA (vertical) y 5ms (horizontal). **B)** Valores medios de las respuestas mediadas por receptores AMPA en la ventana temporal de 25-30 minutos, normalizados con respecto a los valores basales, para el canal en el que se indujo LTP y para el canal control en el que no se produjo estimulación pre-sináptica durante la despolarización. Se encontraron diferencias significativas en la expresión de LTP en células infectadas con GFP-FIP2-S227A ( $1.5\pm 0.2$ ) y con GFP-FIP2-S227D ( $1.5\pm 0.2$ ) con respecto a células no infectadas ( $3.6\pm 0.6$ ) con un p valor de 0.04 y 0.01 respectivamente.

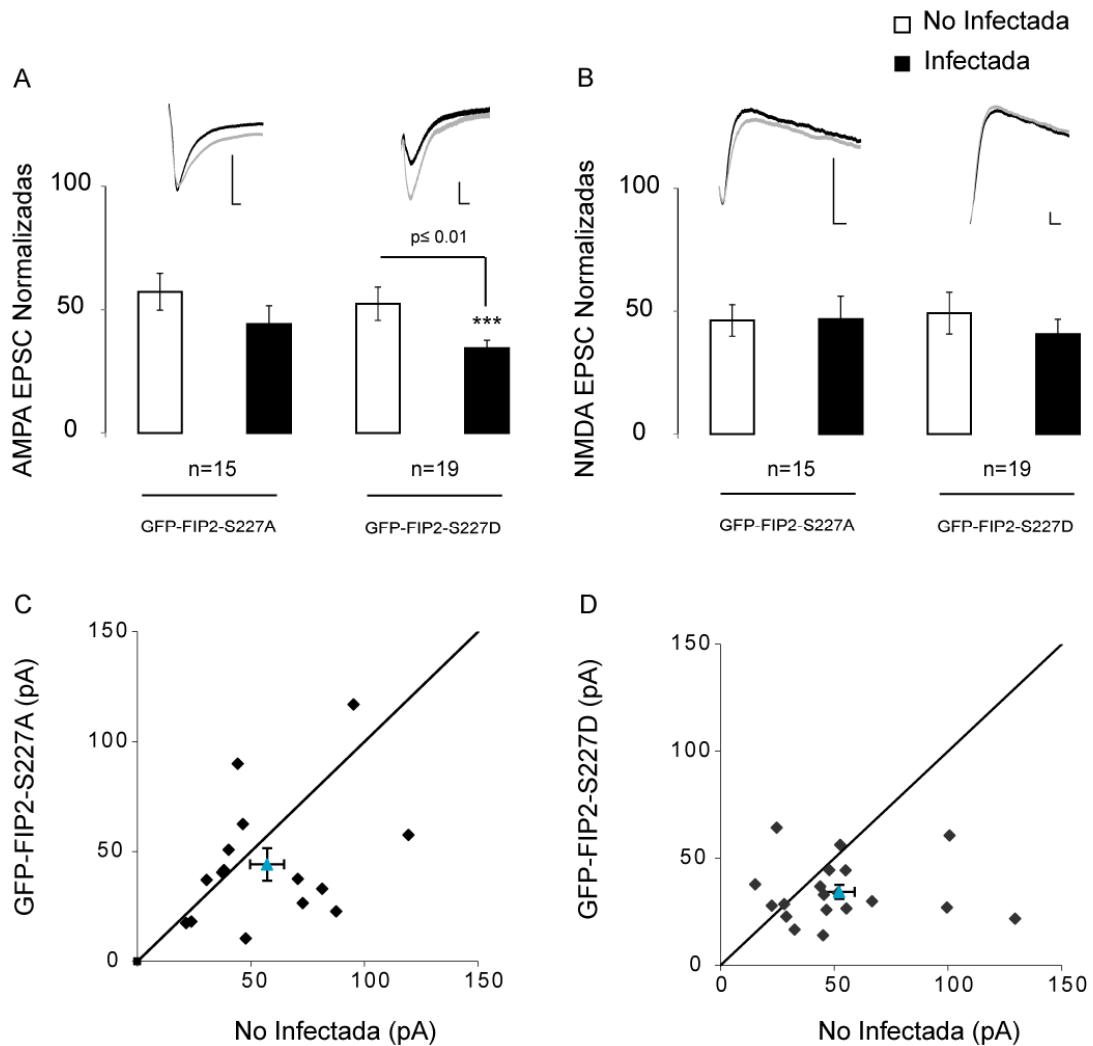
## 9. La fosforilación de FIP2 en la serina 227 está implicada en el reciclaje constitutivo de receptores AMPA

Con el objetivo de evaluar el papel de la fosforilación de FIP2 en la serina 227 durante transmisión sináptica basal llevamos a cabo registros electrofisiológicos estimulando las fibras pre-sinápticas de las células de CA3 (colaterales de *Schaffer*) y registramos la respuesta post-sináptica mediada por los receptores AMPA (-60mV) y por los receptores NMDA (+40mV) simultáneamente en pares de células infectadas y no infectadas que se encuentren próximas en la capa CA1.

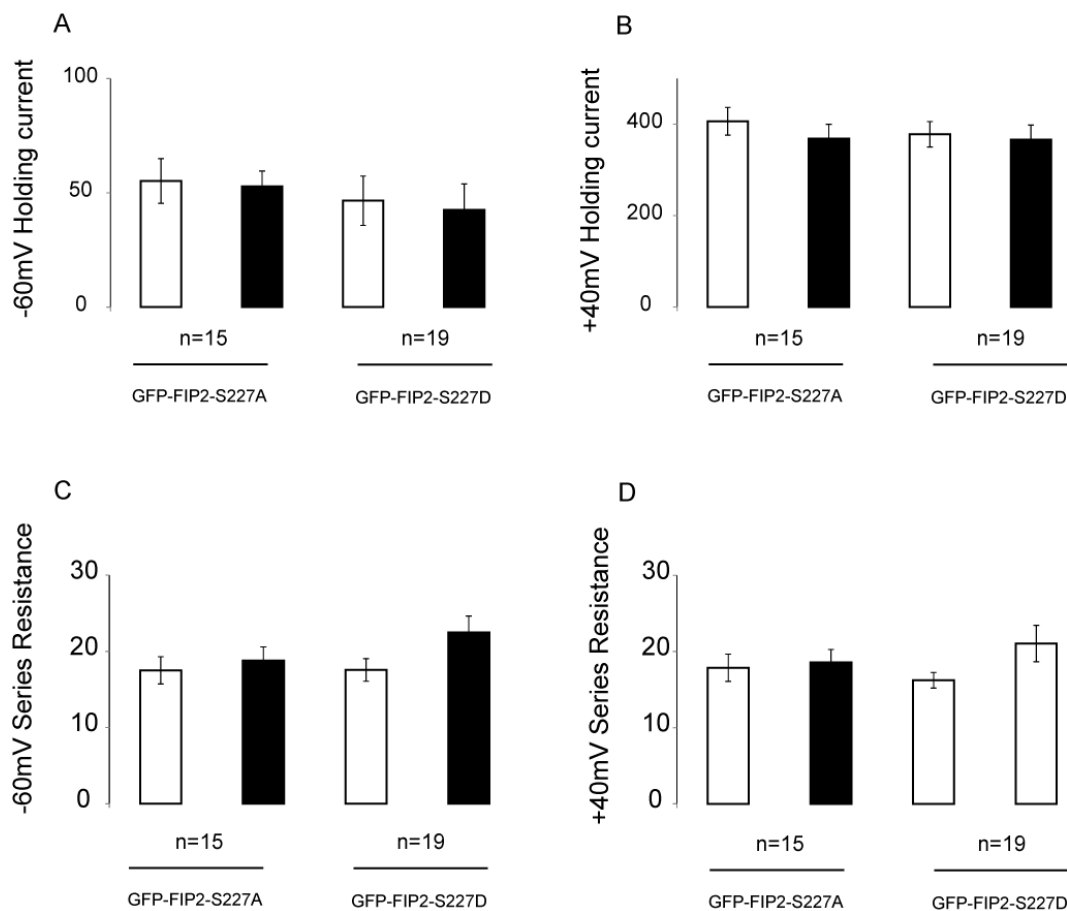
Para ello se infectaron cultivos organotípicos de hipocampo con las construcciones GFP-FIP2-S227A y GFP-FIP2-S227D durante 24 horas. La sobreexpresión de GFP-FIP2-S227A, que mimetiza la forma no fosforilada de FIP2, no produjo alteraciones en las respuestas de los receptores AMPA o NMDA en comparación con las respuestas obtenidas en células control no infectadas (Fig. 35A y B).

Sin embargo la sobreexpresión del mutante opuesto, GFP-FIP-S227D, que mimetiza la forma constitutivamente fosforilada de FIP2, produce una disminución significativa de alrededor del 40% en la respuesta basal mediada por los receptores AMPA, con respecto a células control no infectadas. Para la respuesta basal mediada por los receptores NMDA no hay variaciones significativas, aunque sí presenta una tendencia a la baja de en torno al 20% (Fig. 35A y B). Como control, comprobamos que la sobreexpresión de las proteínas recombinantes no altera las propiedades pasivas de las neuronas ni la calidad de los registros electrofisiológicos (Fig. 36A, B, C, D).

Este efecto sugiere un papel para la fosforilación de FIP2 en la serina 227 durante reciclaje constitutivo. La forma fosforilada produce un reciclaje defectuoso de los receptores, mientras que no observamos cambios con la sobreexpresión de la forma no fosforilada. Este resultado señala la posibilidad de que esta fosforilación sea determinante en el establecimiento de dos subpoblaciones de FIP2, de este modo el estado de fosforilación controlaría la función de FIP2 a nivel de transmisión basal. De acuerdo con esta hipótesis el reciclaje constitutivo de los receptores requeriría la subpoblación de FIP2 no fosforilada.

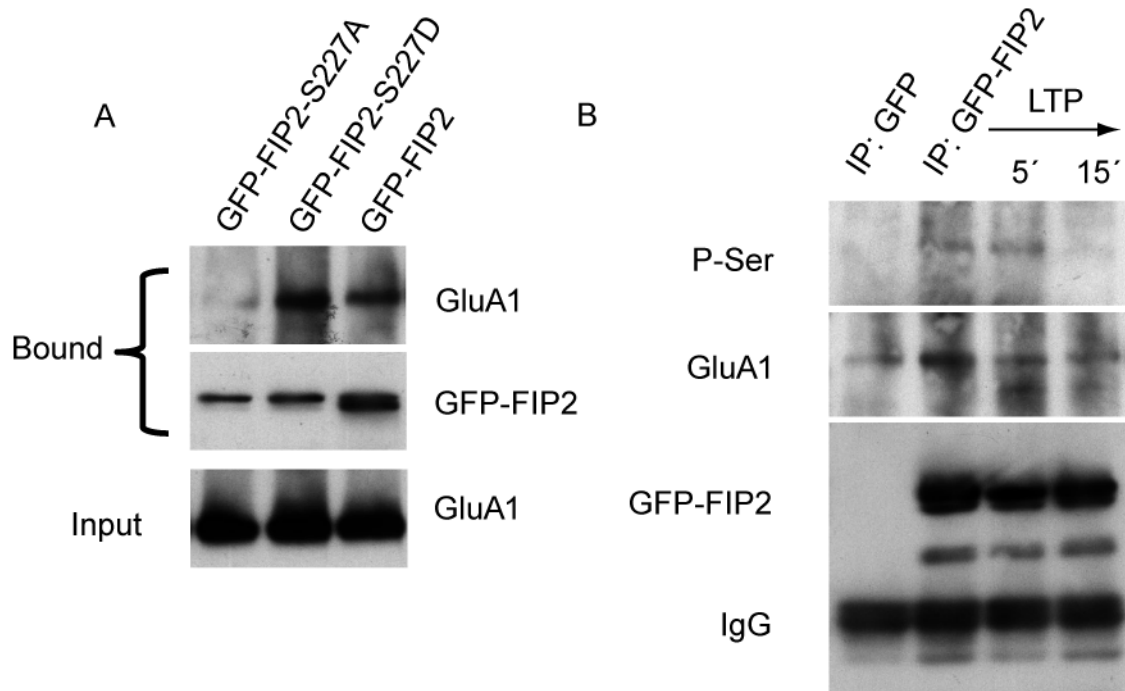


**Figura 35. A) B)** Cultivos organotípicos de hipocampo fueron infectados con virus Sindbis conteniendo las construcciones GFP-FIP2-S227A y GFP-FIP2-S227D que fueron expresadas durante 24 horas. Se llevaron a cabo registros electrofisiológicos en configuración de célula entera simultáneamente en neuronas infectadas y no infectadas a  $-60\text{mV}$  **(A)** para medir respuesta mediada por receptores AMPA y a  $+40\text{mV}$  **(B)** para medir respuestas mediadas por receptores NMDA. Se muestran ejemplos representativos para las células no infectadas (gris) o infectadas (negro) para cada una de las condiciones. Barras de escala 50 pA (vertical) y 5ms (horizontal). **C) D)** Se representan los valores correspondientes a la corriente mediada por receptores AMPA para cada pareja de células infectada y no infectada para GFP-FIP2-S227A **(C)** y GFP-FIP2-S227D **(D)** procedentes de los experimentos anteriores. La media se representa con color azul.



**Figura 36.** La sobreexpresión de las proteínas recombinantes GFP-FIP2-S227A y GFP-FIP2-S227D no afectó las propiedades pasivas de la membrana, reflejadas en “holding current” (A y B), ni el acceso a la célula con la pipeta de registro, reflejado en “series resistance” (C y D)

Nuestros resultados anteriores sugieren que dos poblaciones distintas de FIP2 están implicadas en el reciclaje constitutivo de los receptores AMPA, frente a su retención regulada durante la LTP. Dado que el reciclaje constitutivo parece requerir la forma no fosforilada de FIP2, evaluamos si la capacidad de retención/interacción con GluA1 dependería de su estado de fosforilación. Siguiendo esta hipótesis, esperaríamos que GFP-FIP2-S227D (mimetizando FIP2 fosforilado) fuera capaz de interactuar con GluA1, mientras que GFP-FIP2-S227A (análogo de FIP2 defosforilado), no sería capaz de interactuar con GluA1 en condiciones basales. Los experimentos preliminares de inmunoprecipitación que llevamos a cabo infectando rodajas de hipocampo con ambos mutantes, indicaron que efectivamente el mutante no fosforilado (S227A) no interacciona con GluA1 mientras que si lo hace el mutante fosforilado (S227D) (Fig. 37A).



**Figura 37. A)** Inmunoprecipitación con anticuerpo anti-GFP en rodajas de hipocampo infectadas con las construcciones GFP-FIP2, GFP-FIP2-S227A y GFP-FIP2-S227D. La inmunodetección con un anticuerpo anti-GluA1 permitió la detección de GluA1 co-inmunoprecipitado junto a GFP-FIP2 y GFP-FIP2-S227D, que no aparece en el mutante no fosforilado GFP-FIP2-S227A. **B)** Inmunoprecipitación con anticuerpo anti-GFP en rodajas de hipocampo infectadas con las construcciones GFP-FIP2, y GFP como control. La inmunodetección con un anticuerpo anti-P-Ser permitió la detección de una banda en el peso molecular esperado para GFP-FIP2 que no aparece en el control negativo para GFP y que desaparece tras la inducción de la LTP indicando que se produce una disminución en el estado de fosforilación de FIP2.

Nuestros resultados anteriores indican que FIP2 se disocia de GluA1 durante la inducción de la LTP (Fig. 20). Dado que la interacción con GluA1 se observa con la forma fosforilada de FIP2 (S227D) y no con la forma defosforilada (S227A), nos preguntamos si la inducción de la LTP alteraría el estado de fosforilación de FIP2. Para ello realizamos ensayos de inmunoprecipitación con rodajas infectadas con GFP-FIP2 en los que se llevó a cabo la inducción de la LTP. El uso del anticuerpo anti-P-Ser en la fracción inmunoprecipitada permitió la detección de bandas en el peso molecular esperado para GFP-FIP2 que desaparecen gradualmente tras la inducción de la LTP (Fig. 37B). Esto significaría que la disociación del complejo FIP2/GluA1 durante la LTP va acompañado de una disminución en la fosforilación de FIP2.

Pese a algunos de estos datos son aún preliminares, parece indicar que la regulación de las diversas funciones de FIP2 podría estar siendo controlada mediante

fosforilación/defosforilación de la proteína. A pesar de que nuestros estudios se han centrado en el sitio de fosforilación previamente descrito para FIP2, no debemos obviar que los experimentos realizados sugieren la existencia de más sitios de fosforilación en la proteína endógena, que podrían implicar diferentes kinasas y ser determinantes tanto en transmisión basal, como en la regulación del transporte de los receptores durante plasticidad sináptica.



# DISCUSIÓN



Los procesos de tráfico de membrana intracelulares constituyen el mecanismo molecular que regula la composición de la superficie celular, regulando las vías de endocitosis y exocitosis y asegurando un continuo flujo de proteínas y lípidos de membrana. En dichos procesos intervienen una amplia variedad de compartimentos intracelulares de membrana, con propiedades estructurales, bioquímicas y funcionales altamente específicas que aseguran el mantenimiento de la morfología y la función celular. En el establecimiento de la identidad de los compartimentos de membrana, las proteínas GTPasas de la familia Rab, juegan un papel crítico (Fukuda, 2008; Zerial & McBride, 2001). Es por ello que esta familia es objeto de numerosos estudios con el objetivo de comprender el modo en el que su actividad y localización son controladas (Barr & Lambright, 2010; Grosshans et al., 2006).

Concretamente, la participación de Rab11 en procesos de reciclaje apical de membrana en prácticamente todas las células eucariotas es un hecho hoy día bien establecido, sin embargo muy poco se conoce aún sobre los mecanismos reguladores que gobiernan su función fisiológica. El descubrimiento de la familia de proteínas efectoras de Rab11, Rab11-FIPs, ha dado un nuevo impulso a este campo de investigación, revelando la existencia de un complejo grupo de proteínas de interacción necesario para la regulación de los sistemas de reciclaje de membrana.

Estos fenómenos son especialmente importantes en neuronas, donde una gran variedad de proteínas, como los receptores de membrana, canales iónicos, proteínas de anclaje o moléculas de adhesión, son transportadas de manera constitutiva o regulada en respuesta a determinados estímulos, a lugares específicos de la membrana celular para asegurar la función sináptica.

El estudio del transporte de los receptores AMPA y su inserción en la membrana post-sináptica ha sido ampliamente desarrollado, debido a su importancia en plasticidad sináptica. La implicación de Rab11 en estos fenómenos, demostrada en trabajos anteriores de este laboratorio, nos llevó a la búsqueda de nuevos mecanismos reguladores que pudieran controlar la actividad y localización de Rab11 en procesos altamente regulados como es la potenciación a largo plazo.

Este trabajo se propuso ahondar en el conocimiento de la maquinaria molecular implicada en la movilización de los receptores AMPA durante la plasticidad sináptica, mediante el estudio

de una proteína efectora de Rab11: Rab11-FIP2. FIP2 es un buen candidato a participar en este transporte debido a la presencia de dominios de interacción con piezas clave en el transporte de los receptores AMPA, así como a la existencia de trabajos previos que relacionan FIP2 con este tipo de funciones en otros tipos celulares.

### **1. Rab11-FIP2 como regulador del tráfico de proteínas en neuronas**

FIP2 ha sido relacionado con una amplia variedad de fenómenos de reciclaje de membrana, en los que sus dominios carboxilo y amino terminales juegan un papel clave, sin embargo muy poco se conoce sobre su expresión y papel funcional en neuronas. Nuestros experimentos han permitido la confirmación de la expresión de FIP2 en neuronas de hipocampo, así como la evaluación de la importancia de sus dominios de interacción en estos tipos celulares, mediante el uso combinado de un anticuerpo anti-FIP2 y el diseño de herramientas de biología molecular.

Hemos detectado la expresión de FIP2 en hipocampo a través de experimentos de *western blot* con un anticuerpo específico anti-FIP2. Comprobamos dicha especificidad mediante el uso de shRNA para inducir el silenciamiento de FIP2 endógeno. Pese a que no nos fue posible contrastar estos experimentos en ensayos de inmunocitoquímica, debido a la ineficiencia del anticuerpo para este tipo de ensayos, los *western blots* realizados en cultivos primarios de neuronas de hipocampo nos permitieron confirmar la presencia de FIP2 en neuronas. Esta es la primera prueba de su expresión específicamente en neuronas de hipocampo, pues el único trabajo previo había mostrado su presencia en homogeneizados de cerebro (Wang et al., 2008).

El diseño de proteínas recombinantes y mutantes de delección para el dominio amino terminal C2 y el dominio carboxilo terminal  $\alpha$ -hélice, nos han permitido demostrar que ambos dominios son determinantes para su patrón de expresión y su distribución en neuronas de hipocampo.

La sobreexpresión de la proteína GFP-FIP2 presenta dos distribuciones diferentes, donde encontramos una fracción de la proteína soluble distribuida de manera homogénea y una fracción formando cúmulos estáticos muy prominentes en el soma, con localización perinuclear y a lo largo de las dendritas. Nuestros estudios de FRAP mostraron además como estas dos poblaciones están caracterizadas por propiedades dinámicas distintas, siendo las acumulaciones

altamente inmóviles, mientras que la proteína con distribución homogénea es móvil con tiempos de recuperación de alrededor de 1.5 minutos. Pese a que no conocemos la naturaleza de estos cúmulos, el hallazgo de dos poblaciones de FIP2 con distintos comportamientos dinámicos, sugiere la existencia de cierta variabilidad funcional.

En comparación con la sobreexpresión de la proteína completa, la delección del dominio  $\alpha$ -hélice lleva a la proteína a una distribución mucho más difusa, tal como se ha visto en otros tipos celulares (Lindsay & McCaffrey, 2002). Nuestros ensayos de *pull-down* con dicho mutante han confirmado también que este dominio es necesario para la dimerización y la unión a Rab11.

De la misma manera cuando expresamos el mutante de delección para su dominio de unión a membrana detectamos un desplazamiento en la distribución de FIP2, formando cúmulos prominentes. Este mismo fenotipo había sido descrito en células HeLa y MDCK, donde la sobreexpresión de un mutante de delección para el dominio amino terminal provoca una fuerte asociación de la proteína a membranas, e inhibe el reciclaje de los receptores (Hales et al., 2002; Lindsay & McCaffrey, 2002).

## **2. Rab11-FIP2 se encuentra en compartimentos de membrana distintos de los endosomas de reciclaje asociados a Rab11**

Son muy numerosos los trabajos existentes que describen la ubicación y colocalización de FIP2 en los endosomas de reciclaje junto a Rab11 (Hales et al., 2001; Lindsay & McCaffrey, 2002), aunque a diferencia de otros miembros de la familia FIP, la colocalización de Rab11 y FIP2 es solo parcial, principalmente en células polarizadas como células MDCK. Basándonos en estos trabajos iniciamos estudios de colocalización en cultivos primarios de neuronas de hipocampo, partiendo de la hipótesis de que Rab11 y FIP2 forman parte del sistema de reciclaje formando un complejo característico de los endosomas de reciclaje.

Nuestros experimentos de inmunomarcaje en neuronas que sobreexpresan GFP-FIP2, mostraron valores de correlación positivos para Rab11 y GFP-FIP2, sin embargo estos valores corresponden a colocalización parcial con valores similares en regiones difusas y en regiones en las que GFP-FIP2 forma agregados. Sorprendentemente la realización de estos experimentos de colocalización para GluA1 mostró como, pese a que en regiones difusas FIP2 y GluA1 correlacionan positivamente con valores similares a los obtenidos para Rab11, las regiones en

las que encontramos cúmulos o agregados de FIP2 muestran valores de correlación con GluA1 significativamente más altos. GluA1 aparece secuestrado en los agregados inmóviles formados por FIP2.

Estos resultados sugieren un papel para FIP2 en el transporte de los receptores GluA1, aunque el fuerte desplazamiento de GluA1 a regiones agregadas para FIP2 podría ser un artefacto debido a la sobreexpresión. Sin embargo, los experimentos de fraccionamiento subcelular en gradiente de sacarosa llevados a cabo en rodajas de hipocampo con la proteína endógena, mostraron como esta distribución se halla presente de manera fisiológica, de modo que FIP2 y GluA1 aparecen situados en los mismos compartimentos celulares en los que sin embargo no encontramos Rab11.

De estos resultados se deducen dos conclusiones importantes. En primer lugar, FIP2 no es un componente permanente de los endosomas de reciclaje típicamente caracterizados por la presencia de Rab11. En segundo lugar, FIP2 aparece localizado en otro tipo de compartimentos en los que GluA1 se halla presente. Es también importante el hecho de que estos compartimentos son principalmente extra-sinápticos, como se deduce de las inmunofluorescencias, en las que estos agregados aparecen en el soma y a lo largo de las dendritas, así como de los experimentos de fraccionamiento, que se llevaron a cabo previa eliminación de la fracción correspondiente a sinaptosomas, donde encontraríamos concentradas las proteínas presentes en sinapsis. Además la colocalización positiva con GluA1 se mantiene en el caso de los dos mutantes para el RBD, por lo que estos resultados indican que la función de FIP2 en el transporte de los receptores AMPA es independiente de su interacción con Rab11.

Pese a lo inesperado de estos resultados, lo cierto es que numerosos estudios han revelado la existencia de motivos en la secuencia de FIP2 que permiten su interacción con proteínas relacionadas con compartimentos subcelulares distintos de los endosomas de reciclaje, como endosomas tempranos o aparato de Golgi.

FIP2 es el único miembro de la familia FIP que contiene tres secuencias NPF formadas cada una de ellas por tres aminoácidos (asparagina-prolina-fenilalanina), implicados en la interacción con dominios del tipo *Eps15-Homology domain* (EHD). Este dominio está presente en proteínas con actividad adenosina trifosfatasa relacionadas con endocitosis y tráfico de

vesículas. Concretamente ha sido demostrada la interacción de FIP2 con proteínas de esta familia implicadas en endocitosis (Reps1,  $\alpha$ -adaptina) (Cullis et al., 2002), proteínas relacionadas con los endosomas tempranos como EHD3 o con los endosomas de reciclaje como EHD1 (Naslavsky et al., 2006). Además, recientemente se ha descrito la interacción entre FIP2 (y en general de todos los miembros de la clase I de la familia FIP) con la GTPasa de la familia Rab, Rab14 (Fukuda et al., 2008; Kelly et al., 2010) una proteína localizada en endosomas tempranos, aparato de Golgi (Junutula et al., 2004a) y también relacionada con el tráfico de proteínas a la membrana plasmática (Kitt et al., 2008). Debemos considerar también, las interacciones entre los distintos miembros de la familia FIP. Ha sido descrito como además de formar homodímeros, estas proteínas pueden interaccionar con otros miembros de la familia formando heterómeros (Wallace et al., 2002).

Todas estas interacciones soportan la hipótesis de que FIP2 podría estar actuando de manera independiente de Rab11, regulando distintos puntos a lo largo de sistema de reciclaje de proteínas de membrana, a través de sus dominios EH, a través de su dominio de dimerización o incluso a través de su dominio RBD.

### **3. Rab11-FIP2 interacciona con la subunidad GluA1 de los receptores AMPA y se disocia tras la inducción de la LTP**

Interesados en determinar qué tipo de interacciones podrían estar mediando la localización de FIP2 en una población de endosomas distinta de los endosomas de reciclaje, hemos detectado una interacción entre la subunidad GluA1 de los receptores AMPA y FIP2. A pesar de que no hemos determinado la secuencia concreta de FIP2 implicada en esta interacción, en base a los experimentos paralelos llevados a cabo con los mutantes para el RBD, podemos asegurar que dicho dominio no es necesario para la unión. Del mismo modo tampoco podemos asegurar si es una interacción directa o formaría parte de un complejo proteico formado por otros adaptadores, por ello sería interesante determinar qué secuencias concretas tanto para FIP2 como para GluA1, son determinantes en la formación de este complejo.

Es muy probable que esta interacción se produzca en regiones extra-sinápticas como podemos extrapolar de los experimentos de fraccionamiento en gradiente de sacarosa, sin embargo sería también un aspecto interesante la investigación detallada de si esta interacción se produce de forma generalizada o está restringida a una subpoblación de FIP2 localizada en

regiones concretas, como en las dendritas donde controlaría el transporte dendrítico de los receptores, o en la base de las espinas dendríticas, donde podría regular su inserción en la espina. De manera general el análisis de la localización concreta de dicha interacción, así como la co-inmunoprecipitación de FIP2/GluA1 endógenos mediante el uso del anticuerpo anti-FIP2, que no ha sido posible debido a limitaciones técnicas, nos permitiría un abordaje más completo.

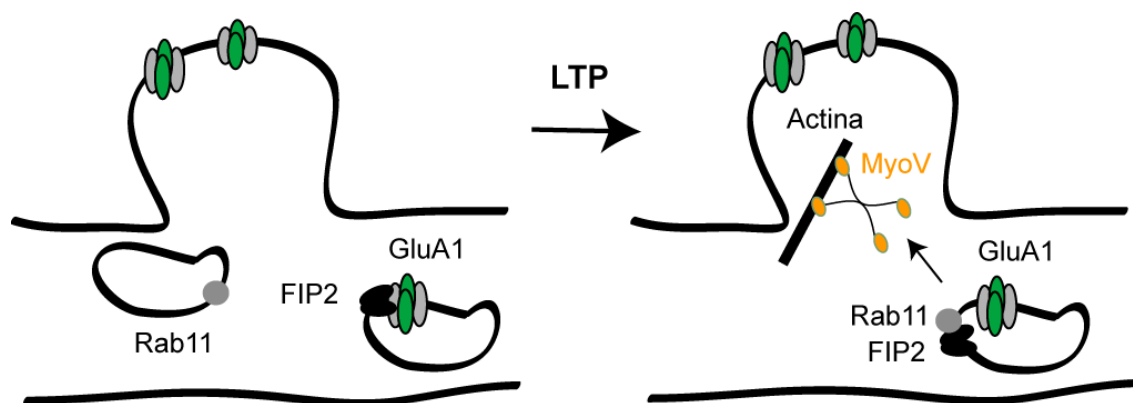
La interacción de FIP2 con receptores de membrana ha sido descrita previamente en el caso de receptor CXCR2 en células HEK293 (Fan et al., 2004). Estos receptores de quimioquinas son de tipo GPCRs (G protein-coupled receptors) y su activación mediada por ligando tiene como consecuencia su internalización, así mismo la interacción con FIP2 se produce en respuesta a dicha activación por ligando.

En nuestro caso la interacción de FIP2 y GluA1 también se halla regulada por la inducción de la LTP, aunque en este caso hemos detectado una regulación negativa, de manera que la inducción de la LTP tiene como consecuencia la disociación del complejo. Los experimentos con los mutantes mostraron además como la disociación no depende de la interacción de FIP2 con Rab11, pues el mutante puntual GFP-FIP2-I481E que no une Rab11 se disocia del receptor tras la inducción de la LTP de la misma manera que GFP-FIP2. Sin embargo el mutante de delección GFP-FIP2- $\Delta$ RBD es incapaz de disociarse tras la inducción de la LTP, por lo que esta región es clave en la regulación de la interacción tras la inducción de plasticidad.

Este mutante carece de su dominio RBD y también ha perdido su habilidad para formar dímeros, por lo que no es posible determinar cuál de las dos regiones es importante para la disociación. Podría ser necesaria la dimerización de FIP2 para la efectiva ruptura del complejo formado con GluA1 o podría ser necesaria la presencia del dominio RBD al mediar algún otro tipo de interacción.

En cualquier caso, la disociación de GluA1 durante la inducción de la LTP se encuentra acompañada de una redistribución dinámica de FIP2 como se observa en nuestros experimentos de microscopía *ex vivo*, caracterizada por la formación de cúmulos a los largo de las dendritas de manera muy similar a la descrita previamente para GluA1 (Shi et al., 1999). Este fenómeno, es dependiente del dominio RBD, tal y como se desprende de los experimentos equivalentes realizados con los mutantes para el RBD, en los que estas redistribuciones dinámicas han desaparecido por completo.





Teniendo en cuenta que FIP2 y GluA1 se encuentran unidos en condiciones basales y

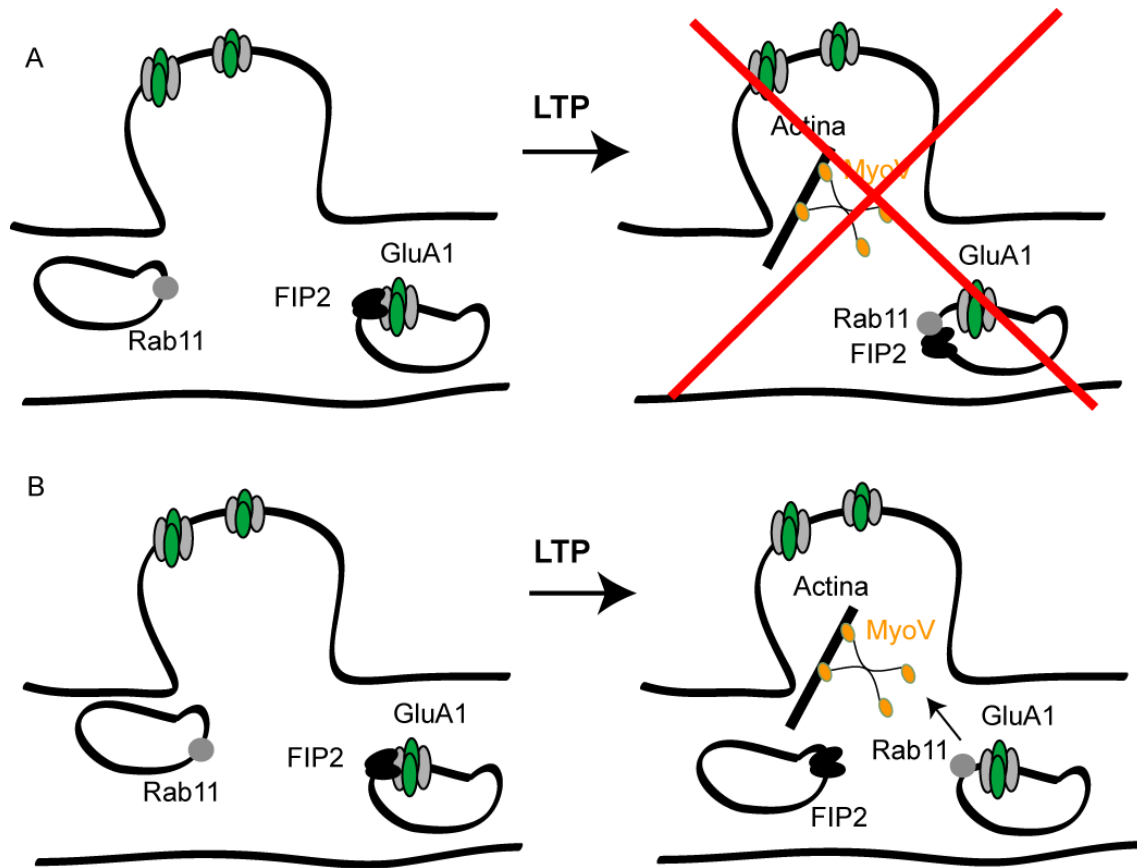
**Figura 38.** Representación del modelo de acuerdo a la hipótesis de partida. El complejo FIP2/GluA1 permanece unido en condiciones basales en endosomas diferentes de los endosomas de reciclaje caracterizados por la presencia de Rab11. La inducción de LTP permitiría la disociación de FIP2/GluA1 y esto a su vez permitiría el reclutamiento de Rab11 mediante su interacción con FIP2, el ensamblaje de la maquinaria de transporte a los endosomas y finalmente su inserción en la espina.

separados de Rab11, mientras que la inducción de la LTP produce disociación del complejo y una redistribución dinámica de FIP2, dependiente de RBD, podríamos especular con un modelo en el que la disociación permitiría el reclutamiento de Rab11 a los endosomas y su anclaje mediante FIP2 al resto de la maquinaria de transporte requerida para la inserción de receptores en las espinas dendríticas, como consecuencia de la inducción de la LTP (Figura 38).

#### 4. Rab11-FIP2 no es necesario para la movilización de los receptores AMPA durante la LTP

En base al modelo anterior, nos propusimos responder dos preguntas fundamentales: cuál es el papel de la disociación observada durante la inducción de la LTP y cuál es el papel de la unión basal entre los receptores AMPA y FIP2. Para responder a estas cuestiones llevamos cabo estudios funcionales mediante registros electrofisiológicos en cultivos organotípicos de hipocampo, empleando las herramientas moleculares diseñadas para la manipulación de la expresión de FIP2.

Los registros electrofisiológicos realizados durante la inducción eléctrica de la LTP en rodajas de hipocampo en las que se ha silenciado previamente la expresión endógena de FIP2, no mostraron cambios en la expresión de la LTP con respecto a células control. Estos resultados nos permiten descartar que FIP2 esté actuando como proteína de ensamblaje para la



**Figura 39.** Los datos proporcionados por los registros electrofisiológicos durante el silenciamiento de la proteína endógena nos permiten descartar el modelo anterior (A) y establecer un modelo en el que FIP2 no participa en el proceso de ensamblaje de la maquinaria de transporte y su interacción con Rab11 no es necesaria para la movilización regulada de los endosomas dependientes de Rab11 (B).

maquinaria de transporte, como había sido propuesto en un trabajo previo sobre la función de FIP2 en plasticidad (Wang et al., 2008). Proponemos un modelo alternativo en el que la disociación del complejo FIP2/GluA1 permite la liberación de los receptores y su acoplamiento con la maquinaria de transporte sin la participación de FIP2 (Fig. 39).

Por otro lado, la sobreexpresión de FIP2 provoca una disminución significativa en la potenciación de la respuesta AMPA durante la LTP. Es decir, pese a que la presencia de FIP2 y su interacción con Rab11 no son necesarias para la expresión de la LTP, el exceso de la proteína impide el correcto funcionamiento del sistema de reciclaje regulado de GluA1. De alguna manera, FIP2 es un regulador negativo cuya interacción con GluA1 en condiciones basales

controla el tráfico de los receptores AMPA, impidiendo su liberación e inserción en la membrana. Esta función, como hemos mencionado anteriormente es independiente de su interacción con Rab11, puesto que ambos mutantes para el dominio RBD, muestran la misma capacidad para interactuar con GluA1 en condiciones basales.

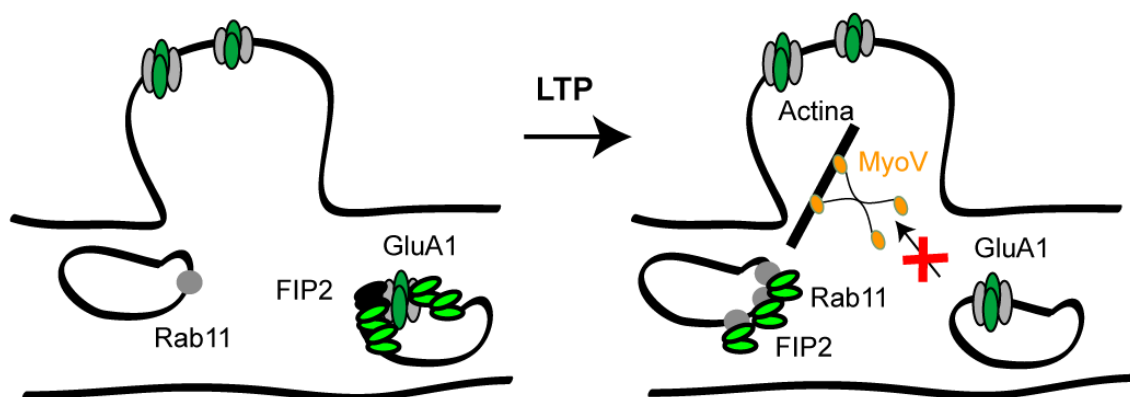
Hay un aspecto que sin embargo permanece sin resolver, la razón por la cual GFP-FIP2 muestra una reducción en la LTP a pesar de que se disocia de GluA1. Pensamos que se debe a una interacción con Rab11, es decir, es probable que la sobreexpresión de una proteína con elevada afinidad por Rab11 activa, al liberar GluA1 esté, de alguna manera secuestrando Rab11 y limitando la cantidad de Rab11 activa disponible para su participación en la LTP (Fig. 40A). En este sentido sería muy interesante comprobar si, como sería esperable de acuerdo con nuestra hipótesis, los agregados formados por GFP-FIP2 tras la inducción de la LTP están relacionados con Rab11. No hemos desarrollado este tipo de experimentos debido a importantes limitaciones técnicas ya que no es posible la co-infección con dos proteínas recombinantes mediante el vector viral Sindbis. Como alternativa más sencilla, decidimos realizar inmunohistoquímicas tras la inducción de la LTP. Sin embargo los agregados formados por GFP-FIP2 no resisten el proceso de fijación y permeabilización necesarios para la realización de experimentos de fluorescencia de este tipo, por lo que no obtuvimos resultados concluyentes. Por tanto, nos planteamos el uso, en un futuro de otras técnicas de transfección, que permitan la co-expresión simultánea de dos construcciones como por ejemplo la biolística como alternativa para la resolución de este aspecto de nuestra investigación.

Sin embargo, el análisis funcional de los mutantes para el RBD en experimentos de electrofisiología, sí nos ha permitido esclarecer dos cuestiones clave. En primer lugar contrastar los resultados obtenidos en base al silenciamiento génico de FIP2. El mutante puntual que no puede interactuar con Rab11 y que se disocia de GluA1 muestra una expresión de la LTP perfectamente normal, por lo que confirma nuestros anteriores resultados y refuerza la hipótesis de que FIP2 y su interacción con Rab11 no son necesarias para la inducción de la LTP. Así mismo la incapacidad de este mutante para interactuar con Rab11 elimina la retención observada para GFP-FIP2, por lo que también apoya la idea de que dicha retención es la consecuencia de algún tipo de interacción con Rab11 debido a la sobreexpresión (Fig. 40B). Por otro lado el mutante de delección que es incapaz de liberar GluA1 muestra una disminución en la

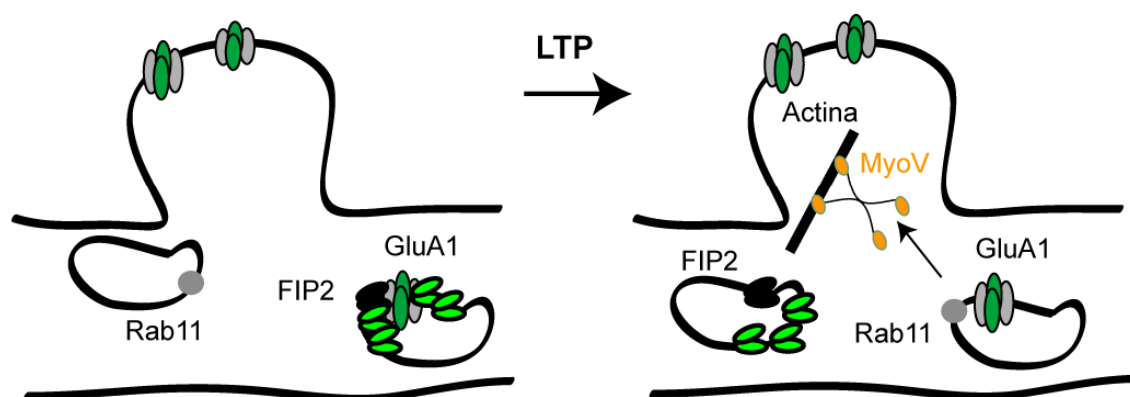
expresión de la LTP, confirmando así que dicha disociación es fundamental para permitir la liberación y posterior inserción de los receptores en la membrana (Fig. 40C).

La existencia de una población de endosomas de reciclaje marcados por la presencia de FIP2 pero distinta de aquella caracterizada por la presencia de Rab11, permitiría cierta compartimentación dentro del propio sistema de reciclaje. Nuestros estudios de *pull-down* mediante el uso de la proteína recombinante GST-FIP2 (Fernández-Monreal et al., 2012), han demostrado que en condiciones basales existe una importante población de Rab11 activo, que entre otras cosas, regularía la entrada de los receptores endocitados durante la LTD en el sistema de reciclaje. La presencia de FIP2 en determinados compartimentos permite la separación física de estas poblaciones de Rab11 activa, de aquellas implicadas en inserción de los endosomas en las espinas durante la LTP. FIP2 funciona como un mecanismo de retención, atrapando específicamente una población de receptores permitiendo su liberación en un intervalo espacial y temporal determinado, y estableciendo un control adecuado de las distintas funciones en las que Rab11 participa a nivel de reciclaje apical.

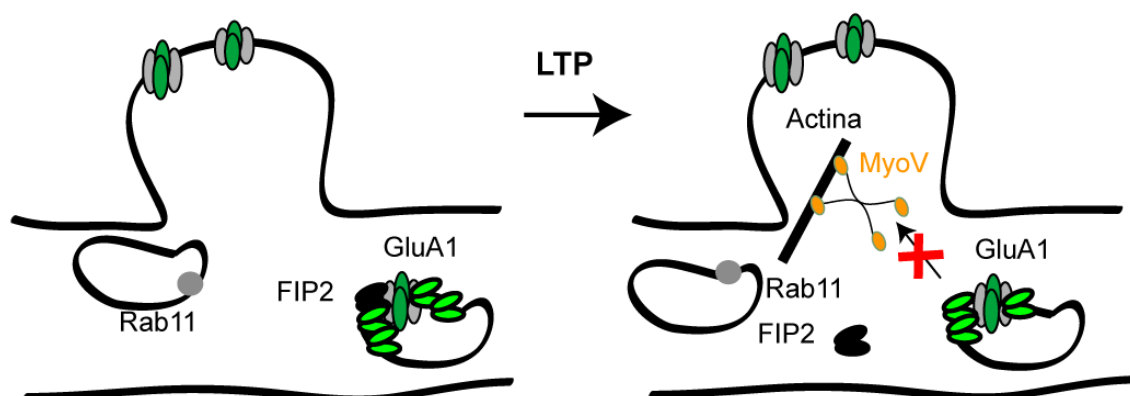
A. GFP-FIP2



B. GFP-FIP2-I481E



C. GFP-FIP2-ΔRBD



**Figura 40.** Representación del modelo propuesto para la sobreexpresión de la proteína de fusión GFP-FIP2 (A), así como para los mutantes para el dominio de interacción con Rab11, GFP-FIP2-I481E (B) y GFP-FIP2-ΔRBD (C).

## **5. Rab11-FIP2 es un regulador positivo del reciclaje constitutivo de los receptores en transmisión basal**

La evaluación funcional de FIP2 durante transmisión sináptica basal se llevó a cabo a través de registros electrofisiológicos simultáneos en pares de células infectadas y no infectadas, sobrexpresando las construcciones de fusión a GFP. Ninguna de ellas, GFP-FIP2, GFP-FIP2- $\Delta$ RBD, o GFP-FIP2-I481E mostraron cambios con respecto a células control en sus propiedades electrofisiológicas basales, sin embargo el silenciamiento de la expresión endógena de FIP2 sí afectó las respuestas de los receptores AMPA y NMDA, en comparación con células control.

En este caso, la expresión del lentivirus shFIP2 produjo una disminución en la respuesta de los receptores AMPA de aproximadamente el 50%. Este resultado sugiere que FIP2 funciona en el reciclaje constitutivo de los receptores como regulador positivo, es decir su presencia se requiere para asegurar el tráfico de los receptores a través del sistema de reciclaje durante transmisión sináptica basal. Este reciclaje es un ciclo continuo de exocitosis y endocitosis, por lo que basándonos únicamente en estos datos no podemos determinar cuál es el paso afectado por la ausencia de FIP2. Además también hemos encontrado afectada la respuesta de los receptores de NMDA con una disminución de alrededor del 25% con respecto a células control. Esto podría significar que FIP2 en condiciones basales estaría regulando procesos de reciclaje de membrana de una variedad de receptores de manera coordinada o a través de distintas vías.

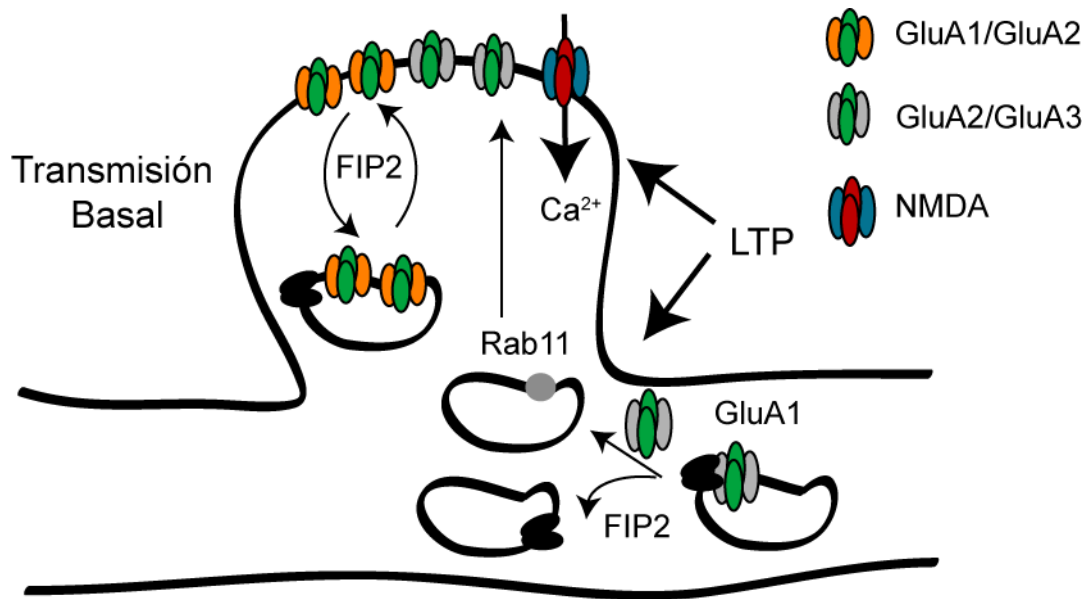
Existe cierta ambigüedad en las funciones descritas para FIP2. Se ha descrito su importancia en el transporte intracelular del receptor de transferrina (TfR) (Lindsay & McCaffrey, 2002) a lo largo del sistema de reciclaje, así como también del receptor de inmunoglobulina A (IgA-R) (Hales et al., 2002). Sin embargo también se ha demostrado su implicación en la internalización de CXCR2 (Fan et al., 2004) o de EGFR (epidermal growth factor (EGFR) (Cullis et al., 2002). En este último caso FIP2 interacciona con las vesículas endocitadas a través de sus dominios NPF y las dirige hacia el sistema de reciclaje de membrana gracias a su RBD. De hecho la estimulación de células A431 con EGF produce la translocación de FIP2 a la membrana plasmática, pero no se observa la translocación de TfR, lo cual sugiere que esta vía es independiente de los endosomas de reciclaje (Lindsay & McCaffrey, 2004). Además FIP2, está implicado en el transporte de NPC1L1 hacia la membrana plasmática (Chu et al., 2009).

Todos estos trabajos muestran una gran variedad de funciones en las que FIP2 se halla implicada, bien asegurando el tráfico de vesículas intracelulares a través de los distintos compartimentos del sistema de reciclaje o bien asegurando la inserción de proteínas en la membrana plasmática, en algunos casos de manera constitutiva y en otras de manera regulada por determinados estímulos, y siempre gracias a la interacción con una variedad de proteínas con diversas funciones.

De la misma manera, nuestros estudios en neuronas de hipocampo muestran como FIP2 está actuando en distintos puntos a lo largo del sistema de transporte, mediante mecanismos distintos, y probablemente también a través de interacciones moleculares distintas. Si bien hemos demostrado que su función como mecanismo de retención para la LTP es independiente de Rab11, no podemos extraer conclusiones definitivas en cuanto a su función como regulador positivo en el reciclaje constitutivo durante transmisión basal, puesto que la sobreexpresión de los mutantes para la interacción con Rab11 no presenta alteraciones en transmisión basal. Esto puede significar que dicha función tampoco requiere de la interacción con Rab11 o bien que ninguno de nuestros mutantes funcionan como dominantes negativos.

Una manera sencilla de determinar a nivel funcional la importancia de la interacción con Rab11 en transmisión basal, sería llevar a cabo el silenciamiento génico de la proteína endógena a través de la infección con lentivirus, que además de la secuencia de shRNA dirigida contra FIP2, permitiera la expresión de la proteína recombinante GFP-FIP2 o sus distintos mutantes para el dominio RBD, GFP-FIP2-I481E o GFP-FIP2- $\Delta$ RBD. Si los mutantes fueran capaces de rescatar el fenotipo provocado por el silenciamiento, significaría que Rab11 tampoco está implicado en esta vía. Esta estrategia también nos permitiría comprobar si los problemas en el tráfico basal de AMPA y de NMDA a través de FIP2 se producen ambos por la misma o si por el contrario son vías independientes.

En cualquier caso estos datos indican que FIP2 es un regulador multifuncional coordinando diversos pasos a lo largo del sistema de vesículas intracelular en neuronas de hipocampo, cuya función puede ser crucial en la especificación de poblaciones de endosomas determinadas (Fig. 41).



**Figura 41.** Representación del modelo propuesto para la participación de FIP2 a lo largo de las vías de transporte constitutivo y regulado de los receptores AMPA.

## 6. Rab11-FIP2 se encuentra regulado por fosforilación en neuronas

La coordinación de las distintas funciones de FIP2 a nivel de transmisión basal y de plasticidad sináptica en neuronas debe estar sujeta a algún tipo de mecanismo regulador. Sabemos que FIP2 se halla regulado por fosforilación en células MDCK y que de esta manera se controla el establecimiento de polaridad en esta línea celular (Ducharme et al., 2006). Teniendo en cuenta además, la importancia de la fosforilación/defosforilación de proteínas en los procesos de plasticidad sináptica, decidimos llevar a cabo una serie de ensayos para determinar la capacidad de esta proteína para ser fosforilada en rodajas de hipocampo.

Nuestros experimentos nos han permitido confirmar que FIP2 se encuentra fosforilado de manera endógena y que está sometido a un ciclo de fosforilación y defosforilación puesto que las modificaciones encontradas en la proteína endógena en los geles de *phos-tag* pueden ser manipuladas mediante el uso de inhibidores de kinasas y fosfatasa. Estos geles además nos han permitido la detección de varias bandas de fosforilación, indicando que esta proteína podría estar regulada por distintas vías.

La única kinasa identificada hasta el momento es Par1b/EMK/MARK2, cuya fosforilación en la serina 227 de FIP2 está descrita en células MDCK. Dicha fosforilación está implicada en el



establecimiento de polaridad en esta línea celular donde además parece regular las funciones de FIP2 de manera independiente de su papel a lo largo del sistema de reciclaje, pues mutaciones en el sitio de fosforilación no afectan el reciclaje de membrana apical (Ducharme et al., 2006). Esta kinasa está implicada en este tipo de procesos de establecimiento de polaridad a través de la reorganización del citoesqueleto microtubular (Cohen et al., 2004) y se ha visto que fosforila proteínas como Tau, MAP2C o MAP4 en sus dominios de interacción con microtúbulos lo cual desencadena la desestabilización del citoesqueleto (Ebner et al., 1999). También desarrolla importantes funciones en neuronas donde regula la expansión de las neuritas y el establecimiento de la polaridad neuronal (Biernat et al., 2002) y controla el mantenimiento de la morfología de las espinas dendríticas en neuronas de hipocampo (Hayashi et al., 2011; Terabayashi et al., 2007) y además es fosforilada por CaMKI (Uboha et al., 2007) en varios sitios, algunos de los cuales se encuentran dentro de su dominio kinasa.

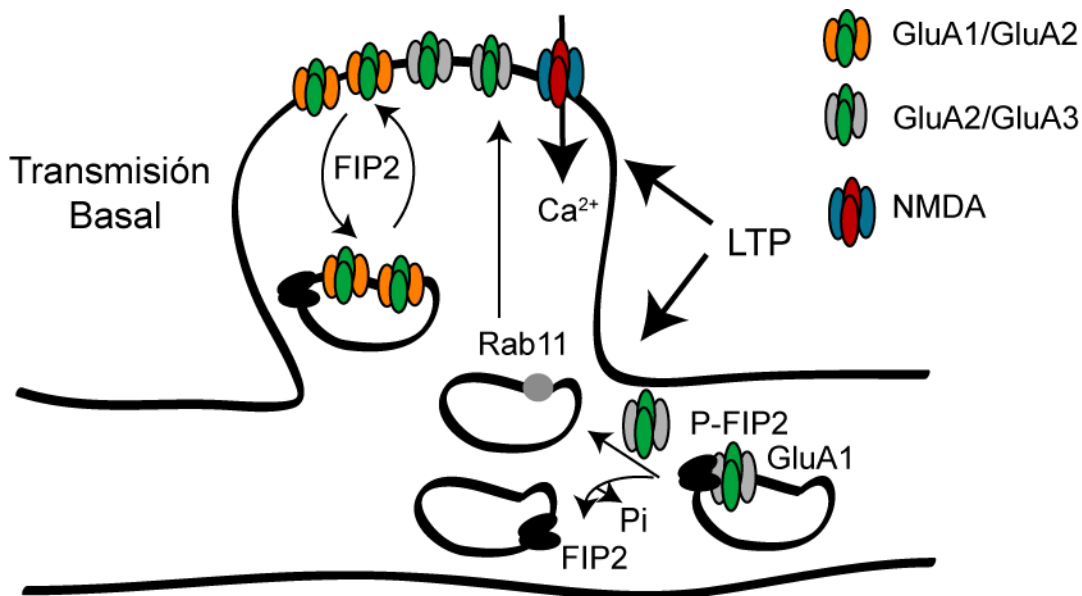
Como punto de inicio para el estudio de la posible regulación de FIP2 en neuronas de hipocampo generamos dos construcciones que mimetizaran las formas constitutivamente fosforilada y defosforilada en la serina 227 de FIP2: GFP-FIP2-S227D y GFP-FIP2-S227A respectivamente. Ambos presentaron una disminución significativa en la potenciación de la respuesta de los receptores AMPA durante la LTP, es decir presentan el mismo fenotipo que la sobreexpresión de GFP-FIP2, sin embargo el análisis de las propiedades electrofisiológicas durante actividad sináptica basal mostró como el mutante constitutivamente fosforilado, reduce de forma significativa la respuesta de AMPA, mientras el mutante mimético para la forma defosforilada no altera transmisión basal.

En base a este resultado podríamos considerar que a pesar de no encontrar cambios con respecto a GFP-FIP2 durante la LTP, podría ser la forma fosforilada GFP-FIP2-S227D, la que estaría implicada en retención de los receptores GluA1 y su liberación durante la inducción de la LTP, mientras que la forma no fosforilada estaría implicada en el reciclaje constitutivo de los receptores (Fig. 42). Siguiendo esta hipótesis, esperaríamos que GFP-FIP2-S227D fuera capaz de interactuar con GluA1 en condiciones basales mientras que GFP-FIP2-S227A, la forma no fosforilada, no sería capaz de interactuar con GluA1. Nuestros datos avalan esta hipótesis, puesto que los ensayos de inmunoprecipitación con estos mutantes nos han permitido detectar interacción entre GluA1 y GFP-FIP2-S227D pero no con el mutante GFP-FIP2-S227A.

Si esta hipótesis fuera cierta la reducción observada en la expresión de la LTP para ambos mutantes podría no estar produciéndose por los mismos motivos, de manera que la sobreexpresión de la forma GFP-FIP2-S227D produce una disminución en la expresión de la LTP debido a un exceso en la retención de los receptores GluA1 o bien debido a su incapacidad para disociarse de ellos tras la inducción de la LTP, en caso de que esto requiriera cambios en la fosforilación de FIP2. Por ello decidimos analizar mediante inmunoprecipitación de FIP2 a lo largo de un experimento de LTP, si existen cambios en el nivel de fosforilación de la proteína mediante un anticuerpo anti-P-Ser/Thr.

Nuestros experimentos preliminares han podido detectar una disminución en la fosforilación de la proteína sobreexpresada tras la inducción de la LTP. Sin embargo estos experimentos no son en absoluto concluyentes y deberemos combinarlos con la realización de ensayos de inducción de la LTP para comprobar cuál es el grado de interacción de ambos mutantes con GluA1 y qué ocurre con esta interacción durante la LTP, de la misma manera que hicimos en experimentos anteriores. De la misma manera, para comprobar si el mutante no fosforilado, GFP-FIP2-S227A reduce la expresión de la LTP mediante el mismo mecanismo que GFP-FIP2 sería interesante combinar esta mutación en la serina 227 con la mutación puntual para la interacción con Rab11, en isoleucina 481.

Estos resultados permitirían construir un modelo en el que coexisten dos subpoblaciones independientes de FIP2 reguladas por ciclos de fosforilación/defosforilación, lo cual determinaría su participación en distintos procesos de transporte. Es interesante tener en cuenta el hecho de que la fosforilación de FIP2 en células MDCK, pese a que no inhibe la capacidad de FIP2 para interaccionar con MiosinaV o con Rab11, desplaza la proteína a localizaciones subcelulares que no dependen de estas proteínas. Así la subpoblación fosforilada de FIP2 no colocaliza en ensayos de inmunofluorescencia con Rab11 ni con MiosinaV (Lapierre et al., 2012), lo cual respalda los resultados obtenidos a lo largo de este trabajo.



**Figura 42.** Representación del modelo propuesto para la participación de FIP2 a lo largo de las vías de transporte constitutivo y regulado de los receptores AMPA. Una subpoblación de FIP2 fosforilada sería la responsable de la retención de los endosomas que contienen subunidades GluA1/GluA2 de receptores AMPA, mientras que FIP2 no fosforilada se halla involucrada en el mantenimiento del reciclaje basal.

Este modelo implicaría la activación de proteínas fosfatasas o la inactivación de la quinasa MARK2 durante la inducción de la LTP. Pese a que durante la LTP predomina la activación de proteínas kinasas, existen también kinasas cuya inactivación es necesaria para la correcta expresión de la LTP, como es el caso de GSK3 $\beta$  (Hooper et al., 2007). No debemos olvidar tampoco que FIP2 podría estar siendo sustrato de fosforilaciones por kinasas distintas de MARK2, por lo que este estudio abre un nuevo modo de regulación cuya comprensión completa requiere de la investigación de aquellas kinasas y fosfatasas que podrían estar actuando sobre FIP2.

De manera general este trabajo ha contribuido al esclarecimiento de la función de FIP2 durante el transporte constitutivo y regulado de los receptores AMPA. Nuestros estudios aportan nuevas pistas sobre la posible regulación de Rab11, a través de una familia de proteínas efectoras que podrían servir como marcadores moleculares que controlen el destino de las vesículas de transporte intracelular. En este sentido se ha descrito como la presencia de los efectores de la familia FIP a lo largo de distintos puntos del sistema de transporte y su capacidad para interactuar unos con otros y a su vez con otras proteínas, permitiría crear una compleja red

a través de la cual se generarían vías alternativas para una variedad de proteínas transportadas (Baetz & Goldenring, 2013), lo que proporciona a la célula de un sistema más versátil de transporte. Dicha versatilidad queda patente en este trabajo, donde hemos mostrado la capacidad de FIP2 para regular mediante mecanismos distintos, ya sea como factor de retención o como regulador positivo, la movilización de los receptores a lo largo de procesos de transporte altamente regulados, imprescindibles para el mantenimiento de la función sináptica en todos los niveles.

# CONCLUSIONES



## Conclusiones:

1. La localización y distribución de FIP2 en neuronas piramidales de la capa CA1 de hipocampo se encuentra determinada, al igual que en otros tipos celulares, por su dominio de interacción con Rab11 (RBD) así como por su dominio de interacción con fosfoinositidos de membrana (C2).
2. Al contrario que en otros tipos celulares, FIP2 en neuronas de hipocampo se halla concentrado en compartimentos subcelulares junto a GluA1, y diferentes de los endosomas de reciclaje caracterizados por la presencia de Rab11.
3. La sobreexpresión de GFP-FIP2 lleva al secuestro de GluA1 en compartimentos subcelulares extra-sinápticos inmóviles, de una manera independiente de la interacción con Rab11.
4. FIP2 forma un complejo con las subunidades GluA1 de los receptores AMPA, que no depende de su dominio de interacción con Rab11 en condiciones basales en cultivos organotípicos de hipocampo.
5. El complejo formado por FIP2/GluA1 en cultivos organotípicos de hipocampo se disocia durante la inducción de la LTP. Esta disociación se encuentra acompañada por una redistribución dinámica de la proteína.
6. FIP2 no forma parte de la maquinaria de transporte de los receptores AMPA ni participa directamente en la movilización de los endosomas de reciclaje durante la LTP.
7. FIP2 actúa como regulador negativo para la LTP, reteniendo los receptores GluA1 en condiciones basales y permitiendo su liberación tras la inducción de la LTP. Esta función de retención se desarrolla de manera independiente de Rab11 y MiosinaV, aunque la disociación de los receptores, necesaria para la expresión de la LTP, si requiere la integridad de sus dominios de interacción o su capacidad de dimerización.
8. FIP2 es necesario durante el reciclaje constitutivo de los receptores AMPA, proceso en el que participa como regulador positivo en un mecanismo independiente de su participación en la LTP.

- 9.** FIP2 es susceptible de fosforilación en cultivos organotípicos de hipocampo, y dicha modificación puede regular las distintas funciones en las que FIP2 se halla implicado.



# **BIBLIOGRAFÍA**



- Adams, J. P., & Sweatt, J. D. 2002. Molecular psychology: roles for the ERK MAP kinase cascade in memory. **Annual review of pharmacology and toxicology**, 42: 135–63.
- Akazawa, C., Shigemoto, R., Bessho, Y., Nakanishi, S., & Mizuno, N. 1994. Differential expression of five N-methyl-D-aspartate receptor subunit mRNAs in the cerebellum of developing and adult rats. **The Journal of comparative neurology**, 347(1): 150–60.
- Alagarsamy, S., Sorensen, S. D., & Conn, P. J. 2001. Coordinate regulation of metabotropic glutamate receptors. **Current opinion in neurobiology**, 11(3): 357–62.
- Alford, S., Frenguelli, B. G., Schofield, J. G., & Collingridge, G. L. 1993. Characterization of Ca<sup>2+</sup> signals induced in hippocampal CA1 neurones by the synaptic activation of NMDA receptors. **The Journal of physiology**, 469: 693–716.
- Andersen, P. 1956. Localization of microelectrode sites by silver impregnation. **Acta physiologica Scandinavica**, 35(3-4): 305–11.
- Andersen, P., & Lomo, T. 1967. Control of hippocampal output by afferent volley frequency. **Progress in brain research**, 27(null): 400–12.
- Andersen, P., Morris, R., Amaral, D., Bliss, T., & O'Keefe, J. 2006. *The Hippocampus Book*. Oxford University Press, USA.
- Anwyl, R. 1999. Metabotropic glutamate receptors: electrophysiological properties and role in plasticity. **Brain Research Reviews**, 29(1): 83–120.
- Arendt, K. L., Royo, M., Fernández-Monreal, M., Knafo, S., Petrok, C. N., Martens, J. R., & Esteban, J. A. 2010. PIP3 controls synaptic function by maintaining AMPA receptor clustering at the postsynaptic membrane. **Nature neuroscience**, 13(1): 36–44.
- Baetz, N. W., & Goldenring, J. R. 2013. Rab11-Family Interacting Proteins define spatially and temporally distinct regions within the dynamic Rab11a-dependent recycling system. **Molecular biology of the cell**, 24(5): 643–58.

- Bagal, A. A., Kao, J. P. Y., Tang, C.-M., & Thompson, S. M. 2005. Long-term potentiation of exogenous glutamate responses at single dendritic spines. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 102(40): 14434–9.
- Barr, F., & Lambright, D. G. 2010. Rab GEFs and GAPs. **Current opinion in cell biology**, 22(4): 461–70.
- Barria, A., Derkach, V., & Soderling, T. 1997a. Identification of the Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II regulatory phosphorylation site in the alpha-amino-3-hydroxyl-5-methyl-4-isoxazole-propionate-type glutamate receptor. **The Journal of biological chemistry**, 272(52): 32727–30.
- Barria, A., & Malinow, R. 2002. Subunit-specific NMDA receptor trafficking to synapses. **Neuron**, 35(2): 345–53.
- Barria, A., Muller, D., Derkach, V., Griffith, L. C., & Soderling, T. R. 1997b. Regulatory phosphorylation of AMPA-type glutamate receptors by CaM-KII during long-term potentiation. **Science (New York, N.Y.)**, 276(5321): 2042–5.
- Baskys, A., Bayazitov, I., Zhu, E., Fang, L., & Wang, R. 2007. Rab-mediated endocytosis: linking neurodegeneration, neuroprotection, and synaptic plasticity? **Annals of the New York Academy of Sciences**, 1122: 313–29.
- Beattie, E. C., Carroll, R. C., Yu, X., Morishita, W., Yasuda, H., von Zastrow, M., & Malenka, R. C. 2000. Regulation of AMPA receptor endocytosis by a signaling mechanism shared with LTD. **Nature neuroscience**, 3(12): 1291–300.
- Bedoukian, M. A., Weeks, A. M., & Partin, K. M. 2006. Different domains of the AMPA receptor direct stargazin-mediated trafficking and stargazin-mediated modulation of kinetics. **The Journal of biological chemistry**, 281(33): 23908–21.
- Benke, T. A., Lüthi, A., Isaac, J. T., & Collingridge, G. L. 1998. Modulation of AMPA receptor unitary conductance by synaptic activity. **Nature**, 393(6687): 793–7.

- Beretta, F., Sala, C., Saglietti, L., Hirling, H., Sheng, M., & Passafaro, M. 2005. NSF interaction is important for direct insertion of GluR2 at synaptic sites. **Molecular and cellular neurosciences**, 28(4): 650–60.
- Biernat, J., Wu, Y.-Z., Timm, T., Zheng-Fischhöfer, Q., Mandelkow, E., Meijer, L., & Mandelkow, E.-M. 2002. Protein kinase MARK/PAR-1 is required for neurite outgrowth and establishment of neuronal polarity. **Molecular biology of the cell**, 13(11): 4013–28.
- Bliss, T. V., & Lomo, T. 1973. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. **The Journal of physiology**, 232(2): 331–56.
- Boehm, J., Kang, M.-G., Johnson, R. C., Esteban, J., Huganir, R. L., & Malinow, R. 2006. Synaptic incorporation of AMPA receptors during LTP is controlled by a PKC phosphorylation site on GluR1. **Neuron**, 51(2): 213–25.
- Bortolotto, Z. A., Fitzjohn, S. M., & Collingridge, G. L. 1999. Roles of metabotropic glutamate receptors in LTP and LTD in the hippocampus. **Current opinion in neurobiology**, 9(3): 299–304.
- Braithwaite, S. P., Meyer, G., & Henley, J. M. 2000. Interactions between AMPA receptors and intracellular proteins. **Neuropharmacology**, 39(6): 919–930.
- Brown, T. C., Correia, S. S., Petrok, C. N., & Esteban, J. A. 2007. Functional compartmentalization of endosomal trafficking for the synaptic delivery of AMPA receptors during long-term potentiation. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, 27(48): 13311–5.
- Brown, T. C., Tran, I. C., Backos, D. S., & Esteban, J. A. 2005. NMDA receptor-dependent activation of the small GTPase Rab5 drives the removal of synaptic AMPA receptors during hippocampal LTD. **Neuron**, 45(1): 81–94.
- Carroll, R. C., Beattie, E. C., Xia, H., Lüscher, C., Altschuler, Y., Nicoll, R. A., Malenka, R. C., & von Zastrow, M. 1999a. Dynamin-dependent endocytosis of ionotropic glutamate receptors.

**Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 96(24): 14112–7.

Carroll, R. C., Lissin, D. V, von Zastrow, M., Nicoll, R. A., & Malenka, R. C. 1999b. Rapid redistribution of glutamate receptors contributes to long-term depression in hippocampal cultures. **Nature neuroscience**, 2(5): 454–60.

Cho, C.-H., St-Gelais, F., Zhang, W., Tomita, S., & Howe, J. R. 2007. Two families of TARP isoforms that have distinct effects on the kinetic properties of AMPA receptors and synaptic currents. **Neuron**, 55(6): 890–904.

Chu, B.-B., Ge, L., Xie, C., Zhao, Y., Miao, H.-H., Wang, J., Li, B.-L., & Song, B.-L. 2009. Requirement of myosin Vb.Rab11a.Rab11-FIP2 complex in cholesterol-regulated translocation of NPC1L1 to the cell surface. **The Journal of biological chemistry**, 284(33): 22481–90.

Citri, A., & Malenka, R. C. 2008. Synaptic plasticity: multiple forms, functions, and mechanisms. **Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, 33(1): 18–41.

Cohen, D., Brennwald, P. J., Rodriguez-Boulan, E., & Müsch, A. 2004. Mammalian PAR-1 determines epithelial lumen polarity by organizing the microtubule cytoskeleton. **The Journal of cell biology**, 164(5): 717–27.

Coleman, S. K., Möykkynen, T., Cai, C., von Ossowski, L., Kuismanen, E., Korpi, E. R., & Keinänen, K. 2006. Isoform-specific early trafficking of AMPA receptor flip and flop variants. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, 26(43): 11220–9.

Collingridge, G. 1987. Synaptic plasticity. The role of NMDA receptors in learning and memory. **Nature**, 330(6149): 604–5.

Collingridge, G. L., Herron, C. E., & Lester, R. A. 1988. Frequency-dependent N-methyl-D-aspartate receptor-mediated synaptic transmission in rat hippocampus. **The Journal of physiology**, 399: 301–12.

- Contractor, A., Mulle, C., & Swanson, G. T. 2011. Kainate receptors coming of age: milestones of two decades of research. **Trends in neurosciences**, 34(3): 154–63.
- Correia, S., Bassani, S., Brown, T., Lise', M., Backos, D., El-Husseini, A., Passafaro, M., & Esteban, J. 2008. Motor protein-dependent transport of AMPA receptors into spines during long-term potentiation. **Nature neuroscience**, 11(4): 457–66.
- Cowan, W. ., Südhof, T. ., & Stevens, C. . 2001. *Synapses*. The Johns Hopkins University Press.
- Cull-Candy, S., Brickley, S., & Farrant, M. 2001. NMDA receptor subunits: diversity, development and disease. **Current opinion in neurobiology**, 11(3): 327–35.
- Cullis, D. N., Philip, B., Baleja, J. D., & Feig, L. a. 2002. Rab11-FIP2, an adaptor protein connecting cellular components involved in internalization and recycling of epidermal growth factor receptors. **The Journal of biological chemistry**, 277(51): 49158–66.
- Cummings, J. A., Mulkey, R. M., Nicoll, R. A., & Malenka, R. C. 1996. Ca<sup>2+</sup> signaling requirements for long-term depression in the hippocampus. **Neuron**, 16(4): 825–33.
- Derkach, V., Barria, A., & Soderling, T. R. 1999. Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-kinase II enhances channel conductance of alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate type glutamate receptors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 96(6): 3269–74.
- Dev, K. K., Nishimune, A., Henley, J. M., & Nakanishi, S. 1999. The protein kinase C alpha binding protein PICK1 interacts with short but not long form alternative splice variants of AMPA receptor subunits. **Neuropharmacology**, 38(5): 635–44.
- Dingledine, R., Borges, K., Bowie, D., & Traynelis, S. F. 1999. The glutamate receptor ion channels. **Pharmacological reviews**, 51(1): 7–61.
- Ducharme, N. a, Ham, A.-J. L., Lapierre, L. a, & Goldenring, J. R. 2011. Rab11-FIP2 influences multiple components of the endosomal system in polarized MDCK cells. **Cellular logistics**, 1(2): 57–68.

- Ducharme, N. A., Hales, C. M., Lapierre, L. A., Ham, A.-J. L., Oztan, A., Apodaca, G., & Goldenring, J. R. 2006. MARK2/EMK1/Par-1 $\alpha$  phosphorylation of Rab11-family interacting protein 2 is necessary for the timely establishment of polarity in Madin-Darby canine kidney cells. **Molecular biology of the cell**, 17(8): 3625–37.
- Ducharme, N. A., Jin, M., Lapierre, L. A., & Goldenring, J. R. 2005. Assessment of Rab11-FIP2 interacting proteins in vitro. **Methods in enzymology**, 403: 706–15.
- Ebneth, A., Drewes, G., Mandelkow, E. M., & Mandelkow, E. 1999. Phosphorylation of MAP2c and MAP4 by MARK kinases leads to the destabilization of microtubules in cells. **Cell motility and the cytoskeleton**, 44(3): 209–24.
- Ehlers, M. D. 1999. Synapse structure: glutamate receptors connected by the shanks. **Current biology : CB**, 9(22): R848–50.
- Ehlers, M. D. 2000. Reinsertion or degradation of AMPA receptors determined by activity-dependent endocytic sorting. **Neuron**, 28(2): 511–25.
- Erreger, K., Dravid, S. M., Banke, T. G., Wyllie, D. J. A., & Traynelis, S. F. 2005. Subunit-specific gating controls rat NR1/NR2A and NR1/NR2B NMDA channel kinetics and synaptic signalling profiles. **The Journal of physiology**, 563(Pt 2): 345–58.
- Esteban, J. A. 2004. Living with the enemy: a physiological role for the beta-amyloid peptide. **Trends in neurosciences**, 27(1): 1–3.
- Esteban, J. A., Shi, S.-H., Wilson, C., Nuriya, M., Haganir, R. L., & Malinow, R. 2003. PKA phosphorylation of AMPA receptor subunits controls synaptic trafficking underlying plasticity. **Nature neuroscience**, 6(2): 136–43.
- Fan, G., Lapierre, L. A., Goldenring, J. R., Sai, J., & Richmond, A. 2004. Rab11-Family Interacting Protein 2 and Myosin Vb Are Required for CXCR2 Recycling and Receptor-mediated Chemotaxis. **Molecular Biology of the cell**, 15(May): 2456–2469.
- Fernández-Monreal, M., Brown, T. C., Royo, M., & Esteban, J. A. 2012. The balance between receptor recycling and trafficking toward lysosomes determines synaptic strength during



- long-term depression. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, 32(38): 13200–5.
- Fukata, Y., Tzingounis, A. V, Trinidad, J. C., Fukata, M., Burlingame, A. L., Nicoll, R. A., & Bredt, D. S. 2005. Molecular constituents of neuronal AMPA receptors. **The Journal of cell biology**, 169(3): 399–404.
- Fukuda, M. 2008. Regulation of secretory vesicle traffic by Rab small GTPases. **Cellular and molecular life sciences : CMLS**, 65(18): 2801–13.
- Fukuda, M., Kanno, E., Ishibashi, K., & Itoh, T. 2008. Large scale screening for novel rab effectors reveals unexpected broad Rab binding specificity. **Molecular & cellular proteomics : MCP**, 7(6): 1031–42.
- Fuller, L., & Dailey, M. E. 2007. Preparation of rodent hippocampal slice cultures. **CSH protocols**, 2007(10): pdb.prot4848.
- Galdzicki, Z., & Siarey, R. J. 2003. Understanding mental retardation in Down's syndrome using trisomy 16 mouse models. **Genes, brain, and behavior**, 2(3): 167–78.
- Gallo, V., Upson, L. M., Hayes, W. P., Vyklicky, L., Winters, C. A., & Buonanno, A. 1992. Molecular cloning and development analysis of a new glutamate receptor subunit isoform in cerebellum. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, 12(3): 1010–23.
- Gardner, L. a, Hajjhussein, H., Frederick-Dyer, K. C., & Bahouth, S. W. 2011. Rab11a and its binding partners regulate the recycling of the  $\beta$ 1-adrenergic receptor. **Cellular signalling**, 23(1): 46–57.
- Gerges, N. Z., Backos, D. S., & Esteban, J. A. 2004a. Local control of AMPA receptor trafficking at the postsynaptic terminal by a small GTPase of the Rab family. **The Journal of biological chemistry**, 279(42): 43870–8.

- Gerges, N. Z., Backos, D. S., Rupasinghe, C. N., Spaller, M. R., & Esteban, J. A. 2006. Dual role of the exocyst in AMPA receptor targeting and insertion into the postsynaptic membrane. **The EMBO journal**, 25(8): 1623–34.
- Gerges, N. Z., Brown, T. C., Correia, S. S., & Esteban, J. A. 2005. Analysis of Rab protein function in neurotransmitter receptor trafficking at hippocampal synapses. **Methods in enzymology**, 403: 153–66.
- Gerges, N. Z., Tran, I. C., Backos, D. S., Harrell, J. M., Chinkers, M., Pratt, W. B., & Esteban, J. A. 2004b. Independent functions of hsp90 in neurotransmitter release and in the continuous synaptic cycling of AMPA receptors. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, 24(20): 4758–66.
- Gladding, C. M., & Raymond, L. A. 2011. Mechanisms underlying NMDA receptor synaptic/extrasynaptic distribution and function. **Molecular and cellular neurosciences**, 48(4): 308–20.
- Greger, I. H., Akamine, P., Khatri, L., & Ziff, E. B. 2006. Developmentally regulated, combinatorial RNA processing modulates AMPA receptor biogenesis. **Neuron**, 51(1): 85–97.
- Greger, I. H., & Esteban, J. A. 2007. AMPA receptor biogenesis and trafficking. **Current opinion in neurobiology**, 17(3): 289–97.
- Greger, I. H., Khatri, L., & Ziff, E. B. 2002. RNA editing at arg607 controls AMPA receptor exit from the endoplasmic reticulum. **Neuron**, 34(5): 759–72.
- Grosshans, B. L., Ortiz, D., & Novick, P. 2006. Rabs and their effectors: achieving specificity in membrane traffic. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 103(32): 11821–7.
- Gundelfinger, E. D., & tom Dieck, S. 2000. Molecular organization of excitatory chemical synapses in the mammalian brain. **Die Naturwissenschaften**, 87(12): 513–23.
- Hales, C. M., Griner, R., Hobdy-Henderson, K. C., Dorn, M. C., Hardy, D., Kumar, R., Navarre, J., Chan, E. K., Lapierre, L. a, & Goldenring, J. R. 2001. Identification and characterization of a

- family of Rab11-interacting proteins. **The Journal of biological chemistry**, 276(42): 39067–75.
- Hales, C. M., Vaerman, J.-P., & Goldenring, J. R. 2002. Rab11 family interacting protein 2 associates with Myosin Vb and regulates plasma membrane recycling. **The Journal of biological chemistry**, 277(52): 50415–21.
- Halpain, S. 2000. Actin and the agile spine: how and why do dendritic spines dance? **Trends in neurosciences**, 23(4): 141–6.
- Hamlyn, L. H. 1961. Electron microscopy of mossy fibre endings in Ammon's horn. **Nature**, 190: 645–6.
- Hamlyn, L. H. 1963. An electron microscope study of pyramidal neurons in the Ammon's horn of the rabbit. **Journal of anatomy**, 97: 189–201.
- Hammond, C. 2008. *Cellular and Molecular Neurophysiology*. Academic Press.
- Hanley, J. G., & Henley, J. M. 2005. PICK1 is a calcium-sensor for NMDA-induced AMPA receptor trafficking. **The EMBO journal**, 24(18): 3266–78.
- Hanley, J. G., Khatri, L., Hanson, P. I., & Ziff, E. B. 2002. NSF ATPase and alpha-/beta-SNAPs disassemble the AMPA receptor-PICK1 complex. **Neuron**, 34(1): 53–67.
- Harris, A. Z., & Pettit, D. L. 2007. Extrasynaptic and synaptic NMDA receptors form stable and uniform pools in rat hippocampal slices. **The Journal of physiology**, 584(Pt 2): 509–19.
- Hayashi, K., Suzuki, A., Hirai, S., Kurihara, Y., Hoogenraad, C. C., & Ohno, S. 2011. Maintenance of dendritic spine morphology by partitioning-defective 1b through regulation of microtubule growth. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, 31(34): 12094–103.
- Hayashi, Y., Shi, S. H., Esteban, J. A., Piccini, A., Poncer, J. C., & Malinow, R. 2000. Driving AMPA receptors into synapses by LTP and CaMKII: requirement for GluR1 and PDZ domain interaction. **Science (New York, N.Y.)**, 287(5461): 2262–7.

- Henderson, G., Johnson, J. W., & Ascher, P. 1990. Competitive antagonists and partial agonists at the glycine modulatory site of the mouse N-methyl-D-aspartate receptor. **The Journal of physiology**, 430: 189–212.
- Henson, M. A., Roberts, A. C., Pérez-Otaño, I., & Philpot, B. D. 2010. Influence of the NR3A subunit on NMDA receptor functions. **Progress in neurobiology**, 91(1): 23–37.
- Hering, H., & Sheng, M. 2001. Dendritic spines: structure, dynamics and regulation. **Nature reviews. Neuroscience**, 2(12): 880–8.
- Herron, C. E., Lester, R. A., Coan, E. J., & Collingridge, G. L. 1986. Frequency-dependent involvement of NMDA receptors in the hippocampus: a novel synaptic mechanism. **Nature**, 322(6076): 265–8.
- Hollmann, M., & Heinemann, S. 1994. Cloned glutamate receptors. **Annual review of neuroscience**, 17: 31–108.
- Hoogenraad, C. C., Milstein, A. D., Ethell, I. M., Henkemeyer, M., & Sheng, M. 2005. GRIP1 controls dendrite morphogenesis by regulating EphB receptor trafficking. **Nature neuroscience**, 8(7): 906–15.
- Hooper, C., Markevich, V., Plattner, F., Killick, R., Schofield, E., Engel, T., Hernandez, F., Anderton, B., Rosenblum, K., Bliss, T., Cooke, S. F., Avila, J., Lucas, J. J., Giese, K. P., Stephenson, J., & Lovestone, S. 2007. Glycogen synthase kinase-3 inhibition is integral to long-term potentiation. **The European journal of neuroscience**, 25(1): 81–6.
- Huang, Y. Y., & Kandel, E. R. 1994. Recruitment of long-lasting and protein kinase A-dependent long-term potentiation in the CA1 region of hippocampus requires repeated tetanization. **Learning & memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)**, 1(1): 74–82.
- Jiang, C., & Schuman, E. M. 2002. Regulation and function of local protein synthesis in neuronal dendrites. **Trends in biochemical sciences**, 27(10): 506–13.

- Ju, W., Morishita, W., Tsui, J., Gaietta, G., Deerinck, T. J., Adams, S. R., Garner, C. C., Tsien, R. Y., Ellisman, M. H., & Malenka, R. C. 2004. Activity-dependent regulation of dendritic synthesis and trafficking of AMPA receptors. **Nature neuroscience**, 7(3): 244–53.
- Junutula, J. R., De Mazière, A. M., Peden, A. A., Ervin, K. E., Advani, R. J., van Dijk, S. M., Klumperman, J., & Scheller, R. H. 2004a. Rab14 is involved in membrane trafficking between the Golgi complex and endosomes. **Molecular biology of the cell**, 15(5): 2218–29.
- Junutula, J. R., Schonteich, E., Wilson, G. M., Peden, A. a, Scheller, R. H., & Prekeris, R. 2004b. Molecular characterization of Rab11 interactions with members of the family of Rab11-interacting proteins. **The Journal of biological chemistry**, 279(32): 33430–7.
- Kaech, S., & Banker, G. 2006. Culturing hippocampal neurons. **Nature protocols**, 1(5): 2406–15.
- Kandel, E. R., & Spencer, W. A. 1961a. Electrophysiology of hippocampal neurons. II. Afterpotentials and repetitive firing. **Journal of neurophysiology**, 24: 243–59.
- Kandel, E. R., & Spencer, W. A. 1961b. The pyramidal cell during hippocampal seizure. **Epilepsia**, 2: 63–9.
- Kandel, E. R., & Spencer, W. A. 1961c. Excitation and inhibition of single pyramidal cells during hippocampal seizure. **Experimental neurology**, 4: 162–79.
- Kandel, E. R., Spencer, W. A., & Brinley, F. J. 1961. Electrophysiology of hippocampal neurons. I. Sequential invasion and synaptic organization. **Journal of neurophysiology**, 24: 225–42.
- Kelly, E. E., Horgan, C. P., Adams, C., Patzer, T. M., Ní Shúilleabháin, D. M., Norman, J. C., & McCaffrey, M. W. 2010. Class I Rab11-family interacting proteins are binding targets for the Rab14 GTPase. **Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization**, 102(1): 51–62.
- Kennedy, M. J., & Ehlers, M. D. 2006. Organelles and Trafficking Machinery for Postsynaptic Plasticity. **Annual Review of Neuroscience**, 29: 325–364.

- Kitt, K. N., Hernández-Deviez, D., Ballantyne, S. D., Spiliotis, E. T., Casanova, J. E., & Wilson, J. M. 2008. Rab14 regulates apical targeting in polarized epithelial cells. **Traffic (Copenhagen, Denmark)**, 9(7): 1218–31.
- Köhler, M., Kornau, H. C., & Seeburg, P. H. 1994. The organization of the gene for the functionally dominant alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid receptor subunit GluR-B. **The Journal of biological chemistry**, 269(26): 17367–70.
- Lapierre, L. A., Avant, K. M., Caldwell, C. M., Oztan, A., Apodaca, G., Knowles, B. C., Roland, J. T., Ducharme, N. A., & Goldenring, J. R. 2012. Phosphorylation of Rab11-FIP2 regulates polarity in MDCK cells. **Molecular biology of the cell**.
- Lee, H. K., Barbarosie, M., Kameyama, K., Bear, M. F., & Huganir, R. L. 2000. Regulation of distinct AMPA receptor phosphorylation sites during bidirectional synaptic plasticity. **Nature**, 405(6789): 955–9.
- Lee, H.-K., Takamiya, K., Han, J.-S., Man, H., Kim, C.-H., Rumbaugh, G., Yu, S., Ding, L., He, C., Petralia, R. S., Wenthold, R. J., Gallagher, M., & Huganir, R. L. 2003. Phosphorylation of the AMPA receptor GluR1 subunit is required for synaptic plasticity and retention of spatial memory. **Cell**, 112(5): 631–43.
- Lee, S. H., Liu, L., Wang, Y. T., & Sheng, M. 2002. Clathrin Adaptor AP2 and NSF Interact with Overlapping Sites of GluR2 and Play Distinct Roles in AMPA Receptor Trafficking and Hippocampal LTD. **Neuron**, 36(4): 661–674.
- Lerma, J. 2006. Kainate receptor physiology. **Current opinion in pharmacology**, 6(1): 89–97.
- Lester, R. A., Clements, J. D., Westbrook, G. L., & Jahr, C. E. 1990. Channel kinetics determine the time course of NMDA receptor-mediated synaptic currents. **Nature**, 346(6284): 565–7.
- Li, Q., Lau, A., Morris, T. J., Guo, L., Fordyce, C. B., & Stanley, E. F. 2004. A syntaxin 1, Galpha(o), and N-type calcium channel complex at a presynaptic nerve terminal: analysis by quantitative immunocolocalization. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, 24(16): 4070–81.

- Lin, J. W., Ju, W., Foster, K., Lee, S. H., Ahmadian, G., Wyszynski, M., Wang, Y. T., & Sheng, M. 2000. Distinct molecular mechanisms and divergent endocytotic pathways of AMPA receptor internalization. **Nature neuroscience**, 3(12): 1282–90.
- Lindsay, A. J., Hendrick, A. G., Cantalupo, G., Senic-Matuglia, F., Goud, B., Bucci, C., & McCaffrey, M. W. 2002. Rab coupling protein (RCP), a novel Rab4 and Rab11 effector protein. **The Journal of biological chemistry**, 277(14): 12190–9.
- Lindsay, A. J., & McCaffrey, M. W. 2002. Rab11-FIP2 functions in transferrin recycling and associates with endosomal membranes via its COOH-terminal domain. **The Journal of biological chemistry**, 277(30): 27193–9.
- Lindsay, A. J., & McCaffrey, M. W. 2004. The C2 domains of the class I Rab11 family of interacting proteins target recycling vesicles to the plasma membrane. **Journal of cell science**, 117(Pt 19): 4365–75.
- Lisé, M.-F., Wong, T. P., Trinh, A., Hines, R. M., Liu, L., Kang, R., Hines, D. J., Lu, J., Goldenring, J. R., Wang, Y. T., & El-Husseini, A. 2006. Involvement of myosin Vb in glutamate receptor trafficking. **The Journal of biological chemistry**, 281(6): 3669–78.
- Lisman, J. E., & Harris, K. M. 1993. Quantal analysis and synaptic anatomy — integrating two views of hippocampal plasticity. **Trends in Neurosciences**, 16(4): 141–147.
- Lisman, J., & Raghavachari, S. 2006. A unified model of the presynaptic and postsynaptic changes during LTP at CA1 synapses. **Science's STKE: signal transduction knowledge environment**, 2006(356): re11.
- Lømø, T. 2003. The discovery of long-term potentiation. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, 358(1432): 617–20.
- Lu, W., & Ziff, E. B. 2005. PICK1 interacts with ABP/GRIP to regulate AMPA receptor trafficking. **Neuron**, 47(3): 407–21.

- Lu, W.-Y., Man, H.-Y., Ju, W., Trimble, W. S., MacDonald, J. F., & Wang, Y. T. 2001. Activation of Synaptic NMDA Receptors Induces Membrane Insertion of New AMPA Receptors and LTP in Cultured Hippocampal Neurons. **Neuron**, 29(1): 243–254.
- Lüscher, C., Xia, H., Beattie, E. C., Carroll, R. C., von Zastrow, M., Malenka, R. C., & Nicoll, R. A. 1999. Role of AMPA receptor cycling in synaptic transmission and plasticity. **Neuron**, 24(3): 649–58.
- Madison, D. V., Malenka, R. C., & Nicoll, R. a. 1991. Mechanisms underlying long-term potentiation of synaptic transmission. **Annual review of neuroscience**, 14: 379–97.
- Malenka, R. C., & Bear, M. F. 2004. LTP and LTD: an embarrassment of riches. **Neuron**, 44(1): 5–21.
- Malenka, R. C., Kauer, J. A., Perkel, D. J., Mauk, M. D., Kelly, P. T., Nicoll, R. A., & Waxham, M. N. 1989. An essential role for postsynaptic calmodulin and protein kinase activity in long-term potentiation. **Nature**, 340(6234): 554–7.
- Malinow, R., Hayashi, Y., Maletic-Savatic, M., Zaman, S. H., Poncer, J.-C., Shi, S.-H., Esteban, J. A., Osten, P., & Seidenman, K. 2010. Introduction of green fluorescent protein (GFP) into hippocampal neurons through viral infection. **Cold Spring Harbor protocols**, 2010(4): pdb.prot5406.
- Malinow, R., & Malenka, R. C. 2002. AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity. **Annual review of neuroscience**, 25: 103–26.
- Mammen, A. L., Kameyama, K., Roche, K. W., & Huganir, R. L. 1997. Phosphorylation of the alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole4-propionic acid receptor GluR1 subunit by calcium/calmodulin-dependent kinase II. **The Journal of biological chemistry**, 272(51): 32528–33.
- Man, H.-Y., Wang, Q., Lu, W.-Y., Ju, W., Ahmadian, G., Liu, L., D'Souza, S., Wong, T. P., Taghibiglou, C., Lu, J., Becker, L. E., Pei, L., Liu, F., Wymann, M. P., MacDonald, J. F., & Wang, Y. T. 2003. Activation of PI3-kinase is required for AMPA receptor insertion during LTP of mEPSCs in cultured hippocampal neurons. **Neuron**, 38(4): 611–24.



- Matthies, H. J. G., Moore, J. L., Saunders, C., Matthies, D. S., Lapierre, L. A., Goldenring, J. R., Blakely, R. D., & Galli, A. 2010. Rab11 supports amphetamine-stimulated norepinephrine transporter trafficking. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, 30(23): 7863–77.
- Mayer, M. L., Westbrook, G. L., & Guthrie, P. B. 1984. Voltage-dependent block by Mg<sup>2+</sup> of NMDA responses in spinal cord neurones. **Nature**, 309(5965): 261–3.
- Meyers, J. M., & Prekeris, R. 2002. Formation of mutually exclusive Rab11 complexes with members of the family of Rab11-interacting proteins regulates Rab11 endocytic targeting and function. **The Journal of biological chemistry**, 277(50): 49003–10.
- Monyer, H., Burnashev, N., Laurie, D. J., Sakmann, B., & Seeburg, P. H. 1994. Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. **Neuron**, 12(3): 529–40.
- Monyer, H., Seeburg, P. H., & Wisden, W. 1991. Glutamate-operated channels: developmentally early and mature forms arise by alternative splicing. **Neuron**, 6(5): 799–810.
- Mulkey, R. M., Herron, C. E., & Malenka, R. C. 1993. An essential role for protein phosphatases in hippocampal long-term depression. **Science (New York, N.Y.)**, 261(5124): 1051–5.
- Naslavsky, N., Rahajeng, J., Sharma, M., & Jovic, M. 2006. Interactions between EHD Proteins and Rab11-FIP2 : A Role for EHD3 in Early Endosomal Transport □. **Molecular Biology of the cell**, 17(January): 163–177.
- Nedvetsky, P. I., Stefan, E., Frische, S., Santamaria, K., Wiesner, B., Valenti, G., Hammer, J. a, Nielsen, S., Goldenring, J. R., Rosenthal, W., & Klussmann, E. 2007. A Role of myosin Vb and Rab11-FIP2 in the aquaporin-2 shuttle. **Traffic (Copenhagen, Denmark)**, 8(2): 110–23.
- Newey, S. E., Velamoor, V., Govek, E.-E., & Van Aelst, L. 2005. Rho GTPases, dendritic structure, and mental retardation. **Journal of neurobiology**, 64(1): 58–74.
- Nicholls, J. G., Martin, A. R., Fuchs, P. A., Brown, D. A., Diamond, M. E., & Weisblat, D. 2011. *From Neuron to Brain*. Sinauer Associates, Inc.

- Nishimune, A., Isaac, J. T., Molnar, E., Noel, J., Nash, S. R., Tagaya, M., Collingridge, G. L., Nakanishi, S., & Henley, J. M. 1998. NSF binding to GluR2 regulates synaptic transmission. **Neuron**, 21(1): 87–97.
- Nowak, L., Bregestovski, P., Ascher, P., Herbet, A., & Prochiantz, A. 1984. Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. **Nature**, 307(5950): 462–5.
- Okabe, S., Miwa, A., & Okado, H. 1999. Alternative splicing of the C-terminal domain regulates cell surface expression of the NMDA receptor NR1 subunit. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, 19(18): 7781–92.
- Osterweil, E., Wells, D. G., & Mooseker, M. S. 2005. A role for myosin VI in postsynaptic structure and glutamate receptor endocytosis. **The Journal of cell biology**, 168(2): 329–38.
- Otmakhov, N., Khibnik, L., Otmakhova, N., Carpenter, S., Riahi, S., Asrican, B., & Lisman, J. 2004. Forskolin-induced LTP in the CA1 hippocampal region is NMDA receptor dependent. **Journal of neurophysiology**, 91(5): 1955–62.
- Paoletti, P., Bellone, C., & Zhou, Q. 2013. NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. **Nature reviews. Neuroscience**, 14(6): 383–400.
- Park, M., Penick, E. C., Edwards, J. G., Kauer, J. A., & Ehlers, M. D. 2004. Recycling endosomes supply AMPA receptors for LTP. **Science (New York, N.Y.)**, 305(5692): 1972–5.
- Passafaro, M., Piëch, V., & Sheng, M. 2001. Subunit-specific temporal and spatial patterns of AMPA receptor exocytosis in hippocampal neurons. **Nature neuroscience**, 4(9): 917–26.
- Pei, W., Huang, Z., Wang, C., Han, Y., Park, J. S., & Niu, L. 2009. Flip and flop: a molecular determinant for AMPA receptor channel opening. **Biochemistry**, 48(17): 3767–77.
- Perez, J. L., Khatri, L., Chang, C., Srivastava, S., Osten, P., & Ziff, E. B. 2001. PICK1 targets activated protein kinase Calpha to AMPA receptor clusters in spines of hippocampal neurons and reduces surface levels of the AMPA-type glutamate receptor subunit 2. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, 21(15): 5417–28.

- Perez-Otano, I., Schulteis, C. T., Contractor, A., Lipton, S. A., Trimmer, J. S., Sucher, N. J., & Heinemann, S. F. 2001. Assembly with the NR1 Subunit Is Required for Surface Expression of NR3A-Containing NMDA Receptors. **J. Neurosci.**, 21(4): 1228–1237.
- Petralia, R. S. 2012. Distribution of extrasynaptic NMDA receptors on neurons. **TheScientificWorldJournal**, 2012: 267120.
- Plant, K., Pelkey, K. A., Bortolotto, Z. A., Morita, D., Terashima, A., McBain, C. J., Collingridge, G. L., & Isaac, J. T. R. 2006. Transient incorporation of native GluR2-lacking AMPA receptors during hippocampal long-term potentiation. **Nature neuroscience**, 9(5): 602–4.
- Prekeris, R. 2003. Rabs, Rips, FIPs, and endocytic membrane traffic. **TheScientificWorldJournal**, 3: 870–80.
- Prekeris, R., Davies, J. M., & Scheller, R. H. 2001. Identification of a novel Rab11/25 binding domain present in Eferin and Rip proteins. **The Journal of biological chemistry**, 276(42): 38966–70.
- Prekeris, R., Klumperman, J., & Scheller, R. H. 2000. A Rab11/Rip11 protein complex regulates apical membrane trafficking via recycling endosomes. **Molecular cell**, 6(6): 1437–48.
- Priel, A., Kollerker, A., Ayalon, G., Gillor, M., Osten, P., & Stern-Bach, Y. 2005. Stargazin reduces desensitization and slows deactivation of the AMPA-type glutamate receptors. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, 25(10): 2682–6.
- Reits, E. A., & Neefjes, J. J. 2001. From fixed to FRAP: measuring protein mobility and activity in living cells. **Nature cell biology**, 3(6): E145–7.
- Roche, K. W., O'Brien, R. J., Mammen, A. L., Bernhardt, J., & Huganir, R. L. 1996. Characterization of multiple phosphorylation sites on the AMPA receptor GluR1 subunit. **Neuron**, 16(6): 1179–88.
- Rosenmund, C., Stern-Bach, Y., & Stevens, C. F. 1998. The tetrameric structure of a glutamate receptor channel. **Science (New York, N.Y.)**, 280(5369): 1596–9.

- Rosenmund, C., & Stevens, C. F. 1996. Definition of the readily releasable pool of vesicles at hippocampal synapses. **Neuron**, 16(6): 1197–207.
- Rudy, J. W. 2008. *The Neurobiology of Learning and Memory*. Sinauer Associates.
- Salmon, P., & Trono, D. 2006. Production and titration of lentiviral vectors. **Current protocols in neuroscience / editorial board, Jacqueline N. Crawley ... [et al.]**, Chapter 4: Unit 4.21.
- Scannevin, R. H., & Huganir, R. L. 2000. Postsynaptic organization and regulation of excitatory synapses. **Nature reviews. Neuroscience**, 1(2): 133–41.
- Schwenk, R. W., Luiken, J. J. F. P., & Eckel, J. 2007. FIP2 and Rip11 specify Rab11a-mediated cellular distribution of GLUT4 and FAT/CD36 in H9c2-hIR cells. **Biochemical and biophysical research communications**, 363(1): 119–25.
- Seeburg, P. H., Higuchi, M., & Sprengel, R. 1998. RNA editing of brain glutamate receptor channels: mechanism and physiology. **Brain research. Brain research reviews**, 26(2-3): 217–29.
- Setou, M., Hayasaka, T., & Yao, I. 2004. Axonal transport versus dendritic transport. **Journal of neurobiology**, 58(2): 201–6.
- Setou, M., Seog, D.-H., Tanaka, Y., Kanai, Y., Takei, Y., Kawagishi, M., & Hirokawa, N. 2002. Glutamate-receptor-interacting protein GRIP1 directly steers kinesin to dendrites. **Nature**, 417(6884): 83–7.
- Sheng, M. 2001. Molecular organization of the postsynaptic specialization. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 98(13): 7058–61.
- Sheng, M., & Kim, M. J. 2002. Postsynaptic signaling and plasticity mechanisms. **Science (New York, N.Y.)**, 298(5594): 776–80.
- Shepherd, J. D., & Huganir, R. L. 2007. The cell biology of synaptic plasticity: AMPA receptor trafficking. **Annual review of cell and developmental biology**, 23: 613–43.

- Shi, S. H., Hayashi, Y., Petralia, R. S., Zaman, S. H., Wenthold, R. J., Svoboda, K., & Malinow, R. 1999. Rapid spine delivery and redistribution of AMPA receptors after synaptic NMDA receptor activation. **Science (New York, N.Y.)**, 284(5421): 1811–6.
- Shi, S.-H., Hayashi, Y., Esteban, J. A., & Malinow, R. 2001. Subunit-Specific Rules Governing AMPA Receptor Trafficking to Synapses in Hippocampal Pyramidal Neurons. **Cell**, 105(3): 331–343.
- Shin, O. H., Ross, A. H., Mihai, I., & Exton, J. H. 1999. Identification of arfophilin, a target protein for GTP-bound class II ADP-ribosylation factors. **The Journal of biological chemistry**, 274(51): 36609–15.
- Shin, O.-H., Couvillon, A. D., & Exton, J. H. 2001. Arfophilin Is a Common Target of both Class II and Class III ADP-Ribosylation Factors. **Biochemistry**, 40(36): 10846–10852.
- Sommer, B., Keinänen, K., Verdoorn, T. A., Wisden, W., Burnashev, N., Herb, A., Köhler, M., Takagi, T., Sakmann, B., & Seeburg, P. H. 1990. Flip and flop: a cell-specific functional switch in glutamate-operated channels of the CNS. **Science (New York, N.Y.)**, 249(4976): 1580–5.
- Song, I., Kamboj, S., Xia, J., Dong, H., Liao, D., & Huganir, R. L. 1998. Interaction of the N-ethylmaleimide-sensitive factor with AMPA receptors. **Neuron**, 21(2): 393–400.
- Steiner, P., Alberi, S., Kulangara, K., Yersin, A., Sarria, J.-C. F., Regulier, E., Kasas, S., Dietler, G., Muller, D., Catsicas, S., & Hirling, H. 2005. Interactions between NEEP21, GRIP1 and GluR2 regulate sorting and recycling of the glutamate receptor subunit GluR2. **The EMBO journal**, 24(16): 2873–84.
- Stephan, K. E., Baldeweg, T., & Friston, K. J. 2006. Synaptic plasticity and dysconnection in schizophrenia. **Biological psychiatry**, 59(10): 929–39.
- Sutton, M. A., & Schuman, E. M. 2005. Local translational control in dendrites and its role in long-term synaptic plasticity. **Journal of neurobiology**, 64(1): 116–31.
- Tada, T., & Sheng, M. 2006. Molecular mechanisms of dendritic spine morphogenesis. **Current opinion in neurobiology**, 16(1): 95–101.

- Tang, S. J., & Schuman, E. M. 2002. Protein synthesis in the dendrite. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, 357(1420): 521–9.
- Tashiro, A., & Yuste, R. 2003. Structure and molecular organization of dendritic spines. **Histology and histopathology**, 18(2): 617–34.
- Terabayashi, T., Itoh, T. J., Yamaguchi, H., Yoshimura, Y., Funato, Y., Ohno, S., & Miki, H. 2007. Polarity-regulating kinase partitioning-defective 1/microtubule affinity-regulating kinase 2 negatively regulates development of dendrites on hippocampal neurons. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, 27(48): 13098–107.
- Thomas, G. M., & Huganir, R. L. 2004. MAPK cascade signalling and synaptic plasticity. **Nature reviews. Neuroscience**, 5(3): 173–83.
- Tingley, W. G., Roche, K. W., Thompson, A. K., & Huganir, R. L. 1993. Regulation of NMDA receptor phosphorylation by alternative splicing of the C-terminal domain. **Nature**, 364(6432): 70–3.
- Tomita, S., Chen, L., Kawasaki, Y., Petralia, R. S., Wenthold, R. J., Nicoll, R. A., & Brecht, D. S. 2003. Functional studies and distribution define a family of transmembrane AMPA receptor regulatory proteins. **The Journal of cell biology**, 161(4): 805–16.
- Tovar, K. R., & Westbrook, G. L. 2002. Mobile NMDA receptors at hippocampal synapses. **Neuron**, 34(2): 255–64.
- Traynelis, S. F., Hartley, M., & Heinemann, S. F. 1995. Control of proton sensitivity of the NMDA receptor by RNA splicing and polyamines. **Science (New York, N.Y.)**, 268(5212): 873–6.
- Turetsky, D., Garringer, E., & Patneau, D. K. 2005. Stargazin modulates native AMPA receptor functional properties by two distinct mechanisms. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, 25(32): 7438–48.
- Uboha, N. V., Flajolet, M., Nairn, A. C., & Picciotto, M. R. 2007. A calcium- and calmodulin-dependent kinase I $\alpha$ /microtubule affinity regulating kinase 2 signaling cascade

- mediates calcium-dependent neurite outgrowth. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, 27(16): 4413–23.
- Vance, K. M., Hansen, K. B., & Traynelis, S. F. 2012. GluN1 splice variant control of GluN1/GluN2D NMDA receptors. **The Journal of physiology**, 590(Pt 16): 3857–75.
- Wallace, D. M., Lindsay, A. J., Hendrick, A. G., & McCaffrey, M. W. 2002. The novel Rab11-FIP/Rip/RCP family of proteins displays extensive homo- and hetero-interacting abilities. **Biochemical and biophysical research communications**, 292(4): 909–15.
- Wang, Y. T., & Linden, D. J. 2000. Expression of cerebellar long-term depression requires postsynaptic clathrin-mediated endocytosis. **Neuron**, 25(3): 635–47.
- Wang, Z., Edwards, J. G., Riley, N., Provance, D. W., Karcher, R., Li, X.-D., Davison, I. G., Ikebe, M., Mercer, J. a, Kauer, J. a, & Ehlers, M. D. 2008. Myosin Vb mobilizes recycling endosomes and AMPA receptors for postsynaptic plasticity. **Cell**, 135(3): 535–48.
- Watanabe, M., Inoue, Y., Sakimura, K., & Mishina, M. 1992. Developmental changes in distribution of NMDA receptor channel subunit mRNAs. **Neuroreport**, 3(12): 1138–40.
- Wentholt, R. J., Petralia, R. S., Blahos J, I. I., & Niedzielski, A. S. 1996. Evidence for multiple AMPA receptor complexes in hippocampal CA1/CA2 neurons. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, 16(6): 1982–9.
- White, J., & Stelzer, E. 1999. Photobleaching GFP reveals protein dynamics inside live cells. **Trends in Cell Biology**, 9(2): 61–65.
- Winder, D. G., & Sweatt, J. D. 2001. Roles of serine/threonine phosphatases in hippocampal synaptic plasticity. **Nature reviews. Neuroscience**, 2(7): 461–74.
- Wyllie, D. J., Manabe, T., & Nicoll, R. A. 1994. A rise in postsynaptic Ca<sup>2+</sup> potentiates miniature excitatory postsynaptic currents and AMPA responses in hippocampal neurons. **Neuron**, 12(1): 127–38.

- Xia, J., Zhang, X., Staudinger, J., & Huganir, R. L. 1999. Clustering of AMPA receptors by the synaptic PDZ domain-containing protein PICK1. **Neuron**, 22(1): 179–87.
- Zerial, M., & McBride, H. 2001. Rab proteins as membrane organizers. **Nature reviews. Molecular cell biology**, 2(2): 107–17.
- Zhu, J. J., Esteban, J. A., Hayashi, Y., & Malinow, R. 2000. Postnatal synaptic potentiation: delivery of GluR4-containing AMPA receptors by spontaneous activity. **Nature neuroscience**, 3(11): 1098–106.
- Ziff, E. B. 2007. TARPs and the AMPA receptor trafficking paradox. **Neuron**, 53(5): 627–33.
- Zukin, R. S., & Bennett, M. V. 1995. Alternatively spliced isoforms of the NMDAR1 receptor subunit. **Trends in neurosciences**, 18(7): 306–13.



**ANEXO**



**1. Artículos publicados durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral:**

- 1.1 Arendt, K. L., Royo, M., Fernández-Monreal, M., Knafo, S., Petrok, C. N., Martens, J. R., & Esteban, J. A. 2010. PIP3 controls synaptic function by maintaining AMPA receptor clustering at the postsynaptic membrane. *Nature neuroscience*, 13(1): 36–44.**
- 1.2 Fernández-Monreal, M., Brown, T. C., Royo, M., & Esteban, J. A. 2012. The balance between receptor recycling and trafficking toward lysosomes determines synaptic strength during long-term depression. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 32(38): 13200–5.**



Published in final edited form as:

*Nat Neurosci.* 2010 January ; 13(1): 36–44. doi:10.1038/nn.2462.

## PIP<sub>3</sub> controls synaptic function by maintaining AMPA receptor clustering at the postsynaptic membrane

Kristin L. Arendt<sup>1,2,4</sup>, María Royo<sup>3</sup>, Mónica Fernández-Monreal<sup>3</sup>, Shira Knafo<sup>3</sup>, Cortney N. Petrok<sup>2</sup>, Jeffrey R. Martens<sup>1,2</sup>, and José A. Esteban<sup>1,2,3,\*</sup>

<sup>1</sup> Neuroscience Program, University of Michigan Medical School, Ann Arbor, Michigan 48109, USA

<sup>2</sup> Department of Pharmacology, University of Michigan Medical School, Ann Arbor, Michigan 48109, USA

<sup>3</sup> Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa”, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)/Universidad Autónoma de Madrid, Madrid 28049, Spain

### Abstract

Despite their low abundance, phosphoinositides are critical regulators of intracellular signaling and membrane compartmentalization. However, little is known of phosphoinositide function at the postsynaptic membrane. Here we show that continuous synthesis and availability of phosphatidylinositol-(3,4,5)-trisphosphate (PIP<sub>3</sub>) at the postsynaptic terminal is necessary for sustaining synaptic function in rat hippocampal neurons. This requirement is specific for synaptic, but not for extrasynaptic, AMPA receptors, nor NMDA receptors. We found that PIP<sub>3</sub> down-regulation impairs PSD-95 accumulation in spines. Concomitantly, AMPA receptors become more mobile and migrate from the postsynaptic density towards the perisynaptic membrane within the spine, leading to synaptic depression. Interestingly, these effects are only revealed after prolonged inhibition of PIP<sub>3</sub> synthesis or by direct quenching of this phosphoinositide at the postsynaptic cell. Therefore, we conclude that a slow, but constant turnover of PIP<sub>3</sub> at synapses is required for maintaining AMPA receptor clustering and synaptic strength under basal conditions.

Phosphoinositides (phosphorylated derivatives of phosphatidylinositol) are fundamental second messengers in the cell. They are able to integrate multiple intracellular signaling pathways and modulate a large spectrum of cellular activities<sup>1</sup>. Phosphoinositides are highly compartmentalized in the cell, and in this fashion, they are thought to provide essential spatial and temporal cues for protein recruitment and intracellular membrane trafficking<sup>2</sup>. The functional role of phosphoinositide metabolism and compartmentalization has been studied with great detail at the presynaptic terminal, where phosphoinositide turnover has been shown to be critical for neurotransmitter vesicle cycling and synaptic function<sup>3</sup>. There is also abundant evidence for the relevance of phosphoinositide pathways for synaptic plasticity<sup>4–8</sup>. However, very little is known about specific roles of phosphoinositides in membrane trafficking at the

Users may view, print, copy, download and text and data- mine the content in such documents, for the purposes of academic research, subject always to the full Conditions of use: [http://www.nature.com/authors/editorial\\_policies/license.html#terms](http://www.nature.com/authors/editorial_policies/license.html#terms)

\*Correspondence should be addressed to J.A.E. (jaesteban@cbm.uam.es): Nicolás Cabrera 1, Madrid 28049, Spain, Phone: +34-91-1964637, Fax: +34-91-1964420.

<sup>4</sup>Current address: Department of Molecular and Cell Biology, University of California at Berkeley, California 94720, USA

### AUTHOR CONTRIBUTIONS

K.L.A. is responsible for most of the experimental work. M.R., M.F.-M. and S.K. contributed some of the biochemical and imaging experiments. C.N.P. carried out cloning and provided technical support. J.R.M. designed and supervised some of the experiments. K.L.A. and J.A.E. designed the experiments and wrote the manuscript.

postsynaptic terminal, despite the importance of neurotransmitter receptor trafficking for synaptic plasticity<sup>9,10</sup>.

Phosphatidylinositol-(3,4,5)-trisphosphate (PIP<sub>3</sub>) is among the most elusive phosphoinositides. Basal levels of PIP<sub>3</sub> are extremely low, due to a tight spatial and temporal regulation of PIP<sub>3</sub> synthesis<sup>11</sup>. Nevertheless, PIP<sub>3</sub> can be found enriched in specific subcellular compartments, such as the tip of growing neurites<sup>12</sup>. Indeed, local accumulation of PIP<sub>3</sub> is very important for the establishment of cell polarity, including neuronal differentiation and dendritic arborization<sup>13,14</sup>. The mechanisms by which PIP<sub>3</sub> exerts its functions are still being elucidated. Nevertheless, a common theme is the role of PIP<sub>3</sub> as a landmark for docking and co-localization of a variety of signaling molecules at the plasma membrane<sup>1</sup>.

AMPA-type glutamate receptors (AMPA receptors) mediate most excitatory transmission in the brain, and their regulated addition and removal from synapses leads to long-lasting forms of synaptic plasticity such as long-term potentiation (LTP) and long-term depression (LTD)<sup>15</sup>. In addition, AMPARs continuously cycle in and out of the synaptic membrane in a manner that does not require synaptic activity. This constitutive trafficking involves both exocytic delivery from intracellular compartments<sup>16</sup> and fast exchange with surface extrasynaptic receptors *via* lateral diffusion<sup>17</sup>. Still, we know very little about the organization and regulation of AMPARs within the synaptic terminal. In particular, the potential role of PIP<sub>3</sub> in these processes has never been explored.

In this work we have investigated specific actions of PIP<sub>3</sub> at the postsynaptic membrane, using a combination of pharmacological and molecular tools, together with electrophysiology, fluorescence imaging and electron microscopy assays. Surprisingly, we have found that PIP<sub>3</sub> is continuously required for the maintenance of AMPARs at the synaptic membrane. This effect is only visible upon direct PIP<sub>3</sub> quenching or prolonged inhibition of its synthesis, suggesting that a slow but constant turnover of PIP<sub>3</sub> is required for sustaining synaptic function.

## RESULTS

### PIP<sub>3</sub> limits AMPA receptor-mediated synaptic transmission

As a first step to evaluate the role of PIP<sub>3</sub> in synaptic transmission, we manipulated endogenous PIP<sub>3</sub> levels by overexpressing the pleckstrin homology (PH) domain from General Receptor for Phosphoinositides (GRP1) in CA1 neurons from organotypic hippocampal slice cultures (see Methods). This domain has a 650-fold specificity for PIP<sub>3</sub> *versus* PIP<sub>2</sub> and other phosphoinositides<sup>18</sup>, and it has a dominant negative effect on PIP<sub>3</sub>-dependent processes by restricting binding to the endogenous targets<sup>19</sup>. As shown in Fig. 1a, this construct (PH-GRP1) is well expressed in neurons, where it reaches dendritic spines. The lack of an obvious membrane distribution of this recombinant protein is consistent with the presence of very low levels of PIP<sub>3</sub> under basal conditions<sup>11</sup>. That is, PH-GRP1 is expected to be well in excess over endogenous PIP<sub>3</sub><sup>18</sup>, as it would be required for PH-GRP1 to act as a dominant negative. Nevertheless, we have confirmed the PIP<sub>3</sub>-binding ability and specificity of PH-GRP1 *in vitro* (Fig. 1b,c) and in BHK cells upon PIP<sub>3</sub> up-regulation (Fig. 1d).

We then monitored the effect of PIP<sub>3</sub> quenching with PH-GRP1 on evoked AMPAR- and NMDAR-mediated responses in CA1 pyramidal neurons using whole-cell simultaneous double recordings. Importantly, only CA1 (but not CA3 cells) express the recombinant protein. Therefore, PIP<sub>3</sub> levels are only altered in the postsynaptic cell when monitoring CA3-to-CA1 synaptic transmission. As shown in Fig. 2a, quenching of PIP<sub>3</sub> with PH-GRP1 caused a significant and selective depression of AMPAR synaptic responses compared to control neighboring pyramidal neurons. Recordings at +40mV revealed no effect on NMDAR transmission (for simplicity, only average values are plotted in the graphs, but statistical

comparisons are always calculated for infected-uninfected paired data). Importantly, expression of PH-GRP1 did not affect passive membrane properties of the cell, such as holding current or input resistance, indicating that cell-wide ion channel conductances were not altered. In addition, cell size, as reported by whole-cell capacitance was not affected either (Supplementary Fig. 1). Therefore, overnight expression of this construct does not appear to have any general toxic effect in neurons from organotypic slices.

PH domains have been reported to have cellular effects independent from their phosphoinositide binding activity<sup>20</sup>. Therefore, we tested whether the depression of AMPAR transmission by PH-GRP1 was directly due to PIP<sub>3</sub> sequestration. We expressed a PH-GRP1 domain with a point mutation that specifically prevents phosphoinositide binding: R284C<sup>20</sup>. As shown in Fig. 2b, paired recordings for AMPAR- and NMDAR-mediated transmission revealed no difference in synaptic responses between cells expressing PH-GRP1-R284C and their control neighbors. These results confirm that the binding and thus sequestering of PIP<sub>3</sub> causes the depression of AMPAR-mediated transmission.

As an independent approach to test the role of PIP<sub>3</sub> in synaptic transmission, we used specific inhibitors of class I phosphatidylinositol-3-kinases (PI3Ks), the enzymes that generate PIP<sub>3</sub>. For these experiments we pre-treated hippocampal slices with 10 μM LY294002 or 100 nM wortmannin for one hour prior to whole-cell recordings (these drugs were also present in the perfusion solution during the recordings). At these concentrations, LY294002 and wortmannin are potent inhibitors of PI3K, without significant effects on phosphoinositide kinases required for PI(4,5)P<sub>2</sub> synthesis<sup>11</sup>. Synaptic responses were evoked at -60 mV and +40 mV holding potentials to obtain AMPA/NMDA ratios (Fig. 2c). Compared to the equivalent vehicle control (DMSO), AMPA/NMDA ratio was significantly decreased in cells treated with LY294002 or wortmannin. Finally, depression of AMPA/NMDA ratios was observed in both cultured and acute hippocampal slices (Fig. 2c, right histogram).

To test whether pharmacological inhibition of PI3K and overexpression of PH-GRP1 depress synaptic transmission by the same mechanism, we compared AMPAR and NMDAR responses between PH-GRP1-expressing and control neurons, after pre-treating the slices with 10 μM LY294002 for 1 hour (LY294002 was also present during the recordings). As shown in Fig. 2d, PH-GRP1 expression did not alter AMPAR nor NMDAR currents with respect to the control neuron when PIP<sub>3</sub> synthesis was inhibited. This result confirms that PH-GRP1 and LY294002 depress synaptic transmission through the same pathway, most likely by limiting PIP<sub>3</sub> availability.

This observed depression of AMPAR-mediated transmission upon PIP<sub>3</sub> depletion suggests that PIP<sub>3</sub> may be a limiting factor for AMPAR synaptic function. If this is the case, enhanced PIP<sub>3</sub> synthesis might lead to increased AMPAR responses. To test this possibility, we generated a constitutively active PI3K by permanently targeting its catalytic subunit (p110) to the plasma membrane using a myristoylation tag (Myr-p110, <sup>21</sup>). The efficacy of this construct to upregulate PIP<sub>3</sub> signaling was confirmed by monitoring Akt phosphorylation in CA1 neurons expressing Myr-p110 (Supplementary Fig. 2). Evoked AMPAR and NMDAR responses were compared between infected and non-infected neighboring pyramidal neurons. Neurons expressing Myr-p110 displayed a significant potentiation of AMPAR transmission (Fig. 2e) with no alteration of NMDAR responses. Passive membrane properties including holding current, input resistance and capacitance were not different between infected and uninfected cells (Supplementary Fig. 1). These results support the interpretation that PIP<sub>3</sub> is a limiting factor controlling AMPAR synaptic function.

### Gradual synaptic depression upon PIP<sub>3</sub> synthesis inhibition

Previous reports using PI3K inhibitors have yielded conflicting results on the role of PIP<sub>3</sub> on basal synaptic transmission<sup>4,5</sup>. However, it is important to keep in mind that the magnitude of the decrease in PIP<sub>3</sub> levels upon blockade of its synthesis will depend on its metabolic turnover under basal conditions. Thus, short incubations with PI3K inhibitors may be ineffective if basal PIP<sub>3</sub> turnover is slow. To directly address this possibility, we incubated hippocampal slices with 10 μM LY294002 for up to two hours while monitoring AMPAR synaptic responses using field recordings.

Stable baselines of a minimum of 25 minutes were obtained from hippocampal slices prior to infusion of 10 μM LY294002 or 0.05% DMSO (vehicle control). As shown in Fig. 3a,b, slices treated with 10 μM LY294002 displayed a slow and gradual run-down of synaptic transmission, which started to be significant 60–80 min after the onset of PI3K inhibition. In contrast, DMSO-treated slices showed a small decrease in synaptic responses, which was not significant after 2 hours of infusion. As control, treatment with LY294002 did not affect fiber volley amplitude (Fig. 3a,c), suggesting that presynaptic excitability was not altered. Therefore, these results confirm our previous conclusion on the importance of PIP<sub>3</sub> for the maintenance of AMPAR synaptic function. In addition, these data support the interpretation that PIP<sub>3</sub> undergoes a slow turnover under basal conditions, which is only revealed after prolonged inhibition of PIP<sub>3</sub> synthesis (to note, recordings in Fig. 2c started one hour after application of LY294002).

The function of some ion channels has been shown to be directly modulated by phosphoinositides, more typically by PIP<sub>2</sub> (see for example <sup>22</sup>), but also by PIP<sub>3</sub><sup>23</sup>. In order to test whether this is the case for AMPARs, we recorded extrasynaptic responses evoked by bath application of AMPA (100 nM) from CA1 neurons expressing PH-GRP1 and from neighboring control cells. Recordings were carried out in the presence of 0.5 μM tetrodotoxin (to prevent action potential firing) and 10 μM cyclothiazide (to prevent AMPAR desensitization). As shown in Fig. 3d, whole-cell AMPA-evoked currents were similar in PH-GRP1-expressing neurons and in control neighboring cells. This result suggests that the requirement for PIP<sub>3</sub> is specific for synaptic AMPARs.

### Postsynaptic PIP<sub>3</sub> is necessary for long-term potentiation

There have been previous conflicting results on the role of PIP<sub>3</sub> in LTP induction, maintenance or both<sup>4,5</sup>. However, it is important to note that pharmacological inhibition of PI3K would affect both pre- and postsynaptic cells. In addition, as discussed above, different incubation times with PI3K inhibitors may yield variable depletion of basal PIP<sub>3</sub> levels. In order to circumvent these complications, we decided to test the role of PIP<sub>3</sub> in LTP by directly quenching this phosphoinositide in the postsynaptic cell using PH-GRP1 in organotypic hippocampal slices. Importantly, this experimental manipulation does not affect NMDAR synaptic currents (Fig. 2a), and therefore, it rules out potential effects on LTP induction.

Whole-cell recordings were obtained from neurons expressing PH-GRP1 and from control, uninfected neurons, in an interleaved manner. LTP was induced according to a pairing protocol (see Methods). As shown in Fig. 4a,b, control cells displayed significant potentiation of transmission compared to the unpaired pathway that did not receive LTP-inducing stimulation. In contrast, LTP expression was abolished in cells expressing PH-GRP1 (black symbols in panel A; black column in panel B).

### PIP<sub>3</sub> requirements for cycling and regulated AMPA receptors

Most AMPARs in the hippocampus are composed of GluA1/GluA2 or GluA3/GluA2 subunit combinations<sup>24</sup> (subunit nomenclature according to <sup>25</sup>). These two populations appear to reach their synaptic targets according to different pathways, with GluA2/3 continuously cycling in



and out of synapses and GluA1-containing receptors undergoing acute, activity-dependent synaptic delivery<sup>26</sup> (but see also <sup>27</sup>). Therefore, we decided to separately test the PIP<sub>3</sub> requirements of these two populations.

To this end, we co-expressed individual EGFP-tagged AMPAR subunits with either RFP or an RFP-tagged PH-GRP1 in organotypic slice cultures using the biolistic delivery system (see Methods). When overexpressed, these subunits form homomeric receptors, which can be detected at synapses from their inward rectification properties<sup>28,29</sup> (in the case of GluA2, we used the unedited version R607Q). Recombinant GluA2 receptors behave as endogenous GluA2/3 heteroligomers<sup>28</sup>; thus, they can be used to monitor the constitutively cycling population of AMPARs. When GluA2(R607Q) was expressed with RFP, the rectification index was significantly increased compared to non-transfected cells (Fig. 4c; compare first and second columns), indicating presence of the recombinant receptor at the synapse. In contrast, when GluA2(R607Q) was coexpressed with PH-GRP1, this increase in rectification was abolished (Fig. 4c; compare second and third columns), indicating that PIP<sub>3</sub> is needed for the delivery and/or stability of this population of AMPARs at synapses.

Similar assays were carried out with recombinant GluA1 subunits to monitor the activity-regulated population of AMPARs<sup>29</sup>. GluA1 is driven into synapses when co-expressed with a constitutively-active form of  $\alpha$ CaMKII (tCaMKII), as judged from the increase in the rectification index (Fig. 4c, compare first and fourth columns). However, when PH-GRP1 is co-expressed with GluA1 and tCaMKII, this increase in rectification is not observed (Fig. 4c; compare fourth and fifth columns). This finding suggests that PIP<sub>3</sub> is also necessary for the synaptic presence of this population of AMPARs. These results were essentially replicated using the PI3K inhibitor LY294002 (10  $\mu$ M) on hippocampal slices expressing either GluA2 (R607Q) or GluA1 plus tCaMKII (Fig. 4d).

These experiments using recombinant receptors fit very well with our results monitoring endogenous AMPARs during basal synaptic transmission and LTP. Together, these data strongly suggest that PIP<sub>3</sub> is a common requirement for all populations of AMPARs.

### AMPA receptor accumulation at spines upon PIP<sub>3</sub> depletion

The results described above suggest that PIP<sub>3</sub> availability affects synaptic, but not extrasynaptic AMPARs. Therefore, we hypothesized that PIP<sub>3</sub> may play a local role in AMPAR function at synapses. To address this hypothesis, we evaluated the distribution of AMPARs at dendritic spines upon PIP<sub>3</sub> depletion.

We used biolistic gene delivery to co-express EGFP-tagged GluA2 together with either RFP (control) or an RFP-tagged PH-GRP1, in organotypic hippocampal slices. The partition of GluA2 between spines and dendrites was estimated from the intensity of the GFP signal in the spine head versus the adjacent dendritic shaft (see Methods). Similarly, the surface distribution of the recombinant receptor in spines and dendrites was assessed by immunostaining with an anti-GFP coupled to an infrared fluorophore (Cy5) under non-permeabilized conditions (the GFP tag is placed at the extracellular N terminus of the receptor; see Fig. 5a for examples and Supplementary Fig. 3 for a control of the non-permeabilizing conditions for surface immunostaining).

As shown in Fig. 5b, GluA2 partitions almost equally between the spine head and the adjacent dendrite when expressed with RFP. To our surprise, co-expression with PH-GRP1 led to a small, but significant increase in the amount of GluA2 receptor in the spine (Fig. 5b, left pair of columns). Notably, PH-GRP1 produced a similar accumulation of GluA2 at the plasma membrane (surface) of the spine (Fig. 5b, right pair of columns). This redistribution appears to be local, since long-range distribution of GluA2 along the primary apical dendrite was not

altered by PH-GRP1 expression (Supplementary Fig. 4). These results were replicated using a pharmacological approach to inhibit PIP<sub>3</sub> synthesis (10 μM LY294002; Fig. 5c).

Importantly, spine size (estimated from cytosolic GFP distribution) and distribution of the PIP<sub>3</sub> precursor, phosphatidylinositol-(4,5)-biphosphate (PIP<sub>2</sub>) at spines were not altered upon PIP<sub>3</sub> blockade (Supplementary Fig. 5). Therefore, these combined data indicate that PIP<sub>3</sub> depletion leads to a local redistribution of AMPARs, which unexpectedly, accumulate in spines. As will be shown below, ultrastructural analyses indicated that this receptor accumulation occurred preferentially on the extrasynaptic region of the spine plasma membrane (Fig. 7).

### PIP<sub>3</sub> contributes to PSD-95 accumulation in spines

PSD-95 is a synaptic scaffolding molecule that critically controls the accumulation of AMPARs at synapses<sup>30</sup>, and accordingly, it is a determining factor for the maintenance of synaptic strength<sup>31–33</sup>. Therefore, we decided to test whether PIP<sub>3</sub> may affect PSD-95 accumulation at synapses. To this end, we co-expressed GFP-tagged PSD-95 with plain (cytosolic) RFP or with RFP-PH-GRP1 in CA1 neurons from organotypic slice cultures (see Fig. 6a for representative examples). The accumulation of PSD-95 in spines was then quantified from the ratio of GFP fluorescence at the spine head *versus* the adjacent dendritic shaft.

As shown in Fig. 6b, co-expression with PH-GRP1 significantly reduced the accumulation of PSD-95 in spines, as compared with RFP-expressing neurons. This reduction was detected across the whole population of spines (left shift in the cumulative distribution). Importantly, as mentioned earlier, PIP<sub>3</sub> depletion did not alter spine size (Supplementary Fig. 5a). Therefore, these results strongly suggest that PIP<sub>3</sub> availability is important for PSD-95 enrichment in spines.

### PIP<sub>3</sub> regulates AMPA receptor mobility at the spine surface

PSD-95 is a critical factor for the stability of AMPARs at the synaptic membrane<sup>30</sup>. Therefore, the results shown above suggest that the depression of synaptic strength upon PIP<sub>3</sub> depletion may be due to a reduction in PSD-95-mediated anchoring of AMPARs at synapses. As an initial approach to test this hypothesis, we evaluated the mobility of AMPARs at the surface of dendritic spines using fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) and Super-Ecliptic-pHluorin-tagged GluA2 (SEP-GluA2). Super-ecliptic-pHluorin is a highly pH-sensitive version of GFP, which has been previously used to track surface AMPARs<sup>34</sup>.

SEP-GluA2 receptors were expressed in organotypic hippocampal slices, and PIP<sub>3</sub> levels were reduced by treatment with the PI3K inhibitor LY294002. Spines expressing SEP-GluA2 were photobleached and the extent of fluorescence recovery was measured over 30 minutes (see representative examples in Fig. 6c). As shown in Fig. 6d, approximately 25% of the SEP-GluA2 signal is recovered in the spine over a time course of 5–10 min (time constant of 5.7 min). In contrast, in slices treated with LY294002, SEP-GluA2 fluorescence recovered to a significantly greater extent (around 50%) over a similar time course (time constant of 5.9 min). These results indicate that PIP<sub>3</sub> depletion leads to an increase in the fraction of AMPARs that are free to exchange between the dendrite and the spine. As a control, the mobility of a membrane-anchored version of GFP (GFP with the farnesylation sequence of H-Ras) was not altered by LY294002 (Supplementary Fig. 6). In addition, PIP<sub>3</sub> depletion did not change the mobility of SEP-GluA2 in dendrites (Supplementary Fig. 7). Therefore, these combined observations indicate that PIP<sub>3</sub> specifically modulates the flow of AMPARs between the spine and the dendrite, in a manner that is consistent with a decreased stability of receptors at the synaptic membrane in the absence of PIP<sub>3</sub>.

PSD-95 anchors AMPARs at synapses through its interaction with transmembrane AMPAR regulatory proteins (TARPs)<sup>30,31</sup>. We then tested whether PIP<sub>3</sub> is required for PSD-95/TARP interaction. To this end, we inhibited PIP<sub>3</sub> synthesis in hippocampal slices with LY294002 for 2 hours, prepared total protein extracts, and carried out co-immunoprecipitations between PSD-95 and two major TARPs expressed in the hippocampus:  $\gamma$ -8 and  $\gamma$ -2 (stargazin)<sup>35</sup>. As shown in Supplementary Fig. 8, PSD-95 can be immunoprecipitated with both  $\gamma$ -8 and  $\gamma$ -2 from hippocampal extracts. Surprisingly, this interaction appeared to be stronger in slices pre-treated with LY294002. The mechanism for this unexpected strengthening of PSD-95/TARP interaction upon PIP<sub>3</sub> depletion is unclear. Nevertheless, we can conclude that the depression of synaptic responses and increased mobility of surface AMPARs induced by PIP<sub>3</sub> depletion are not due to an impaired interaction between PSD-95 and TARPs.

### Local rearrangement of AMPA receptors at the spine surface

One of the most surprising results of this work is that AMPARs accumulate at the spine plasma membrane upon PIP<sub>3</sub> depletion (Fig. 5), although synaptic transmission is depressed (Figs. 2 and 3). However, it should be kept in mind that only a small fraction (around 15%) of the spine plasma membrane is actually occupied by the postsynaptic density, where excitatory transmission occurs<sup>36</sup>. At this submicron scale, confocal fluorescence microscopy cannot easily resolve whether receptors present on the spine surface are actually located on the synaptic membrane. To directly evaluate whether PIP<sub>3</sub> affects AMPAR clustering at the postsynaptic membrane, we employed post-embedding immunogold electron microscopy. In addition to its high spatial resolution, this technique has the advantage of monitoring endogenous AMPARs.

Hippocampal slices were treated with 10  $\mu$ M LY294002 (or DMSO, as control), and processed for postembedding immunogold detection using anti-GluA2 antibodies (see Methods). Electron micrographs were sampled randomly from excitatory (asymmetric) synapses in the stratum radiatum (CA1) (see representative images in Fig. 7a). The abundance of anti-GluA2 immunogold particles was quantified at three compartments: the postsynaptic density, the extrasynaptic membrane lateral to the PSD and the intracellular space within the spine. Interestingly, slices treated with LY294002 displayed a significant accumulation of GluA2 particles in the extrasynaptic membrane lateral to the PSD (Fig. 7b). This effect was accompanied by a decrease in the PSD population, resulting in no net change in total membrane localization (PSD plus extrasynaptic membrane) *versus* intracellular fraction (Fig. 7b).

Prompted by this result, we took a closer inspection to the distribution of GluA2 along the synaptic and perisynaptic membrane within the spine. To this end, we measured the lateral distance of each individual gold particle in these two compartments with respect to the closest PSD edge. Particles within the extrasynaptic membrane are given positive distances (larger numbers representing particles farther away from the PSD edge) and particles within the PSD are given negative distances (larger numbers representing particles closer to the center of the PSD). As shown in Fig. 7c,d, under control conditions, AMPARs accumulate to higher densities within the PSD membrane, whereas the perisynaptic membrane near the PSD edge remains rather unpopulated by receptors. In contrast, upon PIP<sub>3</sub> depletion, the distribution of AMPARs becomes much more homogeneous along synaptic and extrasynaptic membrane within the spine: AMPAR immunolabeling decreases at the PSD and increases in the perisynaptic membrane (Fig. 7c), to the point that receptor density does not appreciably change across the PSD edge (see cumulative distributions in Fig. 7d). Similar results were obtained with a different antibody monitoring the GluA3 subunit of AMPARs (Supplementary Fig. 9). Therefore, this analysis confirms that PIP<sub>3</sub> depletion leads to a very local redistribution of AMPARs within the spine surface, which results in a decreased receptor density at the synaptic membrane and an increased receptor accumulation on the extrasynaptic surface of the spine.

Importantly, this result monitoring endogenous receptors is consistent with the depression of AMPAR synaptic responses produced by PH-GRP1 expression or LY294002 treatment (Figs. 2 and 3), and it also fits with the increased fraction of mobile recombinant receptors reported by FRAP measurements (Fig. 6) (receptors on the perisynaptic membrane exchange more readily with extrasynaptic receptors than those at the postsynaptic site<sup>17</sup>). Taken together, these results indicate that PIP<sub>3</sub> has a critical role in the subsynaptic distribution and dynamics of AMPARs, which bears direct consequences for the maintenance of synaptic function.

### Electrophysiological detection of perisynaptic receptors

In order to functionally evaluate the presence of perisynaptic AMPARs induced by PIP<sub>3</sub> depletion, we decided to test the effect of PH-GRP1 on synaptic responses elicited in the presence of a glutamate reuptake blocker. The rationale is that synaptically released glutamate may reach these nearby receptors if neurotransmitter reuptake is inhibited. To this end, we pre-incubated slices with the glutamate uptake blocker L-trans-pyrrolidine-2,4-dicarboxylate (L-t-PDC). This is a potent uptake inhibitor that does not have any direct action on glutamate receptors<sup>37</sup>. In the presence of L-t-PDC, AMPAR-mediated synaptic responses from neurons expressing PH-GRP1 were no longer depressed with respect to control neurons (see Fig. 8a). This result supports our interpretation that PIP<sub>3</sub> depletion leads to AMPAR diffusion into the perisynaptic membrane of the spine.

Nevertheless, the effects of blocking neurotransmitter reuptake are not necessarily straightforward. It has been previously reported that inhibition of glutamate uptake produces depression of basal synaptic transmission in primary neuronal cultures<sup>38</sup> and in hippocampal slices<sup>39</sup> (but see also <sup>40</sup>). This depression is thought to be mediated by the activation of metabotropic glutamate receptors<sup>38</sup>. Indeed, we observed a run-down of basal synaptic transmission in control neurons when perfusing L-t-PDC (Fig. 8b; white symbols). In the case of PIP<sub>3</sub>-depleted neurons (PH-GRP1), this depression was greatly reduced or completely absent (Fig. 8b, black symbols). This result is consistent with the additional contribution of nearby extrasynaptic receptors in these neurons, which would compensate from the depression otherwise induced by blocking glutamate uptake. Since PH-GRP1 neurons start from an already depressed situation (Fig. 2a), by the end of the incubation with L-t-PDC they display similar AMPAR responses as to those from control neurons (see Fig. 8b, inset, for a representative pair of infected and uninfected neurons recorded simultaneously).

Regardless of the macroscopic effects of L-t-PDC on basal synaptic transmission, the fact that blockade of glutamate uptake abolishes the depression induced by PIP<sub>3</sub> depletion strongly supports the interpretation that AMPARs redistribute to the nearby perisynaptic membrane in the absence of PIP<sub>3</sub>.

## DISCUSSION

In this manuscript we have shown that PIP<sub>3</sub> is a critical effector of AMPAR synaptic function and plasticity, and that it is required for the maintenance of synaptic strength. In particular, we have found that PIP<sub>3</sub> down-regulation leads to a depression of synaptic transmission, which is specific for synaptic AMPARs, since it does not affect NMDAR nor extrasynaptic AMPAR currents. Interestingly, PIP<sub>3</sub> seems to act at a very local scale, by ensuring PSD-95-mediated clustering of AMPARs at the postsynaptic membrane, and therefore, preventing receptor dispersion into the neighboring extrasynaptic membrane of the spine. In addition, PIP<sub>3</sub> depletion leads to the accumulation of AMPARs in spines, possibly through a separate mechanism that remains to be characterized.

These results clarify previous conflicting reports on the role of PIP<sub>3</sub> signaling for synaptic function and plasticity. We report for the first time that basal levels of PIP<sub>3</sub> at the postsynaptic

terminal are necessary for sustaining synaptic function. Importantly, this requirement is only unmasked when blocking PI3K activity for long periods of time (> 1 hour), suggesting that PIP<sub>3</sub> levels (at least at synapses) are subject to a slow turnover. This is an important finding for synaptic signaling, since it implies that both synthetic (PI3K) and degradative (PTEN and/or SHIP) activities are present in unstimulated neurons. Our results suggest that, under basal conditions, these activities are tuned to maintain low (but physiologically relevant) levels of PIP<sub>3</sub>. Obviously, this interpretation also includes the possibility of fast regulation of PIP<sub>3</sub> levels during plasticity. In fact, LTP induction and NMDAR activation have been previously reported to trigger the PI3K signaling cascade<sup>41,42</sup>. According to this scenario, acute blockade of PI3K during LTP induction should be sufficient to prevent the fast up-regulation of PIP<sub>3</sub> and synaptic potentiation. However, prolonged blockade of PIP<sub>3</sub> synthesis would be needed to unveil its requirement for the maintenance of synaptic transmission.

How is PI3K activity maintained (even if at low levels) under basal conditions? This is an important point, since PI3K is usually seen as a regulated enzyme that is activated by upstream effectors (receptor protein tyrosine kinases, G protein coupled receptors, etc.; see<sup>1</sup> for a review). However, it is worth noting that most PI3K activating mechanisms operate by recruiting the enzyme to the plasma membrane, where its substrate, PIP<sub>2</sub>, is found. In fact, “passive” targeting of PI3K to the plasma membrane (in the absence of receptor stimulation) leads to a constitutive up-regulation of PIP<sub>3</sub> signaling<sup>21</sup> (see also Supplementary Fig. 2). Interestingly, it has been shown that PI3K is localized at excitatory synapses, and that it directly binds the cytosolic C-terminus of the AMPAR<sup>6</sup>. This interaction is constitutive and preserves the catalytic activity of PI3K<sup>6</sup>. Therefore, we propose that, *via* its association to AMPARs, PI3K would be maintained in close proximity to the synaptic membrane, where it would be responsible for supplying a low but constant level of PIP<sub>3</sub> necessary to sustain synaptic transmission.

Why is PIP<sub>3</sub> constantly needed at the postsynaptic membrane? To some extent, this situation is reminiscent of the presence of PIP<sub>3</sub> in subcellular domains with high membrane dynamics, such as the tip of growing neurites<sup>12</sup>. Although the precise role of PIP<sub>3</sub> in this process is far from clear, a recurring theme is the requirement of PIP<sub>3</sub> for the establishment or maintenance of cell membrane polarity<sup>12–14</sup>. We now know that the postsynaptic terminal is indeed a domain of intense and polarized membrane dynamics, which is critical for both synaptic function maintenance and plasticity<sup>10</sup>. Therefore, our results suggest that a slow, but active, turnover of PIP<sub>3</sub> may be critical for subserving basal membrane dynamics constantly operating at the postsynaptic terminal.

Finally, our data indicate that PIP<sub>3</sub> plays a very distinct and local function for the regulation of AMPARs at synapses. Specifically, we have found that PIP<sub>3</sub> contributes to the accumulation of PSD-95 at spines. Accordingly, PIP<sub>3</sub> depletion produces an enhanced mobility of AMPARs in spines, which is accompanied by receptor dispersion into the perisynaptic membrane. Therefore, our results suggest that PIP<sub>3</sub> is a critical factor for the synaptic retention of AMPARs, perhaps *via* modulation of the PSD-95 synaptic scaffold. This mechanism is likely to be specific for AMPARs, since knockdown of PSD-95 does not significantly alter synaptic NMDARs<sup>43</sup>. The mechanistic link between PIP<sub>3</sub> and PSD-95 remains to be elucidated. It has been recently shown that a variety of PDZ domains and polybasic clusters confer phosphoinositide binding specificity<sup>44–46</sup>. Therefore, the recruitment of PSD-95 into spines may be modulated by a complex network of phosphoinositide-dependent interactions.

In summary, this work has offered new insights into the complex interplay between lipids and neurotransmitter receptors for the regulation of synaptic function. In addition, it has revealed that an important but poorly understood phosphoinositide, phosphatidylinositol-(3,4,5)-

triphosphate, is a critical factor for the local concentration of AMPARs at the postsynaptic membrane.

## METHODS

### Materials

The PI3K inhibitors LY294002 and wortmannin, and the glutamate uptake inhibitor *L-Trans*-pyrrolidine-2,4-dicarboxylate (*L-t*-PDC) were from Sigma. The antibodies used in this study were: anti-GFP (Roche); GluR2, GluR3, phospho-Akt (Thr308) and stargazin (Millipore); Akt (Cell Signaling); TARP  $\gamma$ -8 (Frontier Science, Hokkaido, Japan).

### Construction of recombinant proteins and expression

The coding sequence of the pleckstrin homology (PH) domain of GRP1 was amplified by RT-PCR from rat brain mRNA and cloned downstream of the enhanced GFP (Clontech) (EGFP-PH-GRP1) or the red fluorescence protein variant tdimer<sup>247</sup> (RFP-PH-GRP1). The corresponding point mutant abolishing PIP<sub>3</sub> binding, R284C<sup>20</sup>, was introduced by PCR-directed mutagenesis. The PH domain of human phospholipase C- $\delta$ 1 fused to EGFP was obtained from Dr. Ronald Holz (PH-PLC-EGFP). A constitutively active form of PI3K was generated by adding an N-terminal myristoylation sequence to the catalytic domain (p110 $\alpha$ ) of mouse PI3K, as previously described<sup>21</sup>. This construct was then tagged with enhanced GFP (Clontech) at the C-terminus (Myr-p110-EGFP). The EGFP-tagged AMPAR subunits (GluA1-EGFP and GluA2-R607Q-EGFP), PSD-95 and the truncated  $\alpha$ CaMKII construct (tCaMKII) were prepared as previously described<sup>28,32</sup>. The membrane-anchored form of GFP was obtained from Carlos Dotti. In this construct, the EGFP coding sequence is followed by a 21-aa farnesylation signal from H-Ras (pEGFP-CAAX). The pH-sensitive Super-Ecliptic-pHluorin-GluA2 construct was obtained from Roberto Malinow<sup>34</sup>. All these constructs were recloned in pSinRep5 for expression using Sindbis virus. Organotypic cultures of hippocampal slices were prepared from postnatal day 5–6 rats. After 4–5 days in culture, the recombinant gene is delivered into the slices using Sindbis virus or biolistic gene deliver (“gene gun”). Protein expression was typically for 15 h or for 1.5 days when expressing AMPAR subunits. All biosafety procedures and animal care protocols were approved by the University of Michigan Committee on Use and Care of Animals and the bioethics committee from the Consejo Superior de Investigaciones Cientificas (CSIC).

### Protein extracts and immunoprecipitations

Protein extracts from hippocampal slices were prepared in 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 10 mM EDTA, 0.1 mM phenylmethanesulphonylfluoride (PMSF), 2  $\mu$ g/ml of chymostatin, leupeptin, antipain and pepstatin, and 1 % Triton X-100. For immunoprecipitations, 200–300  $\mu$ g of protein extracts were incubated with 5  $\mu$ g of the corresponding antibody and with 40  $\mu$ l of protein G-sepharose beads (50%) (Amersham Biosciences), for 4 hours at 4°C. Samples were then washed and immunoprecipitated proteins were eluted by boiling in 1 $\times$  Laemmli sample buffer and separated by SDS-PAGE. Visualization of immunoprecipitated proteins was done by Western Blot and chemiluminescence.

### *In vitro* phosphoinositide binding assays

**PIP pull-down assay**—Different PH-domain EGFP fusion proteins were expressed in organotypic hippocampal slice cultures using the Sindbis virus. Slices were then homogenized in a buffer containing 10 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.5% Nonidet P-40, 5 mM DTT, 0.1 mM PMSF, 10  $\mu$ g/ $\mu$ L chymostatin, 10  $\mu$ g/ $\mu$ L leupeptin, 10  $\mu$ g/ $\mu$ L antipain, 10  $\mu$ g/ $\mu$ L pepstatin. Insoluble extracts were removed via high-speed centrifugation (1 min, 13,200 rpm). The supernatants are then incubated for 3 hours at 4°C with PI(4,5)P<sub>2</sub>- or PI(3,4,5)P<sub>3</sub>-coated

agarose beads, or with control, uncoated beads (Echelon). Bound and unbound fractions are then separated by centrifugation (pull-down). The presence of the different PH domains in the bound fractions was tested by western blot using anti-GFP antibodies.

**PIP membrane overlay assay**—Different PH domains fused to EGFP were expressed in BHK cells *via* Sindbis virus. Whole-cell extracts are then prepared in 1% non-fat dry milk dissolved in PBS with 0.1% Tween-20. Insoluble material is removed by centrifugation. Protein extracts are applied on phosphoinositide strips (Echelon) and incubated for 2 hours at room temperature. The phosphoinositide strips are then washed with PBS-Tween and incubated with anti-GFP for detection of bound recombinant proteins.

## Electrophysiology

Voltage-clamp simultaneous whole-cell recordings are obtained from nearby pairs of infected and uninfected (control) CA1 pyramidal neurons, under visual guidance using fluorescence and transmitted light illumination. The recording chamber is perfused with 119 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 4 mM CaCl<sub>2</sub>, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 26 mM NaHCO<sub>3</sub>, 1 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 11 mM glucose, 0.1 mM picrotoxin, and 4 μM 2-chloroadenosine, at pH 7.4, gassed with 5% CO<sub>2</sub>/95% O<sub>2</sub>. Patch recording pipettes (3–6 MΩ) are filled with 115 mM cesium methanesulfonate, 20 mM CsCl, 10 mM HEPES, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 4 mM Na<sub>2</sub>ATP, 0.4 mM Na<sub>3</sub>GTP, 10 mM sodium phosphocreatine, and 0.6 mM EGTA at pH 7.25. Synaptic responses are evoked with bipolar electrodes using single-voltage pulses (200 μs, up to 20 V). The stimulating electrodes are placed over Schaffer collateral fibers between 300 and 500 μm from the recorded cells. Because only CA1 cells (and not CA3 cells) are infected, this configuration ensures that recombinant proteins are always expressed exclusively in the postsynaptic cell. Synaptic AMPAR-mediated responses are measured at –60 mV and NMDA receptor (NMDAR)-mediated responses at +40 mV, at a latency when AMPAR responses have fully decayed (60 ms). For rectification studies, AMPAR responses were recorded at –60 mV and +40 mV in the presence of 0.1 mM D,L-2-amino-5-phosphonovaleric acid (APV) in the perfusion solution and 0.1 mM spermine in the intracellular solution. The rectification index is calculated as the ratio between the AMPAR synaptic response at –60 mV and +40 mV. Synaptic responses are averaged over 50–100 trials. LTP was induced using a pairing protocol by stimulating Schaffer collateral fibers at 3 Hz (540 pulses) while depolarizing the postsynaptic cell to 0 mV. Field excitatory postsynaptic potentials (fEPSPs) were acquired with 2.5 M NaCl in the recording pipette. All electrophysiological recordings were carried out with Multiclamp 700A/B amplifiers (Axon Instruments).

## Confocal fluorescence imaging

Fluorescence images were acquired with an Olympus FV500 confocal microscope and a 63x lens using FluoView software. Surface immunostaining for EGFP-tagged AMPAR subunits was carried out under nonpermeabilized conditions using anti-GFP (Roche) and biotinylated anti-mouse (Sigma) antibodies, and streptavidin coupled to Cy5 (Amersham Biosciences) (detergents were omitted in all incubations). Image analysis was carried out with Image J. Briefly, line plots of fluorescence intensity were generated across spine heads and the adjacent dendritic shafts. Fluorescence intensity at each compartment was quantified from the peaks corresponding to the spine and the dendrite after background subtraction. Spine/dendrite ratios were calculated from these values. This method is internally normalized for immunostaining variability, since immunofluorescence values are always acquired in pairs of spine and adjacent dendrite. Additionally, spine-dendrite pairs are always selected from the GFP channel, avoiding any bias with respect to their surface immunostaining.

For fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) experiments, GFP signal from dendritic spines or specific dendritic regions was photobleached with high laser intensity for

5 seconds. Recovery of fluorescence was measured at different time intervals after photobleaching. Fluorescence values at the bleached area are normalized to those at an adjacent “non-bleached” region, to compensate for ongoing bleaching during imaging.

### Postembedding immunogold

Hippocampal slices were fixed and processed for osmium-free post-embedding immunogold labeling essentially as described previously<sup>48</sup>. AMPARs were labeled with anti-GluA2 or -GluA3 antibodies (Millipore), and secondary antibodies coupled to 10-nm gold particles (Electron Microscopy Sciences). Electron micrographs were obtained with a Philips CM-100 transmission electron microscope and a Kodak 1.6 Megapixels digital camera. Quantification of gold particles and distance measurements were performed on the digital images using Image J software.

### Statistical analyses

All graphs represent average values  $\pm$  s.e.m. Statistical differences were calculated according to nonparametric tests. Comparisons between multiple groups were performed with the Kruskal-Wallis ANOVA. When significant differences were observed, *p* values for pairwise comparisons were calculated according to two-tailed Mann-Whitney tests (for unpaired data) or Wilcoxon tests (for paired data). Comparisons between cumulative distributions (Figs. 6b, 7d and Supplementary Fig. 9c) were performed according to two-sample Kolmogorov–Smirnov tests. *p* values are indicated in each figure.

### Supplementary Material

Refer to Web version on PubMed Central for supplementary material.

### Acknowledgments

We thank Ronald Holz for the plasmid containing the PH-PLC sequence, Angel Lee for the plasmid containing the catalytic domain of mouse PI3K (p110 $\alpha$ ), Carlos Dotti for the membrane-anchored GFP-CAAX construct, Roberto Malinow for the SEP-GluA2 construct, and Lu Chen for facilitating some of the experiments carried out by K.L.A. We also thank Sandra Jurado and members of the Esteban lab for their critical reading of this manuscript, and Stephen Fisher, Edward Stuenkel, Geoffrey Murphy and Ronald Holz for their thoughtful discussions. This work was supported by grants from the National Institute of Mental Health (MH070417), the Dana Foundation and the Spanish Ministry of Science and Innovation (SAF-2008-04616) to J.A.E. M.F.-M. and S.K. are supported by postdoctoral contracts, and M.R. by a predoctoral fellowship, from the Spanish Ministry of Science and Innovation.

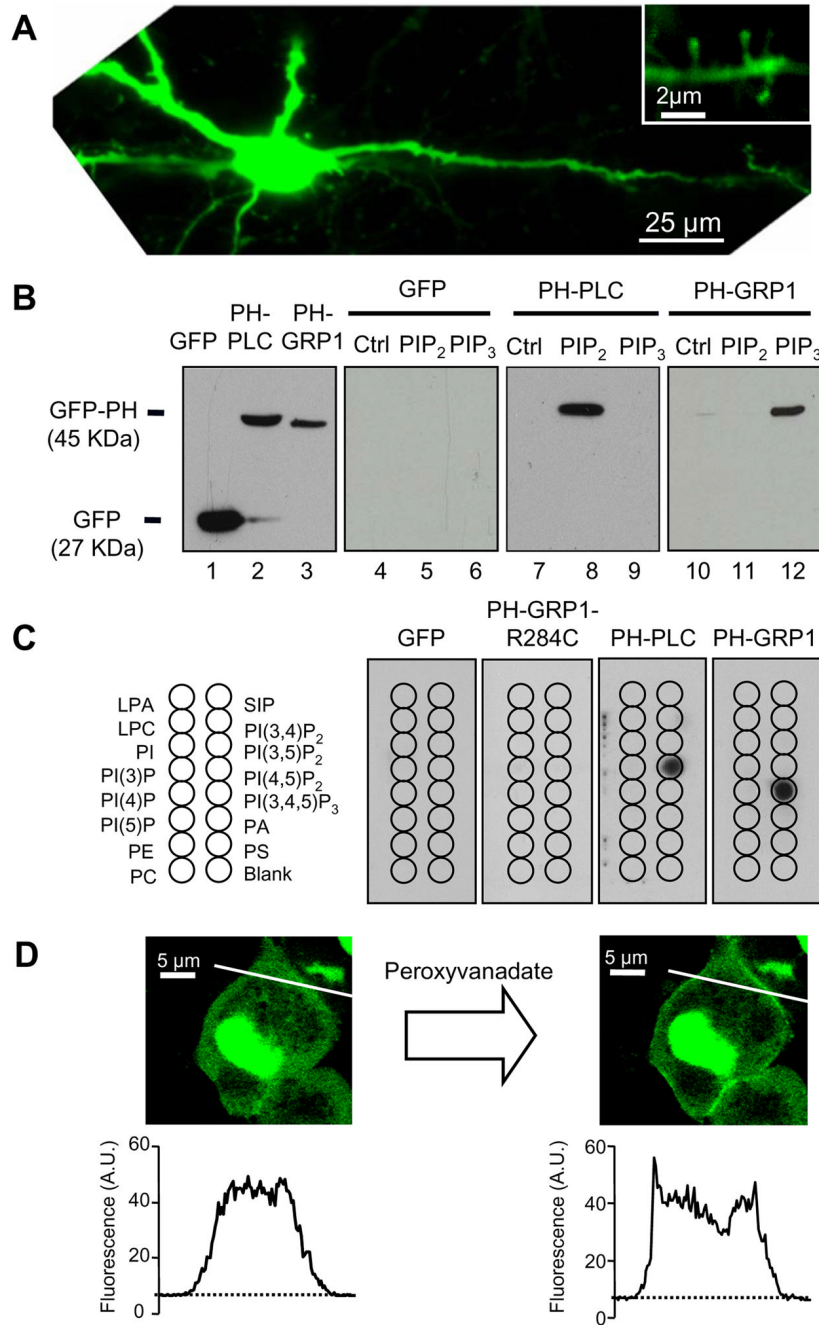
### References

1. Cantley LC. The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* 2002;296:1655–7. [PubMed: 12040186]
2. Di Paolo G, De Camilli P. Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics. *Nature* 2006;443:651–7. [PubMed: 17035995]
3. Wenk MR, De Camilli P. Protein-lipid interactions and phosphoinositide metabolism in membrane traffic: insights from vesicle recycling in nerve terminals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:8262–9. [PubMed: 15146067]
4. Sanna PP, et al. Phosphatidylinositol 3-kinase is required for the expression but not for the induction or the maintenance of long-term potentiation in the hippocampal CA1 region. *J Neurosci* 2002;22:3359–65. [PubMed: 11978812]
5. Opazo P, Watabe AM, Grant SG, O’Dell TJ. Phosphatidylinositol 3-kinase regulates the induction of long-term potentiation through extracellular signal-related kinase-independent mechanisms. *J Neurosci* 2003;23:3679–88. [PubMed: 12736339]
6. Man HY, et al. Activation of PI3-kinase is required for AMPA receptor insertion during LTP of mEPSCs in cultured hippocampal neurons. *Neuron* 2003;38:611–24. [PubMed: 12765612]



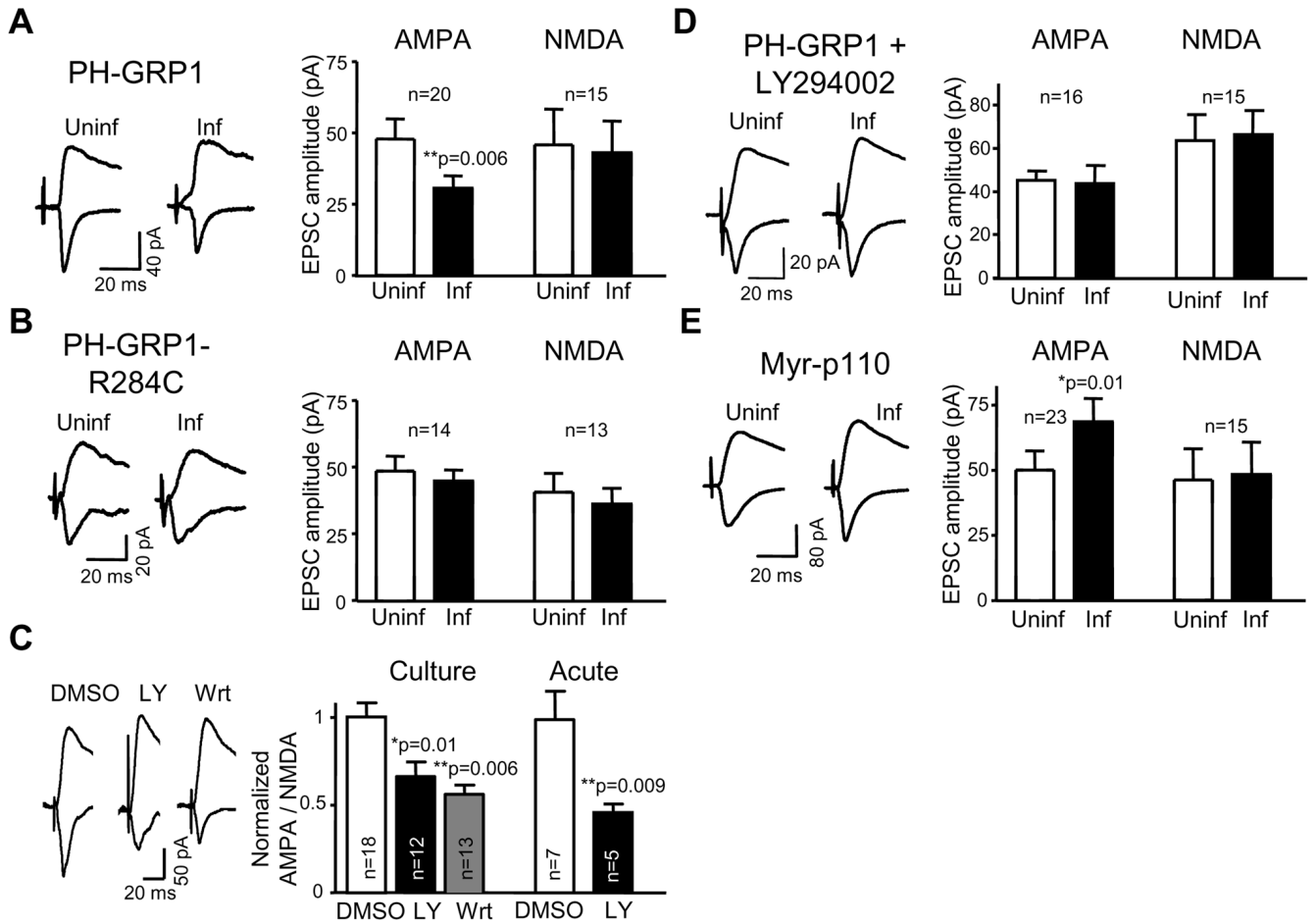
7. Qin Y, et al. State-dependent Ras signaling and AMPA receptor trafficking. *Genes Dev* 2005;19:2000–15. [PubMed: 16107614]
8. Horne EA, Dell'Acqua ML. Phospholipase C is required for changes in postsynaptic structure and function associated with NMDA receptor-dependent long-term depression. *J Neurosci* 2007;27:3523–34. [PubMed: 17392468]
9. Shepherd JD, Huganir RL. The cell biology of synaptic plasticity: AMPA receptor trafficking. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2007;23:613–43. [PubMed: 17506699]
10. Kennedy MJ, Ehlers MD. Organelles and trafficking machinery for postsynaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci* 2006;29:325–62. [PubMed: 16776589]
11. Vanhaesebroeck B, et al. Synthesis and function of 3-phosphorylated inositol lipids. *Annu Rev Biochem* 2001;70:535–602. [PubMed: 11395417]
12. Menager C, Arimura N, Fukata Y, Kaibuchi K. PIP3 is involved in neuronal polarization and axon formation. *J Neurochem* 2004;89:109–18. [PubMed: 15030394]
13. Jaworski J, Spangler S, Seeburg DP, Hoogenraad CC, Sheng M. Control of dendritic arborization by the phosphoinositide-3'-kinase-Akt-mammalian target of rapamycin pathway. *J Neurosci* 2005;25:11300–12. [PubMed: 16339025]
14. Kumar V, Zhang MX, Swank MW, Kunz J, Wu GY. Regulation of dendritic morphogenesis by Ras-PI3K-Akt-mTOR and Ras-MAPK signaling pathways. *J Neurosci* 2005;25:11288–99. [PubMed: 16339024]
15. Malinow R, Malenka RC. AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci* 2002;25:103–26. [PubMed: 12052905]
16. Gerges NZ, Backos DS, Rupasinghe CN, Spaller MR, Esteban JA. Dual role of the exocyst in AMPA receptor targeting and insertion into the postsynaptic membrane. *Embo J* 2006;25:1623–34. [PubMed: 16601687]
17. Tardin C, Cognet L, Bats C, Lounis B, Choquet D. Direct imaging of lateral movements of AMPA receptors inside synapses. *Embo J* 2003;22:4656–65. [PubMed: 12970178]
18. Klarlund JK, Tsiaras W, Holik JJ, Chawla A, Czech MP. Distinct polyphosphoinositide binding selectivities for pleckstrin homology domains of GRP1-like proteins based on diglycine versus triglycine motifs. *J Biol Chem* 2000;275:32816–21. [PubMed: 10913124]
19. Helms MN, et al. Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate mediates aldosterone stimulation of epithelial sodium channel (ENaC) and interacts with gamma-ENaC. *J Biol Chem* 2005;280:40885–91. [PubMed: 16204229]
20. Varnai P, et al. Selective cellular effects of overexpressed pleckstrin-homology domains that recognize PtdIns(3,4,5)P3 suggest their interaction with protein binding partners. *J Cell Sci* 2005;118:4879–88. [PubMed: 16219693]
21. Klippel A, et al. Membrane localization of phosphatidylinositol 3-kinase is sufficient to activate multiple signal-transducing kinase pathways. *Mol Cell Biol* 1996;16:4117–27. [PubMed: 8754810]
22. Wu L, Bauer CS, Zhen XG, Xie C, Yang J. Dual regulation of voltage-gated calcium channels by PtdIns(4,5)P2. *Nature* 2002;419:947–52. [PubMed: 12410316]
23. Tong Q, Gamper N, Medina JL, Shapiro MS, Stockand JD. Direct activation of the epithelial Na(+) channel by phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate and phosphatidylinositol 3,4-bisphosphate produced by phosphoinositide 3-OH kinase. *J Biol Chem* 2004;279:22654–63. [PubMed: 15028718]
24. Wenthold RJ, Petralia RS, Blahos J II, Niedzielski AS. Evidence for multiple AMPA receptor complexes in hippocampal CA1/CA2 neurons. *J Neurosci* 1996;16:1982–9. [PubMed: 8604042]
25. Collingridge GL, Olsen RW, Peters J, Spedding M. A nomenclature for ligand-gated ion channels. *Neuropharmacology* 2009;56:2–5. [PubMed: 18655795]
26. Malinow R, Mainen ZF, Hayashi Y. LTP mechanisms: from silence to four-lane traffic. *Curr Opin Neurobiol* 2000;10:352–7. [PubMed: 10851179]
27. Lu W, et al. Subunit composition of synaptic AMPA receptors revealed by a single-cell genetic approach. *Neuron* 2009;62:254–68. [PubMed: 19409270]
28. Shi S, Hayashi Y, Esteban JA, Malinow R. Subunit-specific rules governing AMPA receptor trafficking to synapses in hippocampal pyramidal neurons. *Cell* 2001;105:331–43. [PubMed: 11348590]

29. Hayashi Y, et al. Driving AMPA receptors into synapses by LTP and CaMKII: requirement for GluR1 and PDZ domain interaction. *Science* 2000;287:2262–7. [PubMed: 10731148]
30. Bats C, Groc L, Choquet D. The interaction between Stargazin and PSD-95 regulates AMPA receptor surface trafficking. *Neuron* 2007;53:719–34. [PubMed: 17329211]
31. Schnell E, et al. Direct interactions between PSD-95 and stargazin control synaptic AMPA receptor number. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:13902–7. [PubMed: 12359873]
32. Ehrlich I, Malinow R. Postsynaptic density 95 controls AMPA receptor incorporation during long-term potentiation and experience-driven synaptic plasticity. *J Neurosci* 2004;24:916–27. [PubMed: 14749436]
33. Stein V, House DR, Brecht DS, Nicoll RA. Postsynaptic density-95 mimics and occludes hippocampal long-term potentiation and enhances long-term depression. *J Neurosci* 2003;23:5503–6. [PubMed: 12843250]
34. Kopec CD, Li B, Wei W, Boehm J, Malinow R. Glutamate receptor exocytosis and spine enlargement during chemically induced long-term potentiation. *J Neurosci* 2006;26:2000–9. [PubMed: 16481433]
35. Tomita S, et al. Functional studies and distribution define a family of transmembrane AMPA receptor regulatory proteins. *J Cell Biol* 2003;161:805–16. [PubMed: 12771129]
36. Harris KM, Jensen FE, Tsao B. Three-dimensional structure of dendritic spines and synapses in rat hippocampus (CA1) at postnatal day 15 and adult ages: implications for the maturation of synaptic physiology and long-term potentiation. *J Neurosci* 1992;12:2685–705. [PubMed: 1613552]
37. Bridges RJ, Stanley MS, Anderson MW, Cotman CW, Chamberlin AR. Conformationally defined neurotransmitter analogues. Selective inhibition of glutamate uptake by one pyrrolidine-2,4-dicarboxylate diastereomer. *J Med Chem* 1991;34:717–25. [PubMed: 1671706]
38. Maki R, Robinson MB, Dichter MA. The glutamate uptake inhibitor L-trans-pyrrolidine-2,4-dicarboxylate depresses excitatory synaptic transmission via a presynaptic mechanism in cultured hippocampal neurons. *J Neurosci* 1994;14:6754–62. [PubMed: 7965076]
39. Li S, et al. Soluble oligomers of amyloid Beta protein facilitate hippocampal long-term depression by disrupting neuronal glutamate uptake. *Neuron* 2009;62:788–801. [PubMed: 19555648]
40. Isaacson JS, Nicoll RA. The uptake inhibitor L-trans-PDC enhances responses to glutamate but fails to alter the kinetics of excitatory synaptic currents in the hippocampus. *J Neurophysiol* 1993;70:2187–91. [PubMed: 7905032]
41. Horwood JM, Dufour F, Laroche S, Davis S. Signalling mechanisms mediated by the phosphoinositide 3-kinase/Akt cascade in synaptic plasticity and memory in the rat. *Eur J Neurosci* 2006;23:3375–84. [PubMed: 16820027]
42. Sutton G, Chandler LJ. Activity-dependent NMDA receptor-mediated activation of protein kinase B/Akt in cortical neuronal cultures. *J Neurochem* 2002;82:1097–105. [PubMed: 12358757]
43. Elias GM, et al. Synapse-specific and developmentally regulated targeting of AMPA receptors by a family of MAGUK scaffolding proteins. *Neuron* 2006;52:307–20. [PubMed: 17046693]
44. Zimmermann P. The prevalence and significance of PDZ domain-phosphoinositide interactions. *Biochim Biophys Acta* 2006;1761:947–56. [PubMed: 16884951]
45. Heo WD, et al. PI(3,4,5)P3 and PI(4,5)P2 lipids target proteins with polybasic clusters to the plasma membrane. *Science* 2006;314:1458–61. [PubMed: 17095657]
46. Jin W, et al. Lipid binding regulates synaptic targeting of PICK1, AMPA receptor trafficking, and synaptic plasticity. *J Neurosci* 2006;26:2380–90. [PubMed: 16510715]
47. Campbell RE, et al. A monomeric red fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:7877–82. [PubMed: 12060735]
48. Phend KD, Rustioni A, Weinberg RJ. An osmium-free method of epon embedment that preserves both ultrastructure and antigenicity for post-embedding immunocytochemistry. *J Histochem Cytochem* 1995;43:283–92. [PubMed: 7532656]



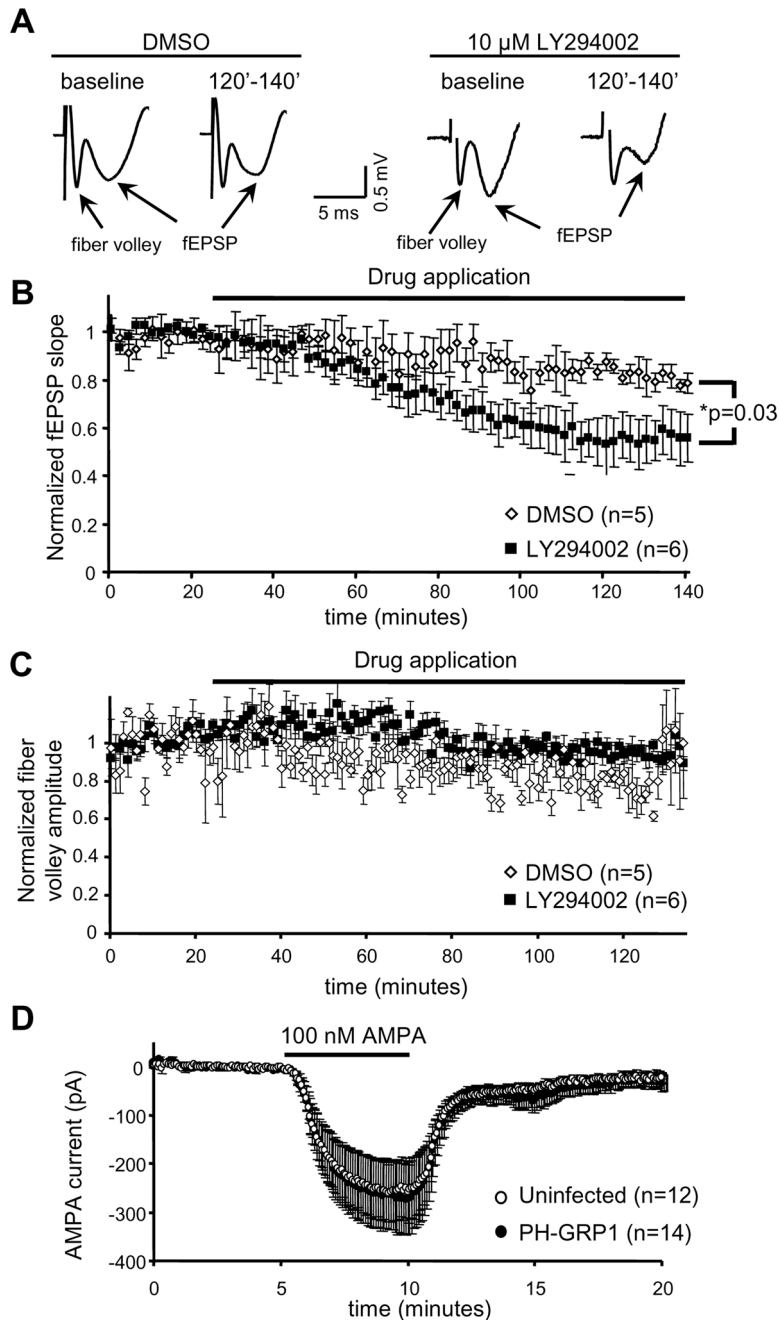
**Figure 1. Expression of PH-GRP1 in hippocampal neurons and specific binding to PIP<sub>3</sub>**  
**A** Expression of PH-GRP1-GFP in the soma, dendrites, and dendritic spines (inset) of CA1 pyramidal neurons in organotypic cultures. **B** Protein extracts from hippocampal slices expressing GFP (lanes 1, 4–6), GFP-PH-PLC (lanes 2, 7–9), or GFP-PH-GRP1 (lanes 3, 10–12) were incubated with agarose beads (Echelon) covalently linked to PIP<sub>2</sub> (lanes 5, 8, 11), PIP<sub>3</sub> (lanes 6, 9, 12), or control beads (lanes 4, 7, 10). Pull down fractions were analyzed by western blot with anti-GFP antibody (Roche). Input extracts: lanes 1–3. **C**. Similar extracts to those used in (B) were incubated with membranes spotted with an array of different phospholipids and phosphoinositides (see <http://echelon-inc.com> for a full list of lipid abbreviations). Membrane bound fractions were visualized with anti-GFP (Roche). **D**.

Representative example of BHK cells expressing GFP-PH-GRP1 before (left) and after (right) stimulation with peroxyvanadate (5 min incubation with 30  $\mu$ M peroxide, 100  $\mu$ M orthovanadate). Line plots show quantification of fluorescence intensity across the cell. Note accumulation of GFP-PH-GRP1 at the cell edge (plasma membrane) after stimulation.



**Figure 2. Bidirectional modulation of AMPA-receptor mediated currents by PIP<sub>3</sub>**

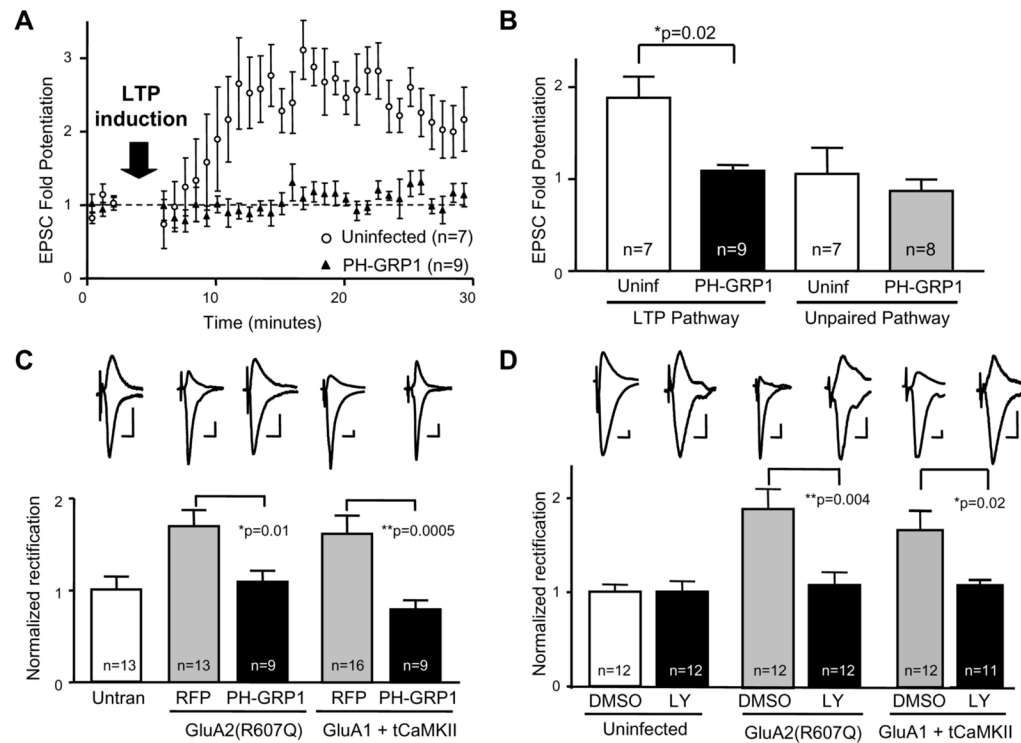
**A, B, D, E** Comparison of evoked synaptic responses from pairs of neighboring CA1 neurons expressing PH-GRP1 (**A, D**), PH-GRP1-R284C (**B**) or Myr-p110 (**E**), and control (uninfected) neurons recorded at  $-60$  mV (AMPA EPSCs) and  $+40$  mV (NMDAR EPSCs). Some slices were pre-treated for 1 hour with  $10 \mu\text{M}$  LY-294002 (**D**). Example traces from uninfected and infected neurons are shown on the left for all panels. “n” represents number of cell pairs. Statistical significance was calculated according to the Wilcoxon test for paired data (individual pairs of infected *versus* uninfected cells). **C**. Comparison of evoked synaptic responses from CA1 neurons pre-treated for 1 hour with  $10 \mu\text{M}$  LY-294002 (“LY”) or  $100$  nM wortmannin (“Wrt”) or with the vehicle control ( $0.05\%$  DMSO). The AMPA/NMDA ratio is calculated from the size of the AMPAR- and NMDAR-mediated responses recorded at  $-60$  mV and  $+40$  mV, respectively. Experiments were carried out on organotypic cultured slices (left histogram) or on acute slices (14 days postnatal; right histogram). Representative traces are shown on the left. “n” represents number of cells; “p” values were calculated according to the Mann-Whitney test. In all cases, error bars represent s.e.m.



**Figure 3. Inhibition of PIP<sub>3</sub> synthesis produces a slow and gradual depression of AMPA receptor-mediated transmission**

A. Examples of evoked field excitatory postsynaptic potentials (fEPSP) obtained from hippocampal slices 5–25 minutes before (“baseline”) or 120–140 minutes after (“120–140”) treatment with DMSO (left) or 10  $\mu$ M LY294002 (right). Presynaptic fiber volleys and fEPSPs are indicated with arrows. **B.** Time course of the slope of fEPSP responses from hippocampal slices treated with 10  $\mu$ M LY294002 (black symbols) or DMSO (white symbols) (drug application is shown with a black bar). Values are normalized to the average slope before drug application. “n” represents number of slices. Statistical significance for the comparison between DMSO- and LY294002-treated slices was done according to the Mann-Whitney test.

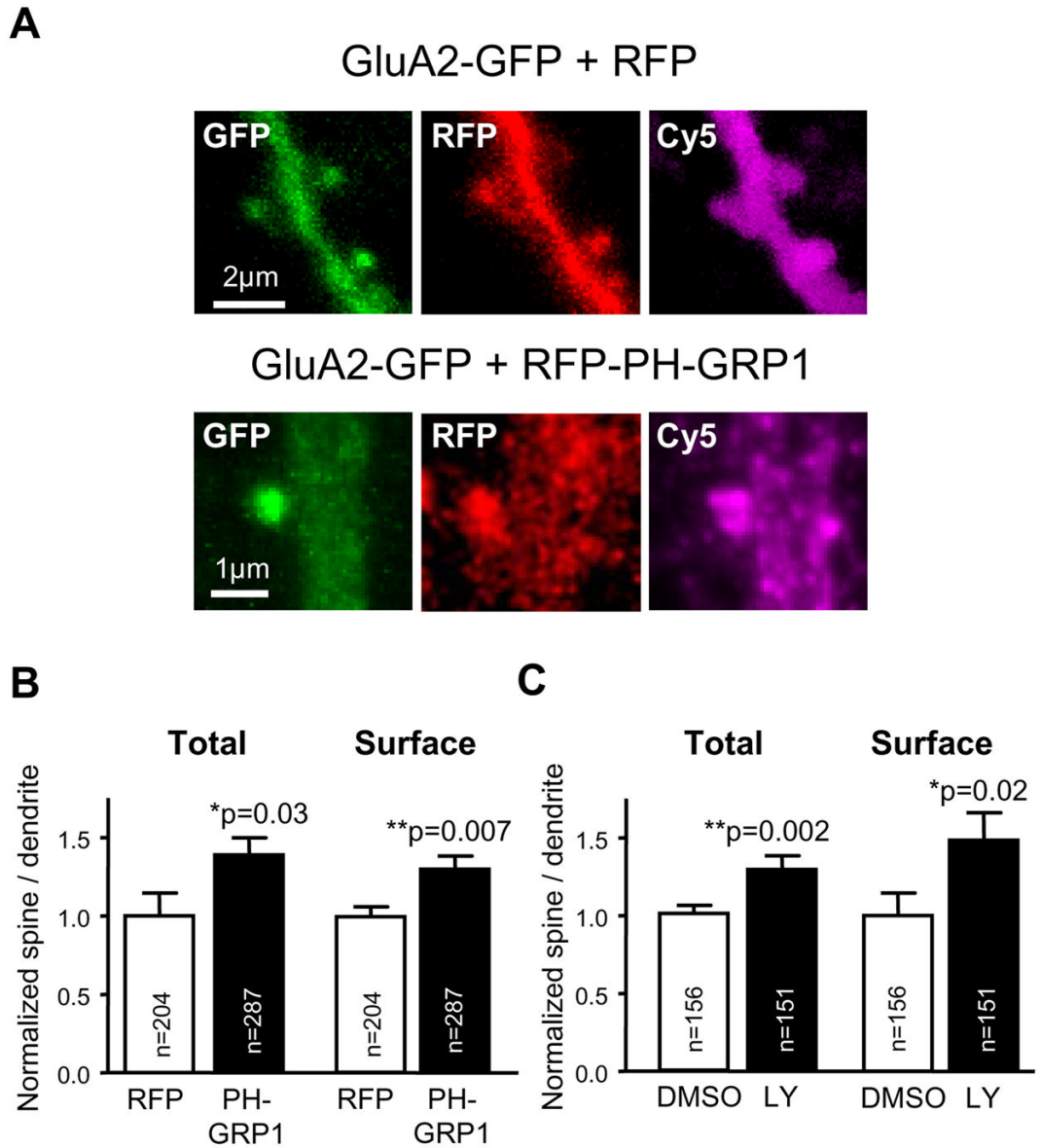
**C.** The amplitude of the presynaptic fiber volley was analyzed from the experiments shown in **B.** Values are normalized to the average fiber volley amplitude before drug application. No significant change in fiber volley amplitude was observed over the time course. **D.** Time course of whole-cell currents recorded from CA1 pyramidal neurons infected with PH-GRP1 (black symbols) or uninfected control neurons (white symbols) during the application of 100 nM AMPA (bar). “n” represents number of cells. In all cases, error bars represent s.e.m.



**Figure 4. PIP<sub>3</sub> is required for LTP and it affects both constitutively cycling and regulated populations of AMPA receptors**

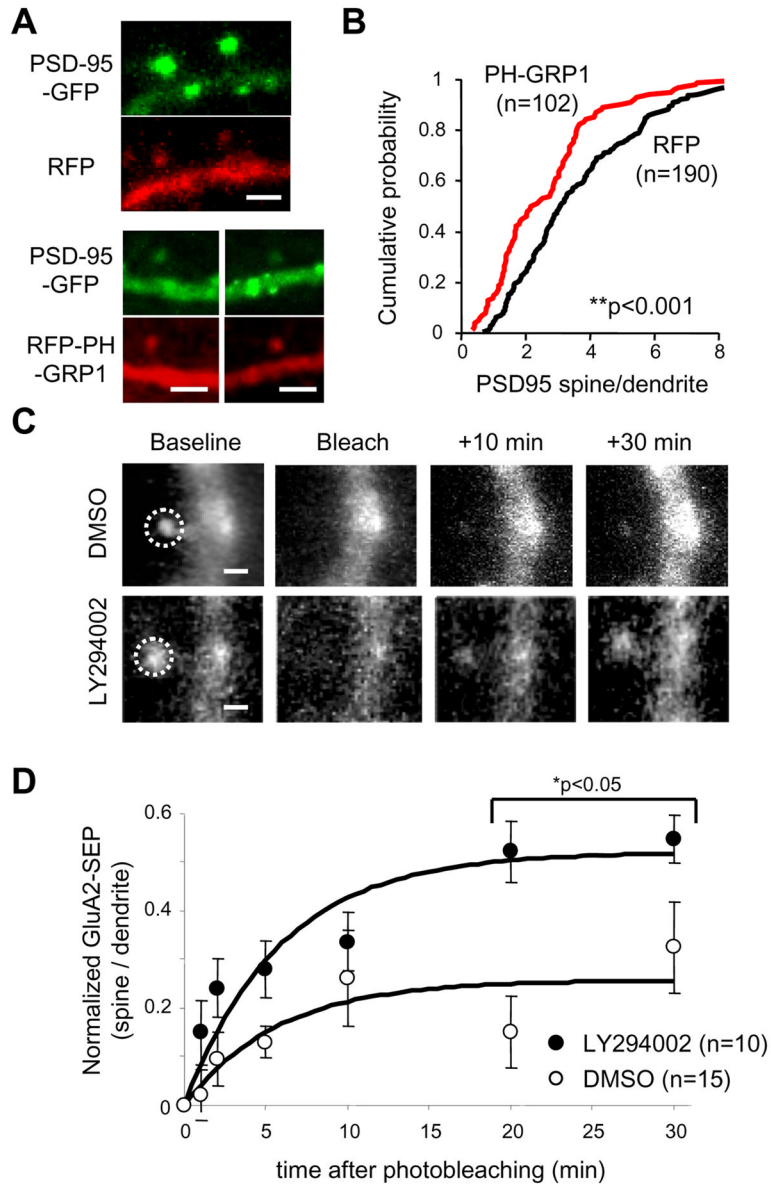
**A.** Time course of AMPAR-mediated synaptic responses before and after LTP induction (black arrow) in control (uninfected) CA1 neurons (white symbols) and in PH-GRP1-expressing cells (black symbols). **B.** Quantification of average synaptic potentiation (“LTP Pathway”) from the last 5 min of the time course shown in A. One of the stimulating electrodes was turned off during LTP induction (“Unpaired Pathway”). **C.** CA1 neurons were transfected with different combinations of GluA2(R607Q) or GluA1 plus constitutively active CaMKII (tCaMKII), together with RFP or RFP-PH-GRP1 coexpression, as indicated. Synaptic responses were evoked at  $-60$  mV and  $+40$  mV to quantify inward rectification. Rectification indexes were normalized to the average value obtained from untransfected cells ( $2.0 \pm 0.3$ ). Representative traces of the recordings are plotted above their respective columns in the graph (scale bars: 20 pA, 10 ms). **D.** Similar experiments as in C, with the indicated recombinant proteins and slices treated with 10  $\mu$ M LY294002 or DMSO (vehicle control) for 1 hour (LY294002 and DMSO were also present during the recordings). Rectification index for uninfected, DMSO-treated cell was  $2.4 \pm 0.2$ . Representative traces of the recordings are plotted above their respective columns in the graph (scale bars: 20 pA, 10 ms). In all cases, “n” stands for the number of cells, error bars represent s.e.m. and statistical significance was calculated according to the Mann-Whitney test.





**Figure 5. Depletion of PIP<sub>3</sub> leads to the accumulation of AMPA receptors in dendritic spines**  
**A** Representative confocal images of total receptor (“GFP”, green) and surface anti-GFP labeling (“Cy5”, purple) in dendritic spines from neurons expressing GluA2-GFP with RFP (top panels) or with RFP-PH-GRP1 (bottom panels). **B.** Quantification of fluorescence intensity at spines versus the adjacent dendritic shaft from neurons as those shown in A. “Total Receptor” (left) is quantified from GFP fluorescence, and “Surface Receptor” (right) from Cy5 signal. Values of spine/dendrite ratios are normalized to the control (RFP-expressing neurons). The actual (non-normalized) ratios for the control were (average  $\pm$  s.e.m.):  $1.15 \pm 0.2$  (total) and  $1.0 \pm 0.1$  (surface). “n” represents number of spines from 11 (GluA2 + RFP) or 25 (GluA2 + PH-GRP1) different neurons. Statistical significance was calculated according to t test. **C.** Neurons expressing GluA2-GFP were treated with 10  $\mu$ M LY294002 or DMSO (vehicle control) for 1 hour prior to fixation and imaging. Total and surface receptors are plotted as in B. Values of spine/dendrite ratios are normalized to the control (DMSO-treated neurons). The actual (non-normalized) values for the control were (average  $\pm$  s.e.m.):  $1.5 \pm 0.1$  (total),  $1.1$

$\pm 0.2$  (surface). “n” represents number of spines from 25 (DMSO) or 22 (LY294002) different neurons. Statistical significance was calculated according to t test.



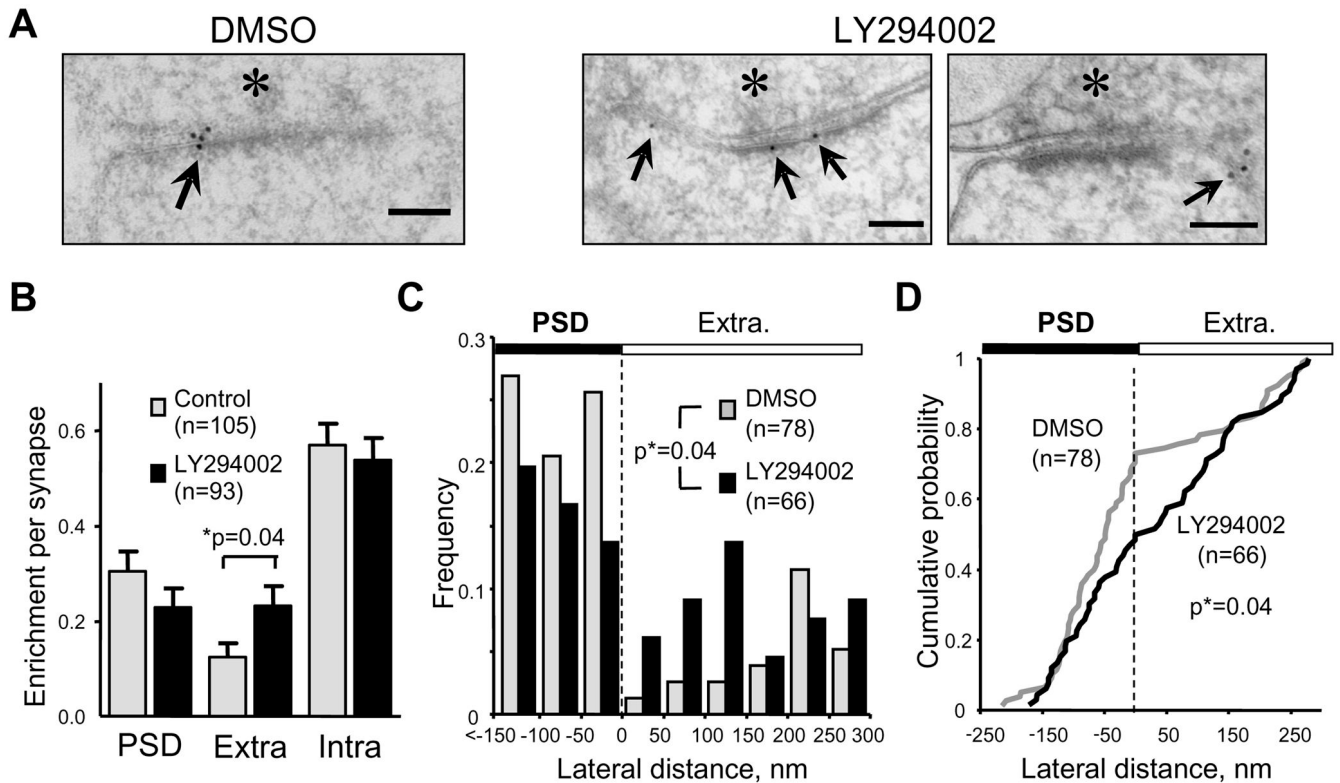
**Figure 6. Depletion of PIP<sub>3</sub> impairs PSD-95 accumulation in spines and increases surface mobility of GluA2 recombinant receptors**

**A.** Representative confocal images of dendritic spines from neurons expressing PSD-95-GFP (green images) with RFP (top panels) or with RFP-PH-GRP1 (bottom panels). **B.**

Quantification of fluorescence intensity at spines versus the adjacent dendritic shaft from neurons as those shown in A. “n” represents number of spines from 29 (PSD-95 + RFP) or 12 (PSD-95 + PH-GRP1) different neurons. Data are presented as cumulative distributions of spine/dendrite ratios (average spine/dendrite ratio  $\pm$  s.e.m. was  $3.7 \pm 0.15$  for PSD-95 + RFP, and  $2.6 \pm 0.15$  for PSD-95 + PH-GRP1). Statistical significance is calculated according to the Kolmogorov-Smirnov test. **C.** Examples of spines expressing GFP-GluA2, treated with either DMSO (vehicle) or 10  $\mu$ M LY49002 for 1 hour prior to undergoing a FRAP experiment. Representative images are shown before photobleaching (“Baseline”), right after photobleaching (“Bleach”) and at different times during fluorescence recovery, as indicated. Bleached regions are indicated with dashed circles in the “Baseline” panels. **D.** Quantification

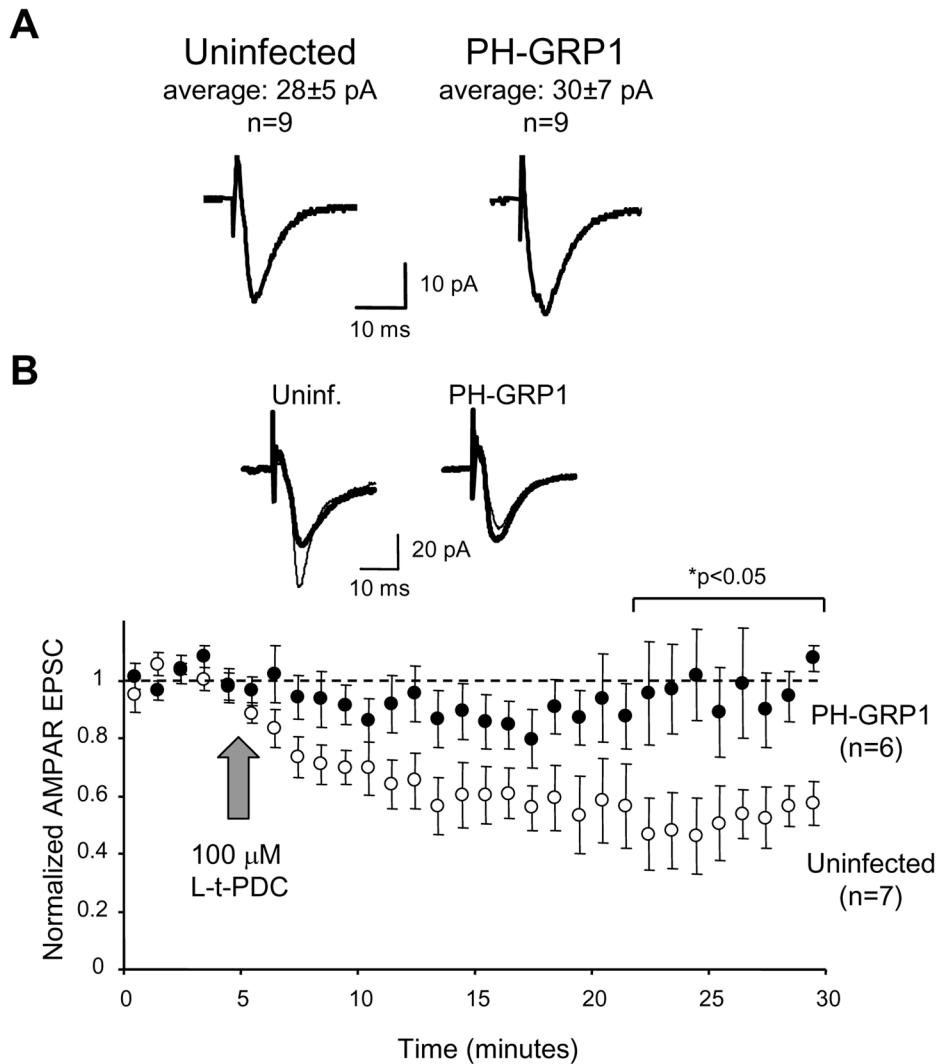
of normalized GluA2-SEP recovery over time. Error bars represent standard error of the mean. \*p<0.05, \*\*p<0.001.

of the amount of GluA2-GFP fluorescence at the spine normalized to the baseline value before photobleaching. Fluorescence intensity at the spine is normalized to the adjacent dendrite (spine/dendrite ratio) to compensate for ongoing photobleaching during image acquisition. Time courses obtained from DMSO- (white symbols) or LY294002-treated slices (black symbols) were fitted to single exponentials (solid lines). Best-fit parameters were:  $\tau=5.7$  min, amplitude=0.26 (DMSO);  $\tau=5.9$  min, amplitude=0.52 (LY294002). Correlation coefficients were 0.71 (DMSO) and 0.84 (LY294002). Error bars represent s.e.m.



**Figure 7. Depletion of PIP<sub>3</sub> causes a redistribution of AMPARs between the PSD and extrasynaptic membrane**

**A.** Examples of electron micrographs from CA1 excitatory synapses labeled with anti-GluA2 immunogold (arrows). Presynaptic terminals are indicated with asterisks. Slices were treated with either DMSO (vehicle) or 10  $\mu$ M LY294002 for 1 hour before fixation. Scale bars represent 100 nm. **B.** Quantification of GluA2 immunogold abundance at the PSD, the extrasynaptic membrane (“Extra”) or the intracellular space (“Intra”) from slices treated with DMSO (grey columns) or LY294002 (black columns). The number of gold particles at each compartment for a given synapse was divided by the total number of gold particles in that synapse. Average values  $\pm$  s.e.m. are plotted for each compartment. “n” represents number of synapses analyzed. Statistical significance is calculated with the Mann-Whitney test. **C.** Frequency histogram of the lateral distribution of GluA2 immunogold particles contained within the PSD or the extrasynaptic membrane. Lateral distances are calculated for individual gold particles with respect to the closest PSD edge, with negative distances for particles within the PSD and positive distances for particles within the extrasynaptic membrane. Only particles within 290 nm (average PSD length) were considered for this analysis. Values are plotted for DMSO- (grey) and LY294002-treated slices (black). “n” represents number of gold particles. Statistical significance was calculated with a  $\chi^2$  test (contingency table). **D.** The same values shown in C are plotted as cumulative distributions. “n” represents number of gold particles. Statistical significance is calculated with the Kolmogorov-Smirnov test.



**Figure 8. Inhibition of glutamate reuptake abolishes PH-GRP1-induced depression of AMPA receptor-mediated transmission**

**A.** Comparison of evoked AMPAR responses from pairs of neighboring CA1 neurons expressing PH-GRP1 and control (uninfected) neurons after treatment with 100  $\mu$ M L-trans-pyrrolidine-2,4-dicarboxylate (L-t-PDC). L-t-PDC was added to the slice cultures 30 min before starting the recordings, and was also present during the recordings. “n” represents number of cell pairs. Average amplitudes ( $\pm$ s.e.m.) of AMPAR responses from pairs of uninfected and infected neurons are indicated. **B.** Time course of AMPAR-mediated EPSCs from hippocampal CA1 neurons expressing PH-GRP1 (black symbols) or from control uninfected neurons (white symbols), in response to the addition of 100  $\mu$ M L-t-PDC (indicated with an arrow). Values are normalized to the average EPSC amplitude before drug application. “n” represents number of cells. Statistical significance for the comparison between uninfected and PH-GRP1-expressing neurons was done according to the Mann-Whitney test. Error bars represent s.e.m. Inset. Representative traces from a pair of uninfected and PH-GRP1-expressing neurons recorded simultaneously during drug application. Thin lines: average response before L-t-PDC application. Thick lines: average response from the last 5 min of the time course.

# The Balance between Receptor Recycling and Trafficking toward Lysosomes Determines Synaptic Strength during Long-Term Depression

Mónica Fernández-Monreal,<sup>1</sup> Tyler C. Brown,<sup>2</sup> María Royo,<sup>1</sup> and José A. Esteban<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa,” Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid 28049, Spain, and <sup>2</sup>Department of Pharmacology, University of Michigan Medical School, Ann Arbor, Michigan 48109

The strength of excitatory synaptic transmission depends partly on the number of AMPA receptors (AMPA receptors) at the postsynaptic surface and, thus, can be modulated by membrane trafficking events. These processes are critical for some forms of synaptic plasticity, such as long-term potentiation and long-term depression (LTD). In the case of LTD, AMPARs are internalized and dephosphorylated in response to NMDA receptor activation. However, the fate of the internalized receptors upon LTD induction and its relevance for synaptic function is still a matter of debate. Here we examined the functional contribution of receptor recycling versus degradation for LTD in rat hippocampal slices, and their correlation with receptor dephosphorylation. We observed that GluA1 undergoes sequential dephosphorylation and degradation in lysosomes after LTD induction. However, this degradation does not have functional consequences for the regulation of synaptic strength, and therefore, for the expression of LTD. In contrast, the partition of internalized AMPARs between Rab7-dependent trafficking (toward lysosomes) or Rab11-dependent endosomes (recycling back toward synapses) is the key factor determining the extent of synaptic depression upon LTD induction. This sorting decision is related to the phosphorylation status of GluA1 Ser845, the dephosphorylated receptors being those preferentially targeted for lysosomal degradation. Altogether, these new data contribute to clarify the fate of AMPARs during LTD and emphasize the importance of membrane sorting decisions to determine the outcome of synaptic plasticity.

## Introduction

AMPA-type glutamate receptors (AMPA receptors) are responsible for most synaptic transmission at excitatory synapses. These receptors can be inserted or removed from synapses in response to neuronal activity, leading to long-lasting changes in synaptic strength, such as long-term potentiation or long-term depression (LTD) (Malenka and Bear, 2004). Subunit composition, phosphorylation state of AMPAR subunits, and interaction with several scaffolding proteins are important for AMPAR localization, stabilization, and membrane trafficking (Sheng and Lee, 2001; Malinow and Malenka, 2002). This complex regulation suggests highly structured dynamics in the intracellular transport of these receptors. Indeed, endosomal trafficking is important for the synaptic sorting of AMPARs, whose functional compartmentalization is governed by multiple GTPases of the Rab family (Gerges et al., 2004; Brown et al., 2005, 2007). In particular, dur-

ing LTD, AMPARs are internalized by a Rab5-dependent mechanism (Brown et al., 2005). After endocytosis, AMPARs may follow two downstream pathways: recruitment to recycling endosomes for plasma membrane insertion or targeting to late endosomes en route to lysosomes for cargo degradation (Ehlers, 2000; Lin et al., 2000). However, the contribution of these alternative pathways to synaptic plasticity has not been directly evaluated. Thus, although lysosomal localization of AMPARs after LTD induction is well established (Ehlers, 2000; Lee et al., 2004), it is still unknown whether lysosomal-dependent degradation of AMPARs contributes to synaptic depression.

In this work, we show that the GluA1 subunit of AMPARs is degraded in lysosomes in an NMDA receptor (NMDAR)-dependent manner upon LTD induction in hippocampal slices. This degradation occurs preferentially on dephosphorylated receptors. However, lysosomal function is not required for LTD. Instead, sorting of internalized AMPARs via Rab7-driven late endosomes favors synaptic depression, whereas Rab11-dependent receptor recycling attenuates LTD expression. Therefore, our work demonstrates that driving AMPAR toward lysosomes is an important event for LTD as a membrane sorting decision, separable from the final enzymatic degradation of the receptor.

## Materials and Methods

**Material.** Chemicals were purchased from Sigma-Aldrich when not specified otherwise. AMPA and DL-APV were obtained from Tocris Biosciences. GluA1 antibodies were purchased from Abcam (intracellular epitope) and Millipore (surface epitope); antibody phospho-specific for Ser845 of GluA1 was from Affinity Bioreagents.

Received Jan. 5, 2012; revised July 3, 2012; accepted July 31, 2012.

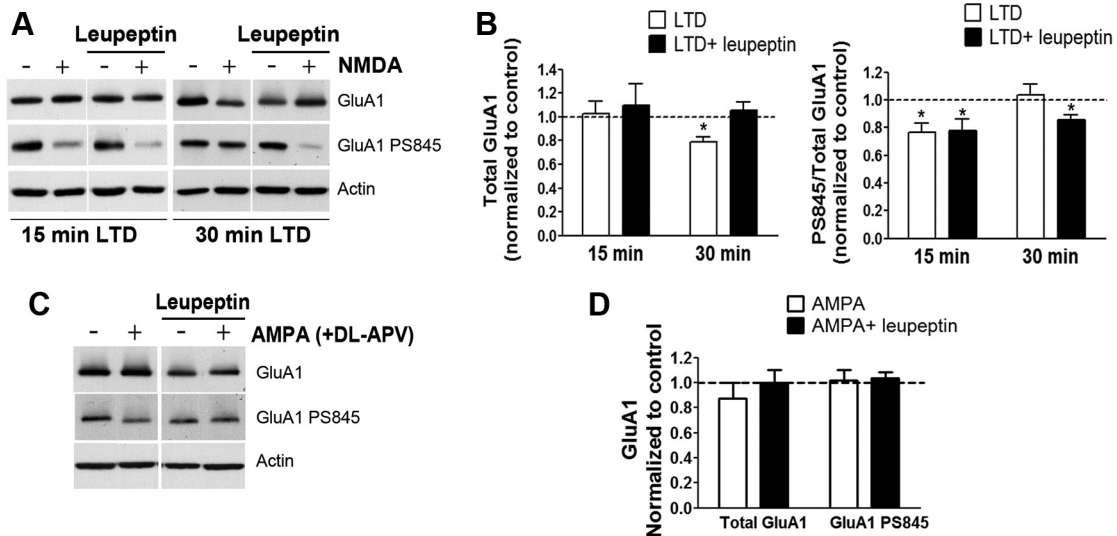
Author contributions: M.F.-M., T.C.B., and J.A.E. designed research; M.F.-M. and T.C.B. performed research; M.R. contributed unpublished reagents/analytic tools; M.F.-M. and T.C.B. analyzed data; M.F.-M. and J.A.E. wrote the paper.

This work was supported by grants from the Spanish Ministry of Science and Innovation (SAF-2008-04616, SAF-2009-05558-E, CSD-2010-00045 and SAF-2011-24730), Fundación Ramón Areces and Institute de France-NRI to J.A.E., and by the International Reintegration Grant from the European FP7 to M.F.-M. M.R. and M.F.-M. are supported by the Spanish National Research Council. We thank Marino Zerial for the Rab7 constructs.

Correspondence should be addressed to José A. Esteban, Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa,” Nicolás Cabrera 1, Madrid 28049, Spain. E-mail: jaesteban@cbm.uam.es.

T. C. Brown's present address: Department of Neuroscience, Brown University, Providence, Rhode Island 02912.  
DOI:10.1523/JNEUROSCI.0061-12.2012

Copyright © 2012 the authors 0270-6474/12/3213200-06\$15.00/0



**Figure 1.** AMPA receptors are degraded upon chemical LTD in lysosomes. **A**, Hippocampal slices were incubated with 20  $\mu$ M NMDA for 5 min (LTD) and protein extracts were analyzed by immunoblotting at different times (left, 15 min; right, 30 min) after treatment. Leupeptin (100  $\mu$ g/ml) was added in some slices 4 h before the experiment and was present during the NMDA treatment. **B**, Immunoblotting quantification for total GluA1 subunit and for phosphorylated GluA1 ( $n = 8$  for 15 min and  $n = 4$  for 30 min; \*significantly different from control,  $p < 0.05$ ). **C**, Hippocampal slices were treated with 100  $\mu$ M AMPA plus NMDA receptor inhibitor DL-APV (100  $\mu$ M) for 5 min, and analyzed by immunoblotting at 30 min after treatment. **D**, Quantification of total GluA1 and phosphorylated GluA1 ( $n = 4$ ).

**Hippocampal slice cultures.** Organotypic cultures were prepared from young Wistar rats of either sex (postnatal day 5–6) and placed on semi-porous membranes for 4–7 d. Expression of single recombinant proteins was performed with the Sindbis virus expression system (Malinow et al., 1999).

**Electrophysiology.** The recording chamber was perfused with the following (in mM): 119 NaCl, 2.5 KCl, 4 CaCl<sub>2</sub>, 4 MgCl<sub>2</sub>, 26 NaHCO<sub>3</sub>, 1 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 11 glucose, 0.1 picrotoxin, and 0.004 2-chloroadenosine, pH 7.4, gassed with 5% CO<sub>2</sub>/95% O<sub>2</sub>. Patch recording pipettes (3–6 M $\Omega$ ) were filled with the following (in mM): 115 cesium methanesulfonate, 20 CsCl, 10 HEPES, 2.5 MgCl<sub>2</sub>, 4 Na<sub>2</sub>ATP, 0.4 Na<sub>3</sub>GTP, 10 sodium phosphocreatine, and 0.6 EGTA, pH 7.25. Synaptic responses were evoked with bipolar electrodes using single-voltage pulses (200  $\mu$ s, up to 20 V). LTD was induced using a pairing protocol by stimulating Schaffer collateral fibers at 1 Hz (300 pulses) while depolarizing the postsynaptic cell to –40 mV.

**Hippocampal primary cultures.** Hippocampi were dissected from E18 rat embryos and cells dissociated with trypsin. Neurons were plated onto poly-L-lysine-coated coverslips and cultured in Neurobasal medium supplemented with B27 and glutamine. Cells were maintained at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>. Neurons were infected with Sindbis virus driving the expression of EGFP or Rab7-DN for 24 h.

**Extracellular staining of surface AMPA receptors and image analysis.** Neuronal cultures were washed and maintained for 30 min in an extracellular solution containing the following (in mM): 150 NaCl, 2 CaCl<sub>2</sub>, 5 KCl, 10 HEPES (pH 7.4), 30 glucose, and 0.001 tetrodotoxin. Neurons were untreated or treated for 5 min with 20  $\mu$ M NMDA plus 1  $\mu$ M glycine, and then fixed at different times with 4% paraformaldehyde plus 4% sucrose for 15 min on ice. Surface AMPA receptors were stained with an antibody directed against the N-terminal epitope of GluA1 (Millipore) without permeabilization. Images were acquired by laser-scanning confocal microscopy. Total fluorescence intensity from the maximum Z-projection was determined by ImageJ and normalized to total area of the neuron. Data presented are means  $\pm$  SEMs.

**GST pull-down.** Rab11-FIP2 was fused downstream from GST, expressed in BL21 star bacteria, and loaded onto glutathione beads (GE Healthcare). Pull-down controls were performed with 0.1 mM nonhydrolyzable GTP analog (GMP-PNP) or 1 mM GDP. Hippocampal extracts were prepared in homogenization buffer containing the following (in mM): 10 HEPES, 150 NaCl, 5 MgCl<sub>2</sub>, 1 DTT, 1% Triton X-100, and 5% glycerol. Extracts from each condition were incubated with GST

beads for 1.5 h at 4°C, followed by three washes in homogenization buffer.

**Statistical analyses.** All graphs represent average values  $\pm$  SEM. Statistical differences were calculated according to nonparametric tests. When significant differences were observed,  $p$  values for pairwise comparisons were calculated according to two-tailed Mann–Whitney tests (for unpaired data) unless otherwise noted, or Wilcoxon's tests (for paired data).

## Results

### Sequential dephosphorylation and lysosomal degradation of AMPARs upon LTD

Most of the evidence on lysosomal-dependent degradation of AMPARs during LTD has been obtained in primary neuronal cultures (Ehlers, 2000; Lee et al., 2004). Therefore, we started by investigating the degradation of the GluA1 subunit of AMPARs during long-term depression in hippocampal slices. To this end, we used a chemical protocol of LTD (c-LTD, 20  $\mu$ M NMDA, 5 min) that maximizes the number of synapses undergoing plasticity (Lee et al., 1998). We analyzed protein content and phosphorylation state by immunoblotting at different times after NMDA application. As shown in Figure 1, *A* and *B*, treatment with NMDA induced a significant degradation of GluA1 at 30 min, which is blocked by the inhibitor of lysosome degradation leupeptin (100  $\mu$ g/ml). This degradation is delayed in time, since it is not observable at 15 min. As dephosphorylation of the Ser845 of the GluA1 subunit is a hallmark of LTD (Lee et al., 1998), we monitored GluA1 phosphorylation in correlation with receptor degradation. We observed that this subunit is significantly dephosphorylated at 15 min, independent from lysosomal degradation. This result suggests that AMPAR dephosphorylation is an early event after c-LTD induction. Interestingly, GluA1 dephosphorylation is detectable at 30 min after c-LTD only if lysosomal degradation is blocked with leupeptin (Fig. 1*A,B*). This suggests that dephosphorylated receptors are preferentially targeted for degradation. Hence, GluA1 dephosphorylation at Ser845 appears to be a tag for lysosomal degradation.



Next, we tested whether dephosphorylation and degradation of GluA1 were specific for NMDAR activation, since direct activation of AMPARs (with AMPA) has also been shown to trigger receptor internalization (Ehlers, 2000). As shown in Figure 1, *C* and *D*, treatment with AMPA (100  $\mu$ M, 5 min, in the presence of 100  $\mu$ M DL-APV to prevent NMDAR activation) neither induced degradation nor dephosphorylation of GluA1 at 30 min of treatment. Altogether, these results suggest that during LTD, the GluA1 subunit of AMPAR undergoes an early dephosphorylation, which is correlated to the subsequent degradation of the receptor by lysosomes. These events are triggered by NMDAR activation, and are not a necessary consequence of ligand-induced receptor internalization.

#### Lysosomal degradation is not necessary for LTD expression

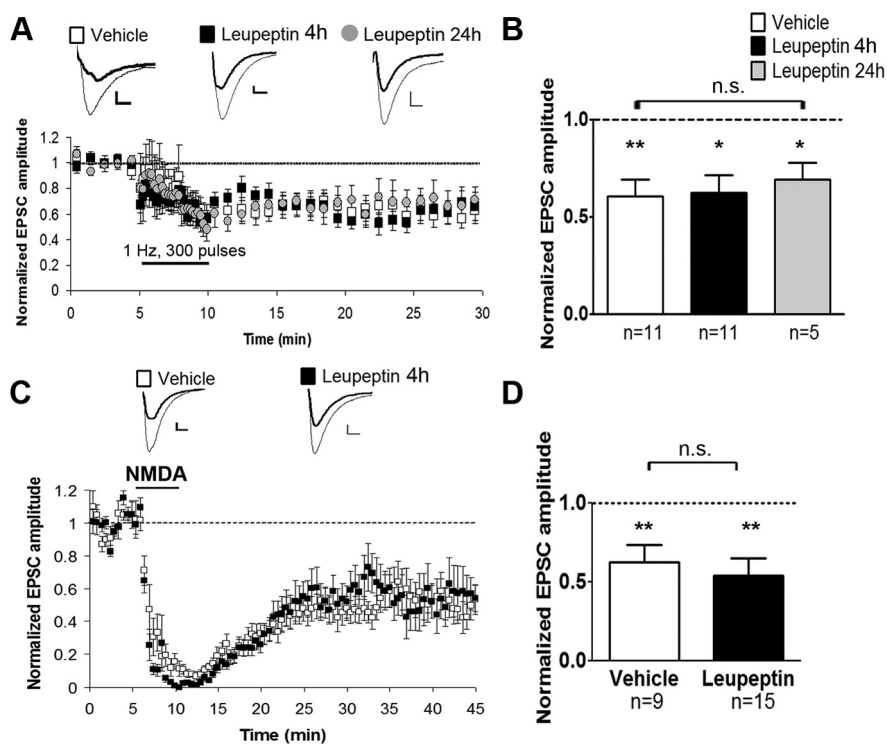
We tested whether AMPAR lysosomal degradation was important for synaptic plasticity using electrophysiological recordings. We induced LTD in the CA1 region of the hippocampus by stimulating Schaffer collaterals for 5 min at 1 Hz. This protocol produces a decrease in the EPSCs of  $\sim$ 40% from the baseline (Fig. 2*A,B*, Vehicle). Importantly, incubation of the slices with leupeptin (for 4 or 24 h, as indicated) had no effect on LTD (Fig. 2*A,B*; leupeptin was also present during the recordings), although these conditions were effective to suppress lysosomal-dependent degradation of AMPARs (Fig. 1*A,B*).

In addition, we tested c-LTD at electrophysiological level. As shown in Figure 2, *C* and *D*, no differences were found between slices treated and untreated with leupeptin during c-LTD. These results are virtually identical to those obtained with synaptic induction of LTD (Fig. 2*A,B*). Therefore, these combined data suggest that lysosomal degradation of AMPARs is not necessary for the functional expression of synaptic depression in hippocampal slices.

#### Membrane sorting toward lysosomes or recycling endosomes determines LTD expression

Targeting of membrane proteins for lysosomal degradation requires endosomal sorting mediated by small GTPases of the Rab family. Therefore, we explored whether the trafficking of AMPARs to lysosomes was important for LTD. For this purpose, we used a dominant negative (DN) version of the small-GTPase Rab7, which mediates the trafficking of target proteins to lysosomes from late-endosomes (Press et al., 1998). As shown in Figure 3, *A* and *B*, blockade of Rab7-dependent trafficking produced a significant reduction in LTD expression compared with control (uninfected) neurons. This result suggests that Rab7-driven trafficking of AMPARs to lysosomes is important for LTD expression.

We reasoned that recycling endosomes may constitute an alternative pathway for internalized AMPARs after LTD induction, as opposed to trafficking toward lysosomes. To evaluate the contribution of this pathway for synaptic depression, we induced

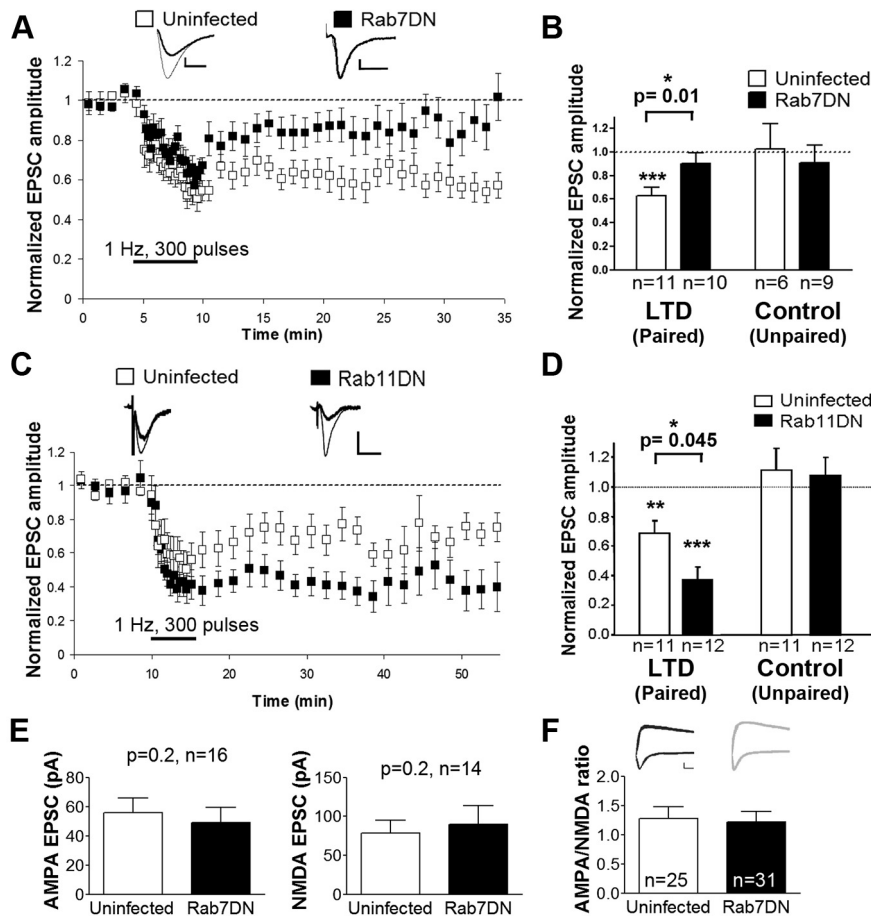


**Figure 2.** Degradation of AMPA receptors in lysosomes is not necessary for LTD expression. *A*, LTD (1 Hz, 300 pulses) was induced in control slices or in slices preincubated with leupeptin for 4 or 24 h, as indicated. Amplitude of synaptic responses during the experiment is normalized to a 5 min baseline. *B*, Average of AMPA receptor-mediated responses collected from the last 5 min of the recording and normalized to the baseline. *C*, c-LTD was induced in control slices and slices preincubated with leupeptin for 4 h. Amplitude of synaptic responses was normalized to a 5 min baseline. *D*, Average of AMPA receptor response collected from the last 5 min of recording and normalized to baseline. *A*, *C*, Insets, Sample traces averaged from baseline (thin lines) or from the last 5 min of recording (thick lines). Scale bars: vertical, 20 pA; horizontal, 5 ms. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .

LTD on CA1 hippocampal neurons expressing a dominant negative version of Rab11 (Rab11-DN), which blocks the transport of AMPARs from recycling endosomes to the postsynaptic compartment (Park et al., 2004; Brown et al., 2007). We observed a significant increase in LTD expression, compared with control neurons (Fig. 3*C,D*). This result suggests that a fraction of the internalized AMPARs upon LTD induction return to the synaptic membrane via Rab11-driven recycling endosomes.

Finally, we tested whether the overexpression of Rab7-DN affects basal transmission in hippocampal neurons. Simultaneous recordings were obtained from nearby pairs of CA1 neurons expressing Rab7-DN and control (uninfected) neurons. As shown in Figure 3, *E* and *F*, overexpression of Rab7-DN does not affect synaptic responses mediated by AMPA or NMDA receptors. Similar results were previously obtained with Rab11-DN-expressing neurons (Gerges et al., 2004). Therefore, semiacute (18–24 h) blockade of recycling (Rab11) or late (Rab7) endosomal trafficking does not alter basal excitatory synaptic transmission.

An important question about the endolysosomal trafficking of AMPARs during LTD is whether it is specific to the activation of synaptic or extrasynaptic NMDARs. The pharmacological approach used in Figure 1 was used to maximize the number of synapses undergoing plasticity and, therefore, increase the sensitivity to detect biochemical changes. We wanted to evaluate whether c-LTD displays the same dependence on Rab proteins as the synaptically induced one. As shown in Figure 4, *A–D*, this was the case for both Rab7 and Rab11: Rab7-DN attenuates c-LTD and Rab11-DN enhances it. These data reinforce the interpreta-



**Figure 3.** Degradation and recycling pathways of AMPA receptors are involved in LTD expression. **A**, LTD was induced in slices infected with Sindbis virus expressing the DN version of Rab7 or from uninfected slices. Amplitude of the synaptic responses is normalized to a 5 min baseline. Scale bars: vertical, 20 pA; horizontal, 5 ms. **B**, Average of AMPA receptor-mediated responses collected from the last 5 min of the recording and normalized to the baseline. Left bars (LTD, paired) correspond to the stimulation pathway in which postsynaptic depolarization (−40 mV) was paired to low-frequency stimulation (\*\*\*) significantly different from baseline,  $p < 0.005$ . Right bars (control, unpaired) correspond to the pathway that was not stimulated during depolarization. **C**, Same LTD experiment as in **A** from neurons infected with Sindbis virus expressing Rab11-DN or control (uninfected) neurons. Amplitude of the synaptic responses is normalized to a 10 min baseline. Scale bars: vertical, 20 pA; horizontal, 30 ms. **A**, **C**, Insets, Sample traces averaged from baseline (thin lines) or from the last 5 min of the recording (thick lines). **D**, Average of AMPA receptor-mediated responses collected from the last 5 min of the recording and normalized to the baseline. Left bars (LTD, paired) correspond to the stimulation pathway (\*significantly different from baseline,  $p < 0.05$ ; \*\*significantly different from baseline,  $p < 0.01$ ). **E**, Average of AMPA receptor- (left) and NMDA receptor- (right) mediated current amplitude (recorded at −60 mV and +40 mV, respectively) from pairs of uninfected and Rab7DN-expressing neurons. **F**, Comparison of evoked synaptic responses from uninfected and infected cells. AMPA/NMDA ratio is calculated from the size of the AMPAR- and NMDAR-mediated responses. Insets, Representative traces. Scale bars: vertical, 50 pA; horizontal, 10 ms.

tion that these two protocols of LTD induction are functionally equivalent, at least with respect to Rab-dependent trafficking and lysosomal degradation.

**Blocking Rab7-dependent trafficking increase the recycling of AMPA receptors to surface**

Our electrophysiological results suggest that after blocking the degradation pathway, internalized AMPARs are recycled back to the surface. To test this possibility, we monitored surface AMPARs in hippocampal neurons during LTD upon suppression of Rab7-dependent trafficking. As shown in Figure 4, *E* and *F*, there were no significant differences in the amount of surface receptors between EGFP and Rab7-DN-expressing neurons under basal conditions. In contrast, as shown in Figure 4, *E* and *G*, upon NMDA treatment, Rab7-DN expression increases AMPAR surface levels

at 15 and 30 min. These results are in agreement with the electrophysiological recordings from Figures 3*A* and 4*A*. These combined data are consistent with our interpretation of Rab7-DN blocking endolysosomal trafficking of internalized receptors, and therefore, favoring their recycling to the neuronal surface. Alternatively, it is also possible that Rab7-DN attenuates receptor endocytosis at late time points during LTD due to a general alteration in early endosomal trafficking.

**Rab11 activity levels are high and do not change during LTD**

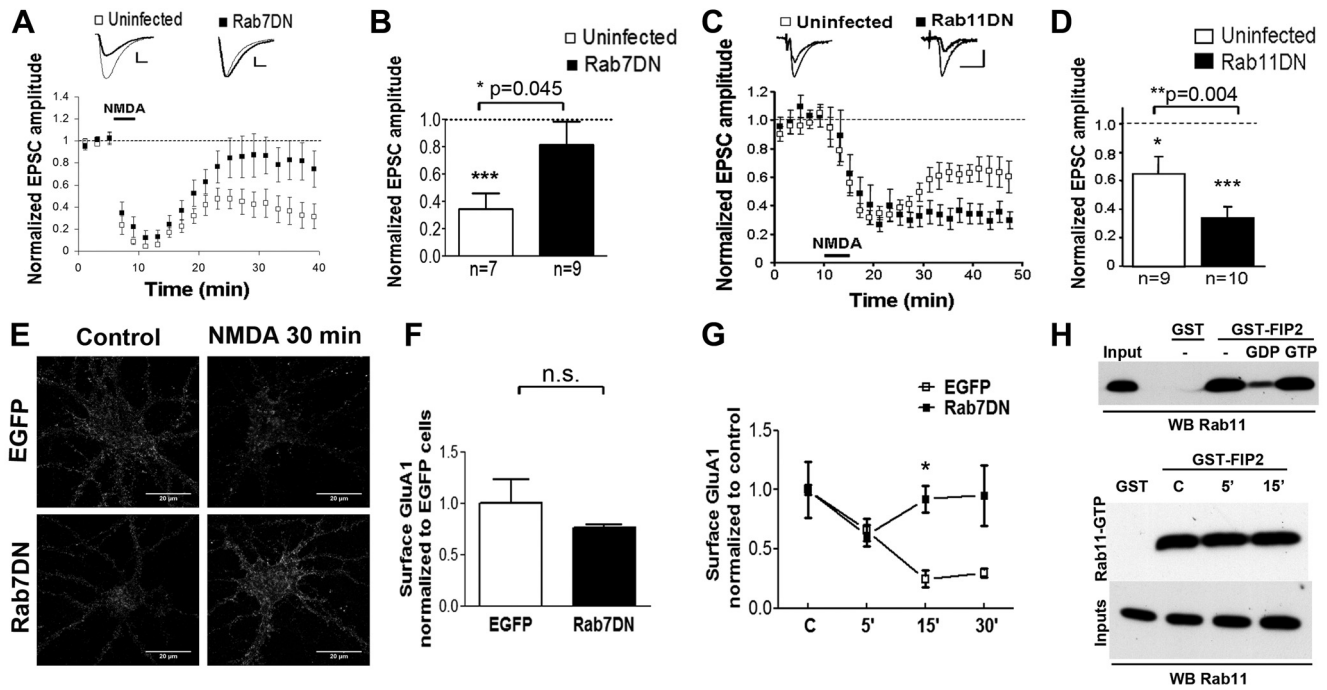
Finally, we determined whether Rab11 activity is altered during the recycling events taking place during LTD. To monitor the levels of active (GTP-bound) Rab11 during LTD induction, we designed a GST pull-down assay using the Rab11 effector protein Rab11-Family Interacting Protein2 (FIP2), which specifically binds Rab11-GTP (Junutula et al., 2004). To evaluate the specificity of the GST fusion protein, we preloaded hippocampal extracts with a nonhydrolyzable GTP analog or with GDP, followed by incubation with beads containing either GST alone or GST fused to FIP2 (GST-FIP2) (see Materials and Methods). As shown in Figure 4*H* (top), GST-FIP2 preferentially binds Rab11-GTP, with only a weak binding to Rab11-GDP. Interestingly, the amount of Rab11 pulled-down from untreated extracts (without nucleotide preloading) was comparable to the condition with nonhydrolyzable GTP, suggesting that hippocampal extracts contain high levels of active Rab11 under basal conditions.

We then evaluated Rab11 activation during LTD. We found that the amount of active (GTP-bound) Rab11 is not altered relative to untreated, control slices (Fig. 4*H*, middle). These results imply that basal Rab11 activity is sufficient to support the recycling of newly internalized

AMPA receptors back to the neuronal surface after LTD induction.

**Discussion**

These studies present a functional dissection of the postendocytic trafficking pathways of AMPARs and how the choice between receptor recycling and lysosomal targeting determines the extent of synaptic depression during LTD. Thus, a fraction of internalized AMPARs are driven via Rab11-dependent recycling endosomes back to the synaptic membrane, and therefore, this process contributes to attenuate synaptic depression. Conversely, some AMPARs traffic with Rab7-dependent late endosomes toward lysosomes. When this pathway is blocked (Rab7-DN), receptor recycling is favored and synaptic depression is decreased (although we cannot rule out an indirect impairment of receptor



**Figure 4.** Blocking Rab7-dependent trafficking to lysosomes increases recycling of AMPA receptors to the surface. **A, C**, LTD was chemically induced by bath incubation with NMDA (20  $\mu$ M) for 5 min in control slices and slices infected with Rab7-DN (**A**) or with Rab11-DN (**C**). Amplitude of synaptic responses was normalized to a 5 min baseline. Insets, Sample traces averaged from the baseline (thin lines) or from the last 5 min of the recording (thick lines). Scale bars: vertical, 20 pA; horizontal, 5 ms. **B, D**, Average of AMPA receptor response collected from the last 5 min of the time course and normalized to the baseline from the recordings shown in **A** and **C** (significantly different from baseline: \*\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$ ). **E**, Representative images of surface GluA1 immunostaining of hippocampal neurons infected with Sindbis virus driving the expression of EGFP or Rab7-DN, untreated (control) or treated with 20  $\mu$ M NMDA for 5 min plus 30 min of washout. **F**, Quantification of surface AMPA receptors under basal conditions from neurons infected with virus expressing EGFP or Rab7-DN. **G**, Time course quantification of surface GluA1 from neurons infected with virus expressing EGFP or Rab7-DN during c-LTD. \*Significantly different from EGFP infected neurons,  $p < 0.05$ . **H**, Top, Western blot of Rab11 pulled-down with GST or GST fused to FIP2 (GST-FIP2) from hippocampal extracts. Extracts were preloaded with nonhydrolyzable GTP or with GDP, or left untreated, as indicated. Ten percent of the extract was loaded as reference (left lane, input). Middle, Analysis of Rab11 pulled-down with GST-FIP2. Extracts from some untreated slices were pulled-down with GST alone (left lane). Bottom, Ten percent of the total extracts corresponding to the middle panel. C: Untreated neurons; 5', 15', 30': minutes after NMDA treatment.

endocytosis with Rab7-DN due to a general alteration of early endosomal trafficking). Interestingly, although a fraction of AMPARs are effectively degraded at lysosomes after LTD induction, this enzymatic degradation is not required for depression. This suggests that transport of AMPARs via Rab7 is a no-return pathway that ensures receptor removal from the synaptic membrane, and therefore synaptic depression, regardless from lysosomal action.

Whether AMPARs are degraded after activity-dependent endocytosis and its role in LTD have been controversial questions the last decade. Using primary neuronal cultures, it has been reported that AMPARs follow alternative sorting pathways depending on whether AMPARs or NMDARs are activated (Ehlers, 2000; Lee et al., 2004). In contrast, another report using acute hippocampal slices from adult mice failed to detect AMPA receptor degradation upon pharmacological NMDA receptor activation (Delgado et al., 2007). Our work helps to clarify this issue by determining the relative contribution of recycling versus endolysosomal pathways to synaptic depression. Indeed, our data suggest that AMPARs partition  $\sim 50\%$  into these two pathways after LTD induction, because blockade of receptor recycling approximately doubles synaptic depression, whereas interfering with lysosomal trafficking almost abolishes LTD.

An important corollary of this work is that AMPAR lysosomal degradation is observable after LTD induction in hippocampal slices (but see Delgado et al., 2007). However, we have revealed that lysosome enzymatic action is in fact not relevant for synaptic depression, because leupeptin incubation blocks receptor degra-

degradation but does not alter LTD expression. In a sense, these results are reminiscent on the role of protein ubiquitination for LTD, where postendocytic trafficking may play the dominant role (Lussier et al., 2011), rather than enzymatic degradation by the proteasome (Citri et al., 2009). Obviously, this interpretation does not preclude a role for ubiquitin-dependent degradation of other proteins in synaptic depression, as it has been described for PSD-95 (Colledge et al., 2003), although this issue remains controversial (Xu et al., 2008; Bhattacharyya et al., 2009).

The existence of a point of choice between receptor recycling and lysosomal trafficking opens the possibility that the relative weight of these two alternative pathways may be modulated to adjust the final outcome of synaptic depression under different circumstances. We have not fully explored this possibility. However, the correlation we have observed between GluA1 phosphorylation and receptor degradation does suggest that this point of choice is in fact a regulated one. GluA1 dephosphorylation at Ser845 is a hallmark of AMPAR regulation during LTD (Lee et al., 1998). While monitoring the phosphorylation state of GluA1 during LTD, we observed that receptor dephosphorylation is only detected transiently (at 15 min, but not at 30 min), unless lysosomal function was blocked with leupeptin. Therefore, prevention of receptor degradation unmasked an accumulation of dephosphorylated GluA1 after LTD induction. This suggests that dephosphorylated receptors are preferentially degraded by the lysosome, or in other words, dephosphorylation of GluA1 Ser845 appears to be a tag to direct AMPARs to lysosomal degradation during LTD. This is consistent with a previous report where

phosphomimetic mutations in GluA1 protected AMPAR from lysosomal degradation under basal conditions (Kessels et al., 2009). By controlling the partition between receptor recycling or degradation, protein phosphatases would play a crucial role in determining synaptic strength during LTD. This interpretation provides a mechanistic explanation for the requirement of protein phosphatase activity for LTD as it was originally described (Mulkey et al., 1993).

In summary, this work sheds light on the contribution of postendocytic trafficking of AMPARs to LTD, and shows for the first time that Rab7-dependent transport is required to drive receptors away from recycling endosomes, thereby preventing them from returning to the synaptic membrane.

## References

- Bhattacharyya S, Biou V, Xu W, Schlüter O, Malenka RC (2009) A critical role for PSD-95/AKAP interactions in endocytosis of synaptic AMPA receptors. *Nat Neurosci* 12:172–181.
- Brown TC, Tran IC, Backos DS, Esteban JA (2005) NMDA receptor-dependent activation of the small GTPase Rab5 drives the removal of synaptic AMPA receptors during hippocampal LTD. *Neuron* 45:81–94.
- Brown TC, Correia SS, Petrok CN, Esteban JA (2007) Functional compartmentalization of endosomal trafficking for the synaptic delivery of AMPA receptors during long-term potentiation. *J Neurosci* 27:13311–13315.
- Citri A, Soler-Llavina G, Bhattacharyya S, Malenka RC (2009) N-methyl-D-aspartate receptor- and metabotropic glutamate receptor-dependent long-term depression are differentially regulated by the ubiquitin-proteasome system. *Eur J Neurosci* 30:1443–1450.
- Colledge M, Snyder EM, Crozier RA, Soderling JA, Jin Y, Langeberg LK, Lu H, Bear MF, Scott JD (2003) Ubiquitination regulates PSD-95 degradation and AMPA receptor surface expression. *Neuron* 40:595–607.
- Delgado JY, Coba M, Anderson CN, Thompson KR, Gray EE, Heusner CL, Martin KC, Grant SG, O'Dell TJ (2007) NMDA receptor activation dephosphorylates AMPA receptor glutamate receptor 1 subunits at threonine 840. *J Neurosci* 27:13210–13221.
- Ehlers MD (2000) Reinsertion or degradation of AMPA receptors determined by activity-dependent endocytic sorting. *Neuron* 28:511–525.
- Gerges NZ, Backos DS, Esteban JA (2004) Local control of AMPA receptor trafficking at the postsynaptic terminal by a small GTPase of the Rab family. *J Biol Chem* 279:43870–43878.
- Junutula JR, Schonteich E, Wilson GM, Peden AA, Scheller RH, Prekeris R (2004) Molecular characterization of Rab11 interactions with members of the family of Rab11-interacting proteins. *J Biol Chem* 279:33430–33437.
- Kessels HW, Kopec CD, Klein ME, Malinow R (2009) Roles of stargazin and phosphorylation in the control of AMPA receptor subcellular distribution. *Nat Neurosci* 12:888–896.
- Lee HK, Kameyama K, Huganir RL, Bear MF (1998) NMDA induces long-term synaptic depression and dephosphorylation of the GluR1 subunit of AMPA receptors in hippocampus. *Neuron* 21:1151–1162.
- Lee SH, Simonetta A, Sheng M (2004) Subunit rules governing the sorting of internalized AMPA receptors in hippocampal neurons. *Neuron* 43:221–236.
- Lin JW, Ju W, Foster K, Lee SH, Ahmadian G, Wyszynski M, Wang YT, Sheng M (2000) Distinct molecular mechanisms and divergent endocytotic pathways of AMPA receptor internalization. *Nat Neurosci* 3:1282–1290.
- Lussier MP, Nasu-Nishimura Y, Roche KW (2011) Activity-dependent ubiquitination of the AMPA receptor subunit GluA2. *J Neurosci* 31:3077–3081.
- Malenka RC, Bear MF (2004) LTP and LTD: an embarrassment of riches. *Neuron* 44:5–21.
- Malinow R, Malenka RC (2002) AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci* 25:103–126.
- Malinow R, Hayashi Y, Maletic-Savatic M, Zaman SH, Poncer JC, Shi SH, Esteban JA, Osten P, Seidenman K (2010) Introduction of green fluorescent protein into hippocampal neurons through viral infection. *Cold Spring Harb Protoc* 2010:pdb.prot5406.
- Mulkey RM, Herron CE, Malenka RC (1993) An essential role for protein phosphatases in hippocampal long-term depression. *Science* 261:1051–1055.
- Park M, Penick EC, Edwards JG, Kauer JA, Ehlers MD (2004) Recycling endosomes supply AMPA receptors for LTP. *Science* 305:1972–1975.
- Press B, Feng Y, Hoflack B, Wandinger-Ness A (1998) Mutant Rab7 causes the accumulation of cathepsin D and cation-independent mannose 6-phosphate receptor in an early endocytic compartment. *J Cell Biol* 140:1075–1089.
- Sheng M, Lee SH (2001) AMPA receptor trafficking and the control of synaptic transmission. *Cell* 105:825–828.
- Xu W, Schlüter OM, Steiner P, Czervionke BL, Sabatini B, Malenka RC (2008) Molecular dissociation of the role of PSD-95 in regulating synaptic strength and LTD. *Neuron* 57:248–262.