

La via de la proteïna cinasa dependent de calci i calmodulina tipus II regula la síntesi i l'alliberament d'histamina cerebral durant la despolarització i forma part del mecanisme de transducció del receptor H3

Anna M. Torrent i Moreno

Memòria de la tesi doctoral presentada per Anna M. Torrent i Moreno per optar al grau de doctora en Bioquímica, per la Universitat Autònoma de Barcelona

Dipositada el 10 de juliol del 2003

Aquest treball ha estat realitzat sota la direcció dels doctors Isaac Blanco Fernández i Jordi Ortiz de Pablo, professors del Departament de Bioquímica i de Biologia Molecular, Unitat de Bioquímica, Facultat de Medicina, i l'Institut de Neurociències, de la Universitat Autònoma de Barcelona.

Directors de la tesi:

Dr Isaac Blanco Fernández
Catedràtic d'universitat

Dr Jordi Ortiz de Pablo
Professor ajudant

Doctoranda:

Anna M Torrent i Moreno

ABREVIACIONS	I
ÍNDIX DE FIGURES	III
ÍNDIX DE TAULES	IV
ABREVIACIONS I	I
INTRODUCCIÓ GENERAL	1
BREU INTRODUCCIÓ HISTÒRICA	1
ESTRUCTURA DE LA HISTAMINA	1
BIOSÍNTESI DE LA HISTAMINA EN EL CERVELL	2
TRANSPORT DE LA HISTIDINA	2
PROPIETATS DE LA HISTIDINA DESCARBOXILASA	2
REGULACIÓ DE LA SÍNTESI D'HISTAMINA EN EL CERVELL	4
EMMAGATZEMATGE DE LA HISTAMINA EN EL CERVELL	7
ALLIBERAMENT DE LA HISTAMINA EN EL CERVELL	9
INACTIVACIÓ I RECANVI DE LA HISTAMINA	9
CARACTERÍSTIQUES I LOCALITZACIÓ DE LES NEURONES HISTAMINÈRGIQUES	11
<i>Projecció de les neurones histaminèrgiques arreu del SNC.</i>	12
<i>Inputs de les neurones histaminèrgiques.</i>	14
ELS RECEPTORS DE LA HISTAMINA	16
<i>Receptors H1</i>	18
Mecanisme de transducció dels receptors H1	18
<i>Receptors H2</i>	20
Mecanisme de transducció dels receptors H2	20
<i>Receptors H4</i>	21
<i>Receptors H3</i>	23
Propietats moleculars dels receptors H3	23
Distribució dels receptors H3	24
Mecanisme de transducció dels receptors H3	26
Paper dels receptors H3 en altres sistemes de neurotransmissió	27
Farmacologia del receptor H3	28
Propietats terapèutiques potencials dels receptors H3	31
El son i la vigília. Els estats d'alerta	31
Els processos cognitius i de memòria	31
Trastorn d'hiperactivitat amb dèficit d'atenció (THDA)	32
Epilèpsia	32
Obesitat	33
OBJECTIUS	35
METODOLOGIA	37
1. PURIFICACIÓ DE LA [³ H]-HISTIDINA COMERCIAL	37
2. PREPARACIÓ DELS HOMOGENATS DE CERVELL	38
3. INCUBACIÓ DELS HOMOGENATS	38
4. PREPARACIÓ DELS MINIPRISMES D'ESCORÇA CEREBRAL	39
5. SÍNTESI I ALLIBERAMENT DE [³ H]-HISTAMINA EN ELS MINIPRISMES D'ESCORÇA CEREBRAL	39
6. ELIMINACIÓ DE L'EXCÉS DE [³ H]-HISTIDINA	41
7. PURIFICACIÓ DE LA [³ H]-HISTAMINA PER HPLC	42
8. PURIFICACIÓ DE LA HISTIDINA DESCARBOXILASA (HDC1/512)	47
9. DETECCIÓ PER IMMUNOBLOT DE LA HDC1/512	48

10. DETECCIÓ AUTORADIOGRÀFICA DE LA FOSFORILACIÓ PER PKA I PER CAMKII DE LA HDC1/512.....	49
11. DETERMINACIÓ DE L'ACTIVITAT HDC1/512	50
12. QUANTIFICACIÓ DE PROTEÏNES	51
13. TRACTAMENT DE LES DADES	51
RESULTATS	53
1. POSADA A PUNT DEL MÈTODE RADIOISOTÒPIC PER A LA DETERMINACIÓ DE LA SÍNTESI D'HISTAMINA EN HOMOGENATS I MINIPRISMES	53
1.1. <i>Introducció</i>	53
1.2. <i>Optimització de la sensibilitat del mètode radioisotòpic</i>	54
1.3. <i>Determinació de la repetitivitat del mètode</i>	55
1.4. <i>Linealitat de l'activitat HDC en funció de la quantitat de proteïna i del temps d'incubació</i>	56
1.5. <i>Determinació de l'especificitat de l'activitat HDC</i>	57
2. ACTIVACIÓ DE LA SÍNTESI D'HISTAMINA PER L'ENTRADA DE CALCI EN MINIPRISMES D'ESCORÇA CEREBRAL DE RATA	58
2.1. <i>Introducció</i>	58
2.2. <i>Efecte de la inhibició dels CCAV sobre l'activació de la síntesi d'HA per despolarització</i>	58
2.3. <i>Efecte de la despolarització per 30mM K⁺ i de l'ionòfor de calci ionomicina sobre la síntesi d'HA</i>	60
2.4. <i>Efecte de l'activació i de la inhibició de la PKC sobre la síntesi d'HA</i>	61
2.5. <i>Efecte de la inhibició de la calmodulina (CaM) i de la proteïna cinasa dependent de calci-calmodulina tipus II (CaMkII)</i>	62
3. ESTUDI DE LA INTERACCIÓ ENTRE LES VIES DE L'AC/PKA I CALCI/CAMKII EN LA REGULACIÓ DE LA SÍNTESI D'HA EN MINIPRISMES D'ESCORÇA CEREBRAL.....	63
3.1. <i>Introducció</i>	63
3.2. <i>Estimulació de la síntesi d'HA per l'augment d'AMPc (per ibmx) i per l'entrada de calci (per 30mM K⁺) simultàniament</i>	64
3.3. <i>Efecte de l'ibmx en presència d'inhibidors dels CCAV i de la CaMkII</i>	65
4. EFECTES DE LA INCUBACIÓ DE L'HDC AMB LA CAMKII I/O LA PKA EN CONDICIONS FOSFORILANTS	66
4.1. <i>Introducció</i>	66
4.2. <i>Fosforilació de l'HDC1/512 per PKA</i>	67
4.3. <i>Fosforilació de l'HDC1/512 per CaMkII</i>	68
4.4. <i>Activació de l'HDC per fosforilació</i>	69
5. ESTUDI DEL PAPER DEL CALCI EN LA REGULACIÓ DE LA SÍNTESI D'HA A TRAVÉS DELS RECEPTORS H3 EN MINIPRISMES D'ESCORÇA CEREBRAL.....	71
5.1. <i>Introducció</i>	71
5.2. <i>Estudi de les vies d'inhibició de la síntesi d'HA per l'agonista del receptor H3 imetit</i>	71
5.3. <i>Estudi de les vies d'activació de la síntesi d'HA per l'antagonista i agonista invers del receptor H3 tioperamida</i>	73
6. PARTICIPACIÓ DE LA CAMKII EN L'ALLIBERAMENT D'HISTAMINA PER DESPOLARITZACIÓ EN MINIPRISMES D'ESCORÇA CEREBRAL.....	76
6.1. <i>Introducció</i>	76
6.2. <i>Efecte de la inhibició dels CCAV tipus N sobre l'alliberament d'HA estimulada per 30mM K⁺</i>	78

6.3. Efecte de la inhibició de la PKC sobre l'alliberament d'HA estimulada per 30 mM de K ⁺	79
6.4. Efecte de la inhibició de la CaM i la CaMkII sobre l'alliberament d'HA estimulada per 30mM K ⁺	80
DISCUSSIÓ.....	81
1. DESENVOLUPAMENT D'UN NOU MÈTODE RADIOISOTÒPIC PER A LA DETERMINACIÓ DE LA SÍNTESI D'HA	81
2. MODULACIÓ DE LA SÍNTESI D'HA PER L'ENTRADA DE CALCI EXTRACEL·LULAR	82
3. LA CAMKII ACTIVA LA SÍNTESI D'HA DURANT LA DESPOLARITZACIÓ	84
4. LA SÍNTESI D'HA EN MINIPRISMES D'ESCORÇA CEREBRAL ES REGULA INDEPENDENTMENT PER LA VIA DEL CALCI/CAMKII I PER LA VIA DE L'AC/PKA	86
5. FOSFORILACIÓ I ACTIVACIÓ DE LA HDC PER CAMKII I PKA	87
6. PARTICIPACIÓ DEL CALCI COM A SEGON MISSATGER EN EL MECANISME DE TRANSDUCCIÓ DEL RECEPTOR H ₃	88
7. MECANISMES DE REGULACIÓ DE L'ALLIBERAMENT D'HA DURANT LA DESPOLARITZACIÓ	92
CONCLUSIONS.....	97
BIBLIOGRAFIA	99

ABREVIATURES

α -FMH:	alfa-fluorometil histidina, inhibidor de la HDC
5-HT:	5-hidroxitriptamina
AC:	adenilat ciclase
AIP:	pèptid inhibidor autocamptide miristoilat, inhibidor de la CaMkII
AMPc:	adenosina 3',5'-monofosfat cíclica
ANOVA:	anàlisi de la variació
CaM:	calmodulina
CaMkII:	proteïna cinasa dependent de calci i calmodulina
CCAV:	canals de calci activats per voltatge
DAG:	diacilglicerol
DTT:	ditiotretitol
H1, H2, H3, H4:	receptors de la histamina
HA:	histamina
HDC:	histidina descarboxilasa
His:	histidina
HMT:	histidina metiltransferasa
HPLC:	cromatografia líquida d'elevada resolució
ibmx:	3-isobutil-1-metilxantina, inhibidor de les PDE
imetit:	5-[2-(imidazol-4-il)etil]isotiourea, agonista H3
IP3:	inositol-1,4,5- trifosfat
Km:	constant de Michaelis-Menten
KN-62:	1-[N,O-bis-(5-isoquinolinesulfonil)-N-metil-L-tirosil]-4-fenilpiperazina, inhibidor de la CaMkII
MAO:	monoaminoxidasa
metHA:	metilhistamina
MKR:	medi bicarbonat Krebs Ringer
nTM:	nuclis tuberomamil·lars de l'hipotàlem
PDE:	fosfodiesterases
PEG:	polietilenglicol

PKA:	proteïna cinasa dependent d'AMPc
PKC:	proteïna cinasa C
PKI 14-22:	inhibidor 14-22 amida de la PKA
PLC:	fosfolipasa C
PLP:	piridoxal-5-fosfat
SAM:	S-adenosil metionina
SDS-PAGE:	electroforesi desnaturalitzant en SDS
SNC:	sistema nerviós central
TCA:	àcid tricloracètic
TH:	tirosina hidroxilasa
THDA:	trastorn d'hiperactivitat amb dèficit d'atenció
Tioperamida:	N-ciclohexil-4-(imidazol-4-il)-1-piperidinacarbotoamina, antagonista/agonista invers H3
TPA:	tetradecanoil forbol acetat
TPH:	triptòfan hidroxilasa
Vmax:	velocitat màxima
W-13:	N-(4-aminobutil)-5-cloro-2naftalenosulfonamida, inhibidor de la calmodulina

ÍNDEX DE FIGURES

Figura 1.1. La histamina amb les seves formes tautomèriques	1
Figura 1.2. Síntesi i metabolisme de la HA	6
Figura 1.3. Seqüència de nucleòtids i d'aminoàcids del clon d'HDC-18. El nombre de residus aminoacídics i de nucleòtids s'indica a la dreta	8
Figura 1.4. Síntesi, alliberament i degradació de la HA neuronal	10
Figura 1.5. Vies histaminèrgiques representades en un tall sagital de cervell de rata....	11
Figura 1.6. Les neurones histaminèrgiques tenen els cossos cel·lulars en els nuclis tuberomamil·lars de l'hipotàlem posterior.....	13
Figura 1.7. Regulació de les neurones histaminèrgiques per altres tipus neuronals.	16
Figura 1.8. Mecanisme de transducció hipotètic dels receptors H1	19
Figura 1.9. Mecanisme de transducció hipotètic dels receptors H2	21
Figura 1.10. Mecanisme de transducció hipotètic dels receptors H4	22
Figura 1.11. Talls sagitals de cervell de rata en els quals es pot veure la distribució dels receptors H3.....	25
Figura 1.12. Mecanismes de transducció dels receptors H3.....	29
Figura 1.13. Localització d'algunes de les respostes funcionals del receptor H3 en el cervell	30
Figura 1.14. Estructures moleculars d'alguns dels agonistes, antagonistes i agonistes inversos del receptor H3.	33
Figura 2.1. Perfils de l'HPLC de fase reversa	42
Figura 2.2. Esquema de la síntesi de [³ H]-histamina en homogenats de cervell.....	44
Figura 2.3. Esquema del mètode de determinació de la [³ H]-HA que se sintetitza a partir de [³ H]-His en miniprismes d'escorça cerebral.....	45
Figura 2.4. Variació del mètode aplicat als miniprismes per a determinar la [³ H]-HA sintetitzada que s'allibera	46
Figura 2.5. Equipament per a purificar la [³ H]-HA formada a partir de [³ H]-His.....	46
Figura 2.6. SDS-PAGE i transferència Western	49
Figura 3.1.1. El mètode radioisotòpic utilitzat per a determinar la síntesi d'HA es basa en la quantificació de la [³ H]-histamina que s'ha format a partir de la [³ H]-histidina afegida en els diferents medis d'incubació	54
Figura 3.1.2. Linealitat en funció del temps i de la concentració de proteïna. Km i Vmax de l'activitat HDC.....	57
Figura 3.2.1. La inhibició dels canals de calci activats per voltatge (CCAV) impedeix l'augment de la síntesi d'HA causat per despolarització.....	59
Figura 3.2.2. La ionomicina i la despolarització per 30 mM de K ⁺ augmenten la síntesi de HA.....	60
Figura 3.2.3. (A) L'estimulació de la síntesi d'HA per despolarització no s'inhibeix en presència de 0,5, 1 i 5 µM de queleritrina (inhibidor del la PKC). (B) Diferents concentracions de TPA (de 3,1 nM a 1 µM) no estimulen la síntesi d'HA en condicions no despolaritzants.....	61
Figura 3.2.4. La proteïna cinasa dependent de calci-calmodulina tipus II (CaMkII) és necessària per a l'activació de la síntesi d'HA dependent de despolarització.....	63
Figura 3.3.1. Efectes additius de la despolarització per 30 mM de K ⁺ i de l'ibmx	65
Figura 3.3.2. Els inhibidors de la CaMkII, KN-62 (30 µM), de la calmodulina, W-13 (1mM) i dels CCAV, ω-conotoxina MVIIC (MVIIC) (3µM) i ω-conotoxina GVIA (GVIA) (3µM) no modifiquen l'augment de la síntesi d'HA estimulat per l'ibmx 66	

Figura 3.4.1. Fosforilació de la HDC1/512 per la PKA	68
Figura 3.4.2. Fosforilació de la HDC1/512 per la CaMkII.....	69
Figura 3.4.3. La incubació de l'HDC1/512 purificada en condicions fosforilants amb CaMkII, PKA o les dues cinases juntes provoca augments de l'activitat HDC.....	70
Figura 3.5.1. L'agonista H3 imetit reverteix l'efecte de la despolarització independentment de la inhibició de la PKA per PKI14-22	72
Figura 3.5.2. L'agonista H3 imetit reverteix l'efecte de l'ibmx independentment de la inhibició dels CCAV per la ω -conotoxina GVIA	72
Figura 3.5.3. Inhibició per PKI14-22, ω -conotoxina GVIA i KN-62 dels efectes de la tioperamida sobre la síntesi d'HA en presència d'ibmx.....	74
Figura 3.5.4. L'estimulació de la síntesi d'HA provocada per la tioperamida en condicions despolaritzants s'inhibeix totalment per la ω -conotoxina MVIIC (A) i pel KN-62 (B), però no per l'AIP (C)	75
Figura 3.6.1. 30 mM de potassi provoca un augment de l'alliberament d'HA que es manté lineal durant els 30 minuts del període d'incubació	77
Figura 3.6.2. L'alliberament de la HA estimulat per la despolarització amb 30 mM de potassi s'inhibeix per acció de la ω -conotoxina GVIA o de l'imetit.....	78
Figura 3.6.3. La PKC no sembla participar en el mecanisme de regulació de l'alliberament d'HA durant la despolarització	79
Figura 3.6.4. Els inhibidors de la CaMkII (KN-62 i AIP) i l'inhibidor de la calmodulina inhibeixen part de l'alliberament d'HA estimulat per la despolarització.....	80
Figura 4.1. La CaMkII forma part del mecanisme d'activació de la síntesi i alliberament d'HA durant la despolarització.....	94
Figura 4.2. L'activació de la síntesi d'HA per acció de l'ibmx depèn de l'activitat PKA i és independent de la via del calci	95
Figura 4.3. L'augment de la síntesi d'HA per tioperamida, tant en presència d'ibmx com en 30 mM de potassi, depèn de l'entrada de calci pels CCAV principalment tipus N i de l'activitat PKA, però no de la CaMkII.....	96

ÍNDIX DE TAULES

Taula 1.1. Resum de les interaccions entre el sistema histaminèrgic i altres sistemes de neurotransmissors.	15
Taula 1.2. Resum de les característiques dels receptors de la histamina. L'interrogant indica característiques suggerides en la bibliografia però pendents de confirmació.	17
Taula 3.1.1. Dpm de blancs d'incubació (per triplicat) obtinguts per diferents mètodes:	55
Taula 3.1.2. Variabilitat de la determinació de l'activitat HDC en un mateix assaig. ...	56
Taula 3.4.1. La mesura de l'activitat HDC en homogenats de miniprismes despolaritzats.	67
Taula 3.4.2. L'activitat HDC mesurada en homogenats d'escorça prèviament incubats en condicions fosforilants per la CaMkII no varia respecte dels controls no incubats amb la cinasa	70

INTRODUCCIÓ GENERAL

BREU INTRODUCCIÓ HISTÒRICA

La histamina (2-4-imidazoletilamina) va ser obtinguda per síntesi química l'any 1907, i tres anys després es va demostrar la seva presència en teixits de mamífer (Dale H. et al., 1910). Aviat es va descriure que la HA contraïa el múscul llis, estimulava de la secreció gàstrica, i participava en la resposta anafil·làctica causant broncoconstricció (Schwartz J. et al., 1991). L'any 1943 es va demostrar que la histamina també es trobava en el cervell (Kwiatkowsky H., 1943) i quinze anys més tard es va descriure la seva síntesi local en el SNC (White T., 1959). Als anys 70, amb l'aparició de noves tècniques de detecció, es torna a revifar l'interès per la HA cerebral i, a partir d'aquí, es comencen a acumular cada cop més dades que indiquen que actua com a neurotransmissor en el SNC. Actualment a la HA cerebral se la relaciona amb diversos processos bioquímics, fisiològics, patològics i comportamentals, com per exemple la regulació de l'alliberament de neurotransmissors i hormones hipotalàmiques, el cicle son-vigília, la temperatura corporal, la catalèpsia, la locomoció, les sensacions de set i gana, l'agressivitat, i l'aprenentatge i la memòria (Passani M., 2000; Huston J.P., 1997).

ESTRUCTURA DE LA HISTAMINA

La nomenclatura química que correspon a la HA és 2-4-imidazoletilamina (figura 1.1) La cadena lateral etilamina es troba també en altres neurotransmissors, com la dopamina, la noradrenalina i la serotonina. El nucli imidazol dona a la histamina una sèrie de propietats químiques que la diferencien d'altres neurotransmissors. El tautomerisme és una d'aquestes propietats que determina que tingui dues formes diferents (figura 1.1). Aquesta propietat és crítica per a activar els receptors.

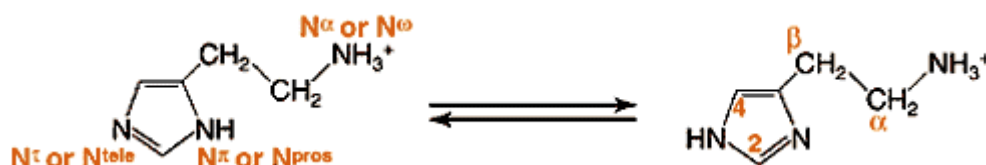


Figura 1.1. La histamina amb les seves formes tautomèriques

En la figura de l'esquerra es poden veure els noms dels àtoms de nitrogen; la numeració dels àtoms de carboni s'aprecia a la figura de la dreta. La nomenclatura de l'esquerra no fa referència als nitrògens dels anells com a 1- i 3-, per evitar confusions.

BIOSÍNTESI DE LA HISTAMINA EN EL CERVELL

La síntesi de la HA té lloc a partir de la histidina (His) en una reacció d'un sol pas enzimàtic catalitzada per la histidina descarboxilasa (E.C. 4.1.1.22) (HDC) (figura 1.2). Com que la HA no travessa la barrera hematoencefàlica, la seva presència en el cervell ha de ser producte d'una síntesi local (White T., 1959). En el cervell la HDC ha estat identificada en neurones i mastòcits (Green J., 1970), encara que treballs molt recents indiquen que les cèl·lules microgials (Kato et al., 2001) i les cèl·lules endotelials dels microvasos cerebrals també podrien sintetitzar HA (Yamakami et al., 2000).

Entre els anys cinquanta i setanta es va parlar d'una histidina descarboxilasa "inespecífica", que va resultar ser la DOPA descarboxilasa, però finalment es va demostrar que l'únic enzim responsable de la síntesi d' HA en el cervell era la HDC (Schwartz et al., 1970 ; Palacios et al 1976). Recentment s'ha aconseguit fer ratolins knock-out per l'HDC que són viables malgrat que no tenen HA cerebral (Parmentier et al., 2002).

TRANSPORT DE LA HISTIDINA

La histidina ha de ser captada de l'exterior de la neurona i aquest procés podria ser important en la regulació de la síntesi d'HA.

No s'ha demostrat l'existència de cap sistema de transport específic de la His. En talls de cervell (Verdiere et al., 1975) i en sinaptosomes (Chudomelka i Murrin, 1983) el transport de l'aminoàcid és saturable, dependent d'energia i inhibit competitivament per aminoàcids aromàtics. En sinaptosomes també s'ha descrit que la despolarització estimula aquest transport (Verdiere et al., 1975).

PROPIETATS DE LA HISTIDINA DESCARBOXILASA

L'activitat HDC s'ha localitzat en gran varietat de teixits de mamífers, però és especialment abundant en fetge de rata fetal, porció gliular d'estómac de rata, ronyó de rata gestant, mastòcits i leucòcits basòfils, així com en certs tumors (Schwartz et al., 1991). No obstant això, a causa de la presència de mastòcits en la major part dels teixits, en molts casos resulta difícil establir en quina proporció l'activitat HDC mesurada en

l'homogenat d'un teixit procedeix de cèl·lules específiques d'aquest i dels mastòcits contaminants.

Encara que no tots els autors hi estan d'acord (Tran V. i Snyder S., 1981; Grzanna R., 1984), existeix un cert consens a descriure la HDC com una proteïna de 110 - 125 kDa formada per dues subunitats idèntiques i enzimàticament actives d'uns 54 kDa, amb un punt isoelèctric al voltant de 5.5 (Savany A. i Cronenberger L., 1982; Watanabe et al., 1984; Martin S. i Bishop J., 1986). A partir de la HDC purificada de 54 kDa i de biblioteques gèniques de fetge de rata fetal (Joseph D., 1990) s'ha pogut identificar un RNA missatger d'una HDC de 74 kDa. Aquest valor superior al de 54 kDa suggereix que la HDC sofreix un processament proteolític postraduccional (Dartch C et al., 1998; Fleming JV i Wang T.C., 2003).

El gen de la HDC s'ha localitzat en el cromosoma 2 del ratolí, molt a prop del gen de la α -2-microglobulina (Joseph D., 1990). L'HDC té diverses homologies amb altres enzims dependents de piridoxal-5-fosfat, com la dopa descarboxilasa, particularment en el domini d'unió al cofactor que comprèn la Lys 307 (Joseph D., 1990). La proteïna comprèn seqüències consens de fosforilació per la proteïna cinasa dependent d'AMPc (PKA) i per la proteïna cinasa dependent de calci (PKC) (Joseph D., 1990), així com per la CaMkII (<http://www.cbs.dtu.dk/researchgroups/protfunction.html>).

Com altres descarboxilases de mamífers, la HDC utilitza com a cofactor el piridoxal-5-fosfat (PLP). La unió del PLP és diferent segons el teixit on es trobi l'enzim. S'ha vist que el PLP s'uneix feblement a la HDC fetal (Hakanson R., 1967) i a la dels mastòcits peritoneals (Schayer R., 1963), i que s'elimina fàcilment per diàlisi. En canvi les HDC de fetge fetal (Tran V., 1998), de cervell (Palacios J., 1978) i de mucosa gàstrica (Savany A. 1982) només tenen el 50% del cofactor feblement unit a l'apoenzim (dialitzable) i l'altre 50% hi està fortament unit (no dialitzable).

El pH òptim de l'activitat HDC mesurada en homogenats de cervell disminueix en augmentar la concentració de substrat: a concentracions baixes (de l'ordre de mM) el pH òptim és de 7.4, i a concentracions saturants és de 6.5. Aquest fet probablement deriva de la participació d'un grup protonable en el mecanisme de catàlisi (Hakanson R., 1967).

Mitjançant estudis de fraccionament subcel·lular s'ha constatat que la major part de l'activitat HDC es localitza en la fracció soluble (Baudry et al., 1973) (Snyder et al., 1974), i que un 30% està associada a membranes. En les membranes també es troba

una part de l'enzim que només és actiu si les fraccions membranoses es tracten amb tritó X-100 (Palacios et al., 1978; Toledo et al., 1988).

En concordància amb la distribució regional del sistema histaminèrgic cerebral, en l'hipotàlem es registra la màxima activitat HDC cerebral, que resulta ser unes 5 vegades superior a la de les regions d'activitat mitjana com l'escorça, el tàlem, l'hipocamp i l'estriat; en canvi, la medul·la, el tronc i el cerebel presenten les activitats més baixes (Schwartz et al., 1970; Taylor i Snyder, 1972).

Malgrat que s'han preparat diversos anticossos contra la HDC, no existeixen estudis inequívocs de llur especificitat. Independentment de l'eventual especificitat creuada amb altres proteïnes diferents de la HDC, probablement tots els anticossos disponibles reconeixen més d'un pèptid relacionat amb la HDC. Això es deu al fet que el processament posttraduccional del precursor de 74 kDa origina, a més de subunitats enzimàticament actives de 54 kDa, diversos fragments de pesos moleculars entre 60 y 20 kDa. D'altra banda, les subunitats de 54 kDa i possiblement també fragments d'altres pesos moleculars formen agregats (Fleming i Wang, 2003) de més de 100 kDa. Sembla que no hi ha dubtes sobre l'activitat enzimàtica del pèptid de 54 kDa, però pel que fa al precursor de 74 kDa la informació és contradictòria (Yatsunami et al., 1995; Dartsch et al., 1998; Fleming i Wang, 2003). No està clar si el precursor de 74 kDa i els restants fragments i agregats tenen o no activitat catalítica. Per totes aquestes raons no existeix una bona correlació entre l'activitat enzimàtica en les fraccions subcel·lulars o les regions cerebrals i les quantitats de proteïna immunoreactiva.

S'han descrit diversos inhibidors per a la HDC, però entre ells l'inhibidor suïcida S- α -fluorometil histidina (α -FMH) ha estat l'eina més útil per a l'estudi del metabolisme de la HDC i la HA. L' α -FMH inhibeix l'HDC cerebral amb una constant d'inhibició (K_i) aproximadament de 10^{-5} M. L' α -FMH no inhibeix altres descarboxilases com la DOPA descarboxilasa o la glutamat descarboxilasa (Skratt et al., 1994; Prell et al., 1996).

REGULACIÓ DE LA SÍNTESI D'HISTAMINA EN EL CERVELL

Com que la HA no penetra la barrera hematoencefàlica, la modulació de la síntesi d'HA és crucial per al manteniment dels nivells de l'amina en el cervell. S'ha vist, mitjançant una sèrie d'estudis *in vivo* (Itoh Y., 1988; Pollard et al., 1974) i en talls de teixit (Verdiere et al., 1975; Arrang et al., 1987b), que els nivells d'HA cerebral estan

eficientment regulats. Tanmateix, es desconeixen els mecanismes que regulen els nivells d'HA, i en particular els que actuen de forma ràpida sobre l'HDC. Aquests darrers són objecte d'estudi d'aquesta tesi.

S'han descrit diferents substàncies capaces d'induir l'expressió d'mRNA d'HDC en teixits perifèrics com per exemple la gastrina en l'estómac (Chen et al., 1994; Hakanson, 1972), però en el cervell no s'ha descrit cap regulació de l'expressió de l'HDC.

L'HDC cerebral no està saturada per la His ni pel seu cofactor, el piridoxal-5-fosfat (Palacios et al., 1978) de manera que en condicions fisiològiques la disponibilitat de substrat i de cofactor poden ser factors reguladors de l'activitat de l'enzim.

Com es pot deduir de l'apartat anterior, el processament proteolític del precursor de 74 kDa de la HDC podria constituir un mecanisme de regulació de la síntesi d'HA. D'altra banda, un altre mecanisme de regulació de la síntesi d'HA podria ser la fosforilació de l'HDC en les seqüències consens anteriorment mencionades. Durant el transcurs d'aquesta tesi el nostre grup ha descrit que, en miniprismes d'escorça cerebral de rata, l'augment dels nivells d'AMPC estimula la síntesi d'HA per la via de la PKA (Gómez-Ramírez et al., 2002).

En el cervell, diferents estudis *in vivo* i *in vitro* (sinaptosomes i talls de cervell) demostren que la síntesi d'HA s'inhibeix per l'activació dels autoreceptors histaminèrgics H3, possiblement per la via de l'adenilat ciclasa-proteïna cinasa A (Arrang et al., 1987; Lovenberg et al., 1999; Gómez-Ramírez et al., 2002). També s'ha descrit que altres tipus de receptors com els adrenèrgics α_2 (Gulat-Marnay et al., 1989b), els muscarínics M1 (Itoh, 1988; Gulat-Marnay et al., 1989a) i els gabaèrgics (Okakura-Mochizuki, 1996) poden inhibir la síntesi d'HA, encara que es desconeixen els mecanismes implicats.

En miniprismes d'escorça cerebral de rata la despolarització per 30 mM de potassi, en presència de calci, augmenta la síntesi d'HA i aquest efecte es reverteix per acció d'agonistes del receptor H3 (Arrang et al., 1987; Arrang et al., 1983) però no en presència d'inhibidors de la PKA (Gómez-Ramírez et al., 2002). No obstant això, paradoxalment la incubació dels miniprismes en absència de Calci estimula la síntesi d'HA un 200% per sobre dels valors control amb 2.6 mM de calci, a través d'un mecanisme desconegut (Arrang et al., 1987b).

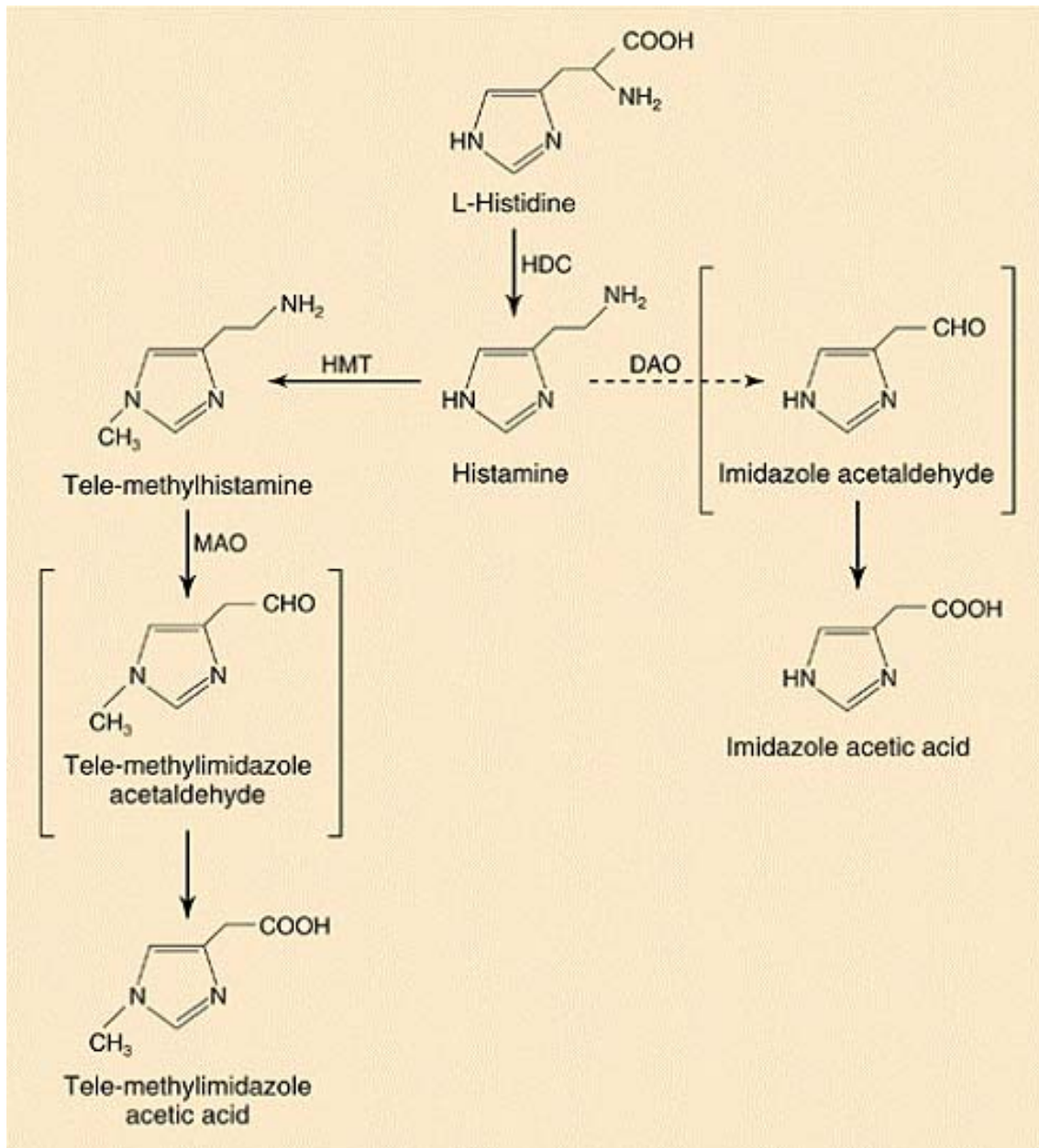


Figura 1.2. Síntesi i metabolisme de la HA

Les línies contínues indiquen les vies de síntesi i degradació de la HA en el cervell.

Les línies discontinues indiquen altres vies descrites fora del sistema nerviós central. HDC, histidina descarboxilasa; HMT, histamina metiltransferasa; DAO, diamino oxidasa; MAO, monoamino oxidasa. Els aldehyds intermediaris que es representen entre claudàtors són hipotètics perquè encara no s'han aïllat.

EMMAGATZEMATGE DE LA HISTAMINA EN EL CERVELL

Mitjançant estudis histològics i de fraccionament subcel·lular s'ha pogut veure que en el cervell de la rata, la HA s'emmagatzema en mastòcits i neurones (Picatoste et al., 1977; Ferrer et al., 1979; Hough i Green, 1984; Goldschmidt et al., 1984; Blanco et al., 1987). Durant la primera setmana de vida postnatal els nivells d'HA en el cervell de la rata són molt elevats (300-400 ng/g), i més del 90% de l'amina es localitza en mastòcits. A partir dels 7 dies de vida postnatal el nombre de mastòcits va minvant fins a establir-se en els valors de l'adult cap a la tercera setmana. En els cervells de les rates adultes els nivells d'HA són baixos (al voltant dels 50 ng/g); només alguns mastòcits persisteixen en la regió talàmica i la HA que contenen aquestes cèl·lules representa un 25% del total de la HA cerebral (Ferrer et al., 1979; Blanco et al., 1987). Malgrat que és cert que s'han trobat mastòcits en el cervell de totes les espècies en què s'han buscat (Ibrahim 1974a; Ibrahim et al., 1974b; Oishi et al., 1983; Blanco et al., 1987) l'evolució ontogenètica del nombre d'aquestes cèl·lules possiblement varia d'unes espècies a altres. Quant a la HA neuronal, augmenta des del naixement fins als 20 dies seguint una corba paral·lela a la de la sinaptogènesi com correspon a un neurotransmissor (Ferrer et al., 1979).

S'ha vist que la HA té una distribució subcel·lular atípica ja que el 30% de l'amina es localitza en la fracció nuclear crua (P1) (Kataoka i De Robertis, 1967; Kuhar et al., 1971a) enfront del 5-10% dels altres neurotransmissors aminèrgics (Kuhar et al., 1971b; Coyle i Kuhar 1974). Això es deu al fet que els grànuls que contenen HA en els mastòcits sedimenten en la fracció nuclear crua P1 (Uvnas 1971; Picatoste et al., 1977). En les neurones histaminèrgiques la HA es sintetitza en el citoplasma i s'emmagatzema en vesícules sinàptiques (Kuhar et al., 1971) que sedimenten principalment en la fracció sinaptosomal (P2). Tenint en compte que en la fracció sinaptosomal P2 la HA es troba dins de les vesícules sinàptiques i que la major part d'HDC es troba en el citoplasma, és lògic pensar que la HA es sintetitza en el citoplasma i després s'emmagatzema en les vesícules sinàptiques a través del transportador VMAT2 tal com passa amb altres neurotransmissors aminèrgics (Schwartz et al., 1991; Merickel i Edwards, 1995).



Figura 1.3. Seqüència de nucleòtids i d'aminoàcids del clon d'HDC-18. El nombre de residus aminoacídics i de nucleòtids s'indica a la dreta

La regió que té homologia amb el gen DDC de *Drosophila* s'indica a sobre de la seqüència de nucleòtids. També es pot veure una seqüència poli(A) d'addició de senyal (AATAAA) subratllada. La metionina inicial és el primer residu de metionina que segueix el punt d'inici de la transcripció putativa en el gen. Les puntes de fletxa marquen el primer residu del clon HDC-21. El clon HDC-2,3 comença en el residu 118. Les lletres a sobre de la seqüència de nucleòtids indiquen les diferències que hi ha en alguns clons de cDNA d'HDC. També es subratllen els llocs potencials de N-glicosilació [Asn-Xaa-(Thr o Ser)]. El punt de N-glicosilació del residu 304 és adjacent al lloc d'unió del piridoxal-5-fosfat (Lys³⁰⁷) i probablement inactivaria l'enzim si es glicosilés (Joseph et al., 1990).

ALLIBERAMENT DE LA HISTAMINA EN EL CERVELL

Tant *in vitro* (Verdiere et al., 1975; Itoh et al., 1988) com *in vivo* (Philippu et al., 1982), s'ha observat que la despolarització per potassi fa que s'alliberi HA de les neurones però no dels mastòcits. Estudis amb llesques de diferents àrees cerebrals revelen que la [³H]-HA sintetitzada a partir de [³H]-His s'allibera per despolarització induïda per potassi (Verdiere et al., 1975), estímuls elèctrics (Van der Werf et al., 1987) o veratridina (Arrang et al., 1985). Aquest alliberament d'HA s'inhibeix completament en absència de calci extracel·lular o en presència de 10 mM de Mg²⁺ (Arrang et al., 1983).

L'alliberament d'HA en talls de teixit i sinaptosomes s'inhibeix per agonistes de diferents tipus de receptors, com per exemple els receptors H₃ de la HA (Arrang et al., 1983), els muscarínics M₁ (Gulat-Marnay et al., 1989a), els receptors α -2 (Gulat-Marnay et al., 1989b) i els receptors Kappa d'opioïds (Gulat-Marnay C., 1990). L'estimulació dels receptors opioïds mu, en canvi, augmenta l'alliberament d'HA (Itoh et al., 1988) (taula 1.1).

INACTIVACIÓ I RECANVI DE LA HISTAMINA

Estudis fets amb talls de cervell i sinaptosomes indiquen que no hi ha cap sistema de recaptació d'alta afinitat d'HA en les terminals de les neurones histaminèrgiques (Neame et al., 1964; Schwartz et al., 1991). En canvi, sí que s'ha descrit recaptació d'HA en cultius de glia astrocitària (Husztli et al., 1994 i 1998). Així doncs, juntament amb les neurones colinèrgiques, les neurones histaminèrgiques són les úniques neurones aminèrgiques conegudes que els manca el sistema de recaptació d'alta afinitat del neurotransmissor.

Encara que en teixits perifèrics s'ha descrit una desaminació oxidativa de la HA per la via de la diamino oxidasa (DAO), en el cervell de mamífers l'única via de degradació sembla ser la metilació de l'amina, catalitzada per l'enzim histamina-N-metiltransferasa (HMT) per donar telemetil-HA (methA).

La purificació de l'HMT ha permès determinar les seves propietats catalítiques (Verburg, 1986). Aquest enzim catalitza la transferència del grup metil des de la S-adenosil metionina (SAM) al nitrogen en posició tele del grup imidazol de la HA, seguint un mecanisme *bi* ordenat. La inhibició de la HMT *in vivo* administrant

amodiaquina (Thithapandha et al., 1978) o metoprina (Duch et al., 1978) fa que augmentin els nivells d'HA en el cervell de rata, fet que confirma el paper clau que ha de tenir la HMT en la inactivació de la HA.

La metHA es desamina de forma oxidativa per la MAO tipus B donant lloc a l'àcid telemetilimidazolacètic, que representa el producte final de degradació de la HA en el cervell de mamífers (figures 1.2 i 1.4).

La relació entre la histamina que es forma i la que es metila és la taxa de recanvi, que es pot utilitzar com a indicador de l'activitat de les neurones histaminèrgiques, i varia molt d'una regió cerebral a una altra. En estudis de recanvi utilitzant His o HA marcades radioactivament (Dismukes i Snyder, 1974; Pollard et al., 1974), s'ha vist que la vida mitjana de la HA en el cervell és molt curta (de 1 a 6 hores, segons els estudis) fet que indica l'eficiència del mecanisme d'inactivació de l'amina.

Com que la HA que s'allibera no es recapta en les neurones i sí en els astròcits (Huszt i et al., 1994 i 1998) i la presència d'HMT en astròglia (Schwartz et al., 1991) podria ser que la HA alliberada es captés i inactivés per metilació en la glia astrocitària (Hough L. 1999) (figura 1.4).

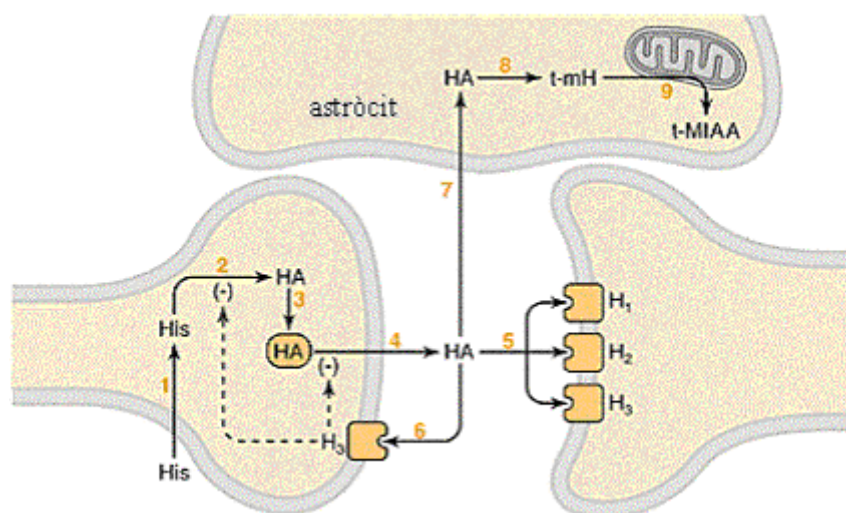


Figura 1.4. Síntesi, alliberament i degradació de la HA neuronal.

1, transport de L-histidina (His) a l'interior de la neurona histaminèrgica; 2, síntesi d'histamina (HA) catalitzada per la histidina descarboxilasa (HDC); 3, la HA entra en les vesícules sinàptiques; 4, alliberament d'HA per exocitosi; 5, activació dels receptors postsinàptics; 6, retroinhibició a través dels receptors H3 de la síntesi i alliberament d'HA; 7, transport d'HA cap a l'interior dels astròcits (no s'han trobat indicis de recaptació de la HA per part de les neurones); 8, metabolisme catalitzat per la histamina-N-metiltransferasa (HMT); 9, oxidació de la telemetil-histamina (t-mHA) catalitzada per la monoaminoxidasa tipus B (MAO B). La localització cel·lular dels passos 7, 8 i 9 encara no ha estat aclarida. T-MIAA, àcid telemetilimidazolacètic (Hough L., 1999)

CARACTERÍSTIQUES I LOCALITZACIÓ DE LES NEURONES HISTAMINÈRGIQUES

L'any 1974 es va veure que després de lesionar l'àrea hipotalàmica lateral disminuïa l'activitat HDC en moltes regions del cervell de rata, fet que evidenciava l'existència d'una via neuronal histaminèrgica ascendent (Garbarg et al., 1974) (figura 1.5).

Deu anys més tard, l'ús de tècniques immunohistoquímiques va permetre localitzar les neurones histaminèrgiques en el cervell utilitzant com a eines de marcatge anticossos contra la HA (Panula et al., 1984) o anticossos policlonals contra l'HDC purificada a partir d'extractes de fetge de rata fetal (Watanabe et al., 1984).

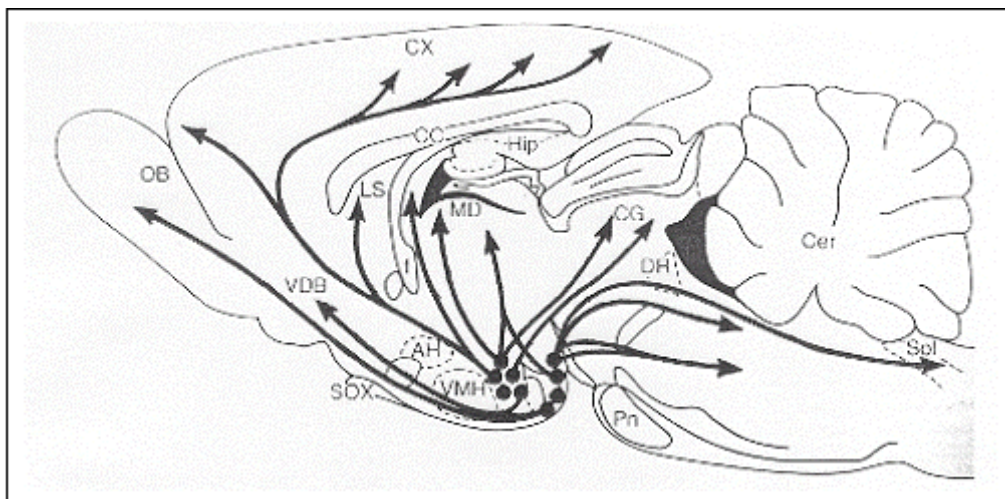


Figura 1.5. Vies histaminèrgiques representades en un tall sagital de cervell de rata

Els cossos neuronals es troben en els nuclis tuberomamil·lars de l'hipotàlem, i des d'aquí es projecten a gairebé totes les àrees cerebrals per mitjà d'una via ascendent i una altra via descendent. AH, hipotàlem anterior; CC, cos callós; Cer, cerebel; CG, substància gris central; CX, escorça; DR, rafe dorsal; f, fòrnix; Hip, hipocamp; LS, septe lateral; MD, tàlem medio-dorsal; OB, bulb olfactori; Pn, nuclis pontins; Sol, nuclis del tracte solitari; SOX, decussació supraòptica; VDB ramificació ventral de la banda diagonal ventral; VMH, nuclis hipotalàmics ventromedials (Schwartz et al., 1991).

En tots els mamífers estudiats, els cossos cel·lulars de les neurones histaminèrgiques es troben reclosos en els nuclis tuberomamil·lars (nTM), situats en la part posterior de l'hipotàlem. Aquests nuclis estan formats per un conjunt de neurones magnocel·lulars i parvocel·lulars. En el cervell de rata els nTM es divideixen en 5 subgrups anomenats E1-E5 (Ericson et al., 1987)(figura 1.6).

Les neurones histaminèrgiques dels nTM tenen característiques electrofisiològiques similars a les d'altres neurones aminèrgiques. Emeten impulsos elèctrics espontanis de forma lenta (0-3 Hz), regular i rítmica (Reiner i McGeer, 1987; Haas i Reiner, 1988). L'emissió d'impulsos de les neurones dels nTM varia al llarg del cicle son-vigília; és màxima durant els períodes de vigília i nul·la durant la fase REM (Sakai et al., 1990).

En els nuclis histaminèrgics dels nTM la HA es pot colocalitzar amb altres neurotransmissors i/o els enzims que els sintetitzen (Kohler et al., 1985; Yamamoto et al., 1990; Ericson et al., 1991B; Onodera et al., 1994). En algunes d'aquestes neurones s'ha trobat glutamat descarboxilasa (l'enzim que sintetitza GABA), GABA, GABA-transaminasa, adenosina desaminasa (l'enzim responsable de la inactivació del neurotransmissor adenosina), monoamino oxidasa B (MAO-B) i diferents neuropèptids com Met-Enk-Arg6-Phe7, substància P, galanina o l'hormona alliberadora de tirotròpina (TRH) (Schwartz et al., 1991).

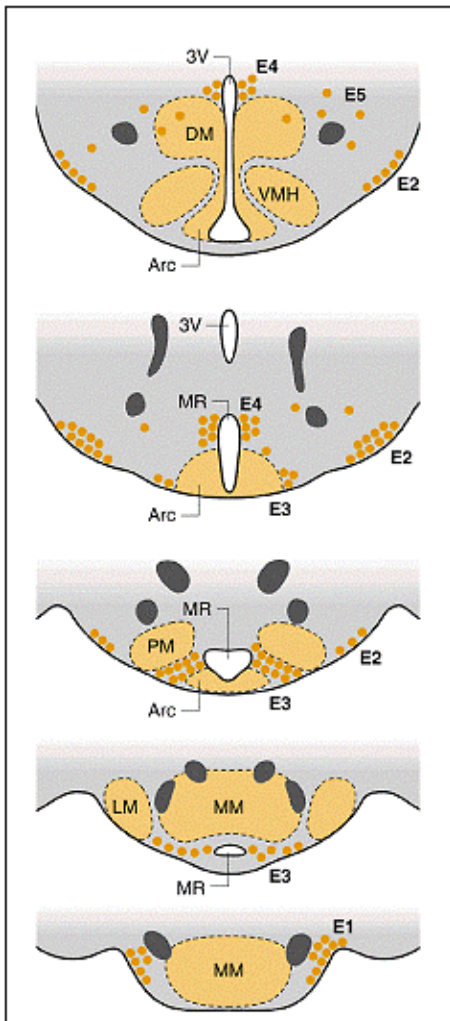
Projecció de les neurones histaminèrgiques arreu del SNC.

Les neurones histaminèrgiques envien els seus àxons a gairebé totes les zones del cervell de rata (Panula et al., 1989) (figura 1.5), conillet d'Índies (Airaksinen et al., 1988) i del cervell humà (Panula et al., 1990). Presenten poques sinapsis típiques i moltes varicositats per on es creu que alliberen gran part de la HA.

En el cervell i la medul·la espinal de mamífers s'han descrit dues vies histaminèrgiques ascendents i almenys una de descendent. La via ascendent ventral connecta amb l'hipotàlem anterior, la banda diagonal, el septe i el bulb olfatori. Les vies ascendents dorsals arriben al tàlem, l'hipocamp, l'amígdala i a les estructures rostrals del cervell anterior. En rates, la via descendent està associada amb el fascicle longitudinal medial i proporciona inputs al tronc de l'encèfal i a la medul·la espinal.

Els subgrups de cèl·lules histaminèrgiques es poden considerar un sol grup funcional (Wada et al., 1991), ja que les ramificacions se solapen unes amb les altres (Kohler et al., 1985).

Figura 1.6. Les neurones histaminèrgiques tenen els cossos cel·lulars en els nuclis tuberomamil·lars de l'hipotàlem posterior.



Des d'aquí projecten els seus àxons a gairebé totes les àrees del SNC. En la figura es mostren talls frontals dels nuclis tuberomamil·lars i les neurones histaminèrgiques (punts rodons) agrupades formant els diferents subgrups (E1-E5). Arc, nucli arcuat; DM, nucli hipotalàmic dorsomedial; LM, nucli mamil·lar lateral; MM, nucli mamil·lar medial; MR, recés mamil·lar; PM, nucli premamil·lar; 3V, tercer ventricle; VMH, nucli hipotalàmic ventromedial. (Schwartz et al., 1991).

Encara que gairebé totes les àrees del SNC contenen fibres histaminèrgiques, la densitat de la innervació és heterogènia. Les zones amb més densitat de fibres histaminèrgiques són l'hipotàlem, la banda diagonal ventral, el septe i el bulb olfactori. L'escorça cerebral, l'amígdala, l'estriat, el nucli acumbens i el tàlem presenten una innervació histaminèrgica moderada. L'hipocamp està poc innervat. Les projeccions cap al cervell mitjà, tronc encefàlic, cerebel i medul·la espinal solen ser menys denses que les vies ascendents, amb algunes excepcions, com per exemple la substància nigra i l'àrea tegmental ventral (Schwartz et al., 1991).

Tot i que algunes regions reben una baixa densitat de fibres histaminèrgiques, presenten una elevada densitat de receptors histaminèrgics, de manera que no hi ha una correlació

entre densitat de fibres i densitat de receptors (Schwartz et al., 1991). Això estaria en relació amb el fet que en regions poc innervades per fibres histaminèrgiques, com per exemple la regió CA1 de l'hipocamp, els efectes electrofisiològics de la HA són importants. D'aquesta manera, un reduït nombre de neurones histaminèrgiques pot exercir la seva influència en la major part del sistema nerviós central (SNC).

Inputs de les neurones histaminèrgiques

Sobre els inputs aferents de les neurones histaminèrgiques dels nuclis tuberomamíl·lars se'n sap ben poca cosa. No obstant això, mitjançant tècniques histoquímiques s'ha vist que les neurones histaminèrgiques reben innervacions de neurones procedents de l'escorça límbica i prefrontal, i d'uns quants grups de neurones de l'hipotàlem, concretament de les àrees preòptica i anterior (Wouterlood et al., 1987; Wouterlood et al., 1988; Ericson et al., 1991a) (figura 1.7).

A més, els grups de cèl·lules adrenèrgiques C1-C3, els A1-A2 de cèl·lules noradrenèrgiques i els B5-B9 de cèl·lules serotoninèrgiques del tronc encefàlic també envien terminals als nuclis histaminèrgics (Ericson et al., 1989).

Les neurones dels nTM reben un fort input gabaèrgic, responsable de la inhibició de l'impuls histaminèrgic durant els períodes de son (Sherin et al., 1996; Yang i Hatton, 1997; Stevens et al., 1999). Aquest input gabaèrgic procedeix de la banda diagonal de l'àrea de Broca, de l'hipotàlem lateral i de la banda preòptica ventrolateral (un centre important de control de la son) (Sherin et al., 1998). El GABA alliberat per aquestes neurones inhibeix les neurones histaminèrgiques per mitjà dels receptors GABA_A (Yang i Hatton, 1997) i GABA_B (Stevens et al., 1999). D'altra banda, la galanina s'ha descrit que hiperpolaritza les neurones histaminèrgiques dels nTM (Schonrock et al., 1991) i es localitza en les mateixes terminals nervioses gabaèrgiques procedents de l'àrea preòptica, per la qual cosa també pot tenir un paper modulador en la transmissió histaminèrgica. Recentment s'ha vist que fibres que contenen un pèptid hipotalàmic, l'orexina, innerven el cos neuronal i les dendrites proximals de les neurones histaminèrgiques, fet que suggereix un paper modulador de l'orexina (Chemelli et al., 1999).

Les neurones histaminèrgiques també reben aferències ascendents, presumiblement colinèrgiques, procedents del tegment mesopontí (Ericson et al., 1991a), amb un paper important en el control de l'estat de vigília.

Neurotransmissor	Efectes de la histamina en altres sistemes de neurotransmissors			Efectes d'altres neurotransmissors en les neurones histaminèrgiques		
	Acció sobre el neurotransmissor	Receptor	Efecte	Acció sobre la histamina	Receptor	Efecte
Acetilcolina	alliberament	H ₃	↓ ^a	alliberament	M ₁	↓
Acetilcolina	alliberament ^b	H ₂	↑	alliberament ^b	M ₁	↓
Acetilcolina				<i>turnover</i>	muscarínic	↓
Acetilcolina				<i>turnover</i>	nicotínic	↓
CGRP, Substància P	alliberament ^c	H ₃	↓			
Dopamina	alliberament	H ₃	↓	alliberament ^b	D ₂	↑
Dopamina	nivells de DOPAC	H ₁	↑ ^d	alliberament ^b	D ₃	↓
GABA	alliberament	H ₃	↓	alliberament ^b	GABA _{A,B}	↓
GABA				<i>turnover</i>	?	↓
Glutamat				alliberament ^b	NMDA	↑
Norepinefrina	alliberament	H ₃	↓	alliberament	α ₂	↓
Norepinefrina	alliberament ^b	H ₁	↑			
Norepinefrina	<i>turnover</i>	H ₁	↑			
Opioids				alliberament	κ	↓
Opioids				<i>turnover</i>	κ	↓
Opioids				alliberament ^b	μ	↑
Opioids				<i>turnover</i>	μ	↑
Serotonina	alliberament	H ₃	↓	alliberament ^b	5HT _{2C/2A}	↑
Serotonina	nivells 5-HIAA	H ₁	↑ ^e	<i>turnover</i>	5HT _{1A}	↓

Taula 1.1. Resum de les interaccions entre el sistema histaminèrgic i altres sistemes de neurotransmissors

Si no s'especifica el contrari, els experiments d'alliberament s'han fet en sinaptosomes o llesques de cervell.

^a la inhibició pel receptor H₃ podria ser indirecta

^b l'alliberament s'ha mesurat amb tècniques aplicades en animals vius

^c alliberament mesurat en teixit de cor perfós

^d alguns efectes de la histamina sobre neurones dopaminèrgiques depenen de l'activitat noradrenèrgica

^e la histamina exògena, però no l'endògena, augmenta els nivells de metaòlits de la 5-hidroxitriptamina (5-HT). CGRP, pèptid relacionat amb el gen de la calcitonina; DOPAC, àcid-3,4- dihidroxifenilacètic; 5-HIAA, àcid 5-hidroxi-indolacètic; NMDA, N-metil-d-aspartat. (Hough L., 1999).

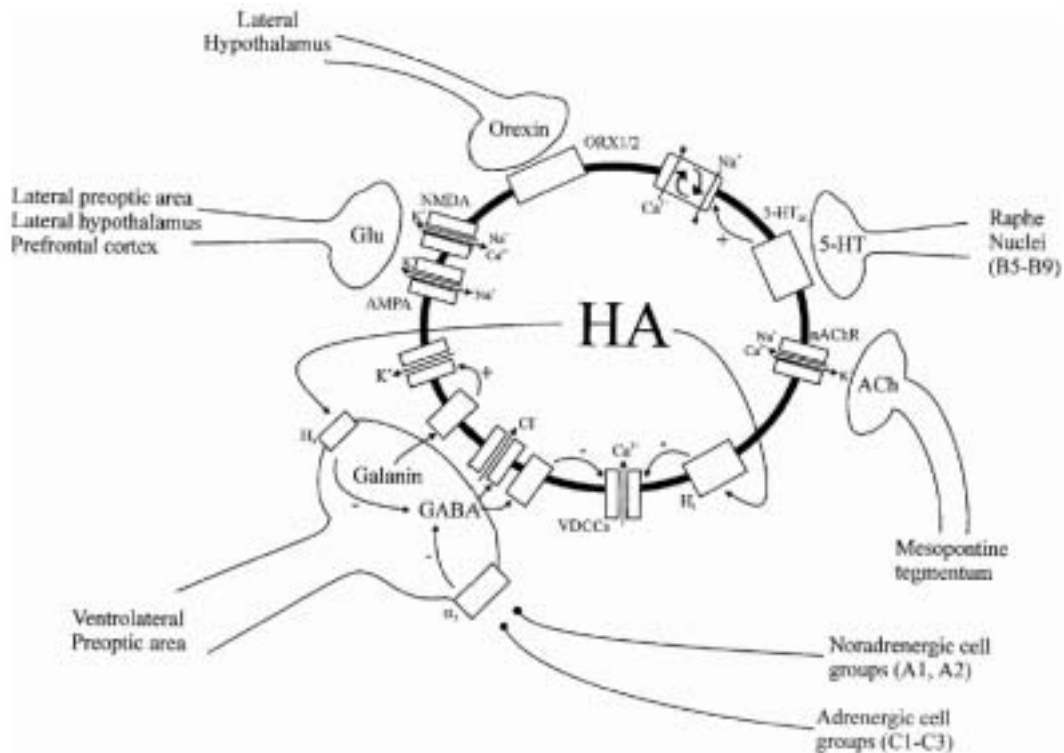


Figura 1.7. Regulació de les neurones histaminèrgiques per altres tipus neuronals.

Les neurones gabaèrgiques i alliberadores de galanina que provenen de l'àrea preòptica ventrolateral inhibeixen l'activitat histaminèrgica en període de son. Altres tipus de neurones (acetilcolinèrgiques procedents del tement mesopontí; serotoninèrgiques procedents dels nuclis del rafe) exciten les neurones histaminèrgiques. Les neurones adrenèrgiques i noradrenèrgiques principalment, modulen l'activitat histaminèrgica indirectament a través de les neurones gabaèrgiques. AMPA, α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol; NMDA, receptors de N-metil-D-aspartat; ORX1/2, receptors de tipus 1 i 2 de l'orexina; VDCCs, canals de calci dependents de voltatge (Brown et al.,2001).

ELS RECEPTORS DE LA HISTAMINA

Es coneixen quatre subtipus de receptors de la HA (H1, H2, H3 i H4), que pertanyen a la superfamília de receptors amb 7 dominis transmembrana, tots ells acoblats a proteïnes G.

característiques	H1	H2	H3	H4
Localització gènica (humans)	cromosma 3	cromosoma 5	cromosoma 20	cromosoma 18
Proteïna	486 Aa	358 Aa	445 Aa	390 Aa
Mecanisme de transducció	pG _{q/11} → PI-PLC: IP3 [↑Calci, ↑cGMP] ↑DAG [↑PKC] PI-PLA ₂ : ↑AA, ↑TXA ₂	pGs → AC: ↑cAMP ↑PI-PLC: Calci, IP ₃ ^e ↓AA ^e	pGi → AC: ↓cAMP ↓ Calci	pGi → PI-PLC ↑Calci ↓cAMP?
Distribució*	SNC: tàlem, escorça, cerebel, hipocamp	SNC: ganglis basals, formació hipocampal, amígdala	SNC: escorça, hipocamp, tàlem, hipotàlem	no SNC: medul·la òssia, melsa, pulmó, intestí prim, leucòcits, mastòcits, fibroblasts, cèl·lules epitelials i endotelials, etc.
Localització	neurones, astròcits i vasos sanguinis	neurones, astròcits i vasos sanguinis	neurones	
Agonistes	2-tiazolil-etilamina, 2(3-bromofenil) -histamina	dimaprit, impromidina	R(α)metil-histamina, imetit, immepip	R(α)metil-histamina, imetit
Antagonistes i/o agonistes inversos	mepiramina, astemizol, cetirizina, loratadina	cimetidina, ranitidina, burimamida, famotidina	proxifan, VUF4904, tioperamida, clobenpropit	tioperamida, clobenpropit

Taula 1.2. Resum de les característiques dels receptors de la histamina. L'interrogant indica característiques suggerides en la bibliografia però pendents de confirmació.

* s'ha de tenir en compte que la distribució dels receptors en el cervell varia molt entre les espècies; la distribució de l'H1 i H2 correspon al cervell del conillet d'Índies, la de l'H3 correspon al cervell de rata. AA, àcid araquidònic; TXA₂, tromboexà A₂; IP₃, inositol 1,4,5-trifosfat; DAG, diacilglicerol; PKC, proteïna cinasa C, PI- PLC, fosfolipasa C específica de fosfoinosítids; SNC, sistema nerviós central (taula modificada de Hough L. 1999).

Receptors H1

Els receptors histaminèrgics H1 estan implicats en diferents processos dels quals els més coneguts són les al·lèrgies i les inflamacions en teixits perifèrics i el cicle son-vigília en el SNC (McCormick i Williamson, 1991; Reiner i Kamondi, 1994). En el cervell, encara que hi ha una petita fracció dels H1 en microvasos cerebrals i en astròcits, aquests receptors majoritàriament es troben en neurones (Bouthenet et al., 1988). La distribució d'aquests receptors en el SNC varia molt entre espècies; en el conillet d'Índies, per exemple, s'han vist densitats altes en l'escorça, l'hipocamp i l'hipotàlem (Chang et al., 1979). En general, però, aquest receptor es troba àmpliament distribuït en el SNC, essent més abundant en les àrees del cervell que controlen els estats d'alerta o vigília com són el tàlem, l'escorça, el grup de cèl·lules colinèrgiques del tegment mesopontí i la part anterior basal del cervell, el locus coeruleus i nuclis del rafe (Palacios et al., 1981; Bouthenet et al., 1988).

El receptor H1 està format per una glicoproteïna de 56 kDa que comprèn una seqüència de 486 a 487 aminoàcids. El gen que codifica pel receptor H1 es troba en el cromosoma 3 (Fukui et al., 1994; Le Coniat et al., 1994).

Quant a la farmacologia del receptor es coneixen diversos agonistes (2-pyridyl-etilamina, 2-tiazoliletilamina o 2-[3-bromofenil]histamina) i antagonistes (mepiramina, astemizol o loratadina) selectius i potents.

Mecanisme de transducció dels receptors H1

La unió de la HA als H1 activa via proteïna Gq/11 la fosfolipasa C (PLC), que hidrolitza el fosfatidil-4-5-bisfosfat de la membrana i dona lloc a dos segons missatgers: inositol-1,4,5- trifosfat (IP3) i diacilglicerol (DAG); aquest últim activa, juntament amb el calci alliberat per l'IP3, la proteïna cinasa C (Schwartz et al., 1995) (figura 1.8). En cultius de cèl·lules intactes també s'ha descrit que l'estimulació dels H1 amplifica la resposta generada per activadors de l'adenilat ciclase, com l'adenosina (Hollingsworth i Daly, 1986), les catecolamines (a través dels receptors α -adrenèrgics) (Daly et al., 1980), el VIP (Vasoactive Intestinal Peptide) (Magistretti i Schoderet, 1985) i per la mateixa HA a través de receptors H2, per mecanismes mal coneguts. Els receptors H1 també estimulen la fosfolipasa A2 (PLA2), amb el consegüent alliberament d'àcid araquidònic i els seus metabòlits (Schwartz et al., 1992).

La HA, a través dels receptors H1, activa la glucogenòlisi (Quach et al., 1980) i la formació de GMPc (Richelson, 1978). Fora del sistema nerviós central els receptors H1 estan implicats en la relaxació de la musculatura llisa, augmentant la concentració de calci de l'endoteli i la síntesi i alliberament d'òxid nítric (ON). En el cervell l'activació dels receptors H1 despolaritza neurones corticals actuant sobre la conductància del potassi (Reiner i Kamondi, 1994) i facilita la despolarització provocada per receptors NMDA (Payne i Neuman, 1997).

L'activació del receptor H1 provoca fortes despolaritzacions a causa de la inhibició del degoteig de potassi pels canals de potassi (gK_{Ca2+}). En les neurones del septa la despolarització s'origina per activació dels canals catiónics dependents de calci i/o pel bescanviador sodi/calci.

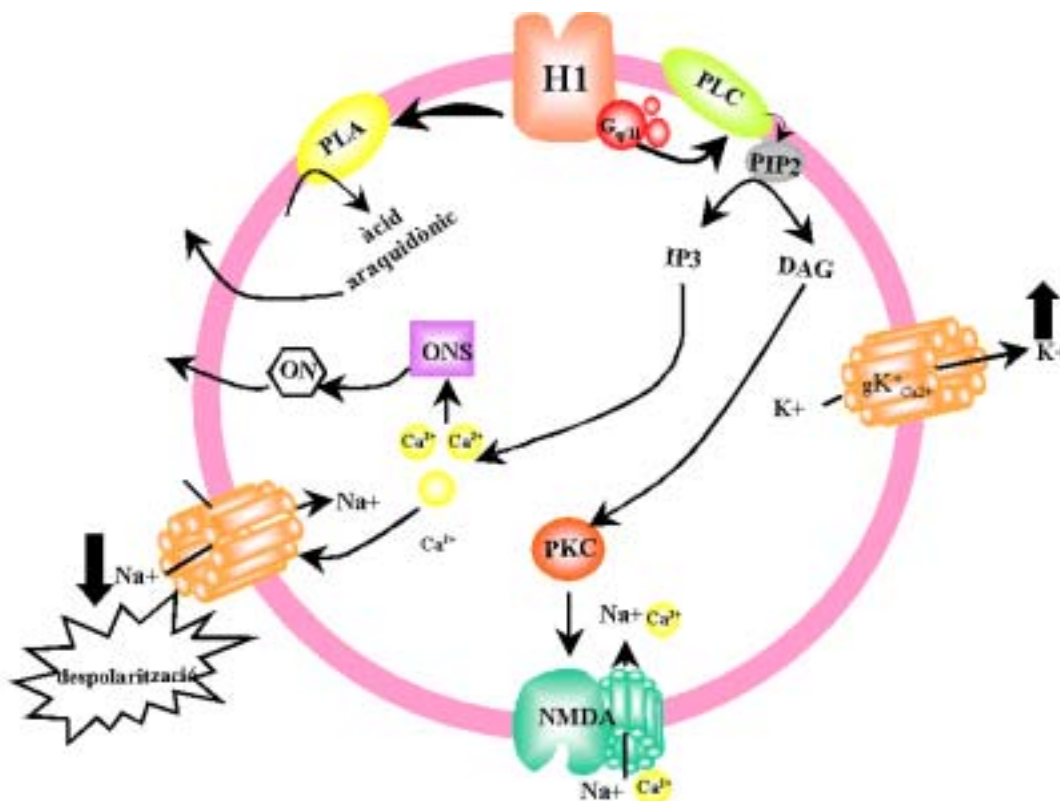


Figura 1.8. Mecanisme de transducció hipotètic dels receptors H1

La unió de la HA als H1 activa via proteïna Gq/11 la fosfolipasa C (PLC), que hidrolitza el fosfatidil-4-5-bisfosfat de la membrana i dona lloc a dos segons missatgers: inositol-1,4,5-trifosfat (IP3) i diacilglicerol (DAG); aquest últim activa, juntament amb el calci alliberat pels IP3, la proteïna cinasa C (PKC). El calci alliberat dels reservoris intracel·lulars activa l'òxid nítric sintetasa (ONS) i pot activar canals catiónics o el bescanviador de sodi/calci. L'activació de la PKC pot fosforilar diferents proteïnes com el receptor NMDA del glutamat (NMDA). D'altres efectes atribuïts al receptor H1 són la producció d'àcid araquidònic (esquema modificat de Brown R.E., 2001)

Receptors H2

Aquests receptors s'ha vist que estan implicats en diferents processos fisiològics com són la secreció gàstrica en teixits perifèrics i la transmissió i la plasticitat sinàptiques en SNC (Brown et al., 1995).

Els receptors H2 es troben en cèl·lules epitelials (com les de la mucosa gàstrica) i sobretot en neurones. En el cervell es localitzen en gairebé totes les regions i són especialment abundants en el caudat putamen, el nucli acumbens i el bulb olfatori (Ruat et al., 1990).

El receptor és una proteïna de 40 kDa i 358-360 aminoàcids que està codificada per un gen sense introns que es localitza en el cromosoma 5 (Traiffort et al., 1995). Es coneixen diversos agonistes per aquests receptors com el dimaprit, amthamina o impromidina, i diversos antagonistes com la burimamida, cimetidina, ranitidina, tiotidina, famotidina o loratadina. Recentment s'ha vist que els receptors H2 presenten una activitat espontània en cèl·lules CHO transfectades (Smit et al., 1996), fet que porta a reclassificar compostos com la ranitidina i famotidina com a agonistes inversos, i la burimamida com a antagonista neutre o clàssic.

Mecanisme de transducció dels receptors H2

Està ben establert que quan s'activen els receptors H2 s'activa l'enzim adenilat ciclasa (AC) per mitjà d'una proteïna Gs, donant lloc a un increment marcat dels nivells d'AMPc (Hegstri et al., 1976) (figura. 1.9) i a l'activació de la PKA. No obstant, en el cervell l'activació dels receptors H2 també sembla que podria activar la PLC, augmentant els nivells de calci intracel·lular i d'IP3, i disminuint de l'alliberament d'àcid araquidònic (Arrang et al., 1995; Hill, 1990) encara que els mecanismes implicats en aquests efectes estan per aclarir i és possible que aquest receptor es pugui acoblar tant a la proteïna Gs com a la Gq, tal com passa en altres receptors (per a revisió vegeu TIPS 2000).

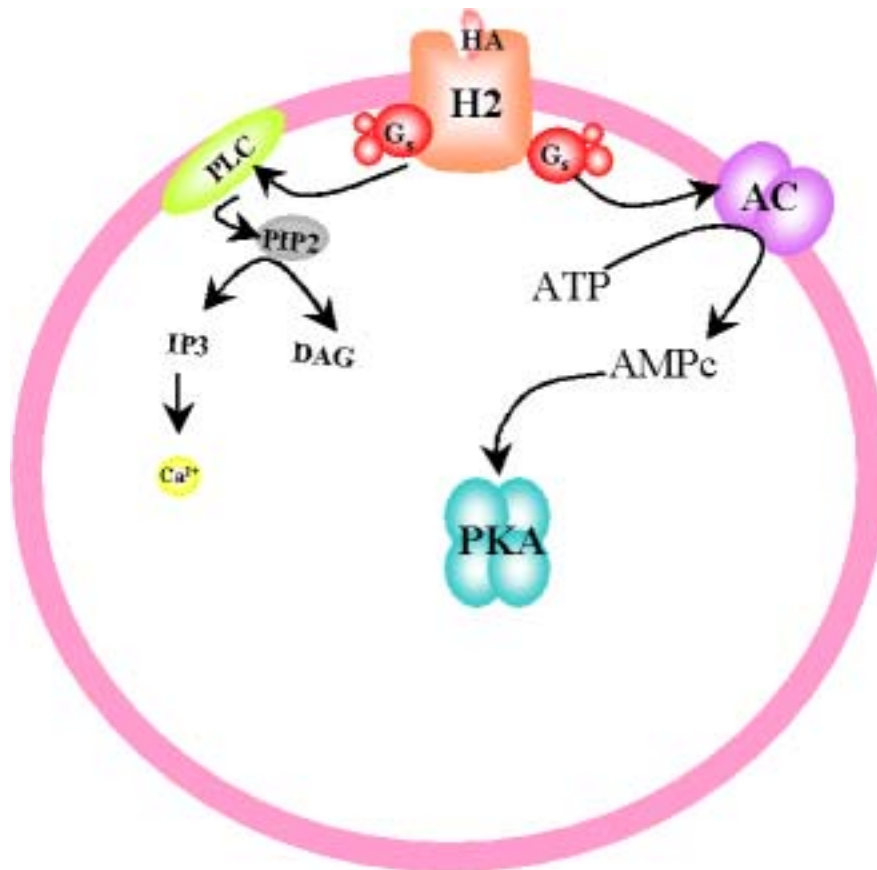


Figura 1.9. Mecanisme de transducció hipotètic dels receptors H2

Aquest receptor s'acobra a una proteïna Gs a través de la qual activa l'adenilat ciclasa (AC) que sintetitza AMPc a partir d'ATP. L'AMPc s'uneix a la subunitat reguladora de la PKA (proteïna cinasa dependent d'AMPc) i fa que es dissociï de les subunitats catalítiques i activi l'enzim. Encara que està per demostrar sembla que un altre mecanisme de transducció de l'H2 en el cervell seria l'activació de la fosfolipasa C (PLC), que hidrolitzaria el fosfatidil-4-5-bisfosfat de la membrana i donaria lloc a dos missatgers secundaris: inositol-1,4,5- trifosfat (IP3) i diacilglicerol (DAG).

Receptors H4

Recentment diversos grups de recerca han descrit un nou grup de receptors histaminèrgics anomenats H4 (Nakamura et al., 2001; Liu et al., 2001; Nguyen et al., 2001; Morse et al., 2001; Zhu et al., 2001). Aquests receptors s'expressen principalment en les cèl·lules mononuclears de la sang i en teixits que contenen elevades concentracions de cèl·lules sanguínies com per exemple la medul·la òssia, el fetge, el ronyó o el pulmó. En canvi, en el cervell no s'han trobat receptors H4. Recentment s'ha descrit la presència del receptor H4 en mastòcits (Hofstra et al., 2003) on té un paper regulador en la quimiotaxi (els mastòcits de ratolins K.O. pel receptor H4 no presenten

quimiotaxi en resposta a la HA). En els mastòcits, l'activació dels receptors H4 per la HA dona lloc a una mobilització dels reservoris de calci intracel·lular a través de proteïnes Gi/o i la fosfolipasa C (PLC) (Hofstra et al., 2003).

La majoria dels estudis estan d'acord que es tracta d'un receptor de la superfamília dels receptors acoblats a proteïna G amb una seqüència aminoacídica que té un 35% d'homologia amb la del receptor H3. Està format per una proteïna de 390 aminoàcids codificada per un gen que es localitza en el cromosoma 18.

El perfil farmacològic d'aquests receptors és molt semblant al de l'H3; per tant, encara no hi ha lligands selectius per al receptor H4.

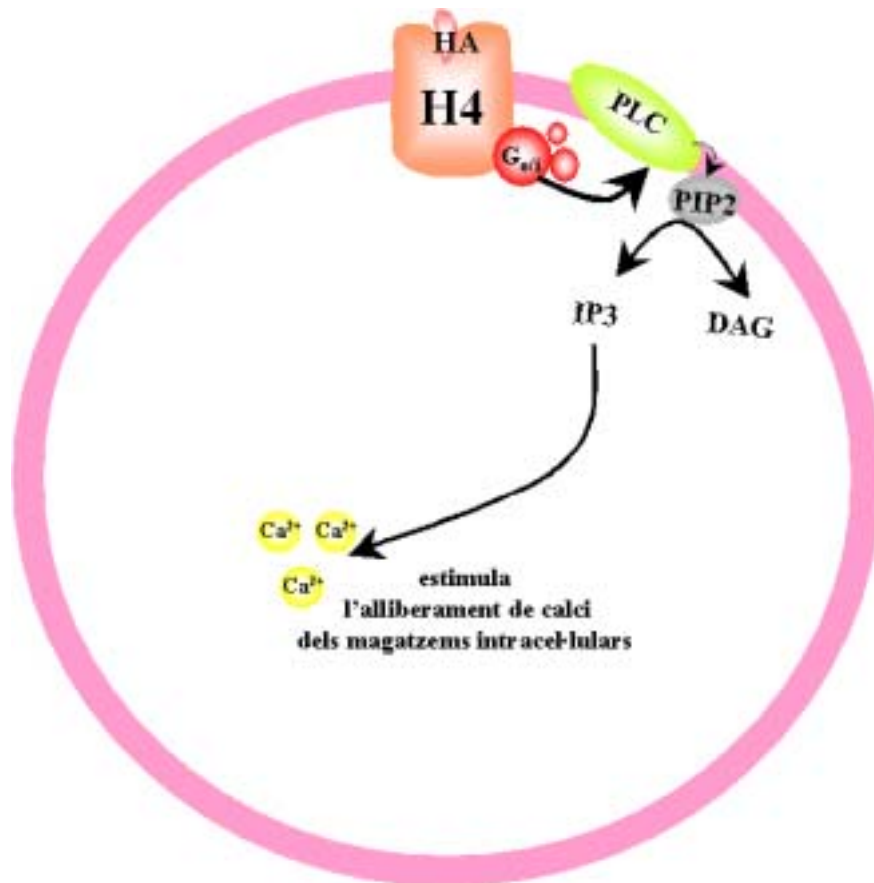


Figura 1.10. Mecanisme de transducció hipotètic dels receptors H4

Pel fet que ha estat descobert recentment, es coneix molt poc sobre el seu mecanisme de transducció. En mastòcits s'ha vist que l'activació dels receptors H4 activa la fosfolipasa C (PLC) i l'alliberament de calci dels reservoris intracel·lulars a través d'una proteïna Go/i; DAG, diacil glicerol; PIP2, fosfatidil-4,5-bisfosfat; IP3, inositol 1,4,5-trifosfat.

Receptors H3

Els receptors H3 es van descriure per primer cop l'any 1983, i es van classificar com autoreceptors inhibidors de la síntesi i alliberament de la HA (Arrang et al., 1983; Arrang et al., 1987b). Actualment existeixen evidències experimentals que indiquen que aquests receptors no només es localitzen presinàpticament en les neurones histaminèrgiques, sinó que també es troben en disposició presinàptica i postsinàptica en neurones no histaminèrgiques, com es demostra pel fet que llur activació pot inhibir l'alliberament de diversos neurotransmissors (Schlicker et al 1994). El desenvolupament d'agonistes i antagonistes específics del receptor H3 ha permès caracteritzar-lo farmacològicament i establir-ne la distribució. L'any 1999 Lovenberg et al., van clonar i expressar aquest receptor, la qual cosa presumiblement permetrà avançar ràpidament en l'estudi de les seves propietats moleculars i bioquímiques.

Propietats moleculars dels receptors H3

El receptor H3 és una proteïna de 445 aminoàcids amb molt poca homologia amb els receptors H1 i H2 així com amb altres receptors aminèrgics. Les màximes homologies les presenta amb els receptors adrenèrgics $\alpha 2A$ i $\alpha 2C$ i amb els receptors muscarínics M1 de l'acetilcolina (al voltant del 30%), mentre que amb els receptors H1 i H2 són només del 22 i el 23% respectivament, fet que explica per què s'ha trigat tant a clonar el receptor H3. A pesar d'aquestes reduïdes similituds, el receptor H3 presenta un residu Asp en el domini transmembrana III (TM3), el lloc d'unió putatiu a l'amina primària, característica comuna de la subfamília de receptors d'amines. L'anàlisi de la seqüència de la proteïna del receptor H3 per Motfinder revela un punt de glicosilació en Asn11 de l'N-terminal. La PKA podria fosforilar una Ser342 situada en el tercer *loop* intracel·lular i la PKC fosforilaria residus situats en el primer (Ser69), segon (Ser141, Thr149) i tercer *loop* intracel·lular (Ser310, Thr314, Ser319, Thr345) (Leurs et al., 2000). Fins ara s'han descrit 4 isoformes funcionals del receptor H3 de rata que corresponen a proteïnes de 445 (H3(445)), 413 (H3(413)), 410(H3(410)) i 397(H3(397)) aminoàcids. La isoforma H3(445) correspon a una proteïna sencera amb un 93% d'identitat amb el receptor H3 humà. Les deleccions de 32-, 35- i 48- aminoàcids de les isoformes H3(413), H3(413) i H3(397) es localitzen a la meitat del tercer *loop*

intracitosòlic (I3), i afecten els llocs potencials de fosforilació. S'han descrit dues isoformes anomenades H3(nf1) i H3(nf2) presumiblement no funcionals producte de la generació de codons de determinació (Drutel et al., 2001; Morisset et al., 2001).

Distribució dels receptors H3

Mitjançant la tècnica de la transferència Northern s'ha vist que el receptor H3 només s'expressa en el cervell, sobretot en el tàlem i els nuclis caudats. En els teixits perifèrics estudiats (cor, placenta, pulmó, fetge, ronyó, pàncreas, melsa i timus) no s'ha trobat expressió d'H3 (Lovenberg et al., 1999; Drutel et al., 2001).

Tal com indiquen les autoradiografies fetes en el cervells de rata (Pollard et al., 1993) i de mico (Martínez-Mir et al., 1990) i el *binding* amb l'agonista selectiu [³H]-R- α -metilhistamina, el nombre i la distribució dels receptors H3 pot variar molt entre les diferents espècies.

En general, però, hi ha molts receptors H3 en l'escorça cerebral, sobretot en les àrees rostrals i les làmines IV i V. En l'hipocamp hi ha un nombre relativament elevat de receptors H3 en el gir dentat, moderat en el subicle i baix en la fimbria. En el complex amigdaloides hi ha densitats altes d'H3 en el *bed nucleus stria terminalis*, coincidint amb una elevada innervació histaminèrgica (Pillot et al., 2002) (figura 1.11).

En la part anterior basal del cervell hi ha abundants receptors H3 en els bulbs olfactoris i el nucli acumbens, així com en la part dorsomedial de l'estriat. En el tàlem, els H3 es troben principalment en els nuclis de la línia mitjana, intralaminar i lateral. A l'hipotàlem la poca densitat d'H3 contrasta amb l'elevada innervació histaminèrgica. Finalment, la quantitat d'H3 en totes les capes del cerebel és molt baixa, així com en l'arrel dorsal de la medulla espinal. Aquesta distribució dels receptors H3 no és paral·lela a la dels àxons histaminèrgics, fet que suggereix que la majoria d'aquests receptors no funcionen com a autoreceptors. Aquest fet es va confirmar amb la identificació de receptors H3 que controlen l'alliberament en terminals nervioses serotoninèrgiques (Schlicker et al., 1988), noradrenèrgiques (Schlicker et al., 1989), colinèrgiques (Prast et al., 1999) i glutamatèrgiques (Brown et al., 1996; Molina-Hernández et al., 2000) de diferents àrees del cervell.

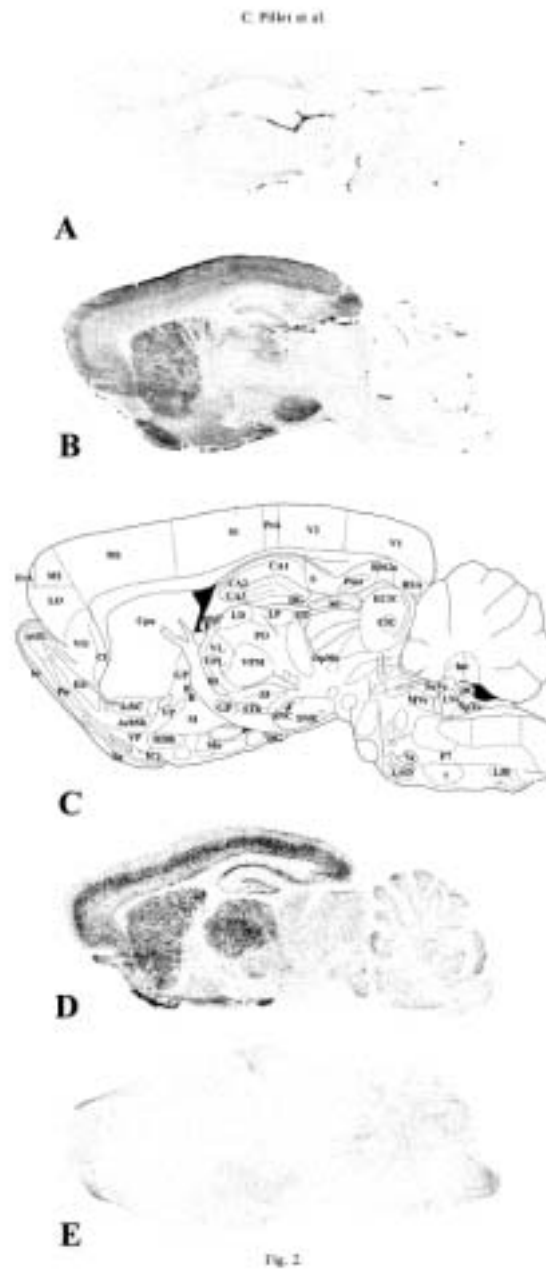


Figura 1.11. Talls sagitals de cervell de rata en els quals es pot veure la distribució dels receptors H3

Per fixació del [^{125}I] iodeproxifan (antagonista H3) i la distribució de l' mRNA del receptor. Els talls es van incubar amb 15 pM de [^{125}I] iodeproxifan sol (binding total, B) o en presència d'1 μM d'(R) α -metHA (binding no específic, A). La secció lateral del cervell és de 2.4 mm (Praxinos i Watson, 1998)(C). En les figures (D) i (E) es van incubar talls del mateix nivell de diferents animals amb sondes antisentit i sentit respectivament marcades amb ^{32}P (Pillot et al., 2003).

Mecanisme de transducció dels receptors H3

Abans de la clonació del receptor H3 diversos estudis havien aportat proves que l'H3 pertanyia a la superfamília dels receptors acoblats a proteïnes G:

1. La unió de l' $[^3\text{H}]\text{-R-}\alpha\text{-metilhistamina}$ està regulada per nucleòtids guanina (Arrang et al., 1990).
2. La unió de $[^{35}\text{S}]\text{-GTP}\gamma[\text{S}]$ en membranes d'escorça de rata augmenta en presència d'agonistes H3 (Clark et al., 1996).
3. L'efecte del receptor H3 és sensible a la toxina pertussis, fet que indica que el receptor està unit a una proteïna del subtipus Gi o Go (Clark et al., 1996; Lovenberg et al 1999; Drutel et al., 2001).

En cèl·lules transfectades amb el receptor H3, l'activació del receptor inhibeix la formació d'AMPC estimulada per la forskolina (Lovenberg et al., 1999), fet que suggereix que l'AMPC podria ser un segon missatger en el sistema de transducció de senyals lligat al receptor H3. Recentment el nostre grup va descriure que la forskolina estimulava la síntesi d'HA a través de la PKA i aquest efecte era modulats pel receptor H3 (Gómez-Ramírez et al., 2001).

Diferents autors indiquen l'existència d'altres mecanismes de transducció del receptor. Takeshita et al (1998) observà que els receptors H3 modulen els canals de calci dependents de voltatge (CCAV) en neurones dissociades dels nTM. D'altra banda, Drutel et al (2001) van observar que, en cèl·lules COS-7, l'activació de certes isoformes del receptor H3 de rata estimula la cascada de senyalització de la MAP cinasa i que aquesta activació era sensible a la toxina pertussis.

Finalment, estudis recents han demostrat que el receptor H3 nadiu presenta una elevada activitat constitutiva en neurones histaminèrgiques. Aquesta conclusió deriva de l'observació que determinats antagonistes com la tioperamida i el ciproxifan, a més d'antagonitzar els efectes dels agonistes també són capaços de potenciar l'alliberament d'histamina induïda per despolarització, disminuir el *binding* de $[^{35}\text{S}]\text{-GTP}\gamma[\text{S}]$ i augmentar els nivells de metHA en el cervell de ratolí, la qual cosa s'interpreta com el bloqueig d'una activitat inhibidora intrínseca del receptor (Morisset et al., 2000; Rouleau et al., 2002). En canvi, altres antagonistes com el proxifan (antagonista neutre) només poden bloquejar la inhibició de l'alliberament d'histamina induïda per imetit en sinaptosomes despolaritzats per K^+ . A partir d'aquests resultats la tioperamida es

considera un antagonista/agonista invers i en conseqüència cal que es revisi la descripció farmacològica dels diferents antagonistes d'aquest receptor.

Paper dels receptors H3 en altres sistemes de neurotransmissió

Com ja s'ha comentat en apartats anteriors, els receptors H3 es troben en les mateixes neurones histaminèrgiques, on funcionen com a autoreceptors regulant la síntesi i l'alliberament d'HA, i en altres tipus neuronals regulant l'alliberament de diversos neurotransmissors.

S'han descrit tres accions principals dels receptors acoblats a proteïnes G sensibles a la toxina pertussis: inhibició de l'alliberament de neurotransmissors, inhibició dels corrents de calci d'alt llindar (*high threshold*) i la hiperpolarització per activació dels canals de potassi (*inwardly-rectifying*). Està clar que els receptors H3 provoquen les dues primeres accions, però la connexió dels H3 amb els canals de potassi encara està per demostrar.

L'activació dels receptors H3 de les neurones dels nTM provoca una inhibició dels canals de calci activats per voltatge (Takeshita et al., 1998) i una inhibició de l'impuls nerviós (Haas et al., 1992). La inhibició dels corrents de calci és bastant petita, però el canvi de la concentració de calci que provoca és suficient per explicar la inhibició de l'alliberament.

Els H3 regulen l'alliberament de neurotransmissors probablement a través de la interacció directa entre la proteïna Gi i els canals de calci activats per voltatge (CCAV) presinàptics. S'ha descrit que els H3 inhibeixen del 20 al 60% l'alliberament de diferents neurotransmissors, depenent de la concentració extracel·lular de calci (Schlicker et al., 1994, Brown et al., 1999B; Blandizzi et al., 2001; Silver et al., 2002). En l'hipotàlem de rata i en l'escorça d'altres espècies, els receptors H3 inhibeixen l'alliberament de 5-HT i noradrenalina (Schlicker et al., 1994). En experiments fets *in vitro* l'activació dels receptors H3 inhibeix l'alliberament d'acetilcolina en l'escorça de cervell de rata (Clapham et al., 1992). En el teixit estriatal de ratolí l'activació del receptor H3 inhibeix l'alliberament de dopamina (Schlicker et al., 1993), i en llesques d'estriat i de substància nigra de rata inhibeix l'alliberament de GABA induït pel receptor dopaminèrgic D1 (Garcia et al., 1997). Mitjançant estudis electrofisiològics amb llesques d'hipocamp s'ha vist que l'H3 inhibeix l'alliberament de glutamat (Brown et al., 1995).

Els diferents lligands H3 modulen l'alliberament d'acetilcolina en l'escorça, l'estriat ventral i l'hipocamp (Prast et al., 1999). En l'hipocamp, l'alliberament d'HA de les terminals histaminèrgiques estimula l'alliberament d'acetilcolina via receptors H2 (Mochizuki et al., 1994). L'administració sistèmica d'agonistes i antagonistes H3 inhibeix o augmenta respectivament l'alliberament d'acetilcolina en l'hipocamp. En l'escorça cerebral de rates vives, l'activació dels receptors H3 postsinàptics estimula l'alliberament de GABA, fet que provoca una inhibició de l'alliberament d'acetilcolina induïda per despolarització (Giorgetti et al., 1997). La davallada de l'alliberament d'acetilcolina en l'escorça cerebral després de l'administració sistèmica d'agonistes H3 coincideix amb un empitjorament de la resposta de les rates en els tests que modelitzen la capacitat d'aprenentatge (Blandina et al., 1996).

Farmacologia del receptor H3

La metilació del grup amino terminal de la HA dóna lloc a compostos com la R-(α)-metilhistamina que són agonistes més potents i selectius. Aquests agonistes han estat molt útils per a caracteritzar farmacològicament els efectes mediatos pel receptor H3 (Leurs et al., 1995a). D'altres agonistes són productes de substituir el grup amino per un grup isotiourea (imetit) o per un anell (immepip) (Vollinga et al., 1994) (figura 1.14). En un principi la R-(α)-metilhistamina ha estat l'agonista més usat tant *in vivo* com *in vitro* pel fet que fou el primer a ser sintetitzat. No obstant, l'elevada polaritat d'aquest compost dificulta la penetració a través de la barrera hematoencefàlica. D'altra banda, la histamina-N-metiltransferasa (HMT) metila l'anell imidazòlic i dóna lloc a un compost de vida mitjana curta en plasma humà (Rouleau et al., 1997). Aquests problemes han estat resolts amb l'aparició d'altres agonistes H3 com l'imetit i l'immepip (Krause et al., 1995).



Figura 1.12. Mecanismes de transducció dels receptors H3

Aquest receptor està acoblat a proteïna Gi/o i inhibeix l'adenilat ciclasa (AC) i la producció d'AMPc. A través de la proteïna Gi/o inhibeix l'alliberament de neurotransmissors (cetilcolina, noradrenalina, dopamina, serotonina, GABA...) a través de la inhibició de l'entrada de calci pels CCAV (canals de calci activats per voltatge). Com a autoreceptor regula l'alliberament i la síntesi d'HA per mecanismes mal coneguts. La inhibició de l'AC inhibeix la PKA i directament o indirectament la síntesi d'HA.

L'antagonista prototip del receptor H3, anomenat tioperamida (Arrang et al., 1987A) té una afinitat nanomolar pel receptor H3 i travessa bastant bé la barrera hematoencefàlica. A pesar del seu ampli ús com antagonista selectiu, també presenta afinitat pel receptor 5-HT3 (Leurs et al., 1995b) i probablement interacciona amb el transport de GABA (Yamamoto et al., 1997). Afegint un grup isotioureica a la cadena lateral de la tioperamida s'obté el clobenpropip, un antagonista deu vegades més potent *in vitro*, però amb poca capacitat de penetrar en el cervell. Amb l'objectiu d'optimitzar els efectes en el cervell i disminuir la toxicitat relacionada amb els grups tioureica i isotioureica, s'han substituït aquests grups per altres cadenes laterals amb grups polars (per exemple urees, amines, amides, éters, carbamats i oxadiazols) i s'ha donat lloc als

antagonistes H3 iodeproxifan, impentamina i GT2016 (figura 1.14). Molts d'aquests nous antagonistes són molt efectius i penetren molt bé la barrera hematoencefàlica en ratolins. El [¹²⁵I]-iodefenpropit i el [¹²⁵I]-iodeproxifan, entre altres han donat bons resultats com a radiol·ligands del receptor H3 (Ligneau et al., 1994).

Tal com hem explicat anteriorment en l'apartat de mecanisme de transducció, el receptor H3 nadiu té una elevada activitat constitutiva regulant l'activitat de neurones histaminèrgiques en el cervell (Morisset et al., 2000; Wieland et al., 2001). A causa d'això substàncies com la tioperamida, el clobenpropit o el ciproxifan, que es classificaven com a antagonistes H3, ara es consideren agonistes inversos, mentre que el proxifan i el VUF4904 (un derivat nou de la impentamina) actuen com a antagonistes clàssics.

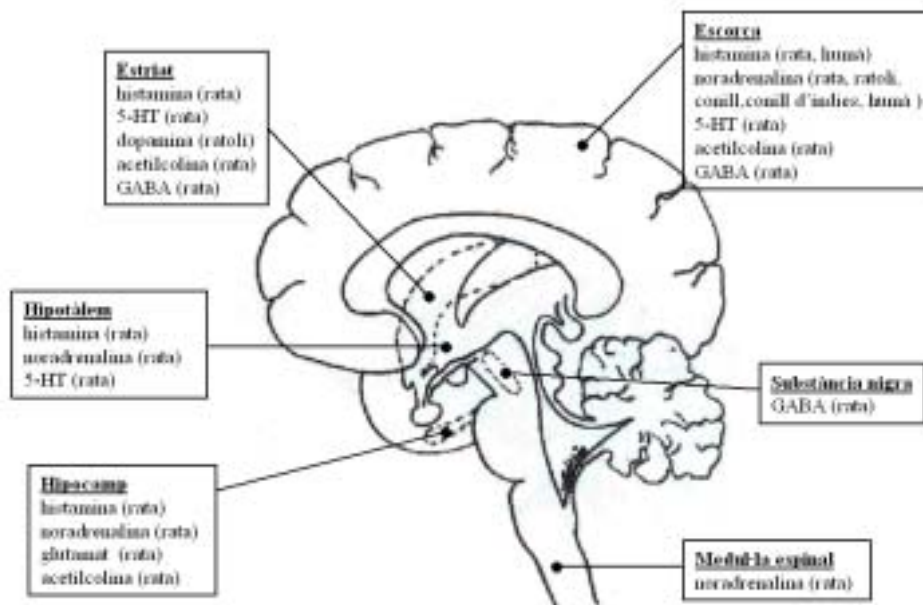


Figura 1.13. Localització d'algunes de les respostes funcionals del receptor H3 en el cervell
El receptor H3 modula l'alliberament de la HA i de molts altres neurotransmissors arreu del cervell. Malgrat que es representa un cervell humà la majoria d'aquestes dades s'han obtingut en el cervell de diferents espècies de rosegadors (pres de Leurs, 1995a).

Propietats terapèutiques potencials dels receptors H3

El receptor H3 modula gran varietat de funcions en el SNC, i els lligands H3 són bons candidats per a pal·liar alteracions en aquestes funcions com poden ser l'insomni, la hiperactivitat, l'epilèpsia, l'obesitat, etc.

El son i la vigília. Els estats d'alerta

La presència de les neurones histaminèrgiques en els nuclis tuberomamil·lars de l'hipotàlem posterior (una àrea implicada en el manteniment dels estats d'alerta) i les projeccions d'aquestes neurones arreu del cervell suggereixen que la histamina pot tenir un paper en el manteniment del cicle son-vigília. Les lesions en l'hipotàlem posterior provoquen somnolència en rates, gats i micos (Monti et al., 1993) i diferents estudis neuroquímics i electrofisiològics indiquen que l'activitat de les neurones histaminèrgiques és màxima durant els períodes de vigília i que davalla molt en períodes de son així com després de l'administració de barbiturats i altres substàncies hipnòtiques (Vanni-Mercier et al., 1984). A més, l'alliberament *in vivo* d'HA en l'hipotàlem de rates mostra un ritme circadià, amb pics d'HA que coincideixen amb els períodes d'activitat motora màxima (Mochizuki et al., 1992). En rates, els agonistes H3 augmenten la fase de son d'ona lenta (*slow-wave sleep*) (Monti et al., 1993). En canvi l'administració sistèmica d'antagonistes H3 incrementa l'estat d'alerta i la motilitat de l'animal. Els ratolins *knock-out* per l'HDC manquen d'histamina cerebral i tenen el cicle son-vigília molt alterat (Parmentier R, et al., 2002).

Els processos cognitius i de memòria.

S'ha relacionat les pèrdues cognitives lligades a diverses malalties neurodegeneratives com la malaltia d'Alzheimer amb alteracions en la transmissió acetilcolinèrgica. No obstant, l'envelliment cerebral i la malaltia d'Alzheimer van acompanyats de nombroses alteracions en diferents sistemes de neurotransmissors, entre els quals es troba el sistema histaminèrgic (Panula et al., 1998). Existeixen evidències directes que relacionen la neurotransmissió histaminèrgica amb l'aprenentatge i la memòria. Per

exemple, l'administració d'HA augmenta la capacitat cognitiva de rates mesurada pel test d'evitació passiva; en canvi, l'administració d'antagonistes H1 provoca una disminució de la memòria (Kamei et al., 1990; Kamei et al., 1991). Tal com descriuen diversos estudis d'alliberament, la HA modula l'activitat de les neurones colinèrgiques (Mochizuki, 1994; Blandina et al., 1996). A més, la tioperamida millora la latència de la resposta en el test d'evitació passiva en ratolins amb envelliment prematur (Meguro et al., 1995). Flood et al (1998) van descriure que l'administració de lligands H3 en el septe modulava la retenció de la memòria. Mitjançant diferents tests de conducta s'ha vist que l'administració de tioperamida i clobenpropit atenua l'amnèsia provocada per l'escopolamina en ratolins (Miyazaki et al., 1995; Miyazaki et al., 1997). Recentment, Orsetti et al (2001) han demostrat que la tioperamida millora la memòria en tasques de reconeixement. Tots aquests resultats suggereixen que els antagonistes i agonistes inversos del receptor H3 poden ser útils per al tractament dels dèficits cognitius.

Trastorn d'hiperactivitat amb dèficit d'atenció (THDA)

El THDA és un trastorn del desenvolupament associat a alteracions motores, emocionals, d'aprenentatge i d'atenció. La disminució de neurotransmissors monoaminèrgics sembla contribuir a les alteracions dels afectats pel THDA (Oades et al., 1987). El fet que els lligands del receptor H3 són capaços de modular el cicle son-vigília, les capacitats cognitives i l'alliberament de neurotransmissors fa pensar que aquests agents podrien ser útils en el tractament d'aquesta síndrome. De fet, en models animals amb alteracions cognitives i motores semblants a les observades en el THDA (Dumery et al., 1987), l'administració de l'antagonista H3, GT2016 disminueix les alteracions motores i millora la resposta en el test multiprova d'evitació passiva.

Epilèpsia

En processos epilèptics la HA endògena té efectes anticonvulsius. Diferents autors indiquen que diversos antagonistes/agonistes inversos del receptor H3 (tioperamida i clobenpropit) disminueixen la susceptibilitat de patir convulsions induïdes elèctricament en ratolins (Murakami et al., 1995; Yokoyama et al., 1993; Yokoyama et al., 1994). Aquests resultats podrien estar relacionats amb l'augment de l'alliberament d'HA induït

per aquestes substàncies. Per tant, seria interessant estudiar les aplicacions dels antagonistes/agonistes inversos H3 en el tractament de l'epilèpsia.

Obesitat

Diferents estudis coincideixen que la HA pot disminuir les ganes de menjar. Injeccions intracerebroventriculars (icv) d'HA provoquen una disminució de la ingesta en les rates; en canvi, l'aplicació d'antagonistes H1 o la disminució d'HA endògena augmenta aquesta ingesta (Sakata et al., 1995). Es creu que la HA disminueix la sensació de gana degut a l'activació dels receptors postsinàptics H1 en els nuclis ventrals medials de l'hipotàlem. També s'han trobat receptors H3 en aquesta regió (Pollard et al., 1993).

L'administració icv de tioperamida suprimeix la ingesta de menjar, probablement a causa de l'augment de l'alliberament i síntesi d'HA provocada per aquest agonista invers. En les rates obeses Zucker (model genètic per a l'obesitat) ni la tioperamida ni els antagonistes H1 afecten la ingesta, fet que porta a pensar que alguns tipus d'obesitat podrien estar associats a alteracions en la neurotransmissió histaminèrgica (Machidori et al., 1992). Finalment, els ratolins K.O. per l'H3 tenen totes les característiques del fenotip obès (Takahashi et al., 2002). Així doncs, tots aquests resultats fan pensar que els receptors H3 es podrien utilitzar com a diana farmacològica per al tractament de l'obesitat.

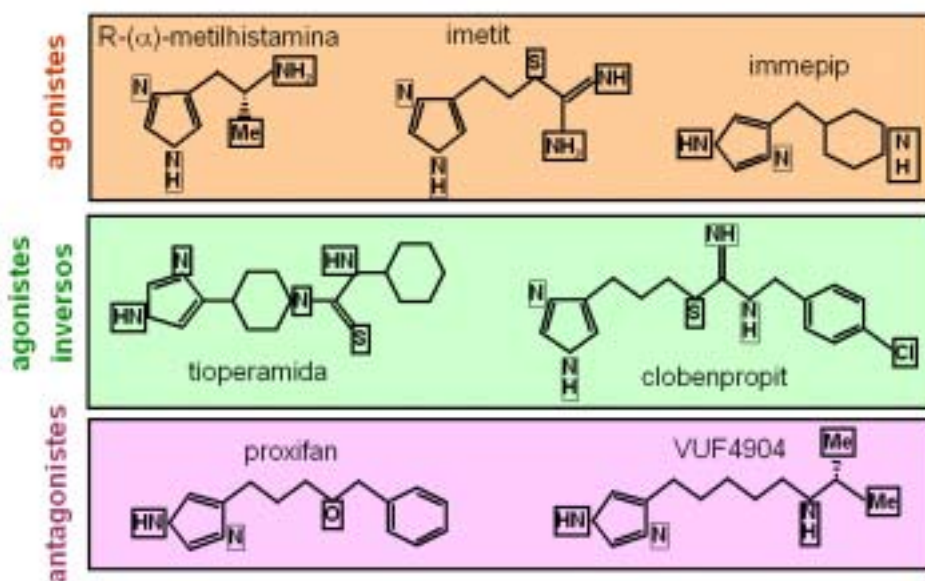


Figura 1.14. Estructures moleculars d'alguns dels agonistes, antagonistes i agonistes inversos del receptor H3.

Objectius

Malgrat que la via de l'AC-PKA participa en la regulació de la síntesi d'HA cerebral, l'augment de la síntesi d'HA per despolarització no depèn de PKA (Gómez-Ramírez-Ramírez et al., 2002) i s'inhibeix en presència de l'agonista H3 imetit (Arrang et al., 1987b). A més, els receptors H3 modulen l'entrada de calci pels CCAV (Takeshita et al., 1998). Tot això indica que el receptor H3 podria modular la síntesi d'HA a través d'una via de transducció de senyal dependent de calci tal com s'ha vist per a altres neurotransmissors.

Tenint en compte la importància de la histamina en diferents processos neurofisiològics i neuropatològics, així com el potencial farmacològic dels receptors H3, ens hem proposat l'objectiu de conèixer més sobre els mecanismes de regulació de la síntesi i l'alliberament de la HA cerebral, i més concretament quin és el paper del calci en aquests mecanismes. Aquest propòsit general es pot concretar en diferents objectius que exposem a continuació, dels quals el primer representa una millora metodològica que ens ha facilitat l'assoliment dels restants objectius:

1. Desenvolupar un mètode d'HPLC per purificar i mesurar la histamina marcada radioactivament que es sintetitza a partir d'histidina marcada.
2. Estudiar si l'entrada de calci extracel·lular està implicada en la regulació de la síntesi i alliberament de la histamina durant la despolarització de les terminals histaminèrgiques.
3. Estudiar si el receptor H3 modula la síntesi d'HA mitjançant mecanismes dependents de calci.
4. Determinar si la histidina descarboxilasa es modula per fosforilació per proteïnes cinases dependents d'AMPc o de calci.

Metodologia

1. PURIFICACIÓ DE LA [³H]-HISTIDINA COMERCIAL

La [³H]-histidina comercial (40-60 Ci/mmol)(Amersham) està marcada amb [³H]- en les posicions 3 i 5 de l'anell imidazol (figura 3.1.1). La taxa de descomposició indicada pels comerciants del producte és de 1-3% cada mes, però pot augmentar durant l'emmagatzematge del producte. Aquesta radiòlisi de la [³H]-histidina genera una sèrie de productes indesitjables (entre els quals s'hi podria trobar [³H]-HA) que s'han d'eliminar per augmentar la sensibilitat del mètode. Per això purifiquem per HPLC alíquotes de l'estoc comercial i la [³H]-histidina recollida és la que s'utilitza com a substrat en els diferents medis d'incubació.

Les columnes d'HPLC que utilitzem són de fase reversa C18 (Tracer Extrasil ODS2, 5 µm de gruïera de partícula, 25 X 0.46 cm; Teknokroma). Durant 12.5 minuts s'aplica un gradient de tampó fosfat sòdic (pH 3) que va de 1 a 6 mM. La fase mòbil conté concentracions constants baixes de metanol (2%) i d'àcid octanosulfònic (0.1 mM) durant el gradient. El flux aplicat és d'1ml / minut. Sota aquestes condicions la [³H]-histidina s'elueix als 9-10 minuts (figura 2.1) i no està contaminada de [³H]-histamina, ja que aquesta última elueix a concentracions de fosfat molt més grans (20 mM). En una purificació típica s'injecta un volum de 400 µL a l'HPLC corresponent a aproximadament 50 µCi de [³H]-histidina (2nmols) i es recull un volum de 0.5 a 1 ml de purificat. El pic de [³H]-His es detecta per absorbància a 225 nm. La concentració de [³H]-histidina de l'eluït es calcula extrapolant l'àrea del pic detectat en una recta patró feta amb un estàndard extern d'His sense marcar (Sigma). El límit de detecció per als estàndards d'His a 225 nm és de 50 pmols. Un cop recollida la [³H]-histidina que ha passat per l'HPLC es diposita una alíquota (5 µl) en un vial, es barreja amb 3 ml de líquid d'escintil·lació i es compten les dpm emeses durant 3 minuts. Seguidament es calcula l'activitat específica de la [³H]-histidina pura multiplicant les dpm pel volum total recollit i dividint el resultat per la quantitat de [³H]-histidina detectada (fmols). S'ha comprovat que la quantitat de metanol i d'àcid octasulfònic present en la solució de [³H]-histidina pura no altera l'activitat HDC de les mostres assajades.

2. PREPARACIÓ DELS HOMOGENATS DE CERVELL

S'ha treballat amb rates Sprage-Dawley de 8 setmanes d'edat, el pes de les quals oscil·la entre 250 g i 350 g. Els animals s'han sacrificat per decapitació entre les 10 i les 11 del matí. L'extracció del cervell s'ha dut a terme introduint les tisores de dissecció per l'orifici medul·lar i tallant seguint les fissures més externes dels temporals, que s'enretiren deixant el cervell al descobert. Finalment, aquest s'extreu amb una espàtula i ràpidament es diposita en tampó fosfat potàssic fred 10 mM (pH 7.4). A continuació es neteja de meninges i s'homogeneïtza manualment amb un 10% (pes /volum) del mateix tampó amb un homogeneïtzador de vidre-tefló. Es fan deu desplaçaments durant els quals l'homogeneïtzador es troba dins un recipient amb gel.

3. INCUBACIÓ DELS HOMOGENATS

Alíquotes d'homogenats d'aproximadament 0.2 mg de proteïna s'incuben amb 10 μ M de piridoxal-5-fosfat (PLP) i amb una concentració de [3 H]-his pre-purificada (40-50 Ci/mmol) de 0,25 μ M. S'afegeix tampó d'homogeneïtzació fosfat potàssic 10 mM (pH 7.4) fins a un volum final d'incubació de 100 μ L. La reacció s'inicia afegint la [3 H]-His i dipositant les mostres en un bany en agitació a 37°C durant una hora. Després de la incubació es posen les mostres sobre el gel i se'ls afegeix àcid tricloracètic (TCA) fins a una concentració final de 0.5% (pes/volum). L'àcid tricloracètic té la doble funció d'aturar la reacció i desproteïnitza. Els blancs d'incubació es preparen afegint el TCA abans que la [3 H]-His i no s'incuben a 37°C sinó que es deixen en gel tota l'estona. Juntament amb l'àcid tricloracètic s'afegeix també a totes les mostres (inclosos els blancs) 100 nM d'HA sense marcar que, com a estàndard intern, té una doble funció: per una banda, controlar les pèrdues de [3 H]-HA durant el procés (o sigui, el rendiment de recuperació de la [3 H]-HA) i per altra banda, serveix per detectar el pic d'HA en l'HPLC (vegeu purificació d'HA per HPLC). Finalment se centrifuguen els tubs a 4°C i 12000 X g durant 10 minuts. Es recullen els sobrenedants i es processen tal com s'indica en els apartats 6 i 7.

4. PREPARACIÓ DELS MINIPRISMES D'ESCORÇA CEREBRAL

Els cervells s'extreuen tal com s'ha indicat anteriorment i es dipositen en un recipient amb medi Krebs-Ringer-bicarbonat (MKR) fred i prèviament gasejat amb una atmosfera composta de 95% d'O₂ i 5% de CO₂. El MKR té la següent composició: 120 mM de NaCl, 0.8 mM KCl, 2.6 mM CaCl₂, 0.67 mM MgSO₄, 1.2 mM KH₂PO₄, 27.5 mM NaHCO₃ i 10 mM de glucosa, pH 7.4. Treballant sempre a 4°C s'extreuen les meninges i se separen els lòbuls corticals netejant-los bé de matèria blanca. Mitjançant un txoper de teixits McIlwain (Mickle Laboratory Engineering Co., Gomshall, Surrey, UK) s'obtenen els miniprismes d'escorça de 0.3 X 0.3 mm. Els miniprismes es resuspenen i es renten tres cops per sedimentació amb MKR fred per tal d'eliminar les restes de cèl·lules que s'han trencat. Un cop nets s'elimina l'excés de MKR, i queda una suspensió de miniprismes que conté aproximadament 15 mg/ml de proteïna total.

5. SÍNTESI I ALLIBERAMENT DE [³H]-HISTAMINA EN ELS MINIPRISMES D'ESCORÇA CEREBRAL

Mitjançant una punta de pipeta de 200 µl tallada a un cm del final es dipositen 100 µl de suspensió de miniprismes (2 - 3mg de proteïna) en tubs de polipropilè de fons pla de 2 ml. En un experiment típic a partir d'una escorça cerebral s'obtenen uns 25 tubs de miniprismes. Les mostres es preincuben 30 minuts a 37°C en un bany en agitació sota una atmosfera composta de 95% O₂ i 5% CO₂. Després de 25 minuts de preincubació s'afegeix la [³H]-His prepurificada (3.125 µCi; concentració final, 0.25 µM) a totes les mostres i es deixen 5 minuts més perquè la [³H]-His penetri a les cèl·lules. A partir d'aquí les mostres s'incuben 30 minuts en un volum final de 250 µl. Quan es despolaritzen els miniprismes amb 30 mM de potassi les mostres es preincuben en un volum de 190 µL i just abans de la incubació s'afegeixen 60 µL de tampó MKR despolaritzant a 37°C que té la següent composició: 2 mM de NaCl, 120 mM KCl, 2.6 mM CaCl₂, 0.67 mM MgSO₄, 1.2 mM KH₂PO₄, 27.5 mM NaHCO₃ i 10 mM de glucosa, pH 7.4 fins assolir 250 µl de volum final; aquest MKR despolaritzant conté KCl concentrat i NaCl diluït per a mantenir la isotonicitat del medi. Els fàrmacs assajats en aquest treball s'han afegit 15 minuts abans del període d'incubació. El volum en què

estan dissolts els fàrmacs s'ha tingut en compte i totes les mostres tenen un volum final de 250 µl. Les concentracions eficients dels fàrmacs sovint són més elevades que les descrites en la bibliografia, ja que cal que els diferents compostos penetrin a través del gruix de teixit relativament dens dels miniprismes. La reacció s'atura posant els tubs en gel i afegint a cada tub 35µl d'una barreja de desproteïnització (25 µl d'àcid tricloracètic al 10% p/v i 10 µl d'HA 10 mM com a estàndard intern). Seguidament se soniquen les mostres durant 10 a 20 segons a 4°C mitjançant un sonicador (Dybatech Lb, Chantilly, V). Els blancs d'incubació es preparen afegint la barreja de desproteïnització abans que la [³H]-His, i es deixen en gel sense incubar-los a 37°C; després es tracten exactament igual que la resta de les mostres. Un cop s'han sonicat els miniprismes es recullen alíquotes de 10 µl i es dissolen 10 cops en aigua per a determinar la concentració de proteïna. Finalment se centrifuguen les mostres a 4°C, 12000 X g durant 10 minuts. Es recullen els sobrenedants per a ser processats tal com s'indica en els apartats 6 i 7.

Per quantificar la [³H]-HA alliberada els miniprismes es preparen i es preincuben i incuben de la manera descrita. Al final del període d'incubació se centrifuguen els tubs a 4°C, 700 X g durant 15 segons per fer baixar els miniprismes al fons del tub sense que es trenquin i poder recollir 150 µl del sobrenedant. Immediatament es diposita aquest volum de sobrenedant en tubs que contenen 35 µl de barreja de desproteïnització (25 µl d'àcid tricloracètic al 10% p/v i 10 µl d'HA 10 mM com a estàndard intern) a 4° C. Els blancs es preparen afegint [³H]-His, centrifugant a continuació i recollint els sobrenedants de 700 X g, als quals se'ls afegeix la barreja de desproteïnització. Els miniprismes (el sediment) es resupenen amb 150 µL de MKR (el mateix volum que hem extret per a mesurar la [³H]-HA alliberada) i 35 µL de la barreja de desproteïnització, i se soniquen durant 10 o 20 segons a 4°C mitjançant el mateix sonicador. Es recullen 10 µL de cada mostra dels miniprismes per a determinar la concentració de proteïna. Totes les mostres (inclosos els sobrenedants) se centrifuguen a 12000 X g 10 minuts. Tots els sobrenedants desproteïnitzats en aquest darrer pas es processen tal com s'indica en els apartats 6 i 7. En aquestes mostres la síntesi total de [³H]-HA s'obté sumant la [³H]-HA alliberada i la romanent en els miniprismes.

6. ELIMINACIÓ DE L'EXCÉS DE [³H]-HISTIDINA

Com que el percentatge de [³H]-His que es transforma a [³H]-HA és molt baix, per augmentar la sensibilitat del mètode és convenient eliminar l'excés de substrat que no ha reaccionat. Amb aquest objectiu les mostres desproteïnitades es barregen amb una reïna amberlita de bescanvi aniònic (IRA 900, Supelco, *mesh* 16-50) que conté amines quaternàries que fixen els grups carboxílics de la His, absents en la HA. Malgrat això últim, la reïna amberlita capta una petita part d'HA, probablement per interaccions inespecífiques amb la matriu de la reïna. Per tant, abans de començar a utilitzar un estoc nou d'amberlita cal comprovar la quantitat adient de reïna que uneix el màxim d'His i el mínim d'HA mitjançant un experiment senzill amb patrons d'HA i His no radioactius. D'altra banda, aquesta reïna comercial porta els grups funcionals equilibrats amb Cl⁻, que actua com a contraió. Com que els grups carboxílics de la His tenen pitjor afinitat per la reïna que el clorur, és convenient regenerar prèviament la reïna amb una alta concentració d'OH⁻, per desplaçar el Cl⁻ com a contraió. La regeneració de la reïna es duu a terme passant 20 volums de NaOH 1M a través d'una columna de 50 ml de reïna. Posteriorment es fan rentats amb 20 volums d'aigua MilliQ i la reïna es guarda en aigua MilliQ en una botella tancada fins a la seva utilització. Abans de cada experiment es renta amb 10 volums d'aigua MilliQ per eliminar impureses que apareixen durant el període d'emmagatzematge. Es pipetegen 100 µl de la reïna (l'equivalent a 14-15 mg de reïna seca) amb una punta de 200 µl tallada a 1,5 cm de l'extrem i es barregen amb 250 µl del sobrenedant. Aquesta barreja s'agita durant 10 minuts a temperatura ambient mitjançant un agitador de vials automàtic. En aquest pas la reïna capta un 95% de la [³H]-His. A més, també capta l'ió tricloracetat, fet que provoca un increment del pH en les mostres de 3 a 9 aproximadament, per l'alliberament de contraions hidroxil. Finalment se centrifuguen les mostres a 8000 X g 5 min i es recullen els sobrenedants en tubs eppendorf sense tap per a ser injectats a l'HPLC. En alguns experiments la barreja de sobrenedant i reïna s'ha filtrat utilitzant tubs microspin (Lida, EUA) amb membranes d'acetat de cel·lulosa de 0.45 µm de porus, que faciliten la manipulació de les mostres i permeten injectar mostres més netes. Abans d'injectar a l'HPLC es quantifica la radioactivitat de 10 µL d'algunes mostres per tal de comprovar l'eficiència d'eliminació de la [³H]-His per l'amberlita.

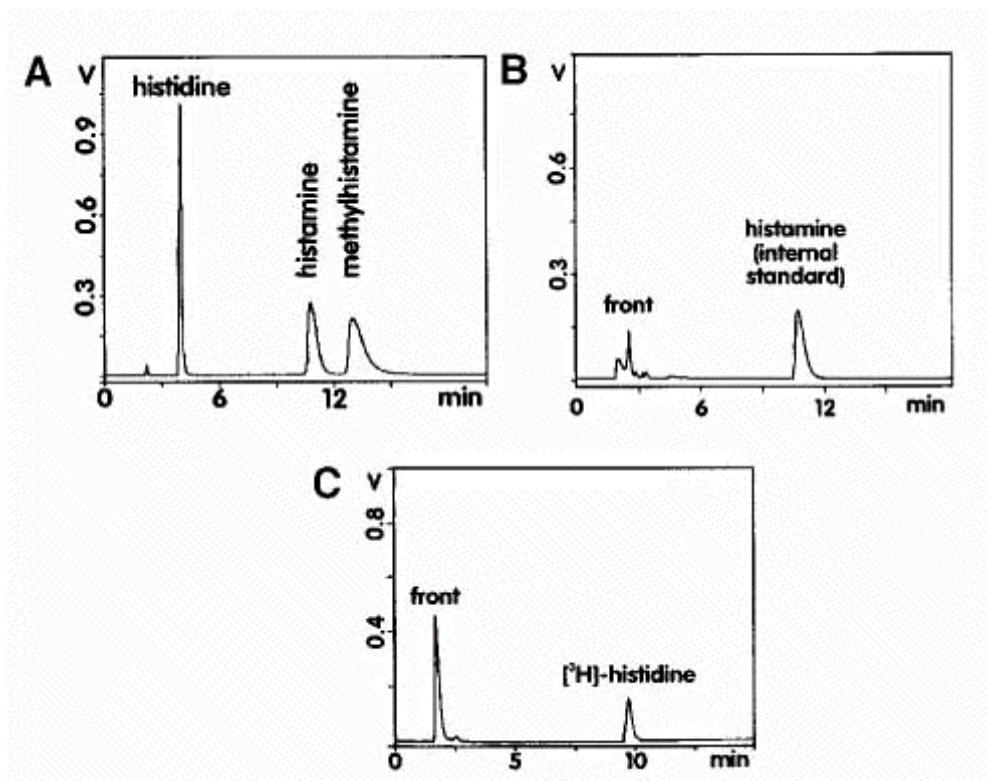


Figura 2.1. Perfils de l'HPLC de fase reversa

Corresponents a 100 nmols d'estàndards d'histidina, histamina i telemetilhistamina (A). La figura B mostra un cromatograma corresponent a una mostra típica; el pic que s'observa correspon a l'estàndard de 100 nmols d'HA afegit, ja que el contingut d'HA endogen és molt petit per a ser detectat. En la figura C es mostra el perfil típic que s'obté de la purificació per HPLC de la [^3H]-His comercial en un gradient de 1 a 6 mM de NaH_2PO_4 . La fase mòbil per a A i B està formada per 3 M de tampó fosfat sòdic pH 3, 10 mM d'àcid octanosulfònic i un 21% de metanol. Els pics es detecten per absorbància a 225 nm (ultraviolat).

7. PURIFICACIÓ DE LA [^3H]-HISTAMINA PER HPLC

Un cop s'ha eliminat l'excés de [^3H]-His, es procedeix a purificar la [^3H]-HA per HPLC. El sistema està format per una columna C18 (Tracer extrasil ODS2, 5 μm de grària de partícula, 25 X 0.46 cm; Teknokroma) amb una precolumna de 2 X 20 mm, i una fase mòbil amb 10 mM d'àcid octanosulfònic (parell iònic), tampó fosfat sòdic 0.3 M ajustat a pH 3 amb àcid fosfòric i 21% (v/v) de metanol. El flux de la fase mòbil durant la injecció de les mostres és d'1 ml/ min. Aquestes condicions són òptimes per separar la His, la HA i la telemetilhistamina (el principal metabòlit de la histamina en el cervell)(fig. 2.1). Tots aquests compostos contenen anells imidazòlics que es detecten per absorbància a 225 nm, però la sensibilitat d'aquesta absorbància només permet

detectar els estàndards no radioactius. Les concentracions d'His i HA, tant radioactives com endògenes, presents en les mostres són tan baixes, que no es poden detectar per absorbància a 225 nm. Per aquesta raó s'observa un sol pic d'HA ben visible i lliure d'interferències que apareix als 9-10 minuts de la injecció i que correspon a l'estàndard d'HA freda afegit prèviament com a patró intern (fig. 2.1). La fracció corresponent a la HA es recull en un vial d'escintil·lació, es barreja amb còctel Optiphase HiSafe III (Wallac) i es quantifiquen les dpm. Per a obtenir el rendiment de recuperació de la HA es comparen les àrees de cada patró intern amb la mitjana de les àrees dels patrons externs injectats (la recuperació de la HA sol ser d'un 75%). Les dpm corresponents a la HA sintetitzada es calculen aplicant a les dpm de cada mostra el rendiment de recuperació dels patrons d'HA sense marcar i restant les dpm dels blancs d'incubació i dels blancs columna (que són les dpm obtingudes en el pic d'elució d'HA freda). La quantitat de [^3H]-HA sintetitzada es calcula dividint les dpm anteriors per l'activitat específica de la [^3H]-His prepurificada en dpm/fmols, la quantitat de proteïna en mil·ligrams i el temps d'incubació en hores. En el cas de les mostres de miniprismes usades per a l'alliberament, per a determinar la síntesi de [^3H]-HA total se sumen els valors de la [^3H]-HA alliberada amb els valors de la [^3H]-HA romanent en els miniprismes .

Hem comprovat que els compostos usats durant la incubació no interfereixen amb el pic d'HA. L'ibmx, es detecta amb un temps de retenció de 50 minuts i el W13, amb un temps de retenció de 30 minuts. En aquests casos, per evitar interferències, allarguem el temps entre injeccions de mostres.

Mesura de la síntesi de HA en homogenats

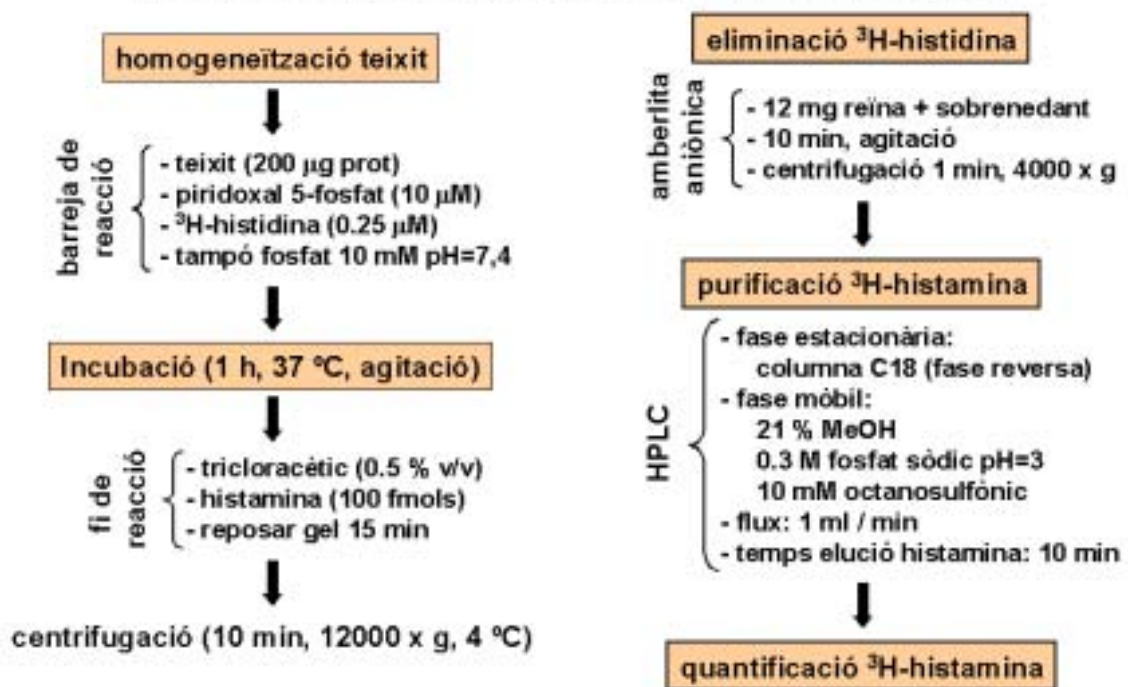


Figura 2.2. Esquema de la síntesi de [³H]-histamina en homogenats de cervell

Un cop les mostres estan desproteïnitzaades, aquest procediment és comú per a la determinació de la síntesi i alliberament d'HA en miniprismes.

Mesura de la síntesi de HA en miniprismes

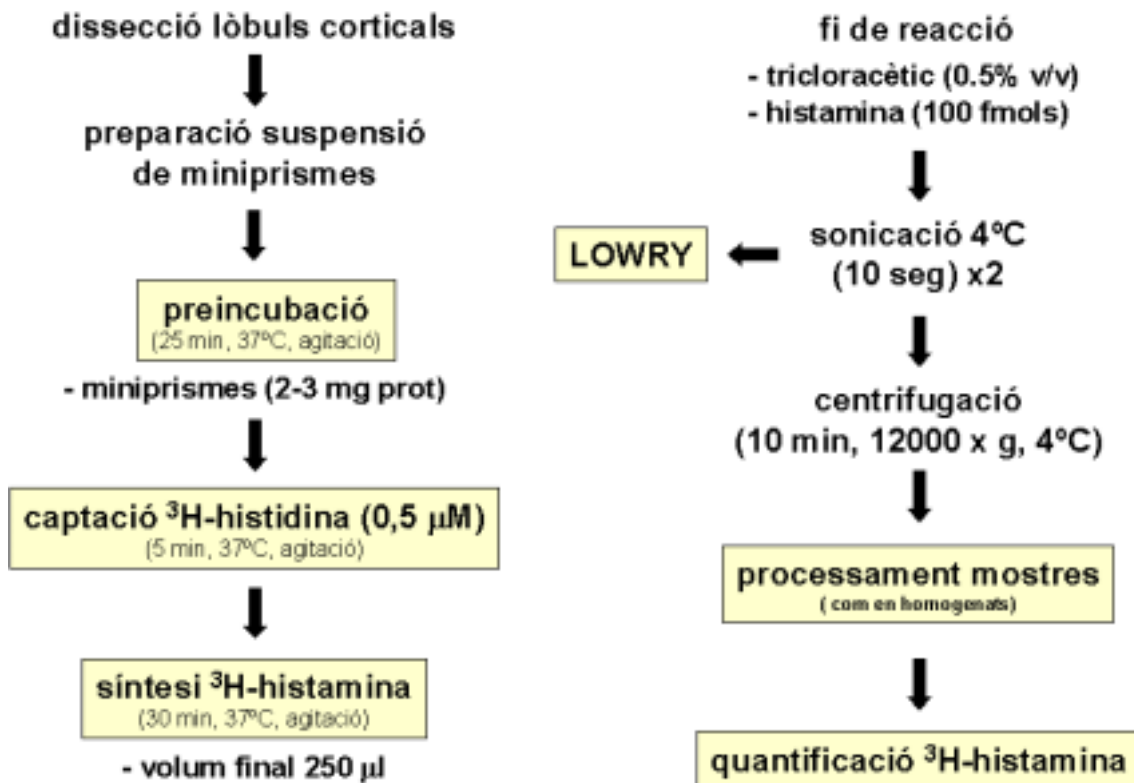


Figura 2.3. Esquema del mètode de determinació de la [³H]-HA que se sintetitza a partir de [³H]-His en miniprismes d'escorça cerebral

La dissecció dels lòbuls corticals i la preparació dels miniprismes es porta a terme a 4°C. Els miniprismes es preincuben per a facilitar la difusió dels fàrmacs a través del teixit, la [³H]-histidina s'afegeix 5 minuts abans del període d'incubació. Un cop s'han desproteïnit les mostres es processen tal com es descriu per als homogeneïtzats de cervell.

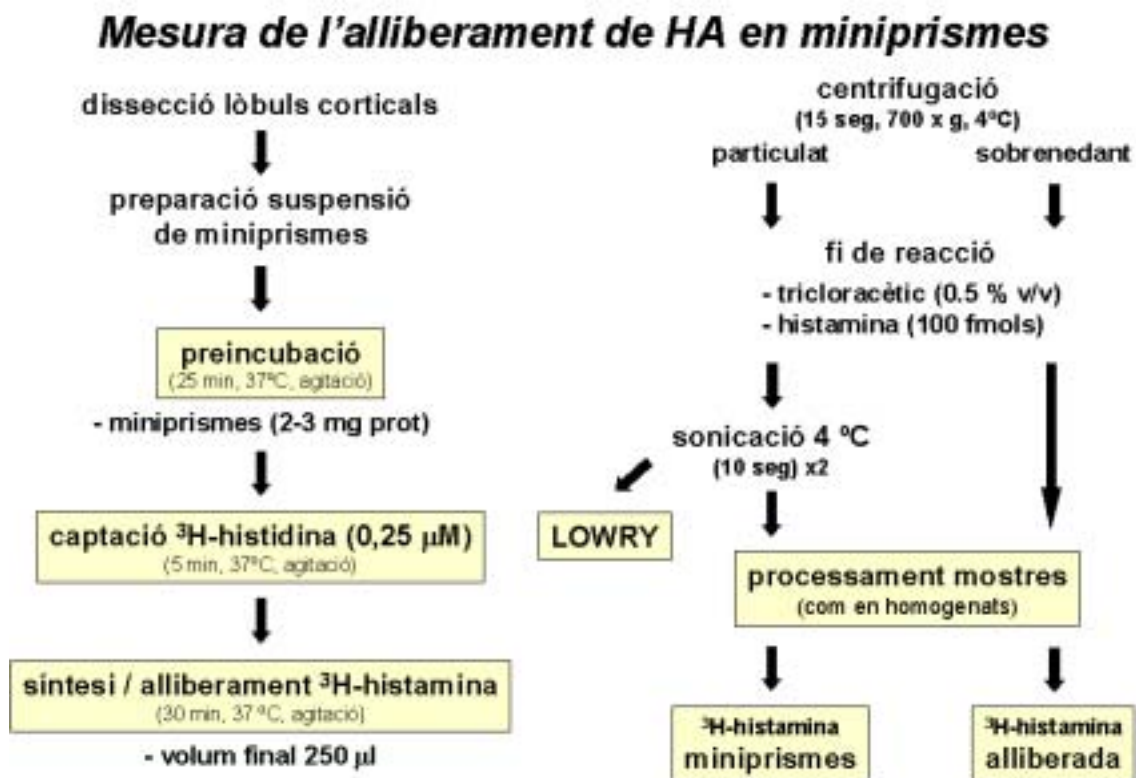


Figura 2.4. Variació del mètode aplicat als miniprismes per a determinar la [³H]-HA sintetitzada que s'allibera

Un cop acabada la incubació, en comptes de desproteïnitzar amb el TCA, se centrifuguen les mostres i es retira el sobrenedant per a determinar la [³H]-HA que s'ha alliberat. El volum de sobrenedant enretirat se substitueix per un volum igual de tampó. A partir d'aquí es processen les mostres de la manera descrita.



Figura 2.5. Equipament per a purificar la [³H]-HA formada a partir de [³H]-His

1) Columna d'HPLC de fase reversa C18 (Tracer Extrasil ODS2, 5 µm de grària de partícula, 25 X 0.46 cm; Teknokroma, Espanya); 2) Espectrofotòmetre (225 nm) Merck Hitachi L-4000; i bombes (flux: 1ml/ minut) Merck Hitachi L-6200A; 3) Injector automàtic Merck Hitachi L-7200; 4) Col·lector de mostres Merck Hitachi L-5200; 5) Interfície Hercule 2000; 6) Ordinador PC.

8. PURIFICACIÓ DE LA HISTIDINA DESCARBOXILASA (HDC1/512)

La proteïna HDC1/512 és una HDC de cervell de rata expressada en bacteris de la soca BL21(DE3)pLyS transformats amb el plàsmid pET-11a (Olmo et al., 2000) que conté una seqüència que codifica pels 512 aminoàcids de l'extrem N-terminal de la HDC. La proteïna és sintetitzada en aquesta soca bacteriana i posteriorment purificada segons el mètode publicat per Engel et al. (1996). Aquest treball s'ha dut a terme en el departament de Bioquímica i Biologia Molecular de la Universitat de Màlaga, en el laboratori de la doctora Francisca Sánchez-Jiménez.

La purificació de la proteïna HDC 1/512 es duu a terme a partir de 4 litres de cultius de bacteris transformats. Les cèl·lules creixen en medi LB suplementat amb ampicil·lina a 100µg/mL i cloranfenicol 34 µg/mL fins arribar a una densitat òptica de 0.6-0.7 a 600nm; llavors s'afegeix isopropil-β-D-tiogalactopiranòsid (IPTG) a una concentració final d'1mM i s'incuba 5 hores a 25°C per induir la síntesi d'HDC. Es precipiten les cèl·lules centrifugant durant 25 minuts a 4°C. El precipitat cel·lular es guarda a -20°C fins a la seva utilització, moment en el qual es resuspèn en 150 mL de tampó potàssic 20 mM pH 7.0, àcid etilediaminotetracètic (EDTA) 2mM, PLP 5 mM i polietilè glicol (PEG) 300 a l'1%. Seguidament les cèl·lules es trenquen mitjançant la sonicació en fred fins que la mostra es veu homogènia i se centrifuguen a 14000 rpm durant 90 minuts a 4°C. El sobrenedant recuperat se sotmet als següents passos de purificació:

1) Precipitació amb sulfat amònic. Al sobrenedant obtingut se li afegeix 1/10 del volum de tampó potàssic 1 M pH 7.5, per tamponar el canvi de pH que provocarà l'addició del sulfat amònic. La solució es manté en gel en agitació suau i es va afegint lentament la sal amònica finament mòlta fins al 25% de concentració final. Finalitzada la precipitació, se centrifuga a 14000 rpm durant 20 minuts a 4°C. La HDC no precipita en aquestes condicions. Es recupera el sobrenedant, que se sotmet al següent pas de purificació.

2) Cromatografia de fenil-sefarosa (2.5 X 25 cm). La columna s'equilibra amb tampó fosfat potàssic 20 mM pH 7.0, DTT (ditiotretitol) 0.1 mM, PLP 5 mM, saturat al 25% amb sulfat amònic. Després de passar la mostra i fer el rentat de la columna, s'aplica un gradient lineal entre 500 g del tampó d'equilibrat i 500 g de tampó fosfat potàssic 1mM pH 7.0, DTT 0.1 mM, PLP 5 mM. Un cop finalitzat el gradient, s'elueix la proteïna passant 300 mL de tampó fosfat potàssic 1 mM pH 7.0, DTT 0.1 mM, PLP 5 mM i

PEG300 al 2%. Es recullen diferents fraccions i s'analitza per transferència Western les que contenen HDC.

3) Cromatografia de bescanvi aniònic DEAE_Sephadex (2.5 X 25 cm). La columna s'equilibra amb tampó fosfat potàssic 5 mM pH 7.0, DTT 0.1 mM, PLP 5 mM i PEG300 a l'1%. Després de passar la mostra i rentar la columna s'aplica un gradient lineal entre 0 i 0.2 M de NaCl en 500 mL del tampó anterior. Les fraccions en què s'elueix la proteïna es concentren mitjançant un sistema de cèl·lules d'ultrafiltració per pressió (Amicon).

4) Cromatografia d'hidroxiapatit. La columna (1 X 20 cm) s'equilibra amb tampó fosfat potàssic 5 mM pH 7.0, DTT 0.1 mM, PLP 5 mM i PEG300 a l'1%. Després de passar la mostra i fer un rentat de la columna, s'aplica 50 ml d'un gradient lineal entre 5 i 200 mM de tampó fosfat potàssic pH 7.0, DTT 0.1 mM, PLP 5 μ M i PEG300 a l'1%. Es recullen les fraccions que contenen la proteïna i es concentren mitjançant ultracentrifugació.

En tots els casos, es realitza un seguiment de la proteïna mitjançant electroforesi desnaturalitzant en SDS al 10% (SDS-PAGE), transferència Western (figura 2.6) i activitat (Engel et al., 1996) fins que es posa a punt la purificació.

9. DETECCIÓ PER IMMUNOBLOT DE LA HDC1/512

10 μ L d'HDC purificada (15 μ g/ μ L) es dilueixen a la meitat amb tampó reductor de mostres, es bullen 5 minuts a 100°C, i es carreguen en un gel desnaturalitzant en SDS de poliacrilamida al 10%. Com a patró de pesos moleculars utilitzem el marcador Precision Protein Standards™ (Bio-Rad). L'electroforesi es realitza a 200 V i 30 mA durant 50-60 minuts. Un cop finalitzada l'electroforesi es transfereixen les proteïnes a una membrana de PVDF durant 40-50 minuts a 50 V i 34 mA. Per a comprovar que l'electrotransferència ha estat correcta es realitza una tinció de la membrana amb solució Ponceau-S 0.1% durant 2 minuts i es marquen amb llapis les bandes corresponents del patró dels pesos moleculars. La membrana es bloqueja durant una hora a temperatura ambient (opcionalment es pot deixar tota la nit a 4°C) en tampó PBS (0.01M de tampó fosfat sòdic pH 7.2 amb 0.14 M de NaCl) amb llet en pols desnatada al 10%. A continuació s'incuba amb sèrum de conill anti-gstHDC obtingut a la Universitat de Màlaga (Urdiales et al., 1998). L'anticòs s'utilitza amb una dilució 1:2000 en tampó PBS amb albúmina de sèrum boví (BSA) a l'1.5% durant 60 minuts a temperatura

ambient. Després es realitzen tres rentats de 10 minuts a temperatura ambient amb tampó PBS-Tween20 al 0.05%. Com a segon anticòs s'utilitza l'anti-IgG de conill conjugat amb peroxidasa de rave (dilució 1:3000 en tampó PBS amb BSA a l'1.5%), la membrana s'incuba en aquesta solució durant una hora a temperatura ambient. Abans de revelar la membrana es torna a rentar de la mateixa manera amb PBS-Tween20 al 0.05%. Per al revelat s'utilitza el sistema de quimioluminiscència ECL (Amersham). Un cop tractada la membrana s'exposa durant uns 20-30 segons a una pel·lícula autoradiogràfica.

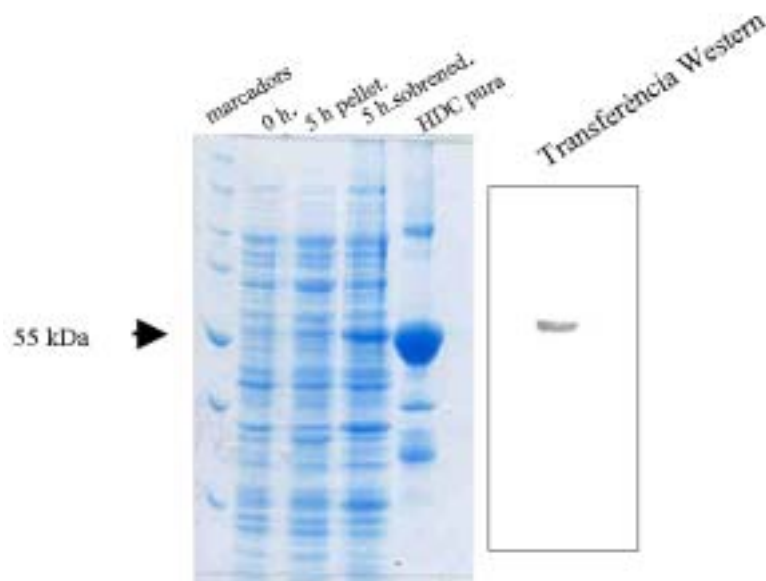


Figura 2.6. SDS-PAGE i transferència Western

SDS-PAGE del cultiu de bacteris de la soca BL21(DE3)pLyS transformats a les 0 hores de la inducció amb IPTG i de les fraccions particulada i soluble del mateix cultiu a les 5 hores des de la inducció amb IPTG. El carril de la dreta correspon a una mostra d'HDC1/512 purificada. En la transferència Western s'observa una sola taca corresponent a HDC1/512.

10. DETECCIÓ AUTORADIOGRÀFICA DE LA FOSFORILACIÓ PER PKA I PER CAMKII DE LA HDC1/512

Per a la determinació de la fosforilació per PKA, es prepara una barreja que conté tampó HEPES 50 mM a pH 7.4, 5mM MgCl₂, 0.1, 0.05, 0.01 mg/ml de HDC1/512 purificada, 1 µg/ml i 0,5 µg/ml de PKA (Subunitat catalítica, cor boví, 20µg/ml en dissolució), i 50µM d'ATP (que conté 5 µCi de [γ -³²P]ATP) en un volum final de 100 µL. L'activitat específica de [γ -³²P]ATP és de 10 mCi/ml, 3000Ci/mmol. Aquesta barreja s'incuba durant 40 minuts en un bany a 30°C i es para la reacció afegint-hi

tampó reductor de mostres concentrat 6 vegades [93.75 mM de tampó Tris-HCl pH 6.8, 3% (p/v) de SDS, 15% de glicerol, 50 mM de DTT i 0.015 (p/v) de blau de bromofenol] i bullint durant 5 minuts. Seguidament es carreguen 10 μ L de cada mostra en cada pouet del gel de poliacrilamida al 10% amb SDS. Es corre l'electroforesi durant 50 minuts a 200 V i 35 mA, sense deixar que el front blau del tampó reductor surti del gel, ja que aquí és on es troba la major part de l'ATP radioactiu. Finalitzada l'electroforesi es talla la part blava del front, s'elimina el gel concentrador i es tenyeix mitjançant el mètode de Coomassie ràpid: 10 minuts en solució fixadora (25% isopropanol, 65% aigua, 10% àcid acètic), 20 minuts de Coomassie i una hora (mínim) en àcid acètic al 10% amb un o dos canvis de la solució.

El gel tenyit s'asseca al buit durant 30 minuts a 70°C i un cop sec es deixa en contacte amb una pel·lícula autoradiogràfica (Kodak X-omat) 24 hores a -80°C amb pantalla amplificadora.

Per a la determinació de la fosforilació per CaMkII es prepara una barreja que conté tampó HEPES 50 mM a pH 7.4, 5mM MgCl₂, 0.3 mM CaCl₃, 30 μ g /mL de calmodulina (de cervell boví; Calbiochem), 0.3, 0.15 mg/ml de HDC1/512 purificada, 0,6 μ g/ml de CaMkII (de cervell de rata; Calbiochem, 1.13 u/mg, 20 μ g/ml) i 50 μ M d'ATP (10 μ Ci de [γ -³²P]ATP) en un volum final de 100 μ L. Seguidament es procedeix tal com s'ha descrit per a la PKA.

11. DETERMINACIÓ DE L'ACTIVITAT HDC1/512

Per a mesurar l'activitat de la HDC purificada hem utilitzat el mètode radioisotòpic descrit per als homogenats de cervell amb petites modificacions: hem utilitzat el tampó Hepes 50 mM pH 7.4 amb 5 mM MgCl₂ en comptes del tampó fosfat potàssic 10 mM pH 7.4. En comptes d'homogenat cerebral vam posar 0.45 μ g d'HDC1/512 purificada sense fosforilar o prèviament fosforilada. La His en el medi s'ha afegit a una concentració final de 60 μ M que conté 0.1 μ M de [³H]-His. En el cas de la HDC prèviament fosforilada, aquesta es dissol en el medi d'incubació i conté traces mínimes dels components de la barreja de fosforilació.

12. QUANTIFICACIÓ DE PROTEÏNES

En mostres de cervell s'ha utilitzat el mètode de Lowry et al.,(1951) i en les mostres d'HDC purificada el mètode de Bradford et al.,(1976). En el cas dels miniprismes desproteïnitats amb TCA s'ha comprovat que l'acidesa de la mostra no afecta la determinació de proteïna, ja que prèviament es neutralitza amb NaOH. En ambdós mètodes s'ha utilitzat l'albumina sèrica com a estàndard.

13. TRACTAMENT DE LES DADES

Els valors absoluts s'expressen amb la mitjana i la desviació estàndard. Els resultats dels diagrames de barres són la mitjana i l'error estàndard (SEM) expressats en % dels valors control. L'anàlisi estadística s'ha fet amb el programa GRAPHPAD PRISM. Les comparacions múltiples respecte d'un grup control s'han analitzat segons la prova ANOVA, seguida del test de Dunnett. Per a totes les anàlisis, el nivell de significació considerat per determinar diferències significatives ha estat de $P < 0.05$ si no s'indica el contrari.

RESULTATS

1. POSADA A PUNT DEL MÈTODE RADIOISOTÒPIC PER A LA DETERMINACIÓ DE LA SÍNTESI D'HISTAMINA EN HOMOGENATS I MINIPRISMES

1.1. Introducció

Pel fet que en el cervell hi ha poca HDC calen mètodes molt sensibles per a determinar aquesta activitat enzimàtica. En general els mètodes que mesuren l'activitat HDC es poden classificar en fluorimètrics i isotòpics. Els mètodes fluorimètrics es basen en la derivatització de la HA amb o-ftaldehid i la quantificació del fluoròfor resultant per fluorometria (Schwartz et al., 1970; Watanabe et al., 1979). Aquests mètodes en general són menys sensibles que els isotòpics i per tant necessiten quantitats més grans de teixit. Dins dels mètodes isotòpics podem diferenciar els mètodes radioenzimàtics i els radioisotòpics. El mètode radioenzimàtic de Taylor i Snyder (1972) es basa en afegir al medi d'incubació S-adenosilmetionina (SAM) marcada radioactivament i l'enzim imidazol-N-metiltransferasa, que catalitzen la formació de metilhistamina radioactiva a partir d'HA. Malgrat la seva elevada sensibilitat aquest mètode és llarg, costós i poc repetitiu a causa de la inestabilitat de la SAM radioactiva. Les tècniques radioisotòpiques es basen en la utilització d'His marcada radioactivament i la posterior quantificació dels productes de la descarboxilació: el CO₂ radioactiu (Kishikawa et al., 1991) o HA radioactiva (Reilly i Schnyder, 1972; Keeling et al., 1984). La tècnica que mesura el [¹⁴C]-CO₂ alliberat s'ha utilitzat poc ja que en molts teixits la quantitat de [¹⁴C]-CO₂ detectada és més gran que la d'HA formada, fet que s'interpreta per la transaminació de la His a imidazol piruvat i la posterior descarboxilació d'aquest (Skratt, 1994). D'altra banda, els mètodes que es basen en la determinació de [³H]-HA marcada a partir de la [³H]-His marcada (figura 3.1.1) tenen els següents inconvenients:

- 1) La [³H]-His comercial sol contenir una sèrie d'impureses i una taxa de radiòlisi alta.

- 2) A causa de la baixa taxa de transformació de la [³H]-His a [³H]-HA en teixit cerebral, és convenient separar molt bé la HA formada de la His en excés que no s'ha descarboxilat, per tal d'aconseguir una bona sensibilitat.

- 3) La purificació de la HA mitjançant columnes de bescanvi catiònic (amberlita CG-50) per gravetat (Baudry et al., 1973; Keeling et al., 1984) ha resultat poc

eficient per separar la His de la HA, i ha donat lloc a uns blancs molt elevats i poca repetitivitat en els valors absoluts.

En aquesta tesi hem adaptat el mètode radioisotòpic basat en la determinació de [^3H]-HA marcada a partir de la [^3H]-His marcada introduint una sèrie de modificacions per tal de solucionar aquests inconvenients i augmentar la sensibilitat i repetitivitat del mètode. Aquestes modificacions es basen principalment en l'ús de columnes d'HPLC per a purificar la [^3H]-His comercial i posteriorment la [^3H]-HA formada.

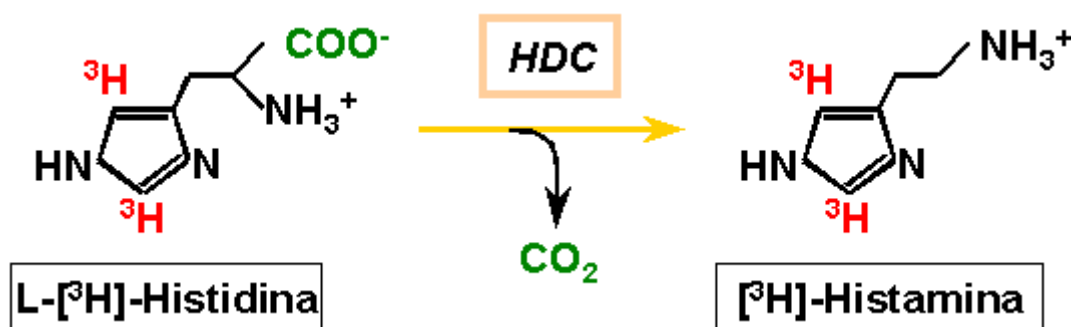


Figura 3.1.1. El mètode radioisotòpic utilitzat per a determinar la síntesi d'HA es basa en la quantificació de la [^3H]-histamina que s'ha format a partir de la [^3H]-histidina afegida en els diferents medis d'incubació

Els medis d'incubació utilitzats són: homogenats de cervell total, miniprismes d'escorça cerebral i purificats d'HDC 1/512. La [^3H]-histamina que es forma es purifica per HPLC.

1.2. Optimització de la sensibilitat del mètode radioisotòpic

La sensibilitat del mètode de purificació de [^3H]-HA depèn de les dpm presents en els blancs. Quan injectem directament a l'HPLC $2,2 \times 10^6$ dpm de [^3H]-His (la quantitat de radioactivitat que s'afegeix normalment a un homogenat), obtenim uns blancs de 340 dpm (0,015%) en la fracció corresponent a la HA. A pesar que aquest percentatge és bastant inferior respecte a la conversió de [^3H]-His a [^3H]-HA, és convenient reduir les dpm de [^3H]-His injectades per millorar la sensibilitat. L'eliminació de l'excés de [^3H]-His (que no ha reaccionat per donar [^3H]-HA) a través d'una reïna amberlita de bescanvi aniónic permet reduir considerablement les dpm dels blancs tal com es pot deduir de la taula 3.1.1. En aquesta taula es pot veure que el mètode de preparació dels blancs d'incubació no fa variar de manera significativa les dpm residuals (en tots els casos inferiors a 340 dpm). Per tant, les dpm romanents dels blancs provenen d'una font no

identificada. Probablement es tracta de productes de la radiòlisi dels estàndards de [³H]-His, que poden tenir unes cues cromatogràfiques prou llargues per a solapar-se parcialment amb el pic d'HA. Així doncs, com que les dpm dels blancs de la taula 3.1.1 correspondrien a 0,7 fmols d'HA (l'activitat específica de la [³H]-His utilitzada fou 81 dpm/fmol) el límit de detecció del mètode és de 2 fmols de [³H]-HA (tres vegades els valors dels blancs).

Blancs	Dpm 1	Dpm 2	Dpm 3	Mitjana Dpm
Sense teixit	57	43	48	49
Teixit bullit	27	39	43	36
α -fluorometilhistidina	53	49	63	55
Sense incubar	81	78	83	81
Acid tricloracètic	84	65	60	69
<i>Control positiu</i>	532	561	484	526

Taula 3.1.1. Dpm de blancs d'incubació (per triplicat) obtinguts per diferents mètodes:

Incubant amb 0.5 mM α -fluorometilhistidina (inhibidor selectiu de l'HDC) o 0.5% d'àcid tricloracètic, desnaturalitzant el teixit bullint-lo abans d'incubar i canviant el teixit per tampó o sense incubar. Totes les mostres s'han incubat amb 25 pmols de [³H]-His purificada (2.2×10^6 dpm) i posteriorment s'ha eliminat l'excés de [³H]-His amb una reïna de bescanvi aniònic. Les mostres amb teixit contenen homogenat de cervell sencer de rata (0.25 mg de proteïna) incubades 1 hora.

1.3. Determinació de la repetitivitat del mètode

L'ús d'HA no radioactiva com a patró intern dóna lloc a una elevada repetitivitat del mètode (taula 3.1.2), ja que permet controlar per a cada mostra les pèrdues de [³H]-HA durant la manipulació experimental. La concentració de [³H]-HA i HA endògena és 1000 vegades menor i no afecta la quantificació per l'absorbància en l'UV del patró intern d'HA sense marcar.

La recuperació de la [³H]-HA i d'HA sense marcar en mostres amb 0.3 mg de proteïna mostren una correlació lineal (Pearson $r = 0.9999$, $n = 4$) i tenen rendiments de recuperació semblants (81% i 86%, respectivament). La HA sense marcar i la [³H]-HA tenen les mateixes propietats cromatogràfiques, fet que permet l'ús de la HA sense marcar per a monitoritzar l'elució de la [³H]-HA en l'HPLC.

Mostres o blancs	Dpm	Àrea de l'estàndard intern (mV min)	Activitat HDC (fmol/mg.h)
Rèplica 1	1155	79	196
Rèplica 1	1350	93	196
Rèplica 1	1285	94	184
Rèplica 1	1399	98	192
Rèplica 1	1263	88	192
Rèplica 1	1382	94	200
Blanc 1	165	106	—
Blanc 2	131	103	—
Mitjana ± DE		94 ± 8.5	193 ± 5.5

Taula 3.1.2. Variabilitat de la determinació de l'activitat HDC en un mateix assaig

Es va incubar homogenat d'hipotàlem de rata (0.25 mg de proteïna) durant 1 hora amb 0.25 µM de [³H]-His. La mitjana de recuperació del patró intern d'HA fou del 81%.

1.4. Linealitat de l'activitat HDC en funció de la quantitat de proteïna i del temps d'incubació

La síntesi d'HA es manté lineal en homogenats d'hipotàlem de rata, almenys durant una hora (figura 3.1.2.a). A més, la síntesi d'HA augmenta proporcionalment amb la quantitat de teixit (figura 3.1.2.b). S'ha de tenir en compte que si augmentem la quantitat de teixit també augmenta la His endògena, amb la qual cosa la [³H]-His es dilueix proporcionalment. Per tant, hem corregit els valors de síntesi de [³H]-HA en funció de la dilució radioisotòpica de la [³H]-His (0.25 µM) amb la His endògena present en l'hipotàlem de rata (25 µg/g de teixit, segons Taylor et al., 1972).

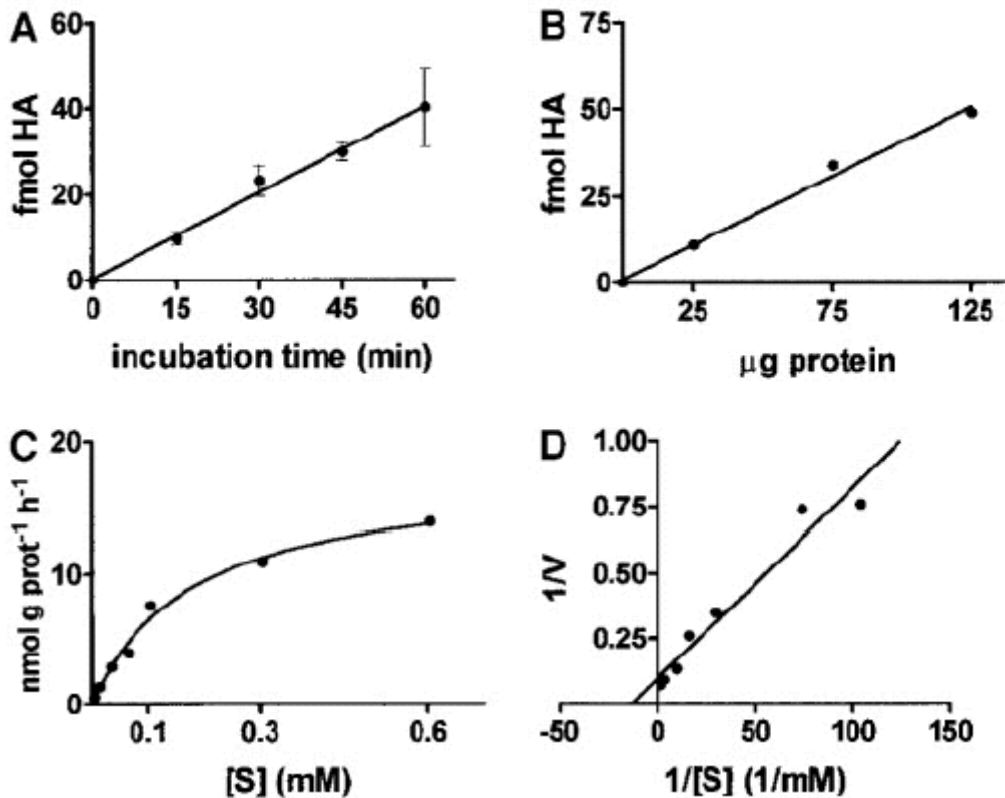


Figura 3.1.2. Linealitat en funció del temps i de la concentració de proteïna. K_m i V_{max} de l'activitat HDC

(A) La formació d'HA en homogenats d'hipotàlem augmenta de forma lineal durant una hora d'incubació. (B) La formació d'HA augmenta linealment a mesura que augmenta la quantitat de proteïna d'homogenats d'hipotàlem en el medi d'incubació. (C) Representació de Michaelis-Menten de l'activitat enzimàtica d'homogenats de cervell sencer incubats a pH 7.4 versus la concentració de substrat. (D) Representació de Lineweaver-Burk. Com que els homogenats contenen His endògena, hem tingut en compte la dilució isotòpica de la [³H]-His amb el substrat endògen per a realitzar els càlculs. La concentració d'His endògena considerada és de 15 μg/g en el cervell sencer o de 25 μg/g en hipotàlem de rata (Taylor et al., 1972). La K_m obtinguda a partir de la representació de Lineweaver-Burk és de 74 μM i la V_{max} calculada és de 10.2 nmol/g.h. La K_m calculada sense considerar la His endògena és aproximadament la meitat.

1.5. Determinació de l'especificitat de l'activitat HDC

El pH òptim per a l'activitat HDC és 7.4 tal com van publicar Garbarg et al., 1983 per a concentracions de substrat similars. A pH 7.4 la K_m de l'HDC és 74 μM (figura 3.1.2) valor intermedi entre el trobat per Garbarg et al. (1983) en el cervell humà (30 μM) i el trobat en el nostre laboratori per fluorimetria (aproximadament 200 μM, segons Palacios et al., 1976). El valor de V_{max} a pH 7.4 (10.2 nmol/g prot/h) (figura.3.1.2) és semblant al descrit per homogenats de cervells de rata (6.7 nmol/g prot/h, segons Palacios et al., 1976).

2. ACTIVACIÓ DE LA SÍNTESI D'HISTAMINA PER L'ENTRADA DE CALCI EN MINIPRISMES D'ESCORÇA CEREBRAL DE RATA

2.1. Introducció

La despolarització per potassi provoca un increment important de la síntesi d'HA en diferents models experimentals (Arrang et al., 1987b), però els mecanismes a través dels quals tenen lloc aquests efectes es desconeixen. En el nostre grup s'ha descrit que en miniprismes d'escorça cerebral de rata l'activitat HDC es regula a través de la via de l'AC/PKA (Gómez-Ramírez et al., 2002),

però aquesta via no està implicada en l'augment de la síntesi d'HA dependent de despolarització per 30 mM de potassi (Gómez-Ramírez et al., 2002). En sinaptosomes d'escorça cerebral de rata el 55% del calci que entra per despolarització ho fa a través dels CCAV tipus P i Q i el 33% a través dels de tipus N (Meder et al., 1997). En neurones histaminèrgiques la HA regula a través dels receptors H3 l'entrada de calci per aquests CCAV (Takeshita et al., 1998).

Tenint en compte tots aquests antecedents, vam pensar que el calci podria ser un bon ciutat com a segon missatger implicat en la regulació de l'activitat HDC en les terminals histaminèrgiques de l'escorça cerebral.

2.2. Efecte de la inhibició dels CCAV sobre l'activació de la síntesi d'HA per despolarització

Per determinar si l'entrada de calci per CCAV activa la síntesi d'HA, hem tractat els miniprismes amb diferents inhibidors dels CCAV afegits 15 minuts abans del període d'incubació. Com a primera aproximació hem estudiat els efectes d'un inhibidor inespecífic de CCAV com és el cadmi (Cd^{2+}) (Halabisky et al., 2000). 200 μM de Cd^{2+} reverteix (-70%) l'efecte activador de la despolarització (figura 3.2.1.a). Aquest catió divalent, però, desacobla la cadena respiratòria i inhibeix o activa una llarga llista d'enzims (Vallee et al., 1972) de manera que part dels efectes inhibidors de la despolarització podrien ser inespecífics, però tal com es pot veure en la mateixa figura 3.2.1.a, la síntesi d'HA basal no es veu afectada pel Cd^{2+} .

Com ja hem comentat, en les terminals histaminèrgiques els CCAV tipus N, P o Q són els principals candidats per a participar en la regulació de la síntesi d'HA. Per aquesta

raó hem estudiat els efectes de la inhibició d'aquests canals per l' ω -conotoxina MVIIC. Aquesta conotoxina inhibeix els CCAV tipus Q, P i N a concentracions majors d' $1 \mu\text{M}$ i és selectiva dels Q a concentracions entre $0.1 \mu\text{M}$ i $1 \mu\text{M}$ (Takeshita et al., 1998). $3 \mu\text{M}$ d'aquesta conotoxina reverteix totalment l'activació de la síntesi d'HA dependent de la despolarització per potassi, sense afectar a la síntesi d'HA basal; $0.1 \mu\text{M}$ de la ω -conotoxina MVIIC no reverteix l'efecte de la despolarització (figura 3.2.1.b). $3 \mu\text{M}$ de la ω -conotoxina GVIA, inhibidor selectiu dels CCAV tipus N, impedeix l'efecte activador de la despolarització per 30 mM de K^+ (-84%) (fig 3.2.1.c) fet que indica que el calci que entra a les terminals histaminèrgiques durant la despolarització i activa la síntesi d'HA ho fa principalment a través dels CCAV tipus N. Cap dels 3 inhibidors dels CCAV afecta la síntesi d'HA en condicions no despolaritzants (figura 3.2.1).

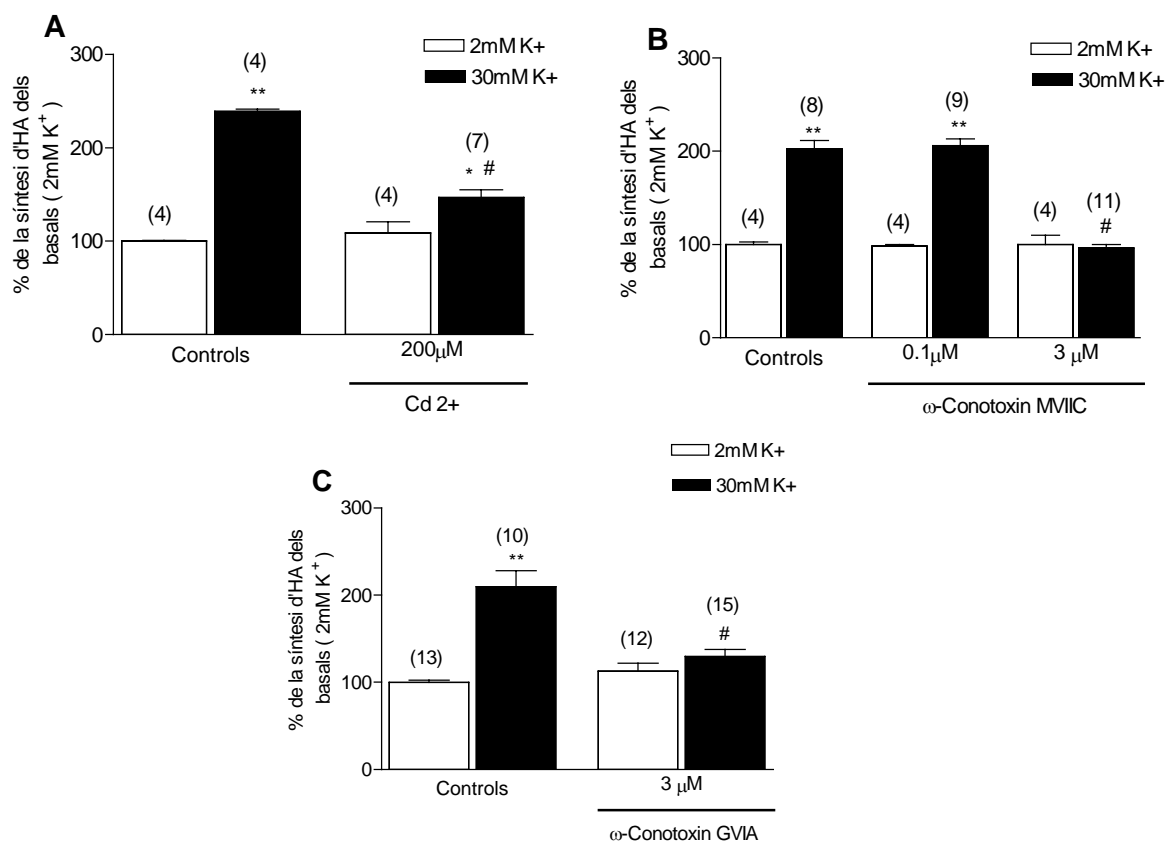


Figura 3.2.1. La inhibició dels canals de calci activats per voltatge (CCAV) impedeix l'augment de la síntesi d'HA causat per despolarització

Tots els inhibidors es van afegir 15 minuts abans del període d'incubació i de l'addició del tampó despolaritzant. (A) Efectes de la preincubació amb $200 \mu\text{M}$ de Cd^{2+} , inhibidor inespecífic dels CCAV. (B) Efectes de la ω -conotoxina MVIIC, inhibidor reversible específic dels CCAV tipus Q a $0.1 \mu\text{M}$ i dels N, P i Q a $3 \mu\text{M}$. (C) Reversió de l'activació de la síntesi d'HA amb $3 \mu\text{M}$

μM de la ω -conotoxina GVIA, inhibidor específic dels CCAV tipus N. Els resultats són mitjanes \pm S.E.M del % dels controls amb 2mM de K^+ . El 100% de la síntesi d'HA en els controls amb 2mM de K^+ és 18 ± 7 fmols/mg proteïna/h (mitjana \pm DE).

** $P < 0.001$ i * $P < 0.01$ respecte als controls amb 2mM de K^+ . # $P < 0.001$ respecte als despolaritzats amb 30 mM K^+ . El nombre de rèpliques s'indica entre parèntesis a sobre de les barres.

2.3. Efecte de la despolarització per 30mM K^+ i de l'ionòfor de calci ionomicina sobre la síntesi d'HA

El resultat anterior indica que l'activació de la síntesi d'HA per despolarització està relacionada amb l'entrada de calci a través dels CCAV. Per tal de veure si els increments de calci intracel·lular poden activar la síntesi d'HA cerebral independentment de la via d'entrada hem estudiat els efectes de la ionomicina (ionòfor del calci). Aquesta substància forma complexos amb cations divalents i s'utilitza per a transportar calci cap a l'interior de les cèl·lules.

10 μM de ionomicina preincubada 15 minuts provoca un increment en la síntesi d'HA del 71% respecte als controls en absència d'ionòfor (figura 3.2.2). La despolarització amb 30 mM de K^+ en aquests experiments estimula la síntesi d'HA un 168% (figura 3.2.2).

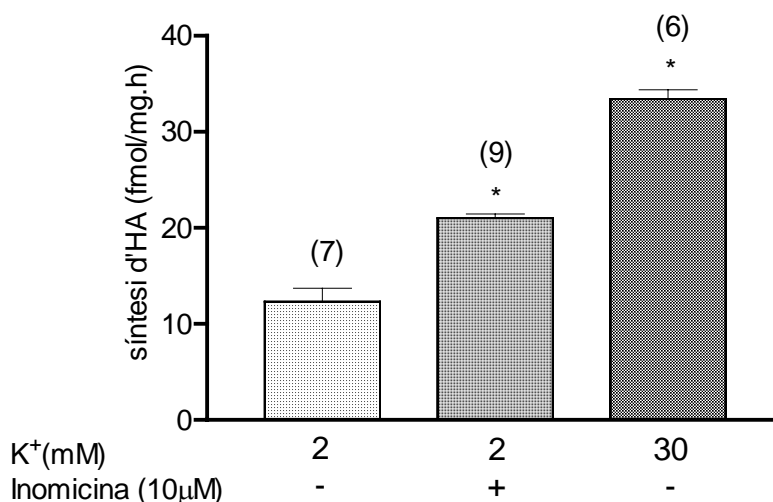


Figura 3.2.2. La ionomicina i la despolarització per 30 mM de K^+ augmenten la síntesi de HA

Els resultats s'han calculat com la mitjana \pm S.E.M de tres experiments. Entre parèntesis s'indiquen el nombre de mostres processades. * $P < 0.01$ respecte dels basals 2 mM de potassi.

2.4. Efecte de l'activació i de la inhibició de la PKC sobre la síntesi d'HA

Com demostren els experiments anteriors, durant la despolarització el calci que entra majoritàriament a través dels CCAV tipus N provoca l'augment de la síntesi d'HA. Com que el calci participa en l'activació de la PKC, en un primer intent de trobar el mecanisme d'activació de la síntesi d'HA per calci vam estudiar la possible implicació d'aquesta cinasa.

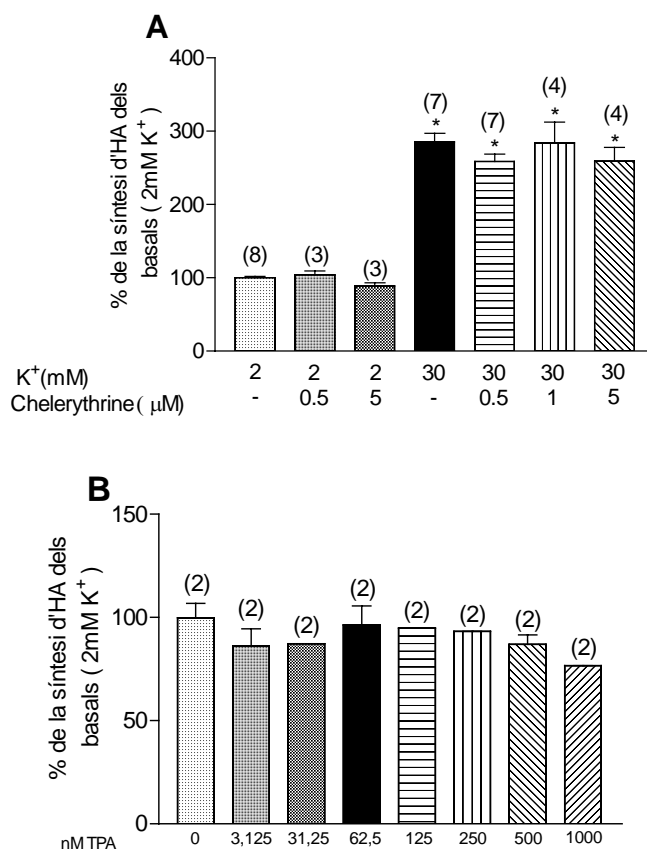


Figura 3.2.3. (A) L'estimulació de la síntesi d'HA per despolarització no s'inhibeix en presència de 0.5, 1 i 5 μM de queleritrina (inhibidor del la PKC). (B) Diferents concentracions de TPA (de 3.1 nM a 1 μM) no estimulen la síntesi d'HA en condicions no despolaritzants.

Els resultats són mitjanes ± S.E.M expressades en% dels controls amb 2mM de K⁺. El 100% de la síntesi d'HA en els controls amb 2mM de K⁺ és (A) 12 ± 0.5 i (B) 17 ± 1 fmols/mg proteïna/h (mitjana ± DE). *P<0.001 i respecte als controls amb 2mM de K⁺. El nombre de rèpliques s'indica entre parèntesis a sobre de les barres.

La incubació dels miniprismes d'escorça amb l'inhibidor específic de la PKC Queleritrina a concentracions finals de 0.5, 1 i 5 μM no afecta la síntesi d'HA dependent de la despolarització (figura 3.2.3.a). A més, la incubació de les motres amb l'activador de la PKC, Phorbol-12-myristate-13-acetate (TPA), utilitzat a concentracions de 3,1 nM fins a 1 μM , tampoc afecta la síntesi d'HA en condicions basals (amb 2mM de K^+) (figura 3.2.3.b). Per tant, el mecanisme d'activació de la síntesi d'HA per despolarització no sembla dependre de la PLC/PKC.

2.5. Efecte de la inhibició de la calmodulina (CaM) i de la proteïna cinasa dependent de calci-calmodulina tipus II (CaMkII)

Com que el calci no activa la síntesi d'HA per la via de la PKC hem pensat que l'activació de la calmodulina (CaM) i de la proteïna cinasa dependent de calmodulina-calci (CaMk) podrien estar implicades en aquesta activació.

Hem estudiat els efectes sobre la síntesi d'HA de tres tipus d'inhibidors: el W-13, que inhibeix la calmodulina, el KN-62 inhibidor específic de la CaMkII (inhibeix en el lloc d'unió a la CaM) i l'AIP (*Autocamtide inhibitory peptide myristoilated*), que inhibeix la CaMkII en el lloc d'autofosforilació de l'enzim i en el lloc d'unió al substrat. S'han assajat diferents concentracions de cada fàrmac pel fet que, sovint, les concentracions que apareixen en la bibliografia s'han aplicat en cultius cel·lulars o sinaptosomes, i els miniprismes, en ser més gruixuts, presenten problemes de difusió. L'inhibidor de la calmodulina W-13 inhibeix la síntesi d'HA dependent de despolarització de manera dosi dependent. 0.6 mM de W-13 inhibeix el 56% de l'efecte, mentre que 1mM de ω -13 reverteix gairebé el 100% (figura 3.2.4.a). 3 μM i 30 μM de KN-62 reverteixen el 62% i el 93% de l'efecte, respectivament (figura 3.2.4.b). De les tres dosis assajades d'AIP només la dosi més alta (500 μM) reverteix l'efecte activador de la despolarització (92% d'inhibició) (figura 3.2.4.c). Tots tres inhibidors són capaços de revertir l'activació de la síntesi d'HA dependent de despolarització sense afectar la síntesi d'HA en condicions no despolaritzants (figura 3.2.4).

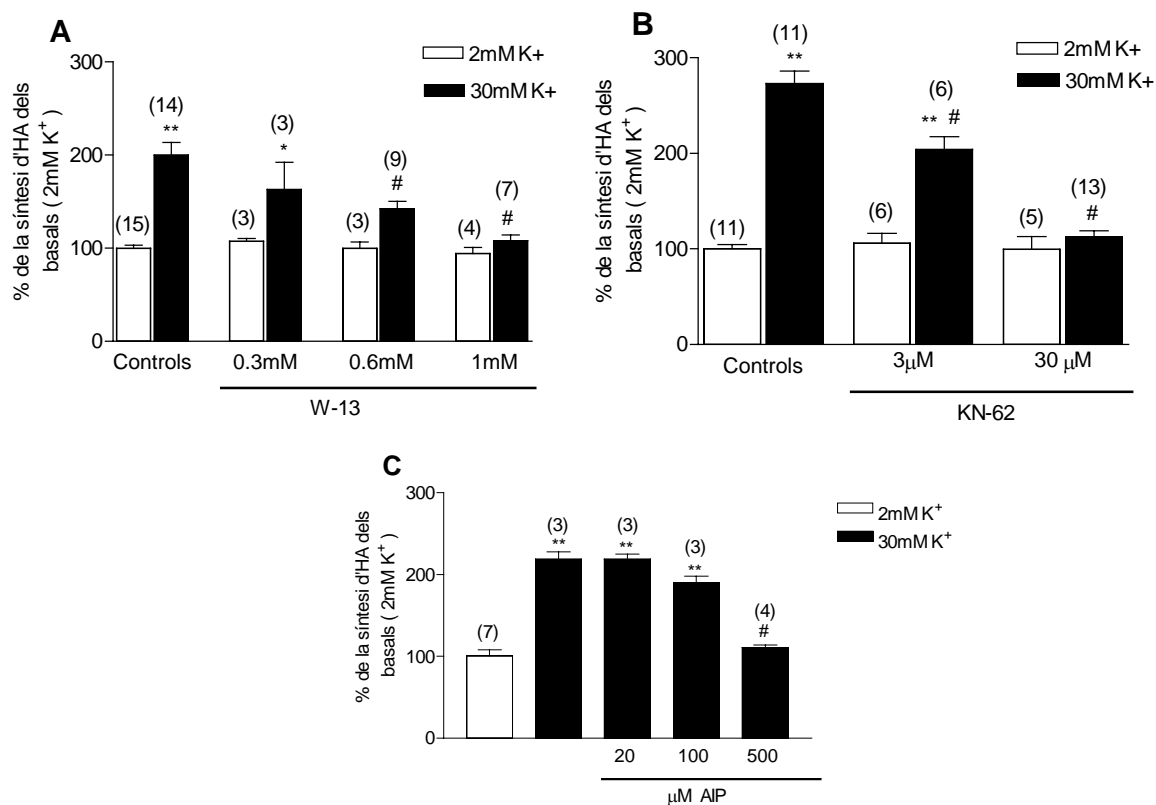


Figura 3.2.4. La proteïna cinasa dependent de calci-calmodulina tipus II (CaMkII) és necessària per a l'activació de la síntesi d'HA dependent de despolarització.

Tots els inhibidors s'han afegit 15 minuts abans del període d'incubació i de l'addició del tampó despolaritzant. (A) Efecte de l'inhibidor de la calmodulina W-13. (B) i (C) efectes dels inhibidors de la CaMkII, KN-62 i AIP, respectivament. Els resultats són mitjanes \pm S.E.M expressades en% dels controls amb 2mM de K⁺. El 100% de la síntesi d'HA en els controls amb 2mM de K⁺ és 17 ± 7 fmols/mg proteïna/h (mitjana \pm DE). *P<0.01; **P<0.001 respecte als controls amb 2mM de K⁺. #P<0.01 respecte als de 30 mM K⁺. El nombre de rèpliques s'indica entre parèntesis a sobre de les barres.

3. ESTUDI DE LA INTERACCIÓ ENTRE LES VIES DE L'AC/PKA I CALCI/CAMKII EN LA REGULACIÓ DE LA SÍNTESI D'HA EN MINIPRISMES D'ESCORÇA CEREBRAL

3.1. Introducció

Fins ara els resultats indiquen que la síntesi d'HA es pot regular per l'entrada de calci pels CCAV tipus N a través de la CaMkII. Una altra via de regulació de la síntesi d'HA descrita recentment (Gómez-Ramírez et al., 2002) és la de l'AC/PKA. S'ha vist que en miniprismes d'escorça cerebral de rata, l'isobutil-metilxantina (inhibidor inespecífic de

la degradació d'AMPC) estimula la síntesi d'HA i que aquesta estimulació és revertida per inhibidors de la PKA. Per tant, existeixen dues vies de transducció de senyals capaces de regular la síntesi d'HA en terminals histaminèrgiques corticals, però es desconeix si aquestes dues vies interaccionen entre si.

Des del 1990 s'han descrit 9 isoformes d' adenilat ciclasa (AC), enzim responsable de la síntesi d'AMPC. Aquestes isoformes es diferencien en la seva distribució i en el seu mecanisme de regulació. El calci forma part del mecanisme de regulació de diversos tipus d'AC. A través de la calmodulina, el calci estimula l'activitat de les AC tipus I, III i VIII i inhibeix l'AC tipus VI a través d'un mecanisme desconegut. La PKC inhibeix l'AC tipus V i VI i estimula les AC tipus II, V i VII. L'AC tipus IX és inhibida per la calcineurina (fosfatasa dependent de calmodulina-calci). I a través de la CaMkII el calci inhibeix les AC tipus I i IBI, mentre que l'AC tipus IV no depèn de calci ni de PKC. El calci també pot actuar sobre la degradació de l'AMPC activant la fosfodiesterasa tipus I (PDE1) a través de la calmodulina (Duman i Nestler, 1999) o inhibint la PDE4 (Kelly et al., 1997).

Així doncs, el calci pot augmentar o disminuir els nivells d'AMPC dependent del tipus d'AC i PDE locals.

D'altra banda, s'ha descrit que l'AMPC pot estimular l'entrada de calci pels CCAV directament o a través de la PKA (Cooper et al., 1995).

Per tant, aquestes vies de regulació de la síntesi d'HA podrien estar connectades a través de l'AC, de les PDE o dels CCAV.

3.2. Estimulació de la síntesi d'HA per l'augment d'AMPC (per ibmx) i per l'entrada de calci (per 30mM K+) simultàniament

La incubació dels miniprismes amb un inhibidor inespecífic de les fosfodiesterases (l'isobutil-metilxantina o ibmx) provoca un augment de la síntesi d'HA (40%) en condicions no despolaritzants, que se suma a l'augment provocat per la despolarització amb 30 mM de potassi (figura 3.3.1), de manera que els efectes de la despolarització i de l'ibmx són additius.

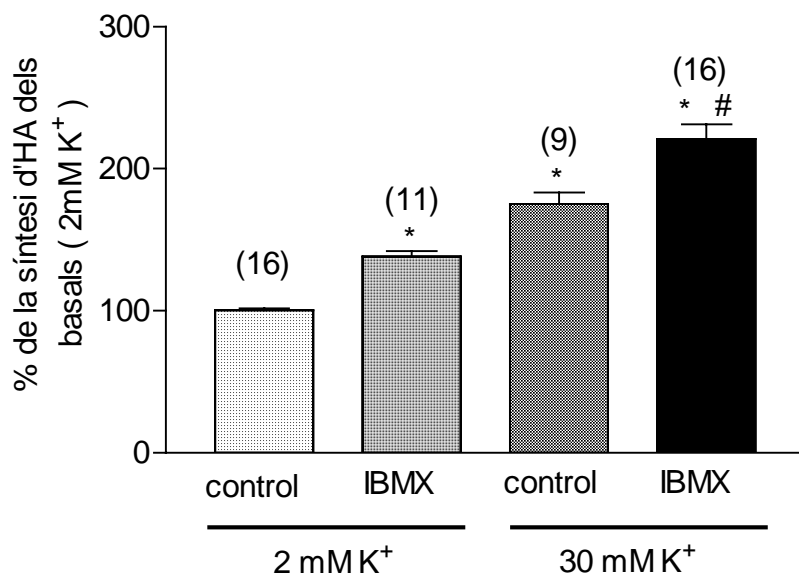


Figura 3.3.1. Efectes additius de la despolarització per 30 mM de K⁺ i de l'ibmx

Els resultats són mitjanes \pm S.E.M expressades en % dels controls amb 2mM de K⁺. L'ibmx es va afegir 15 minuts abans del període d'incubació, el tampó despolaritzant s'afegeix just en el moment de començar la incubació. El 100% de la síntesi d'HA en els controls amb 2mM de K⁺ és 17.5 ± 4 fmols/mg proteïna/h (mitjana \pm DE). *P<0.01 respecte als controls amb 2mM de K⁺. #P<0.01 respecte als despolaritzats amb 30 mM K⁺. El nombre de rèpliques s'indica entre parèntesis a sobre de les barres.

3.3. Efecte de l'ibmx en presència d'inhibidors dels CCAV i de la CaMkII.

Una altra manera de veure si les dues vies estan connectades o no és estimular la via de l'AMPC en presència d'inhibidors dels CCAV i de CaMkII. En la figura 3.3.2 es pot veure que cap dels inhibidors de la via del calci-CaMkII afecta l'augment de la síntesi d'HA provocat per l'ibmx. L'estimulació de la síntesi d'HA per ibmx (40%) es reverteix en presència de l'inhibidor de la PKA, PKI14-22.

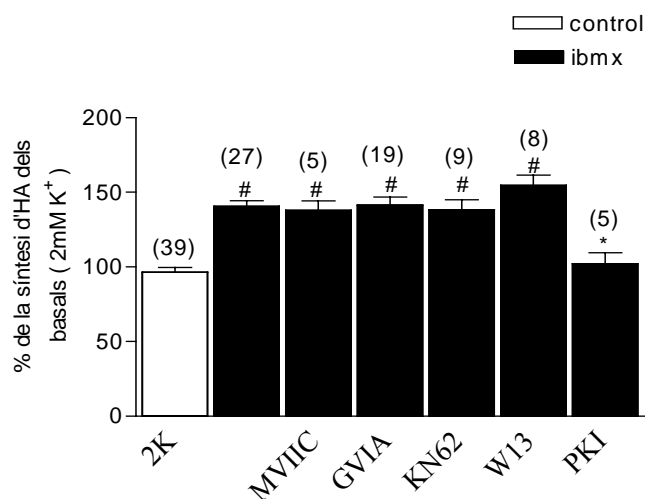


Figura 3.3.2. Els inhibidors de la CaMkII, KN-62 (30 μ M), de la calmodulina, W-13 (1mM) i dels CCAV, ω -conotoxina MVIIC (MVIIC) (3 μ M) i ω -conotoxina GVIA (GVIA) (3 μ M) no modifiquen l'augment de la síntesi d'HA estimulat per l'ibmx

Els resultats són mitjanes \pm S.E.M expressades en% dels controls amb 2mM de K⁺. L'ibmx es va afegir 15 minuts abans del període d'incubació. El 100% de la síntesi d'HA en els controls amb 2mM de K⁺ és 15 ± 6 fmols/mg proteïna/h (mitjana \pm DE). #P<0.001 respecte als controls amb 2mM de K⁺. *P<0.01 respecte als estimulats amb ibmx. El nombre de rèpliques s'indica entre parèntesis a sobre de les barres.

4. EFECTES DE LA INCUBACIÓ DE L'HDC AMB LA CAMKII I/O LA PKA EN CONDICIONS FOSFORILANTS

4.1. Introducció

Els resultats obtinguts fins aquest moment posen en evidència que tant la PKA com la CaMkII estan implicades en la regulació de la síntesi d'HA en miniprismes corticals. No obstant, no sabem si aquestes dues cinases fosforilen i activen directament o indirectament l'HDC. Com ja s'ha comentat en la introducció, aquest enzim té dues seqüències consens de fosforilació per a la PKA i quatre per a la CaMkII, de manera que existeix la possibilitat que aquestes cinases fosforilin l'HDC.

Hem decidit estudiar els efectes de la incubació de l'HDC1/512 purificada amb PKA i CaMkII comercials en condicions fosforilants, en lloc d'estudiar l'eventual fosforilació de l'enzim en els miniprismes o en homogenats per les següents raons:

1) En miniprismes les activacions de la síntesi d'HA provocades per despolarització no es tradueixen en un augment de l'activitat HDC mesurada en

homogenats de miniprismes. Aquests resultats no canvien pel fet d'homogeneïtzar en presència de diferents inhibidors de fosfatases (taula 3.4.1).

2mM K ⁺	30mM K ⁺	30mM K ⁺ (sense inhibidors de fosfatases)
100% ± 13 (n=6)	99% ± 18 (n=5)	88% ± 19 (n=3)

Taula 3.4.1. La mesura de l'activitat HDC en homogenats de miniprismes despolaritzats.

Amb i sense inhibidors de fosfatases (còctel I de calbiochem dil·luït 1/100 que conté *cantharidin*; *bromotetramizole oxalate* i *Microcystin-LR*) no mostra diferències significatives respecte dels controls no despolaritzats. Les dades són la mitjana ± la D.E de *n* mostres. El 100% de l'activitat HDC dels controls amb 2 mM de K⁺ correspon a 21,3 ± 2,7 fmols d'HA/ mg.h.

2) La CaMkII comercial no activa l'HDC en homogenats d'escorça cerebral de rata (taula 3.4.2).

3) En homogenats de cervell de rata l'anticòs anti-HDC comercial detecta un gran nombre de bandes, la qual cosa ens ha fet dubtar de l'especificitat de l'anticòs i per tant hem decidit no començar per un estudi de fosforilacions en miniprismes mitjançant immunoprecipitacions.

4.2. Fosforilació de l'HDC1/512 per PKA

S'han incubat 10, 5 i 1 µg d'HDC1/512 purificada, amb 100 i 50 ng de subunitat catalítica de PKA comercial, en presència de 50 µM d'ATP que conté 5 µCi de [γ-³²P]ATP en un volum final de 100 µL. La separació de mostres en un gel de SDS posteriorment exposat en una placa fotogràfica dona lloc a una banda de 55 kDa que incorpora ³²P (figura 3.4.1).

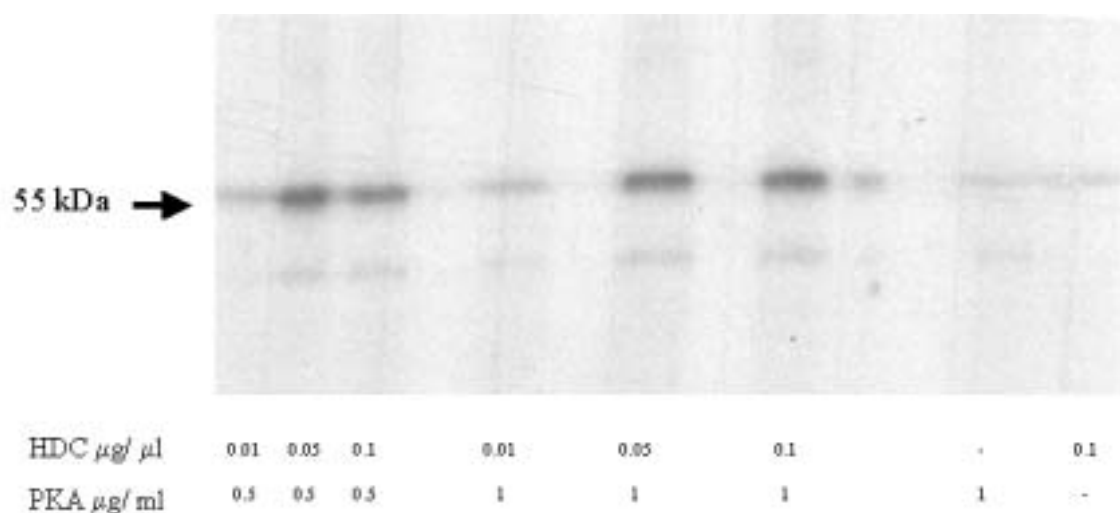


Figura 3.4.1. Fosforilació de la HDC1/512 per la PKA

Autoradiografia d'un gel de SDS d'incubats amb 10, 5 i 1 μg d'HDC1/512 purificada amb 100 i 50 ng de subunitat catalítica de proteïna cinasa A (PKA) purificada de sèrum boví (Calbiochem), en presència de 50 mM d'ATP amb 5 μCi de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$.

4.3. Fosforilació de l'HDC1/512 per CaMkII.

La CaMkII purificada de cervell de rata (Calbiochem) fosforila l'HDC 1/512 (figura 3.4.2), quan s'incuben 60 ng de la CaMkII en presència de 15 o 30 μg de l'HDC, 3 μg de calmodulina, 0.3mM de calci i 50 μM d'ATP (10 μCi $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$), en un volum final de 100 μl . L'autoradiografia mostra que la intensitat de la banda és màxima a 15 μg d'HDC. La banda de 55 kDa que s'observa en els controls amb CaMkII, calmodulina i calci correspon a les subunitats α de la mateixa CaMkII que es fosforilen en presència de calmodulina i calci (Tokumitsu et al., 1990). Quan s'incuba la CaMkII en absència de calmodulina i calci es veu que la banda no apareix. Encara que la CaMkII tingui el mateix pes molecular que la HDC i també es fosforili, la senyal en presència d'HDC és molt més gran que en els controls sense HDC, la qual cosa indica clarament que l'HDC es fosforila en presència de la cinasa (figura 3.4.2).

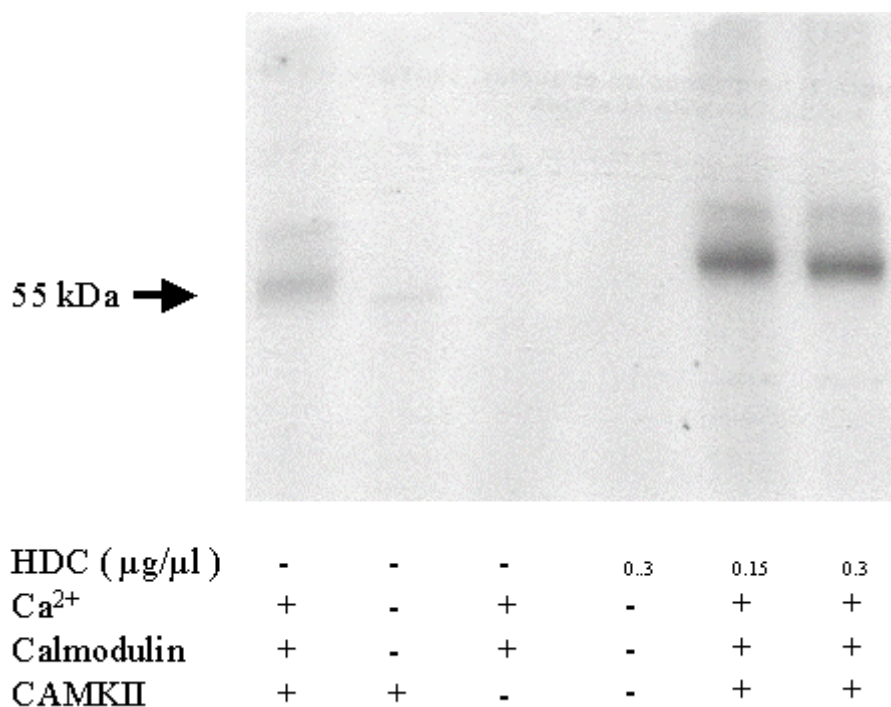


Figura 3.4.2. Fosforilació de la HDC1/512 per la CaMkII.

Autoradiografia d'un gel d'electroforesi amb SDS dels incubats amb 30 o 15 µg d'HDC1/512 purificada amb 60 ng de CaMkII purificada de cervell de rata (Calbiochem), en presència de 50 µM d'ATP que conté 10 µCi de ([γ-³²P]ATP).

4.4. Activació de l'HDC per fosforilació

Alíquotes de les mostres prèviament fosforilades corresponents a 4.5 ng d'HDC s'incuben en presència de 10 µM de piridoxal-5-fosfat i 60 µM d'His (0.1 µM de [³H]-His) i es determina l'activitat HDC seguint el mètode descrit en l'apartat de materials i mètodes.

La fosforilació de la HDC per la PKA, per la CaMkII i per les dues juntes augmenta l'activitat respecte als controls en un 21, 78 i 40%, respectivament (figura 3.4.3).

La incubació d'homogenats d'escorça cerebral (1.5 mg de proteïna total) en les condicions fosforilants descrites per a la CaMkII i la posterior determinació d'activitat HDC d'alíquotes d'aquestes mostres fosforilades indica que el tractament amb CaMkII no modifica l'activitat (taula 3.4.2).

Control	CaMkII
100% ± 6 (n= 6)	102% ± 7,39 (n = 6)

Taula 3.4.2. L'activitat HDC mesurada en homogenats d'escorça prèviament incubats en condicions fosforilants per a la CaMkII no varia respecte dels controls no incubats amb la cinasa

Les dades són la mitjana ± la D.E. de 6 mostres. El 100% de l'activitat HDC dels controls amb 2 mM de K⁺ correspon a 683,7 ± 41 fmols / mg.h.

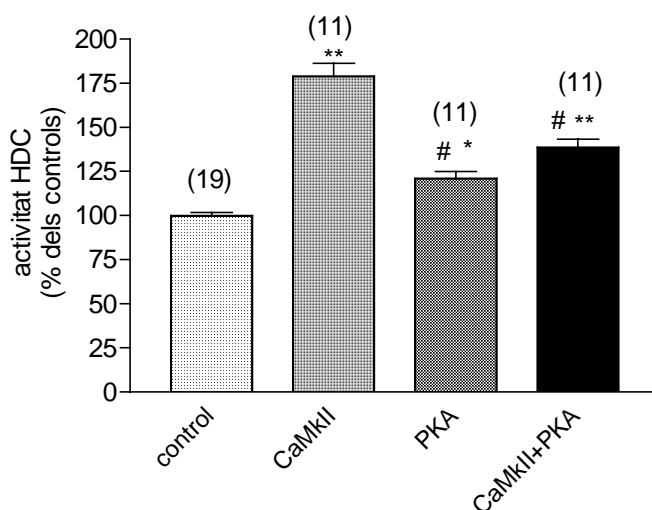


Figura 3.4.3. La incubació de l'HDC1/512 purificada en condicions fosforilants amb CaMkII, PKA o les dues cinases juntes provoca augments de l'activitat HDC

La mesura s'ha realitzat amb 4.5 ng de proteïna i 60 µM d'His (0.1 µM de [³H]-His). El 100% de l'activitat HDC en els controls és 1609 ± 125 fmols/mg proteïna/h (mitjana ± DE). *P<0.01, **P<0.001 respecte als controls no fosforilats. #P<0.001 respecte als fosforilats amb CaMkII sense PKA. El nombre de rèpliques s'indica entre parèntesis a sobre de les barres.

5. ESTUDI DEL PAPER DEL CALCI EN LA REGULACIÓ DE LA SÍNTESI D'HA A TRAVÉS DELS RECEPTORS H3 EN MINIPRISMES D'ESCORÇA CEREBRAL.

5.1. Introducció

La via de l'AC/PKA està implicada en el mecanisme de regulació de la síntesi d'HA per l'autoreceptor H3 (Gómez-Ramírez et al., 2002) però diversos indicis assenyalen que no és l'única via de transducció del receptor: per exemple, l'agonista H3 imetit reverteix l'activació de la síntesi d'HA dependent de despolarització. Tanmateix aquesta despolarització no activa la síntesi d'HA per la via de l'AC/PKA.

En canvi, el mecanisme de regulació de la síntesi d'HA en presència de tioperamida, agonista invers del receptor H3, sembla dependre exclusivament de l'activació de la PKA, ja que en condicions despolaritzants l'efecte estimulador de la tioperamida es reverteix completament en presència d'inhibidors de la PKA (Gómez-Ramírez et al., 2002). En neurones histaminèrgiques la HA regula a través dels receptors H3 l'entrada de calci per aquests CCAV (Takeshita et al., 1998).

Curiosament, l'efecte de la tioperamida només es manifesta quan una de les dues vies està estimulada, ja sigui la de l'AMPC amb l'ibmx o la del calci amb la despolarització (30 mM de K⁺), i no té cap efecte en condicions basals (Gómez-Ramírez et al., 2002).

5.2. Estudi de les vies d'inhibició de la síntesi d'HA per l'agonista del receptor H3 imetit

L'agonista del receptor H3 imetit reverteix l'activació de la síntesi d'HA per ibmx independentment del bloqueig dels CCAV tipus N (figura 3.5.2). D'altra banda, l'inhibidor de la PKA (PKI14-22) no afecta la inhibició per imetit de la síntesi d'HA estimulada per despolarització (figura 3.5.1).

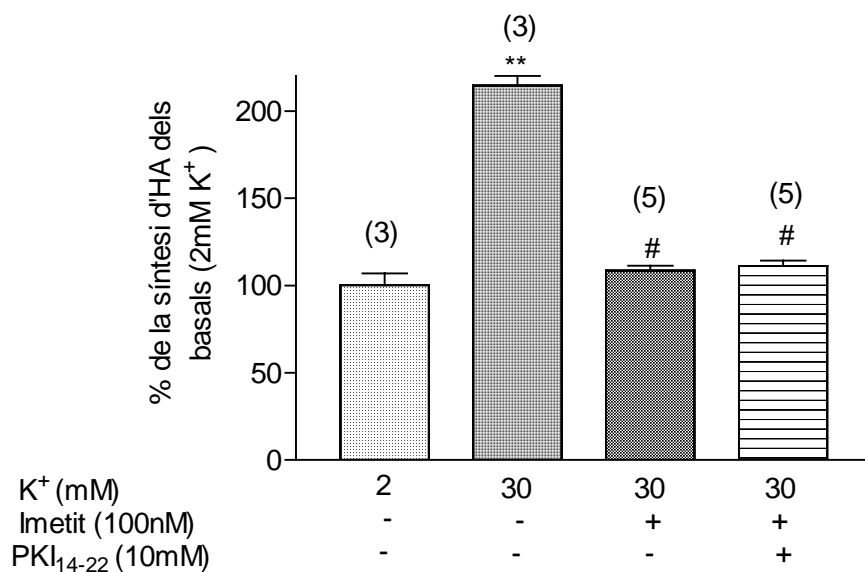


Figura 3.5.1. L'agonista H3 imetit reverteix l'efecte de la despolarització independentment de la inhibició de la PKA per PKI14-22

El 100% de la síntesi d'HA en els controls correspon a 13.6 ± 1 fmols/mg proteïna/h (mitjana \pm DE). ** $P < 0.001$ respecte als controls amb 2mM de potassi. # $P < 0.001$ respecte als estimulats amb 30mM de potassi. El nombre de rèpliques s'indica entre parèntesis a sobre de les barres que representen la mitjana \pm S.E.M.

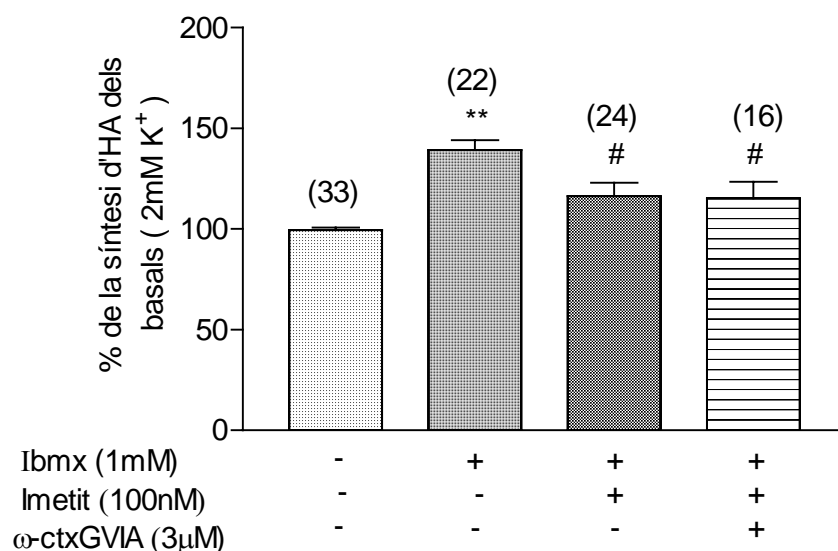


Figura 3.5.2. L'agonista H3 imetit reverteix l'efecte de l'ibmx independentment de la inhibició dels CCAV per la w-conotoxina GVIA

El 100% de la síntesi d'HA en els controls correspon a 18 ± 0.5 fmols/mg proteïna/h (mitjana \pm DE). * $P < 0.01$ respecte als controls amb 2mM de potassi. # $P < 0.05$ respecte als estimulats amb ibmx. El nombre de rèpliques s'indica entre parèntesis a sobre de les barres que representen la mitjana \pm S.E.M.

5.3. Estudi de les vies d'activació de la síntesi d'HA per l'antagonista i agonista invers del receptor H3 tioperamida.

En tots els experiments que es representen en la figura 3.5.3 es veu que l'agonista invers del receptor H3, tioperamida, augmenta significativament la síntesi d'HA en presència d'ibmx encara que la variabilitat de l'efecte és important (de 20% a 58% d'increment). L'inhibidor de la PKA, PKI14-22, reverteix el 82% de l'activació provocada per la tioperamida i l'ibmx conjuntament (figura 3.5.3.a). L'inhibidor dels CCAV tipus N (ω -conotoxina GVIA) reverteix l'activació de la síntesi d'HA induïda per la tioperamida però no per l'ibmx (vegeu figura 3.5.3.b i figura 3.3.2). En la figura 3.5.3.c es veu com l'inhibidor de la CaMkII, KN-62, reverteix l'efecte de la tioperamida però no el de l'ibmx (vegeu també la figura 3.3.2).

L'estimulació de la síntesi d'HA per tioperamida en condicions despolaritzants desapareix totalment en presència de l'inhibidor dels CCAV N, P i Q, ω -conotoxina MVIIC (figura 3.5.4.a) i de l'inhibidor de la CaMkII, KN-62 (figura 3.5.4.b). Com que el KN-62 també pot inhibir els CCAV (Tsutsui M et al., 1996, Greenberg et al., 1987; Marley et al., 1996) hem estudiat els efectes de l'AIP, inhibidor específic de la CaMkII, que no s'ha descrit que afecti l'entrada de calci pels CCAV. A diferència del KN62, aquest compost només bloqueja el 60% de l'activació conjunta produïda per la despolarització i la tioperamida (figura 3.5.4.c). El 40% de l'activació romanent coincideix amb l'increment mitjà de la síntesi d'HA estimulat per l'agonista invers (figura 3.5.4.c).

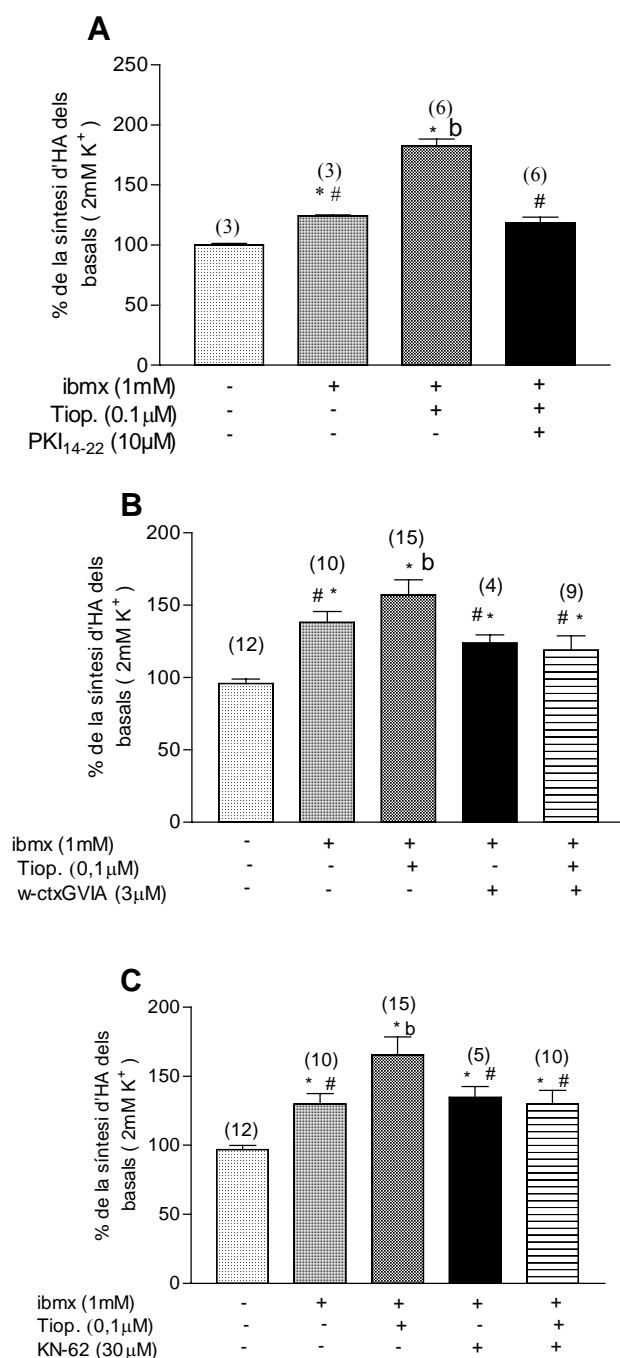


Figura 3.5.3. Inhibició per PKI14-22, ω-conotoxina GVIA i KN-62 dels efectes de la tioperamida sobre la síntesi d'HA en presència d'ibmx

Tots els inhibidors s'afegeixen 5 minuts abans que l'ibmx. L'ibmx s'afegeix 15 minuts abans del període d'incubació amb [³H]-His. Els resultats són la mitjana ± S.E.M. El 100% de la síntesi d'HA dels controls amb 2 mM de potassi és 15 ± 0.32 (A), 12.4 ± 0.9 (B), 13 ± 0.9 (C) i 24 ± 2. *P<0.01 respecte als controls amb 2 mM de potassi; ^bP<0.01 respecte als estimulats amb ibmx. #P<0.01 respecte els estimulats amb ibmx i tioperamida. El nombre de rèpliques s'indica entre parèntesis a sobre de les barres.

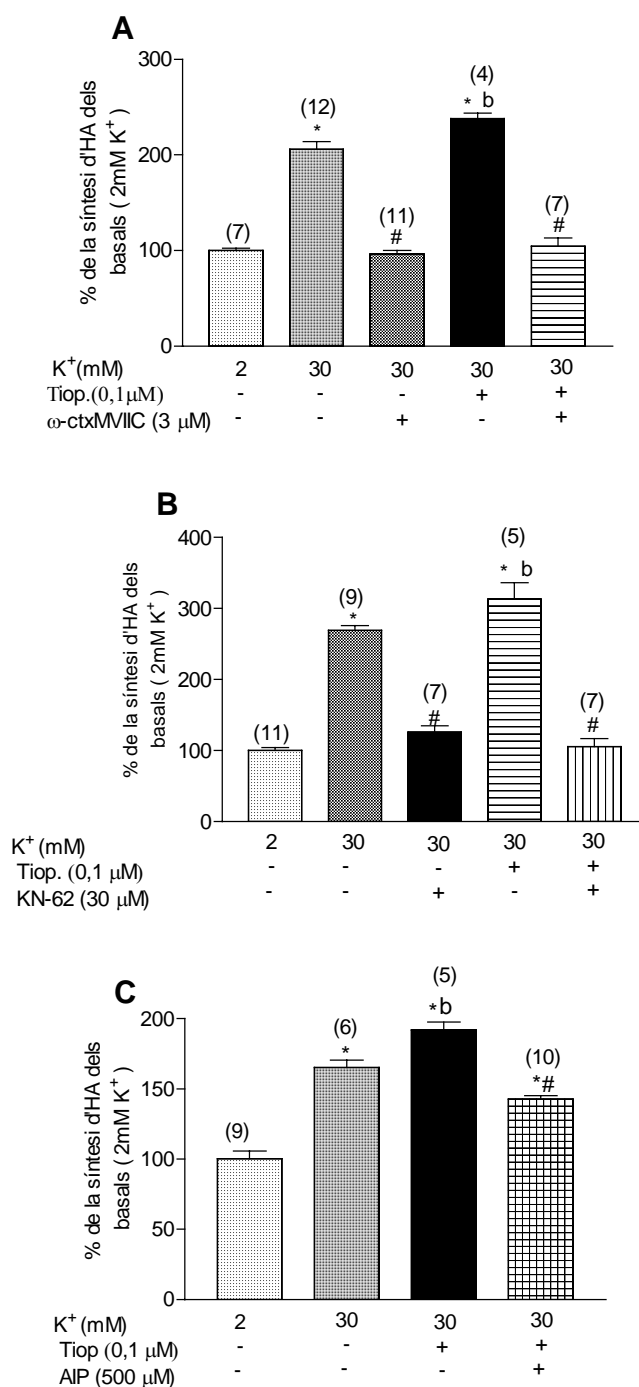


Figura 3.5.4. L'estimulació de la síntesi d'HA provocada per la tioperamida en condicions despolaritzants s'inhibeix totalment per la ω-conotoxina MVIIC (A) i pel KN-62 (B), però no per l'AIP (C)

El 100% de la síntesi d'HA és 23.6 ± 2.5 (A), 13 ± 1 (B) i 14.5 ± 0.2 fmols /mg de proteïna /h. (mitjana \pm D.E) * $P < 0.01$ respecte dels controls 2 mM de potassi; ^b $P < 0.05$ respecte dels despolaritzats amb 30 mM de potassi; # $P < 0.001$ respecte dels estimulats amb tioperamida i 30 mM de potassi. El nombre de rèpliques s'indica entre parèntesis a sobre de les barres.

6. PARTICIPACIÓ DE LA CAMKII EN L'ALLIBERAMENT D'HISTAMINA PER DESPOLARITZACIÓ EN MINIPRISMES D'ESCORÇA CEREBRAL

6.1. Introducció

El receptor H3 modula l'alliberament d'HA (Arrang et al., 1983) i d'altres neurotransmissors com l'acetilcolina (Blandizzi et al., 2001), glutamat (Molina-Hernández et al., 2001) i noradrenalina (Silver et al., 2002). Es coneix que els receptors H3 modulen els CCAV tipus N i P (Takeshita et al., 1988) i que l'entrada de calci a l'interior de la cèl·lula és necessària per a l'alliberament vesicular de neurotransmissors (Südhoff, 1999). D'altra banda, la CaMkII s'ha descrit que fosforila proteïnes implicades en el procés d'exocitosi de neurotransmissors (Niellander et al., 1995 ; Stefani et al., 1997; Hilfiker et al., 1999).

Per estudiar l'alliberament d'HA hem adaptat el mètode radioisotòpic aplicat en miniprismes corticals, de manera que en un mateix experiment podem mesurar la síntesi i l'alliberament simultàniament (vegeu metodologia).

En la figura 3.6.1 es pot veure que la despolarització per 30 mM de potassi augmenta l'alliberament d'HA i que aquest alliberament es manté lineal en el temps. En condicions no despolaritzants (2 mM de potassi) l'alliberament és molt baix i també es manté lineal durant mitja hora d'incubació. Aquests resultats suggereixen que la HA alliberada no afecta significativament al seu propi alliberament almenys durant 30 minuts d'incubació. Per tant, podem utilitzar aquest mètode per estudiar l'alliberament i la síntesi d'HA en les mateixes mostres.

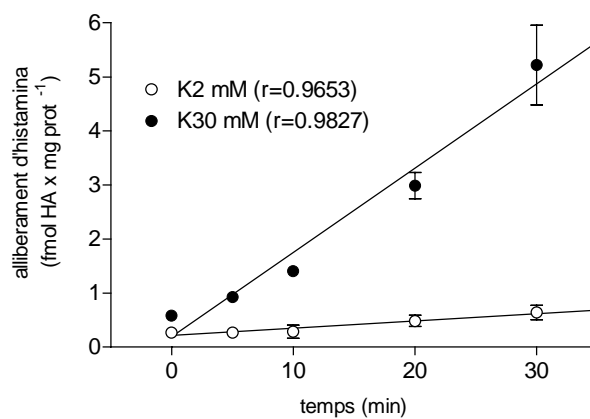


Figura 3.6.1. 30 mM de potassi provoca un augment de l'alliberament d'HA que es manté lineal durant els 30 minuts del període d'incubació

Els resultats són la mitjana \pm S.E.M i cada punt correspon a tres rèpliques. (Gómez-Ramírez-Ramírez J. 2002).

6.2. Efecte de la inhibició dels CCAV tipus N sobre l'alliberament d'HA estimulada per 30mM K⁺

En condicions despolaritzants, amb 30 mM de potassi, s'allibera entre un 62 i un 33% de la histamina sintetitzada (figures 3.6.2, 3.6.3 i 3.6.4). En presència de la ω -conotoxina GVIA o de l'imetit la HA alliberada correspon a un 37 i un 17% de la HA sintetitzada, respectivament (figura 3.6.2). Per tant, la inhibició dels CCAV tipus N i l'acció de l'agonista del receptor H3 imetit reverteixen l'alliberament de la HA un 40 i un 73%, respectivament.

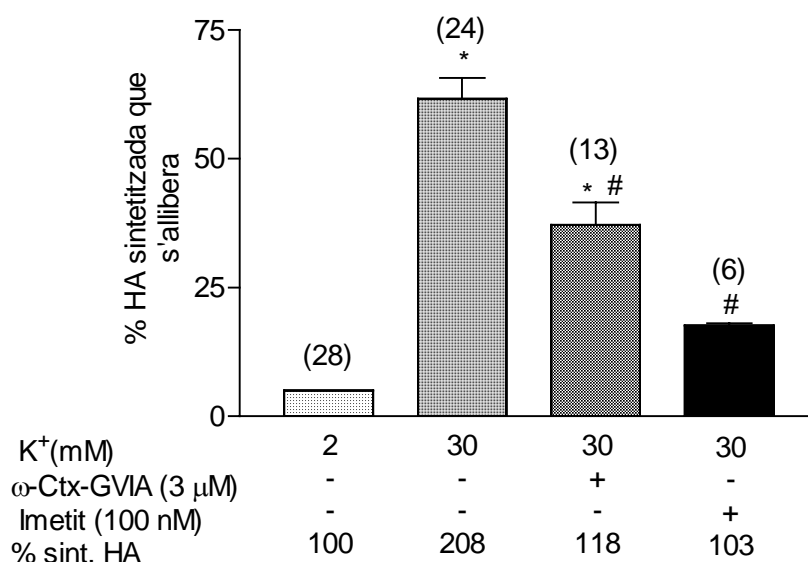


Figura 3.6.2. L'alliberament de la HA estimulat per la despolarització amb 30 mM de potassi s'inhibeix per acció de la ω -conotoxina GVIA o de l'imetit.

* P<0.01 respecte dels controls amb 2mM de potassi; # P<0.01 respecte dels despolaritzats amb 30 mM de potassi. Els resultats són la mitjana \pm SEM del percentatge d'HA sintetitzada que s'allibera. El 100% de la síntesi d'HA és 13.9 ± 0.4 fmols HA/mg proteïna / hora (mitjana \pm D.E.). El nombre de rèpliques s'indica entre parèntesis a sobre de les barres.

6.3. Efecte de la inhibició de la PKC sobre l'alliberament d'HA estimulada per 30 mM de K⁺

En la figura 3.6.3 es pot veure que la PKC probablement no està implicada en la regulació de l'alliberament d'HA en condicions despolaritzants, ja que cap de les concentracions assajades de l'inhibidor de la PKC, queleritrina, inhibeix l'alliberament de la HA sintetitzada.

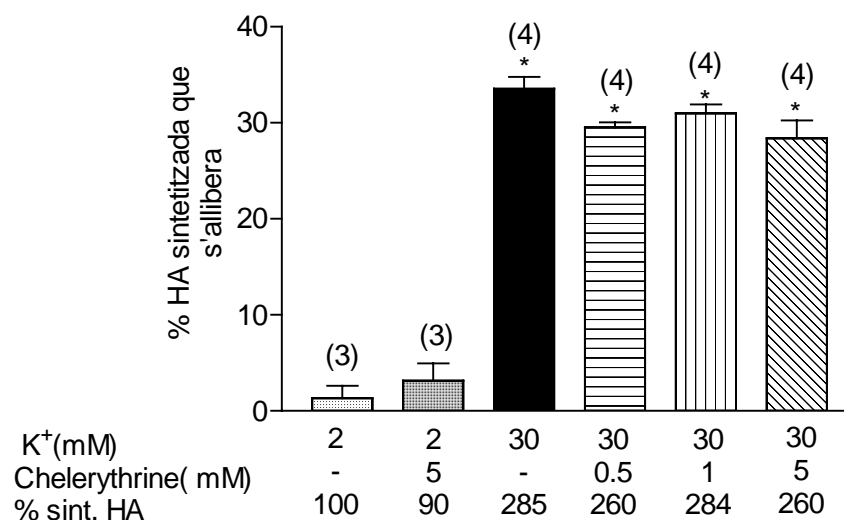


Figura 3.6.3. La PKC no sembla participar en el mecanisme de regulació de l'alliberament d'HA durant la despolarització

*P<0.001 respecte dels controls amb 2mM de potassi. Els resultats són la mitjana ± SEM del percentatge d'HA sintetitzada en cada grup que s'allibera. El 100% de la síntesi d'HA és 12.6 ± 1.2 fmols HA/mg proteïna / hora (mitjana ± D.E.). El nombre de rèpliques s'indica entre parèntesis a sobre de les barres.

6.4. Efecte de la inhibició de la CaM i la CaMkII sobre l'alliberament d'HA estimulada per 30mM K⁺

Els inhibidors de la CaMkII, AIP i KN-62, impedeixen en un 46% i un 60% l'alliberament d'HA sintetitzada (figura 3.6.4). L'inhibidor de la calmodulina, W13, inhibeix un 16% de l'alliberament estimulat per despolarització (figura 3.6.4).

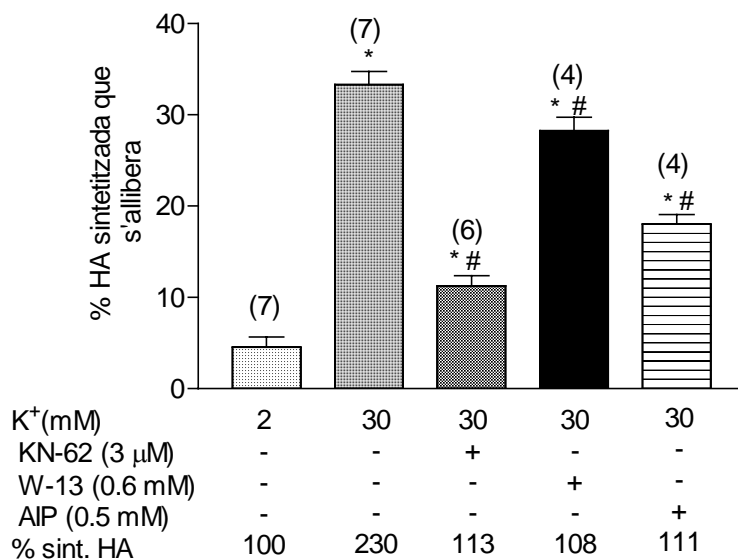


Figura 3.6.4. Els inhibidors de la CaMkII (KN-62 i AIP) i l'inhibidor de la calmodulina inhibeixen part de l'alliberament d'HA estimulat per la despolarització

*P<0.001 respecte dels controls amb 2mM de potassi; # P<0.01 respecte dels despolaritzats amb 30 mM de potassi. Els resultats són la mitjana ± SEM del percentatge d'HA sintetitzada en cada grup que s'allibera. El 100% de la síntesi d'HA és 13.7 ± 1.2 fmols HA/mg proteïna / hora (mitjana ± D.E.). El nombre de rèpliques s'indica entre parèntesis a sobre de les barres.

DISCUSSIÓ

1. DESENVOLUPAMENT D'UN NOU MÈTODE RADIOISOTÒPIC PER A LA DETERMINACIÓ DE LA SÍNTESI D'HA

La primera part d'aquest treball ha consistit en posar a punt una tècnica per a mesurar la síntesi d'HA en teixit cerebral basada en la formació d'HA marcada radioactivament a partir de [^3H]-His. En general, els mètodes radioisotòpics són els més sensibles per a determinar activitat HDC. No obstant això, l'especificitat obtinguda dependrà de la correcta separació del producte que volem mesurar d'altres substàncies interferents. Aquesta tècnica desenvolupada per nosaltres combina la sensibilitat que comporta el fet de determinar un isòtop radioactiu amb l'especificitat de la separació del producte mitjançant columnes d'HPLC. D'altra banda, l'ús de patrons interns d'HA freda per a cada mostra determina una millora de la repetitivitat i també de l'especificitat.

Aquest mètode també té la característica que ens permet quantificar la síntesi d'HA amb més precisió pel fet que prepurifiquem la [^3H]-His comercial i verifiquem la seva activitat específica, la qual hem constatat que en la majoria dels casos no coincideix amb l'especificada pel fabricant.

L'eliminació de l'excés de [^3H]-His es duu a terme perquè només un 0,1-0,5% de la [^3H]-His incubada passa a [^3H]-HA. Si no s'eliminés l'excés de [^3H]-His, part d'aquesta podria contaminar el pic cromatogràfic d'HA a causa de l'asimetria dels pics, la qual cosa augmentaria considerablement les dpm dels blancs i limitaria la sensibilitat.

L'ús de l'HPLC per separar la [^3H]-HA també permet una automatització del mètode, ja que la injecció, detecció i recol·lecció de les mostres es fa automàticament. Com que la quantitat de [^3H]-HA sintetitzada és massa petita per a detectar-se per absorbància, utilitzem un patró intern d'HA freda que, per una banda, ens permet detectar el pic de la HA i per l'altra calcular amb precisió el rendiment del procés, ja que s'utilitza com a patró intern la mateixa substància que es quantifica.

Per comprovar que la mesura que estem fent és HDC hem determinat la K_m i la V_{max} de l'activitat HDC en homogenats de cervell. Els valors obtinguts s'indiquen en la figura 3.1.2. El valor de K_m obtingut se situa entre els valors trobats per Garbarg et al. (1983) en el cervell humà (30 μM) i els descrits per fluorimetria en el nostre laboratori (200 μM) (figura 3.1.2). El valor de la V_{max} a concentracions de substrats similars és proper a l'obtingut mitjançant fluorimetria per Palacios et al., (1976) (figura 3.1.2).

Un altre paràmetre estudiat per validar el mètode ha estat la comprovació de la linealitat de l'activitat HDC en funció de la concentració de proteïna cerebral i del temps. Hem vist que la síntesi d'HA es manté lineal almenys durant una hora i a diferents quantitats de proteïna fins a 125 µg (figures 3.1.2.a i 3.1.2.b).

La quantificació de la síntesi d'HA en fmols/mg/h s'ha dut a terme tant en homogenats com en miniprismes. Si bé en els homogenats aquesta síntesi correspon a l'activitat HDC (ja que és l'únic enzim que duu a terme la síntesi d'HA en el cervell), en els miniprismes no es pot aplicar el terme "activitat HDC". Això es deu al fet que la [³H]-HA que mesurem en miniprismes és el resultat de la interacció de diferents factors: captació de la [³H]-His, activitat HDC i metabolisme de la HA. Així doncs, parlem sempre de síntesi d'HA quan ens referim als miniprismes i d'activitat HDC quan ens referim a homogenats i a l'HDC1/512 purificada.

Hem utilitzat els miniprismes corticals per mesurar la síntesi i alliberament d'HA perquè es tracta de teixit cerebral en el qual la regulació de la síntesi d'HA pel receptor H3 té un significat indubtablement més fisiològic que en cèl·lules transfectades que acostuma a ser el sistema més usat per estudiar mecanismes de transducció. En els miniprismes corticals només podem veure el que succeeix en les terminals de les neurones histaminèrgiques (tots els cossos d'aquestes neurones es troben en el nucli tuberomamill·lars) durant un temps relativament curt, suficient per estudiar els mecanismes de transducció independentment de modificacions a nivell d'expressió gènica. L'inconvenient principal de l'ús d'aquest model és que les modificacions en la síntesi i alliberament d'HA induïdes pels diferents estímuls utilitzats (p.e. la despolarització) podrien ser degudes a l'alliberament de neurotransmissors de terminals no histaminèrgiques adjacents.

2. MODULACIÓ DE LA SÍNTESI D'HA PER L'ENTRADA DE CALCI EXTRACEL·LULAR

En miniprismes d'escorça de rata la despolarització per 30 mM de potassi augmenta la síntesi d'HA (Arrang et al., 1983; Arrang et al., 1987b) mitjançant un mecanisme que no depèn de la PKA (Gómez-Ramírez et al., 2002). És ben conegut que durant la despolarització s'obren els CCAV i que l'entrada de calci per aquests canals activa enzims claus en la biosíntesi de neurotransmissors com la tirosina hidroxilasa

(Mestikawy et al.,1983) i la triptòfan hidroxilasa (Hamon et al., 1978; Kuhn et al., 1978).

D'altra banda, durant la despolarització l'augment de la biosíntesi de neurotransmissors i l'alliberament d'aquests solen ser fenòmens associats, i és conegut que l'entrada de calci pels CCAV és necessària per a l'alliberament de neurotransmissors incloent-hi la HA (Südhoff, 1999).

Els nostres resultats mostren com tres bloquejants dels diferents CCAV, el Cd^{2+} , la ω -conotoxina MVIIC i la ω -conotoxina GVIA afecten la síntesi d'HA induïda per despolarització (figura 3.2.1). El Cd^{2+} , inhibidor inespecífic de tots els CCAV (Halabisky et al., 2000) bloqueja un 70% l'efecte de la despolarització, la qual cosa suggereix que l'entrada de calci pels CCAV durant la despolarització activa la síntesi d'HA. Per tal de determinar quins CCAV estan implicats hem estudiat els efectes de dues conotoxines amb afinitats conegudes per a determinats tipus de CCAV. La ω -conotoxina MVIIC, a concentracions de 0.1 μM , només inhibeix els CCAV tipus Q i no modifica l'efecte de la despolarització, per tant, aquests canals tipus Q no semblen estar-hi implicats. Per sobre d'1 μM aquesta conotoxina no només inhibeix els tipus Q sinó que també inhibeix els tipus N i P i, com es pot veure en la figura 3.2.1.b, reverteix totalment l'efecte de la despolarització. Així doncs, els CCAV tipus N i potser també els tipus P semblen ser els mediadors de l'efecte de la despolarització. La ω -conotoxina GVIA és un inhibidor específic dels canals tipus N (Catterall, 1995) i bloqueja el 84% de l'efecte de la despolarització (figura 3.2.1.c). Amb aquestes dades es pot concloure que durant la despolarització per 30 mM de potassi, el calci que activa la síntesi d'HA en l'escorça cerebral entra majoritàriament pels CCAV tipus N i probablement una petita part ho fa pels tipus P. Malgrat que el Cd^{2+} inhibeix aquests dos tipus de canals, el fet que no produeixi una inhibició total de la síntesi d'HA podria ser degut als efectes inespecífics del Cd^{2+} (Vallee et al.,1972) i/o al fet que les condicions d'incubació no hagin estat les òptimes per a veure l'efecte màxim. Com que l'abundància relativa dels diferents tipus de CCAV varia en funció de la seva localització dins de l'anatomia de la neurona, no es pot descartar la participació d'altres tipus de canals en la regulació de la síntesi d'HA en altres regions cerebrals, com per exemple en els nTM, on es troben els cossos de les neurones histaminèrgiques. Diferències d'aquest tipus s'han descrit en neurones noradrenèrgiques (Rittenhouse et al.,1999). En condicions basals (2mM K^+) el fet que les conotoxines i el cadmi no afectin la síntesi d'HA suggereix que l'entrada

de calci pels CCAV no és necessària perquè se sintetitzi histamina en condicions de repòs (figura 3.2.1).

Tachikawa et al., (1986) publiquen un treball en què el tractament de cèl·lules PC12 amb un ionòfor de calci (A23187) mimetitza l'estimulació de la tirosina hidroxilasa induïda per despolarització. Els nostres resultats indiquen que la inomicina augmenta la síntesi d'HA un 60% (figura 3.2.2) per sobre dels controls, fet que suggereix que per augmentar la síntesi d'HA no és necessari que el calci entri pels CCAV. Aquest augment no és tan espectacular com el provocat per la despolarització (200%) (figures 3.2.1 i 3.2.2), la qual cosa podria estar d'acord amb diferències en els mecanismes activats pel calci en funció de les vies d'entrada. No es pot excloure que el menor efecte del ionòfor en comparació amb la despolarització estigui relacionat amb el fet que els CCAV i altres proteïnes implicades en l'activació de la síntesi d'HA estiguin agrupades formant clústers. Aquests resultats són la primera evidència que l'augment de calci intracel·lular activa la síntesi d'HA en el cervell.

Malgrat la claredat de tots aquests resultats, es coneix (Arrang et al., 1987b) que l'absència de calci en el medi d'incubació dels miniprismes augmenta un 200% la síntesi d'HA. Nosaltres hem replicat l'efecte de l'absència de calci, però no tenim de moment una interpretació clara respecte d'aquestes qüestions (dades no mostrades). Per aquest motiu vam evitar fer experiments amb absència de calci extracel·lular i ens vam centrar en la utilització d'inhibidors específics dels CCAV.

3. LA CAMKII ACTIVA LA SÍNTESI D'HA DURANT LA DESPOLARITZACIÓ

Com que un dels mecanismes establerts d'acció del calci és l'activació de proteïnes cinases, hem estudiat la participació de la PKC i de la CaMkII en l'efecte de la despolarització.

En condicions basals (2 mM de potassi) diferents concentracions de l'activador de la PKC, TPA, no augmenten la síntesi d'HA (figura 3.2.3.b). De forma similar, la preincubació dels miniprismes amb diferents concentracions de Queleritrina (inhibidor específic de la PKC) no reverteix l'efecte de la despolarització (figura 3.2.3.a) la qual cosa indica que la PKC no sembla estar implicada en l'efecte de la despolarització. En canvi, els nostres resultats indiquen que l'activació de la síntesi d'HA per despolarització desapareix quan s'inhibeix la CaMkII.

El mecanisme de l'activació de la CaMkII consisteix en la unió de calmodulina-calci i la posterior autofosforilació de la cinasa. Hem utilitzat tres tipus d'inhibidors amb mecanismes d'inhibició diferents (figura 3.2.4). El W-13 és un antagonista de la calmodulina (Hidaka i Tanaka, 1983) i provoca una inhibició gairebé total de l'efecte de la despolarització (figura 3.2.4.a). El KN-62 impedeix la unió de la calmodulina-calci a la CaMkII (figura 3.2.4.b) i provoca un 93% d'inhibició de l'efecte de la despolarització. L'AIP és un pèptid miristoilat que inhibeix la CaMkII en els llocs d'autofosforilació i d'unió al substrat (Wolfe et al., 2002) (figura 3.2.4.c) i també inhibeix el 92% de la síntesi d'HA dependent de despolarització. La raó d'utilitzar tres tipus d'inhibidors diferents es deu al fet que recentment s'ha vist que tant el W-13 com el KN-62 poden inhibir l'entrada de calci per CCAV (Greenberg et al., 1987; Tsutsui et al., 1996; Marley et al., 1996). En canvi no s'ha descrit cap inespecificitat de l'AIP (Wolfe et al., 2002). El fet que tots tres inhibidors de la CaMkII impedeixin per mecanismes diferents l'activació de la síntesi d'HA per despolarització ens permet afirmar que la CaMkII forma part del mecanisme d'activació de la síntesi d'HA en condicions despolaritzants (figura 3.2.4). En condicions basals (amb 2mM de K^+) cap d'aquests inhibidors afecta la síntesi d'HA, per tant, la CaMkII no formaria part del mecanisme de regulació de la síntesi d'HA en condicions no despolaritzants (figura 3.2.4).

Aquests resultats són similars als trobats prèviament en el cas de la síntesi de dopamina i serotonina. La CaMkII fosforila una gran varietat de proteïnes, entre les quals es troba la tirosina hidroxilasa (TH) (Mestikawy et al., 1983) i la triptòfan hidroxilasa (TPH) (Hamon et al., 1978), enzims claus en la síntesi de catecolamines i de 5-HT, respectivament. L'increment de l'activitat TH durant la despolarització de terminacions dopaminèrgiques cerebrals es deu exclusivament a la fosforilació dependent de calci de la TH (Mestikawy et al., 1983). El mateix enzim és fosforilable per PKA, però aquesta fosforilació no afecta l'activació de la TH per despolarització (Mestikawy et al., 1983).

4. LA SÍNTESI D'HA EN MINIPRISMES D'ESCORÇA CEREBRAL ES REGULA INDEPENDENTMENT PER LA VIA DEL CALCI/CAMKII I PER LA VIA DE L'AC/PKA

En la bibliografia es documenten gran nombre de punts de connexió entre la via del calci/ CaMkII i la via de l'AC/PKA. Per exemple, en el cervell el calci via calmodulina pot activar les AC tipus I, III, VIII (Hanoune i Defer, 2001) i modular la degradació de l'AMPc activant la fosfodiesterasa tipus I (PDE1) (Duman, 1999) o inhibint la PDE4 (Kelly et al., 1997). D'altra banda, la CaMkII fosforila i inactiva l'adenilat ciclasa tipus III (Wayman et al., 1995; Hanoune i Defer, 2001). Finalment, la PKA pot fosforilar i augmentar l'entrada de calci a través dels CCAV tipus L durant la despolarització (Cooper et al., 1995), encara que en neurones dels ganglis de la medul·la espinal la fosforilació dels CCAV tipus N per la PKA mostra un efecte oposat (Sculptoreanu et al., 1995).

Resultats previs del nostre grup descriuen que la inhibició de les fosfodiesterases d'AMPc i GMPc per mitjà de l'ibmx activa la síntesi d'HA a través d'una via diferent. D'altra banda, l'augment de la síntesi d'HA causat per despolarització no desapareix en presència d'un inhibidor de la PKA (PKI14/22) (Gómez-Ramírez et al., 2002), fet que indica que la via de l'AC/PKA pot estimular la síntesi d'HA però no participa en l'efecte de la despolarització.

Els resultats d'aquesta tesi mostren que l'efecte de l'ibmx no desapareix quan s'inhibeixen els CCAV, la calmodulina o la CaMkII (figura 3.3.2), fet que descarta que l'augment en la concentració d'AMPc provocat per ibmx actuï estimulant l'entrada de calci a través dels CCAV. Una altra prova de la independència de les dues vies de transducció és que els efectes activadors de l'ibmx i de la despolarització se sumen (figura 3.3.1), i això suggereix que no hi ha efectes moduladors aparents d'una via respecte de l'altra. Així doncs, existeixen dues vies de transducció de senyal que poden activar de forma independent la síntesi d'HA en terminals histaminèrgiques corticals: la via de l'AC/PKA i la via del calci/CaMkII. També podem concloure que durant la despolarització l'entrada de calci pels CCAV i l'activació de la CaMkII seria l'única via responsable de l'activació de la síntesi d'HA en les terminacions histaminèrgiques.

5. FOSFORILACIÓ I ACTIVACIÓ DE LA HDC PER CAMKII I PKA

Els resultats anteriors plantegen la incògnita de si aquestes dues cinases activen la HDC mitjançant una fosforilació directa o bé mitjançant proteïnes intermediàries. Per veure si aquestes cinases poden fosforilar i activar l'HDC hem escollit treballar amb l'enzim purificat. En teixit cru de cervell pot resultar més difícil determinar canvis de fosforilació en l'HDC pel fet que l'anticòs comercial per a aquest enzim reconeix un gran nombre de bandes en immunoblots. D'altra banda, les activacions de la síntesi d'HA per despolarització no es mantenen un cop s'homogeneïtzen els miniprismes, fet que indica la pèrdua de la modificació activadora de la proteïna HDC, possiblement per l'acció de proteases i/o fosfatases. Un dels avantatges de treballar amb l'enzim purificat és el fet de no tenir presents aquestes fosfatases i proteases en el medi d'incubació. El principal desavantatge és que les fosforilacions *in vitro* podrien no reflectir les fisiològiques, ja que és difícil saber quines són les concentracions precises de cinases i HDC en els compartiments específics de la cèl·lula. A més a més encara no està clar quina forma enzimàtica d'HDC és la forma activa en la cèl·lula.

Els nostres resultats demostren la fosforilació de l'HDC 1/512 per la PKA i/o la CaMkII *in vitro* (figures 3.4.1 i 3.4.2). Aquests resultats tenen un valor especialment rellevant perquè les fosforilacions van acompanyades d'una activació de l'activitat HDC (figura 3.4.3). També és significatiu el fet que l'activació per la CaMkII és major que l'activació per la PKA, ja que coincideix amb l'observació que en els miniprismes d'escorça cerebral la despolarització activa la síntesi d'HA més que l'ibmx. També vam assajar si la fosforilació per les dues cinases juntes provocava una activació sumatòria, però malauradament en aquest cas els resultats *in vitro* no es corresponen amb els efectes sumatoris observats en miniprismes (figura 3.3.1). No tenim una explicació per a la menor activació provocada per les dues cinases juntes (figura 3.4.3), que hauria de ser estudiada amb més profunditat. Per aclarir si la HDC també es fosforila i activa en el cervell, en el nostre grup estem duent a terme immunoprecipitacions d'HDC de miniprismes corticals amb anticossos fosfoespecífics seguits d'immunodetecció d'HDC amb anticossos comercials. Els nostres resultats preliminars (no mostrats) indiquen que la despolarització augmenta la fosforilació en serines/treonines de proteïnes immunoreactives per l'anticòs comercial anti-HDC, la qual cosa indica que *in vivo* l'HDC també es fosforila de forma paral·lela a la seva activació. Aquesta fosforilació no

es produeix en presència d'inhibidors de CaMkII (KN-62 i AIP) (comunicació personal de David Moreno).

Altres enzims purificats com la TH i la TPH també es fosforilen per la CaMkII i la PKA *in vitro*. Aquestes fosforilacions *in vitro* es troben en residus específics diferents per a cada cinasa i es corresponen als que es troben fosforilats *in vivo* per acció de despolarització o estimulació de la via de l'AMPC respectivament (Hamon et al., 1978; Kuhn et al., 1978; Atkinson et al., 1987; Ehret et al., 1989; Stenfors i Ross, 2002;). L'activació de la síntesi de 5-HT durant la despolarització depèn exclusivament de la via del calci-CaMkII, mentre que la inhibició de la síntesi de 5-HT per l'autoreceptor 5HT1B depèn de la via de l'AC/PKA (Stenfors i Ross, 2002). En la TH purificada no s'ha vist que la fosforilació per CaMkII augmenti l'activitat de l'enzim, però quan s'afegeix homogenat la TH s'activa (Yamauchi et al., 1981; Atkinson et al., 1987) fet que suggereix que l'activació per fosforilació de la TH per la CaMkII necessita una proteïna activadora que estaria present en l'homogenat. En el cas de l'HDC no sembla necessària la presència d'una proteïna activadora, ja que la fosforilació per la CaMkII *in vitro* augmenta l'activitat HDC.

6. PARTICIPACIÓ DEL CALCI COM A SEGON MISSATGER EN EL MECANISME DE TRANSDUCCIÓ DEL RECEPTOR H3

El calci forma part del mecanisme de transducció del receptor H3 en la regulació de l'alliberament de neurotransmissors, però no s'havia descrit mai que participés en la regulació de la síntesi d'HA per aquest autoreceptor. Tot i així és conegut el fet que l'imetit, agonista H3, reverteix l'activació de la síntesi d'HA per 30 mM de K⁺ (Arrang et al., 1987a; Gómez-Ramírez et al., 2002) i això fa pensar que l'H3 pot regular la síntesi de l'amina a través del tancament dels CCAV (Takeshita et al., 1998). Com que la despolarització activa la síntesi d'HA mitjançant la CaMkII i l'imetit inhibeix l'efecte de la despolarització, és lògic pensar que l'imetit actua inhibint la CaMkII a través del tancament dels CCAV. Aquesta conclusió es veu refermada per resultats del nostre grup (David Moreno, comunicació personal) que indiquen que l'imetit pot impedir la fosforilació de l'HDC induïda per despolarització. Com ja hem comentat abans, aquesta fosforilació no es dona en presència d'inhibidors de la CaMkII.

L'acció del receptor H3 sobre els CCAV es podria donar a través de la proteïna Gi simultàniament a l'acció sobre l'AC, ja que en el nostre grup hem vist que l'imetit

també inhibeix l'efecte activador de la forskolina (activador de l'AC) i de l'ibmx (inhibidor de les PDE i activador indirecte de la PKA) sobre la síntesi d'HA (Gómez-Ramírez et al., 2002). En les figures 3.5.1 i 3.5.2 es mostren resultats que suggereixen que l'efecte inhibidor de l'imetit sobre qualsevol de les dues vies no necessita la participació de l'altra via, ja que reverteix l'efecte de l'ibmx i de la despolarització independentment de la presència de la ω -conotoxina GVIA i de l'inhibidor de la PKA, respectivament. Aquest resultat descartaria interpretacions més complexes com per exemple la possibilitat que l'imetit inhibís la síntesi d'HA a través de l'acció del calci sobre PDE o la fosforilació per PKA de CCAV, etc. En altres paraules, l'agonista H3 inhibeix les vies del calci i de l'AMPc independentment una de l'altra. Tot i així, es podria obtenir una millor demostració de l'acció dual del receptor H3 mitjançant corbes dosi/efecte amb diferents concentracions d'imetit en presència d'un inhibidor d'una de les dues vies.

Els efectes de la tioperamida sobre la síntesi d'HA són més difícils d'interpretar. Tal com ja s'ha comentat, la tioperamida és un antagonista/agonista invers capaç d'inhibir l'activitat constitutiva intrínseca del receptor (Morisset et al., 2000). En els miniprismes corticals la tioperamida augmenta la síntesi d'HA només quan s'estimula qualsevol de les dues vies (per despolarització o per ibmx) però no en condicions basals (2mM de K^+) (Gómez-Ramírez et al., 2002). Aquest efecte estimulador de la tioperamida podria ser degut a la supressió de l'activitat constitutiva, malgrat que això és difícil d'afirmar amb rotunditat, perquè en els miniprismes existeix HA extraneuronal i per tant la tioperamida podria actuar com a antagonista clàssic. Aquesta HA extraneuronal podria venir de l'alliberament basal o estimulada per despolarització. L'alliberament basal d'HA (2mM de potassi) no sembla suficient per activar el receptor, ja que si el receptor estigués activat la tioperamida antagonitzaria l'efecte de la HA i augmentaria la síntesi de [3 H]-HA. D'altra banda, l'ibmx no sembla produir alliberament d'HA (Gómez-Ramírez, 2002), per la qual cosa l'efecte de la tioperamida en presència d'ibmx tampoc es pot explicar com un antagonisme de la HA alliberada. En presència de 30 mM de potassi (i per tant, d'alliberament d'HA) l'efecte de la tioperamida sobre la síntesi d'HA podria ser degut a la suma d'un efecte antagonista clàssic i d'un efecte agonista invers. Aquestes dades fan pensar que tot, o almenys una part, de l'efecte activador de la tioperamida que observem es deu a la supressió de l'activitat constitutiva del receptor. En condicions amb 2mM de potassi sembla haver-hi activitat AC i PDE en les terminals histaminèrgiques, ja que la inhibició de la degradació d'AMPc per ibmx augmenta la

síntesi d'HA. L'activitat intrínseca del receptor H3 mantindria inhibida l'AC. La tioperamida hauria d'impedir aquesta inhibició, activant l'AC i augmentant així els nivells d'AMPc. S'ha descrit que la tioperamida augmenta els nivells d'AMPc en cèl·lules transfectades amb el receptor i estimulades amb forskolina (Morisset et al., 2000). Els nostres resultats demostren que la tioperamida augmenta la síntesi d'HA en presència d'ibmx, inhibidor de les PDE que augmenta els nivells d'AMPc. No obstant, la tioperamida no incrementa la síntesi d'HA en condicions amb 2 mM de potassi sense ibmx o sense forskolina (Gómez-Ramírez et al., 2002). Aquests resultats permetrien concloure que per tal que la tioperamida incrementi la síntesi d'HA cal sobrepassar uns certs nivells llindar d'AMPc.

El fet que la tioperamida augmenti els nivells d'AMPc estaria d'acord amb l'observació que l'estimulació que produeix sobre la síntesi d'HA es bloqueja per inhibidors de la PKA (figura 3.5.3.a). D'altra banda, malgrat que la despolarització, igual que l'ibmx, permet que es manifesti l'efecte de la tioperamida, la inhibició de la PKA no reverteix l'augment de la síntesi d'HA dependent de despolarització. Aquests fets farien pensar que els efectes de la tioperamida estarien mediatos exclusivament per la via de l'AC/PKA, i no per la de la CaMkII.

Com acabem de comentar, l'efecte de la tioperamida també s'observa en condicions despolaritzants, en absència d'inhibidors de les PDE (figura 3.5.4). Això suggereix que l'entrada de calci pels CCAV també podria ser necessària perquè la tioperamida tingui efecte. Com que la HA tanca CCAV a través del receptor H3 (Takeshita et al., 1998), és raonable pensar que la tioperamida pot obrir aquests CCAV. Nosaltres hem observat que els inhibidors dels CCAV (figura 3.5.3.b i 3.5.4.a) reverteixen l'efecte de la tioperamida sobre la síntesi d'HA. Això suggereix que seria necessària una interacció entre l'entrada de calci pels CCAV i la via de l'AC/PKA per tal que la tioperamida pugui estimular la síntesi d'HA. Aquesta interpretació planteja la incògnita de en quin punt de les vies de transducció es pot donar l'esmentada interacció. La CaMkII no sembla ser necessària perquè es manifesti l'efecte de la tioperamida. Dels inhibidors del CaMkII assajats només el KN62 però no l'AIP inhibeix l'efecte de la tioperamida (figures 3.5.3.c, 3.5.4.b i 3.5.4.c). Aquesta aparent contradicció es pot explicar pel fet que el KN62 també pot inhibir CCAV (Tsutsui et al., 1996). Tots aquests resultats indiquen que l'entrada de calci pels CCAV estimulada per tioperamida no activaria la síntesi d'HA a través de la CaMkII, sinó a través de la via de l'AC/PKA. Existeixen tres tipus d'AC molt abundants en el cervell (tipus I, III i VIII) que s'activen per calci-

calmodulina i són inhibibles per subunitats de la pGi (Hanoune i Defer, 2001). Per tant, podria ser que l'AC que forma part del mecanisme de regulació de la síntesi d'HA per H3 en neurones histaminègiques estigués regulada per calmodulina-calci. La inhibició de l'activitat constitutiva del receptor H3 per la tioperamida, permetria, per una banda una major entrada de calci pels CCAV i per l'altra un desbloqueig de l'AC a través de la inactivació de les subunitats de la pGi, que la faria susceptible de ser activada per calmodulina-calci. Com que l'AC estaria més activa, els nivells d'AMPc augmentarien i s'activaria la PKA, que fosforilaria i activaria l'HDC.

La hipòtesi que l'AC implicada en la regulació de la síntesi d'HA es pugui activar per calci-calmodulina planteja la pregunta de per què la via de l'AC/PKA no participa en l'activació de la síntesi d'HA per despolarització. Encara que no tenim una explicació clara, podria ser que en condicions despolaritzants l'AC estigués inhibida per la pGi a causa de l'activitat constitutiva del receptor H3, i l'entrada de calci extracel·lular no seria suficient per activar-la. També és possible que l'entrada de calci pels CCAV activés PDE, fosfatases o fins i tot proteases que formessin part del mecanisme de regulació de la síntesi d'HA.

També ens podem preguntar per què l'entrada de calci produïda per tioperamida no activa la síntesi d'HA via CaMKII. Una possibilitat seria que l'increment de calci intracel·lular produït per tioperamida es donés només en llocs molt concrets de la neurona, en els quals es trobés l'AC formant un clúster amb el receptor H3 i els CCAV, però no la CaMKII. De fet, la mesura òptica de concentracions de calci en neurones indica que els increments fisiològics de calci citoplasmàtic se situen en punts molt concrets de la neurona (Smith i Augustine, 1988; Fink et al., 1988). Una altra possibilitat no exclouent amb l'anterior seria que l'AC tingués una major afinitat per la CaM-calci que la CaMKII, i per tant s'activés a concentracions petites de calci. Segons aquest raonament, caldria assumir que l'augment de l'entrada de calci produït per tioperamida és de petita magnitud.

7. MECANISMES DE REGULACIÓ DE L'ALLIBERAMENT D'HA DURANT LA DESPOLARITZACIÓ

El receptor H3 regula l'alliberament de gran varietat de neurotransmissors com l'acetilcolina (Blandizzi et al., 2001), glutamat (Molina-Hernández et al., 2001), noradrenalina (Silver et al., 2002) i la mateixa histamina (Arrang et al., 1983) a través de la seva acció sobre els CCAV (Takeshita et al., 1998). Per investigar el mecanisme de transducció del receptor H3 que regula l'alliberament d'HA hem utilitzat miniprismes corticals de forma similar a com ho van fer Arrang et al. (1983 i 1987b), però amb petites modificacions per mesurar simultàniament la síntesi d'HA.

La despolarització amb potassi estimula l'alliberament d'HA en miniprismes d'escorça cerebral entre 9 i 12 vegades respecte al basal com ja s'havia descrit (Arrang et al., 1983 i 1987b). L'alliberament d'HA es manté lineal durant la incubació, tant en condicions basals com en condicions despolaritzants (figura 3.6.1). Això suggereix que en aquestes condicions l'alliberament d'HA no és prou gran per retroinhibir el seu propi alliberament a través del receptor H3. Això estaria en concordança amb el fet que l'imetit és capaç d'inhibir l'alliberament en aquestes condicions (figura 3.6.2).

L'alliberament d'HA en les terminals histaminèrgiques de l'escorça cerebral depèn en part de l'entrada de calci pels CCAV tipus N, perquè en presència de la ω -conotoxina GVIA (inhibidor específic dels CCAV tipus N) s'inhibeix el 40% de l'alliberament (figura 3.6.2). Aquest percentatge d'inhibició és més petit que el percentatge d'inhibició de la mateixa conotoxina sobre la síntesi d'HA estimulada per despolarització (figura 3.2.1.c). Per tant, seria lògic fer la hipòtesi que en l'alliberament hi participessin CCAV que no modulen la síntesi. Washington et al. (2000) han demostrat la participació dels CCAV tipus L en l'alliberament d'HA en l'escorça cerebral mitjançant microdiàlisi, encara que nosaltres hem vist que aquests tipus de CCAV no participen en la regulació de la síntesi d'HA (figura 3.2.1). L'imetit aconsegueix revertir el 70% de l'alliberament provocat per despolarització (figura 3.6.2) la qual cosa indicaria que els receptors H3 poden tancar altres tipus de CCAV, que podrien ser els P (Takeshita et al., 1998) i/o els L (Washington et al., 2000). D'altra banda, com que l'imetit no reverteix tot l'efecte de la despolarització, es podria pensar que hi ha CCAV que no estan modulats pels receptor H3. En tot cas seria necessari fer més experiments amb inhibidors selectius de CCAV per a poder demostrar aquest punt.

L'acció del calci com a modulador de l'alliberament podria estar mediada per diferents mecanismes. Podríem descartar la implicació de la PKC, ja que la inhibició de la cinasa per queleritrina no afecta l'alliberament d'HA estimulat per despolarització (figura 3.6.3). En canvi la CaMkII sí que participa en la regulació de l'alliberament d'HA, ja que els inhibidors de la calmodulina i de la CaMkII bloquegen parcialment aquest alliberament. Cap d'aquests inhibidors bloqueja el 100% de l'alliberament, de manera que hi ha d'haver altres mecanismes implicats en els quals no participa la CaMkII. A més a més, els percentatges d'inhibició varien entre els diferents inhibidors assajats: curiosament l'inhibidor de la calmodulina, W-13, inhibeix menys l'alliberament (33%)(figura 3.6.4) que els inhibidors de la CaMkII. El KN62 i l'AIP reverteixen l'alliberament d'HA estimulat per despolarització en un 60% i un 46% respectivament (figura 3.6.4). La major inhibició per acció del KN-62 es podria explicar per la capacitat que té d'inhibir certs tipus de CCAV, com per exemple els L (Tsutsui et al., 1992). Com que el W-13 també pot inhibir entrades de calci extracel·lular, això ens porta a pensar que aquest inhibidor podria tenir altres efectes sobre el mecanisme d'alliberament que no podem explicar amb les dades actuals. En general, el que es pot concloure d'aquests resultats és que la CaMkII participa en la regulació de l'alliberament de la HA, encara que probablement no sigui l'únic mecanisme implicat.

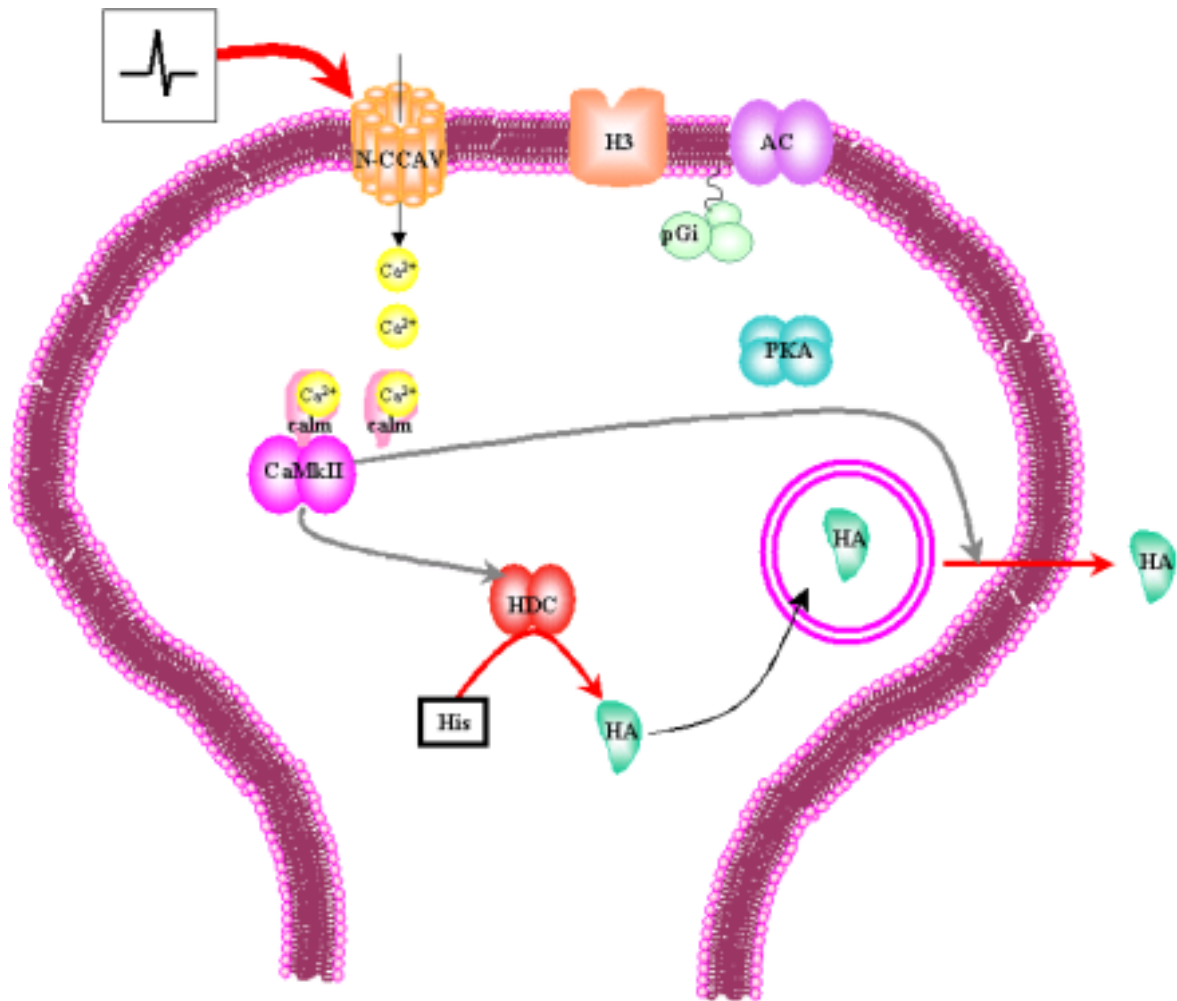


Figura 4.1. La CaMkII forma part del mecanisme d'activació de la síntesi i alliberament d'HA durant la despolarització

La despolarització per 30 mM de potassi activa els CCAV tipus N i entra calci a l'interior de la terminal de la neurona. El calci que entra s'uneix a la calmodulina i l'activa. La calmodulina activada s'uneix a la CaMkII i promou l'autofosforilació i activació d'aquesta cinasa i l'activació de la síntesi i alliberament d'HA. In vitro la CaMkII fosforila i activa l'HDC purificada.

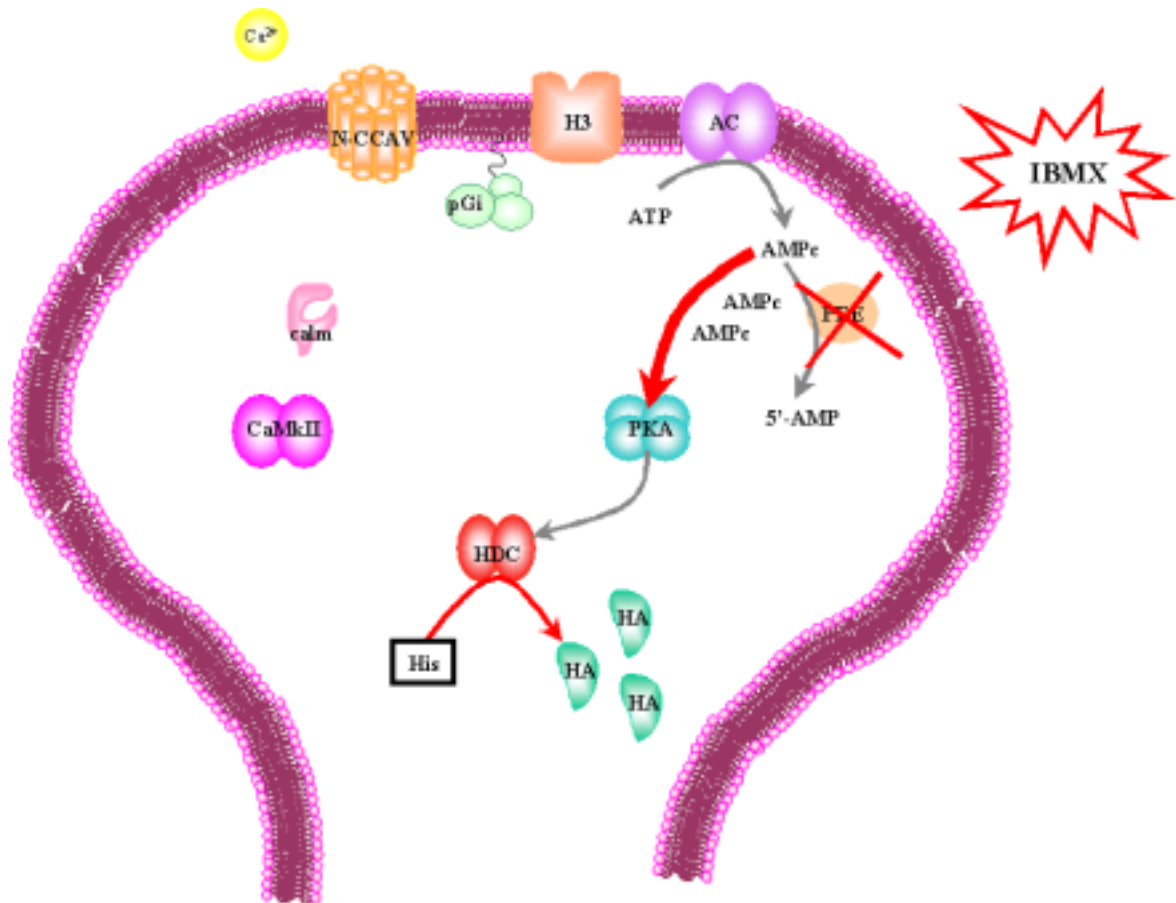


Figura 4.2. L'activació de la síntesi d'HA per acció de l'ibmx depèn de l'activitat PKA i és independent de la via del calci

L'ibmx augmenta els nivells basals d'AMPc i per tant l'activitat PKA. L'increment de la síntesi d'HA dependent d'ibmx s'inhibeix totalment per acció d'inhibidors de la PKA i no per cap inhibidor dels CCAV, de la CaM ni de la CaMkII. *In vitro*, la PKA fosforila i activa l' HDC purificada.

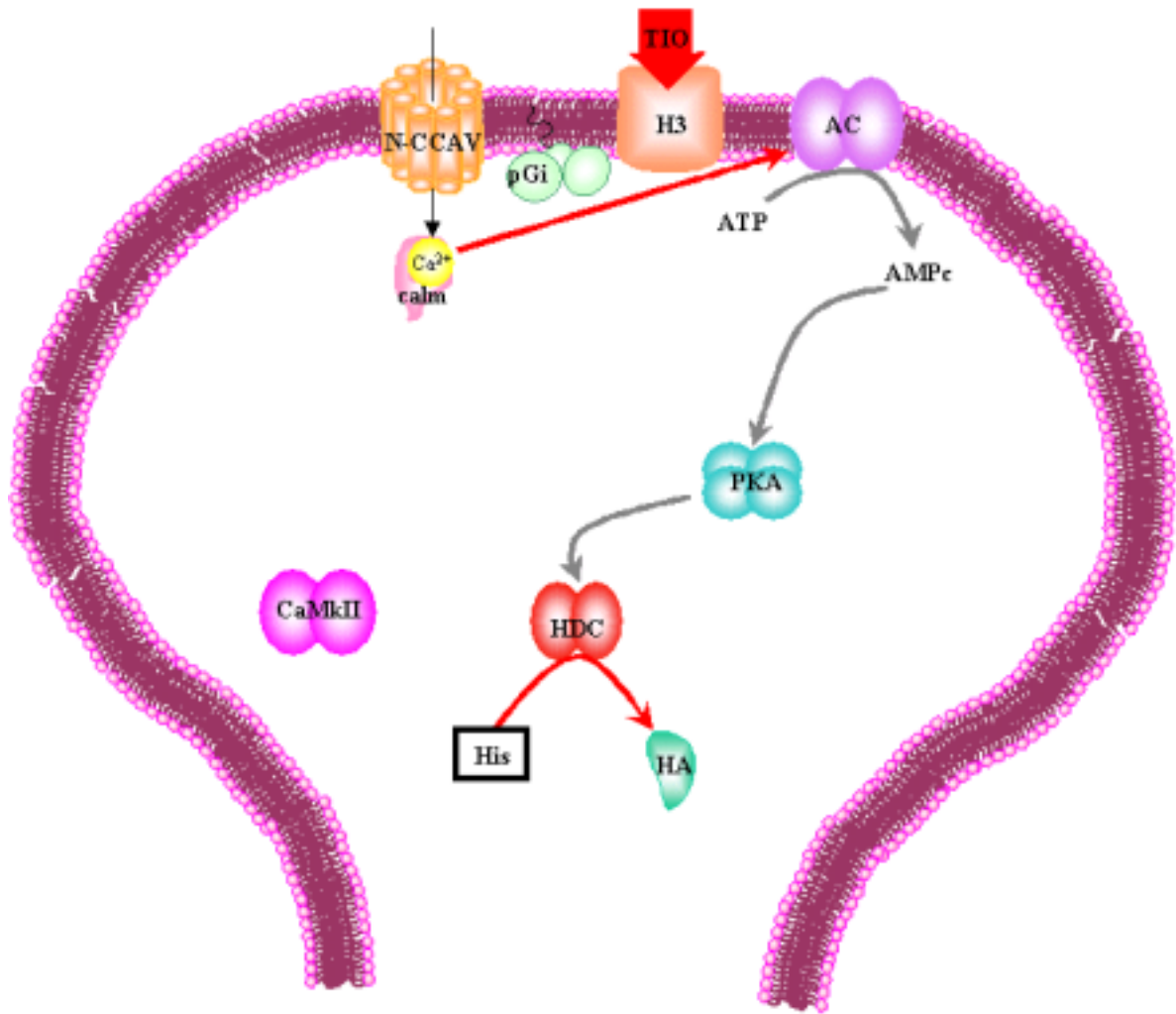


Figura 4.3. L'augment de la síntesi d'HA per tioperamida, tant en presència d'ibmx com en 30 mM de potassi, depèn de l'entrada de calci pels CCAV principalment tipus N i de l'activitat PKA, però no de la CaMkII

En aquest cas la hipòtesi és que la calmodulina activada per l'entrada de calci activaria l'AC i la síntesi d'HA per la via de la PKA. La CaMkII, a causa de la seva posició més distal, no formaria part del clúster i no s'activaria.

CONCLUSIONS

1) Hem posat a punt un mètode radioisotòpic que ens permet determinar l'activitat HDC en homogenats i la síntesi i alliberament de [³H]-histamina en miniprismes d'escorça cerebral, de manera sensible, específica i repetitiva.

2) La despolarització per 30mM de potassi activa la síntesi d'HA a través de l'entrada de Calci majoritàriament pels CCAV tipus N.

3) Durant la despolarització, l'entrada de calci pels CCAV activa la síntesi d'HA per mitjà de l'activació de la proteïna cinasa dependent de calci-calmodulina tipus II (CaMkII).

4) L'increment de la síntesi d'HA per l'activació de la via calci/CaMkII és independent de la via de transducció de l'AC/PKA.

5) *In vitro*, tant la PKA com la CaMkII fosforilen i activen la HDC purificada (versió 1/512).

6) L'agonista de l'autoreceptor H3, imetit, inhibeix la síntesi d'HA estimulada per la via del calci-CaMkII i per la via de l'AC-PKA independentment.

7) L'entrada de calci pels CCAV tipus N forma part del mecanisme de transducció del receptor H3 per regular la síntesi d'HA.

8) L'augment de la síntesi d'HA per tioperamida, tant en presència d'ibmx com en condicions despolaritzants, depèn de l'entrada de calci pels CCAV tipus N i de l'activitat PKA, però no de la CaMkII.

9) En l'escorça cerebral, l'entrada de calci pels CCAV i l'activació de la CaMkII formen part del mecanisme d'alliberament d'HA en condicions despolaritzants.

BIBLIOGRAFIA

- Adam H.M., Hye H.K.A. and Waton N.G. "Studies on uptake and formation of histamine by hypophysis and hypothalamus in the cat" *J. Physiol. Lond.* 175: 70-76, 1964.
- Airaksinen J.S. and Panula P. "The histaminergic system in the guinea-pig central nervous system: an immunocytochemical mapping using an antiserum against histamine". *J. Comp. Neurol.* 273:163-186, 1988.
- Arias-Montaña, Floran B., Garcia M., Aceves J. and Young J.M. "Histamine H3 receptor-mediated inhibition of depolarization-induced D1 receptor-mediated release of [³H]-g-aminobutyric acid from rat striatal slices". *Br. J. Pharmacol.* 133: 165-171, 2001.
- Arrang J.M., Drutel G., Garbarg M., Ruat M. Traiffort E. and Schwartz J.C. "Molecular and functional diversity of histamine receptor subtypes". *Ann. NY Acad. Sci.* 757: 314-323, 1995.
- Arrang J.M., Garbarg M. and Schwartz J.C. "Autoinhibition of brain histamine release mediated by a novel class (H3) of histamine receptor". *Nature Lond.* 302:832-837, 1983.
- Arrang J.M., Garbarg M. and Schwartz J.C. "Autoregulation of histamine release in brain by presynaptic H3-receptors". *Neuroscience* 15: 553-562, 1985.
- Arrang J.M., Garbarg M. and Schwartz. "Autoinhibition of histamine synthesis mediated by presynaptic H3-receptors". *Neuroscience* 23: 149-157, 1987B.
- Arrang J.M., Garbarg M., Lancelot J.C., Lecomte J.M., Pollard H., Robba M., Schunack W. and Schwartz J.C. "Highly potent and selective ligands for histamine H3-receptors". *Nature Lond.* 327: 117-123, 1987A.
- Arrang J.M., Toy J., Morgat J.L., Schunack W. and Schwartz J.C. "Histamine H3 receptor binding sites in rat brain membranes: modulations by guanine nucleotides and divalent cations". *Eur. J. Pharmacol.* 188: 219-227, 1990.
- Atkinson J, Richtand N, Schworer C, Kuczynski R, Soderling T. "Phosphorylation of purified rat striatal tyrosine hydroxylase by Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II: effect of an activator protein". *J. Neurochem.* 49(4):1241-9, 1987.
- Barbin G. Palacios J.M. Garbarg M., Schwartz J.C., Gaspar P., Javoy-Agid F. and Agid Y. "L-Histidine decarboxylase in the human brain: properties and localization". *J. Neurochem.* 35: 400-406, 1980.

- Baudry M., Martres M.P. and Schwartz J.C. "The subcellular localization of histidine decarboxylase in various regions of rat brain". *J. Neurochem.* 21: 1301-1309, 1973.
- Baudry M., Martres M.P. and Schwartz J.C. "H1 and H2 receptors in the histamine-induced accumulation of cyclic AMP in guinea pig brain slices". *Nature* 253:362-364, 1975.
- Beaven M.A. "Histamine: its role in physiological and pathological processes". *Monogr. Allergy*, 13:1-113, 1978.
- Blanco I., Ferrer I., Toledo A., Sabrià J., Picatoste F., Rodríguez R., Brandner R., Rodríguez J and Sentís M. "Subcellular localization of brain mast cell histamine in developing rat". *Neurochem. Int.* 11: 451-461, 1987.
- Blandina P., Giorgetti M., Bartolini L., Cecchi M., Timmerman H., Leurs R., Pepeu G. and Giovannini M.G. "Inhibition of cortical acetylcholine release and cognitive performance by histamine H3 receptor activation in rats". *Br. J. Pharmacol.* 119: 1656-1664, 1996.
- Blandizzi C., Colucci R., Tognetti M., De Paolis B. and Del Tacca M. "H3 receptor-mediated inhibition of intestinal acetylcholine release: pharmacological characterization of signal transduction pathways". *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 363: 193-202, 2001.
- Bouthenet M; Ruat M.; Sales N; et al. "A detailed mapping of H1-receptors in guinea-pig CNS established by autoradiography with [125I]iodobolpyramine". *Neuroscience* 26: 553-600, 1988.
- Brown R., Fedorov N., Haas H.L. and Reymann K. "Histaminergic modulation of synaptic plasticity in area CA1 of rat hippocampal slices". *Neuropharmacology* 34: 181-190, 1995.
- Brown R.E. and Haas H.L. "On the mechanism of histaminergic inhibition of glutamate release in the rat dentate gyrus". *J. Physiol. Lond.* 515: 777-783, 1999.
- Brown R.E. and Reymann K.G. "Histamine H3 receptor-mediated depression of synaptic transmission in the dentate gyrus of the rat in vitro". *J. Physiol. Lond.* 496: 175-184, 1996.
- Brown R.E., Stevens D.R. and Hass H.L. "The physiology of brain histamine". *Prog. in Neurobiol.* 63: 637-672, 2001.
- Burkard W.P, Gey K.F. and Pletscher A. "Diamine oxidase in the brain of vertebrates". *J. Neurochem.* 10: 183-186, 1963.

- Catterall WA. "Structure and function of voltage-gated ion channels". *Annu. Rev. Biochem.* 64:493, 1995.
- Chang, R; Tran V. & Snyder H. "Heterogeneity of H₁- receptors : species variations in [³H]-mepyramine binding of brain membranes". *J. Neurochem.* 32: 1653-1663, 1979.
- Chemelli R.M., Willie J.T., Sinton C.M., Elmquist J.K., Scammell T., Lee C., Richardson J.A., Williams S.C., Xiong Y., Kisanuki Y., Fitch T.E., Nakazato M., Hammer R.E., Saper C.B. and Yanagisawa M. "Narcolepsy in orexin knockout mice: molecular genetics of sleep regulation". *Cell* 98: 437-451, 1999.
- Chen, D.; Monstein H.; Mylander A. et al. "Acute responses of rat stomach enterochromaffin-like cells to gastrin : secretory activation and adaptation". *Gastroenterology* 107 : 18-27, 1994.
- Chudomelka, P. & Murrin L. "Transport of histidine into synaptosomes of the rat central nervous system". *J. Neurochem.* 40 : 830-835, 1983.
- Clark E. and Hill S.J. "Sensitivity of histamine H₃ receptor agonist-stimulated [³⁵S]GTPγ[S] binding to pertussis toxin". *Eur. J. Pharmacol.* 296:223-225, 1996.
- Clapham J. and Kilpatrick GJ. "Histamine H₃ receptors modulate the release of [H₃]-acetylcholine from slices of rat entorhinal cortex:evidence of the possible existence of H₃ receptor subtypes ". *Br. J. Pharmacol.* 107(4): 919-923, 1992.
- Clark M.A., Korte A. and Egan R.W. "Guanine nucleotides and pertussis toxin reduce the affinity of histamine H₃ receptors on AtT-20 cells." *Agents Actions* 40: 129-134, 1993.
- Cooper DMF; Mons N and Karpen J.W. "Adenylyl cyclases and interaction between calcium and cAMP signalling". *Nature* 374:421, 1995.
- Coruzzi G., Gambarelli E., Bertaccini G. and Timmerman H. "Cardiovascular effects of the novel histamine H₂ receptor agonist amthamine: Interaction with the adrenergic system". *Arch. Pharmacol.* 353: 417-422, 1996.
- Coyle JT. and Kuhar MJ. "Subcellular localization of dopamine beta-hydroxylase and endogenous norepinephrine in the rat hypothalamus". *Brain. Res.* 65(3): 475-487, 1974.
- Dale H.H, Laidlaw P. "The physiological action of b-imidazolyethylamine". *J. Physiol.* (London) 41, 318-344, 1910.
- Daly, JW.; McNeal E.; Partington C. et al. "Accumulations of AMPc in adenine-labelled cell-free preparations from guinea pig cerebral cortex : role of alpha-adrenergic and H₁-histaminergic receptors". *J. Neurochem.* 35: 326-337, 1980.

- Dartsch C; Chen D & Person L. "Multiple forms of rat stomach HDC may reflect posttranslational activation of the enzyme". *Regul. Pep.* 77: 33, 1998.
- Dismukes K. & Snyder S. "HA turnover in rat brain". *Brain Res.* 78: 467-481, 1974.
- Diverse-Pierluissi M., McIntires W.E, Myung C.S, Lindorfer M.A, Garrison J.C, Goy M.F. and Dunlap K. "Selective coupling of G protein beta/gamma complexes to inhibition of calcium channels". *J.Biol.Chem.* 275(37):28380, 2000.
- Drutel G., Peitsaro N., Karlstedt K., Wieland K., Smit M.J., Timmerman H., Panula P. and Leurs R. "Identification of Rat H3 Receptor Isoforms with Different Brain Expression and Signaling Properties". *Mol. Pharmacol.* 59: 1-8, 2001.
- Duch, D.; Bowers S.& Nichol C. "Elevation of brain HA levels by diamino pyrimidine inhibitors of HMT". *Biochem. Pharmacol.* 27: 1507-1509, 1978.
- Duman RS and Nestler E. "Cyclic Nucleotides". *Basic Neurochemistry: molecular, cellular and Medical aspects.* chapter 22, pp. 444; 6th Ed. , edited by G. J. Siegel et al. Philadelphia, 1999.
- Dumery V. and Blozovski D. "Development of amygdaloid cholinergic mediation of passive avoidance learning in the rat. I. Muscarinic mechanisms". *Exp. Brain Res.* 67: 61-69, 1987.
- Durant G.J., Duncan W.A., Ganellin C.R., Parsons M.E., Blakemore R.C. and Rasmussen A.C. "Impromidine (SK&F) is a very potent and specific agonist for histamine H2 receptors". *Nature* 276: 403-405, 1978.
- Ehret M, Cash CD., Hamon M. and Maitre M. "Formal demonstration of the phosphorylation of rat brain tryptophan hydroxylase by Calci/calmodulin-dependent protein kinase". *J. Neurochem.* 52(6):1886, 1989.
- El Mestikawy S., Gozlan H., Glowinski J. and Hamon. "Charachtersitics of tyrosine hydroxylase activation by K⁺-induced depolarization and/or forskolin in rat striatal slices". *J. Neurochem.*, 45 (1): 173, 1985.
- El-Ackad, T. and Brody M. " Fluorescence histochemical localization of non mast-cell histamine". In : *Neuropsychopharmacology*, ed. by J.R.Boissier. New York : Elsevier, p.551, 1975.
- Engel N, Olmo MT, Coleman CS, Medina MA, Pegg AE and Sánchez-Jiménez F. " Experimental evidence for structure-activity features in common between mammalian histidine decarboxylase and ornithine decarboxylase". *Biochem. J.* 320:365-368, 1996.

- Ericson H., Blomqvist A. and Kohler C. "Brainstem afferents to the tuberomammillary nucleus in the rat brain with special reference to monoaminergic innervation". *J. Comp. Neurol.* 281: 169-192, 1989.
- Ericson H., Blomqvist A. and Kohler C. "Origin of neuronal inputs to the region of the tuberomammillary nucleus on the rat brain". *J. Com Neruol.* 311: 45-64, 1991a.
- Ericson H., Kohler C. and Blomqvist A. "GABA-like immunoreactivity in the tuberomammillary nucleus: an electron microscopical study in the rat" *J. Comp. Neurol.* 305: 462-469, 1991b.
- Ericson H., Watanabe T. and Kohler C. "Morphological analysis of the tuberomammillary nucleus in the rat brain: delineation of subgroups with antibody against L-histidine decarboxylase as a marker." *J. Comp. Neurol.* 263: 1-24, 1987.
- Eriks J.C., Van der Goot H., Sterk G.J. and Timmerman H. "Histamine H2-receptor agonists - synthesis, in vitro pharmacology, and qualitative structure- activity relationships of substituted 4-(2-Aminoethyl)thiazoles and 5-(2-Aminoethyl)thiazoles". *J. Med. Chem.* 35: 3239-3246, 1992.
- Ferrer I., Picatoste F., Rodergas E., Garcia A., Sabrià J., Blanco I. "Histamine and mast cells in developing rat brain". *J. Neurochem.* 32: 587-592, 1979.
- Fink LA., Connor JA., Kaczmarek LK. "Inositol triphosphate releases intracellular stored calcium and modulates ion channels in molluscan neurons". *J. Neurosci.* 8: 2544-2555, 1988.
- Fleming JV. And Wang TC. "The production of 53-55-kDa isoforms is not required for rat L-histidine decarboxylase activity". *J Biol.Chem.* 278(1):686-94, 2003.
- Flood J.F., Uezu K. and Morley J.E. "Effect of histamine H2 and H3 receptor modulation in the septum on post-training memory processing". *Psychopharmacol. Berl.* 140: 279-284, 1998.
- Fukui H., Fujimoto K., Mizuguchi H., Sakamoto K., Horio Y., Takai S., Yamada K. and Ito S. "Molecular cloning of the human histamine H1 receptor gene". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 201: 894-901, 1994.
- Funakoshi H., Okuno S. and Fujisawa H. "Different effects on activity caused by phosphorylation of tyrosine hydroxylase at Ser 40 by three multifunctional protein kinases". *J.Biol.Chem.* 266(24):15614, 1991.
- Ganellin C.R. "Chemistry and structure activity relationship of drugs acting at histamine receptors". In: *Pharmacology of Histamine Receptors*, edited by C.R. Ganellin and M.E. Parsons. Bristol, UK: Wright, pag. 10-102, 1982.

- Gantz I., Delvalle J., Wang L.D., Tahiro T., Munzert G., Guo Y.J., Konda Y. and Yamada T. "Molecular basis for the interaction of histamine with the histamine H2 receptor". *J. Biol. Chem.* 267: 20840-20843, 1992.
- Gantz I., Munzert G., Tashiro T., Schaffer M., Wang L., Delvalle J. and Yamada T. "Molecular cloning of the human histamine H2 receptor". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 178: 1386-1392, 1991a.
- Gantz I., Schaffer M., Delvalle J., Logsdon C., Campbell V., Uhler M. and Yamada T. "Molecular cloning of a gene encoding the histamine H2 receptor". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88: 429-433, 1991b.
- Garbarg M.; Barbin G.; Feger J. & Schwartz J. "Histaminergic pathway in rat brain evidenced by lesions of FMB". *Science Wash. DC* 186: 833-835, 1974.
- Garbarg M.; Pollard H.; Quach T. and Schwartz J. In "Methods in Biogenic Amine Research" (Parvez S., Nagatsu T.; Nagatsu I. And Parvez H. Eds. p. 623-662, Elsevier, Amsterdam/ New York, 1983.
- Garbarg M.; Rodergas E.; & Schwartz J. "Inhibition of histamine synthesis in brain by α -fluoromethylhistidine, a new irreversible inhibitor: in vitro and in vivo studies". *J. Neurochem.* 35:1045, 1980.
- Garcia M., Floran B., Arias Montaña J.A., Young J.M. and Aceves J. "Histamine H3 receptor activation selectively inhibits dopamine D1 receptor-dependent [3 H]-GABA release from depolarization-stimulated slices of rat substantia nigra pars reticulata". *Neuroscience* 80: 241-249, 1997.
- Giorgetti M., Bacciottini L., Bianchi L., Giovannini MG., Cecchi M., Blandina P. "GABAergic mechanism in histamine H3 receptor inhibition of K^+ -evoked release of acetylcholine from rat cortex in vivo". *Inflamm. Res. Suppl* 1:S33-S34, 1997.
- Giovannini M.G., Bartolini L., Bacciottini L., Greco L. and Blandina P. "Effects of histamine H3 receptor agonists and antagonists on cognitive performance and scopolamine-induced amnesia". *Behav. Brain Res.* 104: 147-155, 1999.
- Gomez-Ramirez J., Ortiz J and Blanco I. "Presynaptic H3 autoreceptors modulate histamine synthesis through cAMP pathway". *Mol. Pharmacol.* 61: 239, 2002.
- Gomez-Ramirez J. "Regulation of histamine synthesis and release in the central nervous system by H3 receptor transduction mechanisms". Tesis doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona, Juny del 2002.
- Goldschmidt RC, Kandelwal JK, Hough LB. "Presence and measurement of tele-methylhistamine in mast cells". *Agents Actions.* 14(2): 174-178, 1984.

- Gorelova N. and Reiner P.B. "Histamine depolarizes cholinergic septal neurons". *J. Neurophysiol.* 75: 707-714, 1996.
- Grace A.A. and Bunney B.S. "Intracellular and extracellular electrophysiology of nigral dopaminergic neurons: action potential generating mechanisms and morphological correlates". *Neuroscience* 10: 317-331, 1983.
- Grace A. and Onn S.P. "Morphology and electrophysiological properties of immunocytochemically identified rat dopamine neurons recorded in vitro". *J. Neurosci.* 9: 3463-3481, 1989.
- Green J. "Histamine". In: *Handbook of Neurochemistry. Control Mechanisms in the Nervous System*, edited by A.Lajtha. New York: Plenum, vol. 4, p. 385, 1970.
- Green R.W. and Haas H.L. "Effects of histamine on dentate gyrus granule cells in vitro". *Neuroscience* 34: 299-303, 1990.
- Greenberg D.A, Carpenter C.L. and Messing R.O. "Interactions of calmodulin inhibitors and calcium-dependent protein kinase inhibitors with voltage-dependent calcium channels". *Brain. Res.* 404: 401, 1987.
- Grzanna R. "Histidine decarboxylase: isolation and molecular characteristics". *Neurochem Res.* Jul;9(7):993-1009, 1984.
- Gulat-Marnay C., Lafitte A., Arrang J.M. and Schwartz J.C. "Modulation of histamine release and synthesis in the brain mediated by alpha-2 adrenoceptors". *J. Neurochem.* 53: 519-524, 1989b.
- Gulat-Marnay C., Lafitte A., Arrang J.M. and Schwartz J.C. "Modulation of histamine release in the rat brain by kappa-opioid receptors". *J. Neurochem.* 55: 47-53, 1990.
- Gulat-Marnay C., Lafitte A., Arrang J.M. and Schwartz J.C. "Regulation of histamine release and synthesis in the brain by muscarinic receptors." *J. Neurochem.* 52: 248-254, 1989a.
- Haas H.L. "Electrophysiology of histamine receptors. In: *The Histamine Receptor*". Wiley-Liss, New York, pp. 161-171, 1992.
- Haas H.L. "Histamine hyperpolarizes hippocampal neurones in vitro". *Neurosci. Lett.* 22: 75-78, 1981.
- Haas H.L. and Konnerth S. "Histamine and noradrenaline decrease calcium-activated potassium conductance in hippocampal pyramidal cells". *Nature* 302: 4032-434, 1983.
- Haas H.L. and Reiner P.V. "Membrane properties of histaminergic tuberomammillary neurons of the rat hypothalamus in vitro". *J. Physiol. Lond.* 399: 633-646, 1988.

- Haas H.L., Reiner P.V. and Greene R.W. "Histamine and histaminoceptive neurons: Electrophysiological studies in vertebrates". In: T. Watanabe and H. Wada (eds.) *Histaminergic Neurons: Morphology and Function*. CRC Press, Boca Raton, pag. 195-208, 1991.
- Hakanson R.; Liedberg G. "Effects of brocresine (NSD-loss) and cycloheximide on amino acid decarboxylase activities in gastric mucosa of normal and vagally denervated rats". *Br. J. Pharmacol.* 46: 688-695, 1972.
- Hakanson, R." Mammalian HDC : interaction between apoenzyme and PLP" *Eur. J. Biochem.* 1 : 383, 1967.
- Halabisky B, Friedman D, Radojicic M, Strowbridge BW. "Calcium influx through NMDA receptors directly evokes GABA release in olfactory bulb granule cells". *J. Neurosci.* 20(13):5124-34, 2000.
- Hamon M, Bourgoin S, Hery F, Simonet G. "Activation of tryptophan hydroxylase by adenosine triphosphate, magnesium, and calcium". *Mol. Pharmacol.* 14(1): 99, 1978.
- Hanoune J. and Defer N. " Regulation and role of adenylyl cyclase isoforms". *Annual Reviews*, 41:145, 2001.
- Hayashi H., Takagi H., Taked N., Kubota Y., Tohyama M., Watanabe T. and Wada H. "Fine structure of histaminergic neurons in the caudal magnocellular nucleus of the rat as demonstrated by immunocytochemistry using histidine decarboxylase as a marker". *J. Comp. Neurol.* 229: 233-241, 1984.
- Hegstrand L.R. and Simon J.R. "Histidine transport into rat brain synaptosomes". *J. Neurochem.* 45: 407-414, 1985.
- Hegstrand L.R., Kanof P.D. and Greengard P. "Histamine-sensitive adenylate cyclase in mammalian brain". *Nature* 260: 163-165, 1976.
- Hidaka H. and Tanaka T. "Naphtalenesulfonamides as calmodulin antagonists". *Methods in enzymol.* 102: 185, 1983.
- Hilfiker S., Pieribone VA., Nordstedt C., Greengard P. and Czernik AJ. " Regulation of synaptotagmin I phosphorylation by multiple protein kinases." *J. Neurochem.* 73(3):921-32, 1999.
- Hill S.J. and Young J.M. "Noradrenaline and (R)-alpha-methyl-histamine inhibit the release of [³H]-Histamine from rat cerebral cortical slices". *Br. J. Pharmacol.* 93: 90P, 1988.
- Hill S.J. "Distribution, properties and functional characteristics of three classes of histamine receptor". *Pharmacol. Rev.* 42:145-183. 1990

- Hill S.J., Ganellin C.R., Timmerman H., Schwartz J.C., Shankley N.P. Young J.M., Schunack W., Levi T. and Haas H.L. "International Union of Pharmacology. XIII. Classification of histamine receptors". *Pharmacol. Rev.* 49: 253-278, 1997.
- Hirasawa N., Ohuchi K., Watanabe M. and Tsurufuji S. "Role of endogenous histamine in postanaphylactic phase of allergic inflammation in rats". *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 241: 967-973, 1987.
- Hitoshi Fujisawa. "Regulation of the activities of multifunctional calcium/calmodulin-dependent protein kinases". *J. Biochem.* 129:193, 2001.
- Hofstra CL., Desai PJ., Thurmond RL. and Fung-Leung WP. "Histamine H4 receptor mediates chemotaxis and calcium mobilization of mast cells". *J. Pharmacol Exp. Ther.*, 305(3): 1212-1221, 2003.
- Hollingsworth E. & Daly J. "Accumulations of IP and AMPc in brain slices : synergic interactions of HA an 2-chloroadenosine". *Eur. J. Pharmacol.* 122: 45-50, 1986.
- Hough, L., Khandelwal J. & Green J. "Ontogeny of subcellular distribution of rat brain metHA". *J. Neurochem.* 38:1593-1599, 1982.
- Hough, L. "Histamine". *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects.* Charper 14, pp. 293; 6th Ed. , edited by G. J. Siegel et al. Philadelphia, 1999.
- Huston JP.; Wagner U.; Hasenöhr R. "The tuberomammillary nucleus projections in the control of learning, memory and reinforcement processes : evidence of inhibitory role". *Behav. Brain. Res.* 83: 97, 1997.
- Huszt Z., Imrik P. and Madarasz E. "[³H]-histamine uptake and release by astrocytes from rat brain: effects of sodium deprivation, high potassium and potassium channel blockers". *Neurochem. Res.* 19: 1249-1256, 1994.
- Huszt Z., Prast H., Tran M.H., Fischer H. and Philippu A. "Glial cells participate in histamine inactivation in vivo". *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 357: 49-53, 1998.
- Ibrahim MZ. "The mast cells of mammalian central nervous system. The effect of proton irradiation in the monkey". *J. Neurol. Sci.* 21(4): 479-499, 1974a.
- Ibrahim MZ., Khreis Y., Koshayan DS. "The histochemical identification of microglia". *J. Neurol. Sci.* 22(2): 211-233, 1974b.
- Ichikawa A., Funakoshi E., Tanaka S., Nemoto K. and Fukui T. "Benzamidine-sensitive proteinase in activated cleavage of recombinant 74kDa histidine decarboxylase into its 53kDa form in mastocytoma cells". *Inflamm. Res.* 47: S46-S47, 1998.

- Itoh, Y.; Nishibori, M.; Oishi R. & Saeki K. "Involvement of the Mu receptors in the opioid-induced increase in the turnover of mouse brain histamine". *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 244: 1021-1026, 1988.
- Joseph, D.; Sullivan, P.; Wang Y.; et al. "Characterization and expression of the complementary DNA encoding rat histidine decarboxylase". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 733-737, 1990.
- Kahlson G. and Rosengren E. "Biogenesis and physiology of histamine" *Monogr. Physiol. Soc.* 21: 1-318, 1971.
- Kamei C, Chung Y.H. and Tasaka K. "Influence of certain H1-blockers on the step-through active avoidance response in rats". *Psychopharmacology* 102: 312-318, 1990.
- Kamei C. and Tasaka K. "Participation of histamine in the step-through active avoidance response and its inhibition by H1-blockers". *Jpn. J. Pharmacol.* 57: 473-482, 1991.
- Kamei C., Okumura Y. and Tasaka K. "Influence of histamine depletion on learning and memory recollection in rats". *Psychopharmacol. Berl.* 111: 376-382, 1993.
- Kataoka, K. and De Robertis E. "Histamine in isolated small nerve endings and synaptic vesicles of rat brain cortex". *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 156: 114-125, 1967.
- Kato Y., Niimi M., Yamamoto Y., Kawamura T., Morimoto-Ishizuka T., Sawada M., Takemori H. and Yamatodani A. "Histamine production by cultured microglial cells of the mouse". *Neurosci. Letters* 305: 181-184, 2001.
- Keeling D.J., Smith I.R. and Tipton K.F. "A coupled assay for histidine decarboxylase: in vivo turnover of this enzyme in mouse brain". *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 326(2): 215, 1984.
- Kelly J.J.; Strader S.J. and Thompson W.J. "Effect of ionomycin on pulmonary microvascular endothelial cell permeability; inhibition of cyclic nucleotide PDE4" (Abstract). *J. Mol. Cell. Cardiol.* 29:A218, 1997.
- Kishikawa H.; Willinger S.M.; Jackowski S.; Barke K. and Hough L.B. "Histidine decarboxylase measurement in brain by $^{14}\text{CO}_2$ trapping". *Biochem. Pharmacol.* 42(2): 217, 1991.
- Kohler C., Swanson L., Haglund L. and Wu JY. "The cytoarchitecture, histochemistry and projections of the tuberomammillary nucleus in the rat". *Neuroscience* 16: 85-110, 1985.

- Kollonitsch J., Patchett A.A., Marburg S., Maycock A.L., Perkins G., Doldouras G.A., Duggan D.E. and Aster S.D. "Selective inhibitors of biosynthesis of aminergic neurotransmitters". *Nature*. 274: 906-908, 1978.
- Kostopoulos G., Psaropoulou C. and Haas H.L. "Membrane properties, response to amines and to tetanic stimulation of hippocampal neurons in the genetically epileptic mutant mouse tottering". *Exp. Brain Res.* 72: 45-50, 1988.
- Krause M., Rouleau A., Stark H., Luger P., Lipp R., Garbarg M., Schwart J.C. and Schunack W. "Synthesis, X-ray crystallography, and pharmacokinetics of novel azomethine prodrugs of (R)- α -methylhistamine: highly potent and selective histamine H3 receptor agonists". *J. Med. Chem.* 38: 4070-4079, 1995.
- Kuhar M.J., Taylor K.M. and Snyder S.H. "The subcellular localization of histamine and histamine methyl-transferase in rat brain". *J. Neurochem.* 18: 1515-1527, 1971.
- Kuhn DM, Vogel RL, Lovenberg W. "Calcium-dependent activation of tryptophan hydroxylase by ATP and magnesium". *Biochem. Biophys Res. Commun.* 30;82(2): 759, 1978.
- Kuhn DM, Vogel RL, Lovenberg W. "Calcium-dependent activation of tryptophan hydroxylase by ATP and magnesium". *Biochem. Biophys Res. Commun.* 30;82(2): 759, 1978.
- Kwiatkowsky H. "Histamine in nervous tissue". *J. Physiol. (London)* 1943, 102, 32-41, 1943.
- Le Coniat M., Traiffort E., Ruat M., Arrang J-M. and Berger R. "Chromosomal location of the human histamine H1- receptor gene". *Hum. Genet.* 94: 186-188, 1994.
- Leurs R., Hoffman M., Wieland K. and Timmerman H. "H3 receptor gene is cloned at last". *Trends Pharmacol. Sci.* 21: 11-12, 2000.
- Leurs R., Smit M. and Timmerman H. "Molecular pharmacological aspects of histamine receptors". *Pharmacol. Ther.* 66: 413-463, 1995a.
- Leurs R., Traiffort E., Arrang J.M., Tardivel Lacombe J., Ruat M. and Schwartz J.C. "Guinea pig histamine H1 receptor. II. Stable expression in chinese hamster ovary cells reveals the interaction with three major signal transduction pathways". *J. Neurochem.* 62: 519-527, 1994.
- Leurs R., Tulp M.T., Menge W.M., Adolfs M.J., Zuiderveld O.P. and Timmerman H. "Evaluation of the receptor selectivity of the H3 receptor antagonists, iodophenpropit and thioperamide: an interaction with the 5-HT3 receptor revealed". *Br. J. Pharmacol.* 116: 2315-2321, 1995b.

Leveque C; Hoshino T; David P; Shoji-Kasai Y; Leys K; Omori A; Lang B; el Far O; Sato K; Martin-Moutot N, et al. "The synaptic vesicle protein synaptotagmin associates with calcium channels and is a putative Lambert-Eaton myasthenic syndrome antigen". *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 15;89(8):3625, 1992.

Ligneau X., Garbarg M., Vizuete M.L., Diaz J., Purand K., Stark H., Schunack W. and Schwartz J.C. "[125I]-iodoproxyfan, a new antagonist to label and visualize cerebral histamine H3 receptors". *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 271: 452-459, 1994.

Liu C., Ma X.J. and Lovenberg T.W. "Alternative splicing of the histamine H3 receptor mRNA at the third cytoplasmic loop is not detectable in humans". *Mol. Brain Res.* 83: 145-150, 2000.

Liu C., Ma X.J., Jiang X., Wilson S.J., Hofstra C.L., Blevitt J., Pyati J., Li X., Chai W., Carruthers N. and Lovenberg T.W. "Cloning and pharmacological characterization of a fourth histamine receptor (H4) expressed in bone marrow". *Mol. Pharmacol.* 59: 420-426, 2001.

Lovenberg T.W., Pyati J., Chang H., Wilson S.J. and Erlander M. "Cloning of rat histamine H3 receptor reveals distinct species pharmacological profiles". *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 293: 771-778, 2000.

Lovenberg T.W., Roland B.L., Wilson S.J., Jiang X., Pyati J., Huvar A. Jackson M.R. and Erlander M.G. "Cloning and functional expression of the human histamine H3 receptor". *Mol. Pharmacol.* 55: 1101-1107, 1999.

Lowry OH., Rosebrough NJ., Farr AL. And Randall RJ. "Protein measurement with the folin phenol reagent". *J. Biol. Chem.* 193:265-275, 1951.

Lutz T.A., DelPret E., Walzer B. and Scharrer E. "The histaminergic, but not the serotonergic, system mediates amylin's anorectic effect". *Peptides* 17: 1317-1322, 1996.

Machidori H., Sakata T., Yoshimatsu H., Ookuma K., Fujimoto K., Kurokawa M., Yamatodani A. and Wada H. "Zucker obese rats: defect in brain histamine control of feeding". *Brain Res.* 590: 180-186, 1992.

Magistretti, P. and Schoderet M. "NorEpinephrine and HA potentiate the increases in AMPc elicited by VIP in mouse cortical slices: mediation by alpha-adrenergic and H1 receptors". *J. Neurosci.* 5: 362, 1985.

Marley P.D. and Thompson K.A. "The Calci/calmodulin protein kinase II inhibitors KN62 and KN93 and their inactive analogs KN04 and KN62, inhibit nicotinic

- activation of tyrosine hydroxylase in bovine chromaffin cells". *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* 221:15, 1996.
- Martin S.A.M. and Bishop J.O. "Purification and characterization of histidine decarboxylase from mouse kidney". *Biochem. J.* 234: 349-354, 1986.
- Martínez-Mir M.I., Pollard H., Moreau J., Arrang J.M., Ruat M., Traiffort E. Schwartz J.C. and Palacios J.M. "Three histamine receptors (H1, H2 and H3) visualized in the brain of human and non-human primates". *Brain Res.* 526: 322-327, 1990.
- Martres M.P., Baudry M. and Schwartz J.C. "Histamine synthesis in the developing rat brain: evidence for a multiple compartmentation". *Brain Res.* 83: 261-275, 1975.
- McCormick D.A. and Williamson A. "Modulation of neuronal firing mode in cat and guinea pig LGNd by histamine: possible cellular mechanisms of histaminergic control of arousal". *J. Neurosci.* 11: 3188-3199, 1991.
- McCullough L.A. and Westfall T.C. "Mechanism of catecholamine synthesis inhibition by neuropeptide Y: role of calcium channels and protein kinases". *J. Neurochem.* 67: 1090, 1996.
- Meder W., Fink K. and Göthert M. "Involvement of different calcium channels in potassium- and veratridine-induced increases of cytosolic calcium concentration in rat cerebral cortical synaptosomes". *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 356:797, 1997.
- Meguro K., Yanai K., Sakai N., Sakurai E., Maeyama K., Sasaki and Watanabe T. "Effects of thioperamide, a histamine H3 antagonist, on the step-through passive avoidance response and histidine decarboxylase activity in senescence-accelerated mice". *Pharmacol. Biochem. Behav.* 50: 321-325, 1995.
- Merali Z. and Banks K. "Does the histaminergic system mediate bombesin/GRP-induced suppression of food intake?". *Am. J. Physiol.* 36: R1589-R1595, 1994.
- Merickel A. and Edwards R. H. "Transport of Histamine by Vesicular monoamine transporter-2". *Neuropharmacology.* 34(11): 1543., 1995.
- Miyazaki S., Imaizumi M. and Onodera K. "Effects of thioperamide, a histamine H3-receptor antagonist, on a scopolamine-induced learning deficit using an elevated plus-maze test in mice". *Life Sci.* 57: 2137-2144, 1995.
- Miyazaki S., Onodera K., Imaizumi M. and Timmerman H. "Effects of clobenpropit (VUF-9153), a histamine H3-receptor antagonist, on learning and memory, and on cholinergic and monoaminergic systems in mice". *Life Sci.* 61: 355-361, 1997.

- Mochizuki T., Okakura-Mochizuki K., Horii A., Yamamoto Y. and Yamatodani A. "Histaminergic modulation of Hippocampal Acetylcholine Release In Vivo". *J. Neurochem.* 62: 2275-2282, 1994.
- Mochizuki T., Yamatodani A., Okakura K., Horii A., Inagaki N. and Wada H. "Circadian rhythm of histamine release from the hypothalamus of freely moving rats". *Physiol. Behav.* 51: 391-394, 1992.
- Molina-Hernández A., Nuñez A. and Arias-Montaño J.A. "Histamine H3-receptor activation inhibits dopamine synthesis in rat striatum". *Neuroreport* 17: 163-166, 2000.
- Molina-Hernández A., Nuñez A., Sierra J.J. and Arias-Montaño J.A. "Histamine H3 receptor activation inhibits glutamate release from rat striatal synaptosomes". *Neuropharmacology* 41: 928-934, 2001.
- Monti J.M. "Involvement of histamine in the control of the waking state". *Life Sci.* 53: 1331-1338, 1993.
- Morisset S., Rouleau A., Ligneau X., Gbahou F., Tardivel-Lacombe J., Stark H., Schunack W., Ganellin C.R., Schwartz J.C. and Arrang J.M. "High constitutive activity of native H3 receptors regulates histamine neurons in brain". *Nature* 408: 860-864, 2000.
- Morisset S., Sasse A., Gbahou F., Heron A., Ligneau X., Tardivel-Lacombe J., Schwartz J.C. and Arrang J.M. "The Rat H3 Receptor: Gene organization and Multiple Isoforms". *Biochem. Biophys. Res. Com.* 280: 75-80, 2001.
- Morse K.L., Behan J., Laz T.M., West R.E., Scott JR., Greenfeder S., Anthes J.C., Umland S., Wan Y., Hipkin R.W., Gonsiorek W., Shin N., Gustafson E.L. Qiao X., Munakata M., and Akaike N. "Regulation of K⁺ conductance by histamine H1 and H2 receptors in neurons dissociated from rat neostriatum". *J. Physiol. Lond.* 480: 233-245, 1994.
- Morse K.L., Behan J., Laz TM, West RE., Greenfeder SA., Anthes JC., Umland S., Wan Y., Hipkin RW., Gonsiorek W., Shin N., Gustafson EL., Qiao X., Wang S., Hedrick JA., Greene J., Bayne M., Monsma FJ. "Cloning and characterization of a novel human histamine receptor". *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 296(3): 1058-1066, 2001.
- Murakami K., Yokoyama H., Onodera K., Iinuma K. and Watanabe T. "AQ-0145, a newly developed histamine H3 antagonist, decreased seizure susceptibility of electrically induced convulsions in mice". *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.* 17: 70-73, 1995.

- Nakamura T., Itadani H., Hidaka Y., Ohta M. and Tanaka K. "Molecular Cloning and Characterization of a New Human Histamine Receptor, HH4R". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 279: 615-620, 2001.
- Neame K.D. "Uptake of histidine, histamine and other imidazole derivatives by brain slices". *J. Neurochem.* 11: 655-662, 1964.
- Nguyen T., Shapiro D.A., George S.R., Setola V., Lee D.K., Cheng R., Rauser L., Lee S.P., Lynch K.R., Rothe B.L. and O'dowd B.R. "Discovery of a Novel member of the Histamine Receptor Family". *Mol. Pharmacol.* 59: 427-433, 2001.
- Nieler HB, Onofri F, Valtorta F, Schiavo G, Montecucco C, Greengard P, Benfenati F. "Phosphorylation of VAMP/synaptobrevin in synaptic vesicles by endogenous protein kinases". *J. Neurochem.* 65(4): 1712-20, 1995.
- Oades R.D. "Attention deficit disorder with hyperactivity (ADDH): the contribution of catecholaminergic activity". *Prog. Neurobiol.* 29: 365-391, 1987.
- Ohiyama A, Hosaka K, Komiya Y, Akagawa K et al. "Regulation of exocytosis through Calcium/calmodulin-activated protein kinase II to syntaxin 1A". *J. Neurosci.* 1; 22(9) : 3342-51, 2002.
- Oishi R., Nishibori M. and Saeki K. "Regional distribution of histamine and tele-methylhistamine in rat, mouse and guinea-pig brain". *Brain. Res.* 490 : 325-339, 1989.
- Okakura-Mochizuki K., Mochizuki T., Yamamoto Y., Horii A. and Yamatodani A. "Endogenous GABA modulates histamine release from the anterior hypothalamus of the rat". *J. Neurochem.* 67: 171-176, 1996.
- Olmo MT., Urdiales JL., Pegg AE., Medina MA. and Sanchez-Jimenez F. "In vitro study of proteolytic degradation of rat histidine decarboxylase". *Eur. J. Biochem.* 267(5):1527-31, 2000.
- Onodera K., Miyazaki S., Imaizumi M., Stark H. and Schunack W. "Improvement by FUB181, a novel histamine H3 receptor antagonist, of learning and memory in the elevated plus-maze test in mice". *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 357: 508-513, 1998.
- Onodera K., Yamatodani A., Watanabe, T. and Wada H. "Neuropharmacology of the histaminergic neuron system in the brain and its relationship with behavioural disorders". *Prog. Neurobiol.* 42: 685-702, 1994.
- Orsetti M., Ghi P. and Di Carlo G. "Histamine H3-receptor antagonism improves memory retention and reverses the cognitive deficit induced by scopolamine in a two-trial place recognition task". *Behav. Brain Res.* 124: 235-242, 2001.

- Ortiz J., Gómez J., Torrent A., Aldavert M. and Blanco I. "Quantitative radioisotopic determination of Histidine Decarboxylase using High-Performance Liquid Chromatography". *Anal. Biochem.* 280: 111-117, 2000.
- Palacios J.M., Wamsley J.K. and Kuhar M.J. "The distribution of histamine H1 receptor in the rat brain: an autoradiographic study". *Neuroscience* 6 : 15-37, 1981.
- Palacios J.M., Mengod B., Picatoste F., Grau M. and Blanco I. "Properties of rat brain histidine decarboxylase". *J. Neurochem.* 27: 1455-1460, 1976.
- Palacios J.M., Mengod G., Grau M., Picatoste F. and Blanco I. "Pyridoxal-5'-phosphate as a cofactor for rat brain histidine decarboxylase". *J. Neurochem.* 30: 213-216, 1978.
- Panula P., Airaksinen M.S., Pirvola U. and Kotilainen E. "A histamine-containing neuronal system in human brain". *Neuroscience* 34: 127-132, 1990.
- Panula P., Pirvola U., Auvinen S. and Airaksinen M.S. "Histamine-immunoreactives nerve fibers in the rat brain". *Neuroscience* 28: 585-610, 1989.
- Panula P., Rinne J., Kuokkanen K., Eriksson K.S., Sallmen T., Kalimo H., Relja M. "Neuronal histamine deficit in Alzheimer's disease". *Neuroscience* 82: 993-997, 1998.
- Panula P., Yang H.Y.T. and Costa E. "Histamine-containing neurons in the rat hypothalamus". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 2572-2576, 1984.
- Parmentier R, Ohtsu H, Djebbara-Hannas Z, Valatx JL, Watanabe T and Lin JS. "Anatomical, physiological, and pharmacological characteristics of histidine decarboxylase knock-out mice:evidence of the role of brain histamine in behavioral and sleep-wake control". *J. Neurosci.* 22(17):7695, 2002.
- Parsons M.E., Owen D.A., Ganellin C.R. and Durant G.J. "Dimaprit -[S[3(N,N-dimethylamino)propyl]isothiourea]- a highly specific histamine H2 receptor agonist". *Agent Actions* 7: 31-37, 1977.
- Passani M; Bacciotti L; Mannaioni F and Blandina P. "Central histaminergic system and cognition". *Neurosci. Biobehav. Rev.* 24:107, 2000.
- Payne G.W. and Neuman R.S. "Effects of hypomagnesia on histamine H1 receptor-mediated facilitation of NMDA responses". *Br. J. Pharmacol.* 121: 199-204, 1997.
- Perdazani P. and Storm J.F. "PKA mediates the effects of monoamine transmitters on the K⁺ current underlying the slow spike frequency adaptation in hippocampal neurons". *Neuron* 11: 1023-1035, 1993.
- Perdazani P. and Storm J.F. "Protein kinase A-independent modulation of ion channels in the brain by cyclic AMP". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 11716-11720, 1995.

- Philippu, A.; Hanesch, U.; Hagen R. and Robinson, L. "Release of endogenous HA in the HT of the anaesthetized cats and conscious, freely moving rabbits". *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 321:282,1982.
- Picatoste F., Blanco I. and Palacios J.M. "The presence of two cellular pools of rat brain histamine". *J. Neurochem.* 29: 735-737, 1977.
- Pillot C., Heron A., Cochois V., Tardivel-Lacombe J. and Ligneau X. "A detailed mapping of the histamine H3 receptor and its gene transcripts in rat brain". *Neuroscience* 114: 173, 2002.
- Pollard H., Bischoff S. and Schwartz J.C. "Turnover of histamine in rat brain and its decrease under barbiturate anaesthesia". *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 190: 88-99, 1974.
- Pollard H., Moreau J. Arrang J.M. and Schwartz J.C. "A detailed autoradiographic mapping of histamine H3-receptors in rat brain areas". *Neuroscience* 52: 169-189, 1993.
- Prast H., Lamberti C., Fischer H., Tran M.H. and Philippu A. "Nitric oxide influences the release of histamine and glutamate in the rat hypothalamus". *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 354: 731-735, 1996.
- Prast H., Tran M.H., Fischer H., Kraus M., Lamberti C., Grass K. and Philippu A. "Histaminergic neurons modulate acetylcholine release in the ventral striatum: role of H3 histamine receptors". *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharm.* 360: 558-564, 1999.
- Prell G.D., Douyon E., Sawyer W.F. and Morrishow A.M. "Disposition of Histamine, Its Metabolites, and pro-Methylimidazolacetic Acid in Brain Regions of Rats Chronically Infused with α -Fluoromethylhistidine". *J. Neurochem.* 66: 2153-2159, 1996.
- Quach, T.; Duchemin A.; Rose C. & Schwartz J. " ^3H -glycogen hydrolysis elicited by HA in mouse brain slices : selective involvement of H1 receptors". *Mol. Pharmacol.* 17: 301, 1980.
- Reilly M.A. and Schayer R.W. "Further studies on histamine catabolism in vivo". *Br. J. Pharmacol.* 43: 349-358, 1971.
- Reilly M.A. and Schayer R.W. "Further studies on histidine-histamine relationship in vivo: effects on endotoxin and histidine decarboxylase inhibitors" *Br. J. Pharmacol.* 34:551, 1968.
- Reiner P.B. and Kamondi A. "Mechanisms of antihistamine-induced sedation in the human brain: H1 receptor activation reduces a background leakage potassium current". *Neuroscience* 59: 579-588, 1994.

- Reiner P.B. and McGeer E.G. "Electrophysiological properties of cortically projecting histamine neurons of the rat hypothalamus". *Neurosci. Lett.* 73: 43-47, 1987.
- Richelson E. "Histamine H1 receptor-mediated guanosine 3',5'-monophosphate formation by cultured mouse neuroblastoma cells". *Science* 201: 69-71, 1978.
- Rittenhouse A.R.; Zigmond R.E. "Role of N- and L-type calcium channels in depolarization-induced activation of tyrosine hydroxylase and release of norepinephrine by sympathetic cell bodies and nerve terminals". *J. Neurobiol.* 40(2): 137, 1999.
- Rouleau A., Garbarg M., Ligneau X., Manton C., Lavie P., Advenier C., Lecomte J.M., Krause M., Stark H., Schunack W. and Schwartz J.C. "Bioavailability, antinociceptive and antiinflammatory properties of BP2-94, a histamine H3 receptor agonist prodrug". *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 281: 1085-1094, 1997.
- Rouleau A., Ligneau X.; Tardivel-Lacombe J.; Morisset S.; Gbahou F.; Schwartz J.C. and Arrang J.M. "Histamine H3-receptor-mediated [³⁵S]GTP gamma[S]binding: evidence of constitutive activity of recombinant and native rat and human H3 receptors". *Br. J. Pharmacol.* 135(2): 383, 2002.
- Ruat M., Traiffort E., Arrang J.M., Leurs R. and Schwartz J.C. "Cloning and tissue expression of a rat histamine H2-receptor gene". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 179: 1470-1478, 1991.
- Ruat M.; Traiffort E., Bouthenet M. et al. "Reversible and irreversible labelling and autoradiographic localization of the cerebral H2-receptor using [¹²⁵I]iodinated probes". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 1658, 1990.
- Sah P. and Isaacson J.S. "Channels underlying the slow afterhyperpolarization in hippocampal pyramidal neurons: neurotransmitters modulate the open probability". *Neuron* 15: 435-441, 1995.
- Sakai K., El Mansari M., Lin J.S., Zhang J.G. and Vanni Mercier G. "The posterior hypothalamus in the regulation of wakefulness and paradoxical sleep". In: M. Mancica, G. Marini (Eds.), *The Diencephalon and Sleep*. Raven Press, New York, pp. 435-441, 1990.
- Sakai N., Sakurai E., Yanai K., Mirua Y. and Watanabe T. "Depletion of brain histamine induced by alpha-fluoromethylhistidine enhances radial maze performance in rats with modulation of brain amino acid levels". *Life Sci.* 62: 989-994, 1998.
- Sakata T., Kang M., Kurokawa M. and Yoshimatsu H. "Hypothalamic neuronal histamine modulates adaptive behavior and thermogenesis in response to endogenous pyrogen". *Obes. Res.* 3: S541-S548, 1995.

- Savany A. and Cronenberger L. "Isolation and properties of multiple forms of histidine decarboxylase from rat gastric mucosa". *Biochem. J.* 205: 405-412, 1982.
- Schayer R.W. "Histidine decarboxylase of rat stomach and other mammalian tissues". *Am. J. Physiol.* 189: 533-536, 1957.
- Schayer R.W. "The metabolism of histamine in various species". *Br. J. Pharmacol. Chemother.* 11: 472-473, 1956.
- Schayer, R. "HDC in mast cells". *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 103 : 164, 1963.
- Schlicker E., Betz R. and Gother M. "Histamine H3 receptor-mediated inhibition of serotonin release in the rat brain cortex". *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 337: 588-590, 1988.
- Schlicker E., Fink K., Detzner M. and Gothert M. "Histamine inhibits dopamine release in the mouse striatum via presynaptic H3 receptors". *J. Neural. Transm. Gen. Sect.* 93: 1-10, 1993.
- Schlicker E., Fink K., Hinterthaler M. and Gothert M. "Inhibition of noradrenaline release in the rat brain cortex via presynaptic H3-receptors". *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 340: 633-638, 1989.
- Schlicker E., Kathmann M., Detzner M., Exner H.J. and Gothert M. "H3 receptor-mediated inhibition of noradrenaline release: an investigation into the involvement of calcium and K⁺ ions, G protein and adenylate cyclase". *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 350: 34-41, 1994.
- Schonrock B., Busselber D. and Haas H.L. "Properties of tuberomammillary histamine neurones and their response to galanin". *Agents Actions* 33: 135-137, 1991.
- Schwartz J., Arrang J., Garbarg M. et al. "Histamine" In : *The Fourth Generation of Progress*, edited by Bloom F. & Kupfer D., Raven press, Ltd. NY p.397-404, 1995.
- Schwartz J.C., Arrang J.M., Garbarg M., Pollard H. and Ruat M. "Histaminergic transmission in the mammalian brain". *Physiol. Review* 71: 1-51, 1991.
- Schwartz J.C., Lampart C. and Rose C. "Histamine formation in rat brain in vivo: effects of histidine loads". *J. Neurochem.* 19: 801-810, 1972.
- Schwartz J.C., Lampart C. and Rose C. "Properties and regional distribution of histidine decarboxylase in rat brain". *J. Neurochem.* 17: 1527-1534, 1970.
- Sculptoreanu A., Figorourov A. and De Groat WC. "Voltage-dependent potentiation of neuronal L-type calcium channels due to state-dependent phosphorylation". *Am. J. Physiol.* 269 (3pt1): C725, 1995.

- Selbach O., Brown R.E. Haas H.L. "Long-term increase of hippocampal excitability by histamine and cyclic AMP". *Neuropharmacol.* 36: 1539-1548, 1997.
- Sharma R.K; Mooibroek S.M. and Wang JM. in molecular aspects of cellular regulation Vol.5: Calmodulin (Cohen, P. and Klee C.B.Eds), Elsevier, pp. 265-266, 1988.
- Sheng M., Thompson M.A. and Greenberg M.E. "CREB: a Calcium-regulated transcription factor phosphorylated by calmodulin-dependent kinases". *Science* 252: 1427-1430, 1991.
- Sherin J.E., Elmquist, J.D., Torrealba R. and Saper C.B. "Innervation of histaminergic tuberomammillary neurons by GABAergic and galaninergic neurons in the ventrolateral preoptic nucleus of the rat". *J. Neurosci.* 18: 4705-4721, 1998.
- Sherin J.E., Shiromani P.J., McCarley R.W. and Saper C.B. "Activation of ventrolateral preoptic neurons during sleep". *Science* 271: 216-219, 1996.
- Silver RB., Poonwasi KS., Seyedi N., Wilson SJ., Lovenberg TW. and Levi R. "Decreased intracellular calcium mediates the histamine H₃-receptor-induced attenuation of norepinephrine exocytosis from cardiac sympathetic nerve endings". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99(1): 501, 2002.
- Skratt JJ, Hough LB, Nalwalk JW, Barke KE. "alpha-Fluoromethylhistidine-induced inhibition of brain histidine decarboxylase. Implications for the CO²-trapping enzymatic method". *Biochem Pharmacol.* 47(2):397-402, 1994.
- Smit M.J., Leurs R., Alewijse A.E., Blauw J., Van Nieuw Amerongen G.P., Van De Vrede Y., Roovers E. and Timmerman H. "Inverse agonism of histamine H₂ antagonists accounts for upregulation of spontaneously active histamine H₂ receptors". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93: 6802-6807, 1996.
- Smith SJ., Augustine GJ. "Calcium ions, active zones and synaptic transmitter release". *Trends Neurosci.* 11: 458-464, 1988.
- Smith BN. and Armstrong WE. "The ionic dependence of the histamine-induced depolarization of vasopressin neurons in the rat supraoptic nucleus". *J. Physiol. Lond.* 495: 465-478, 1996.
- Snyder R.M., McKinney M., Forray C. and Richelson E. "Neurotransmitter receptors mediate cyclic GMP formation by involvement of arachidonic acid and lipoxygenase". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 3905-3909, 1984.
- Snyder S.H. and Taylor K.M. "Isotopic microassay of histamine, histidine, histidine decarboxylase and histamine-methyltransferase in brain tissue" *J. Neurochem.* 19: 1343-1358, 1972.

- Snyder SH, Brown B, Kuhar MJ. "The subsynaptosomal localization of histamine, histidine decarboxylase and histamine methyltransferase in rat hypothalamus". *J. Neurochem.* 23(1):37-45, 1974.
- Somogyi GT., Tanowitz M., Zernova G. and de Groat WC. "M1 muscarinic receptor-induced facilitation of acetylcholine and noradrenaline release in the rat bladder is mediated by protein kinase C". *J. Physiol.* 496:245, 1996.
- Stefani G., Onofri F., Valtorta F, Vaccaro P., Greengard P. and Benfenati F. "Kinetic analysis of phosphorylation-dependent interactions of synapsin I with rat brain synaptic vesicles". *J. Physiol.* 504 (Pt 3): 501-15, 1997.
- Stenfors C. and Ross SB. "Evidence for involvement of protein kinases in the regulation of serotonin synthesis and turnover in the mouse brain in vivo". *J. Neural Transm.* 109(11): 1353, 2002.
- Stevens D.R., Eriksson K.S., Brown R.E. and Haas H.L. "The mechanism of spontaneous firing in histamine neurons". *Behav. Brain Res.* 124: 105-112, 2001.
- Stevens DR., Kuramasu A. and Haas HL. "GABAB-receptor-mediated control of GABAergic inhibition in rat histaminergic neurons in vitro". *Eur. J. Neurosci.* 11: 1148-1154, 1999.
- Storm JF., Winther T. and Perdazani P. "h-current modulation by norepinephrine, serotonin, dopamine, histamine and cyclic-AMP analogues in rat hippocampal neurons". *Soc. Neurosci. Abs.* 572.9, 1996.
- Südhoff TC. "Intracellular Trafficking". *Basic Neurochemistry: molecular, cellular and Medical aspects.* chapter 22, pp. 444; 6th Ed. , edited by G. J. Siegel et al. Philadelphia, 1999.
- Tachikawa E, Tank AW, Yanagihara N, Mosimann W, Weiner N." "Phosphorylation of tyrosine hydroxylase on at least three sites in rat pheochromocytoma PC12 cells treated with 56 mM K⁺: determination of the sites on tyrosine hydroxylase phosphorylated by cyclic AMP-dependent and calcium/calmodulin-dependent protein kinases". *Mol. Pharmacol.* 30(5):476-485, 1986.
- Takahashi K, Suwa H, Ishikawa T, Kotani H. "Targeted disruption of H3 receptors results in changes in brain histamine tone leading to an obese phenotype". *J. Clin. Invest.* 110(12): 1791, 2002.
- Takeshita Y., Watanabe T., Sakata T., Munakata M., Ishibashi H. and Akaike N. "Histamine modulates high-voltage-activated calcium channels in neurons dissociated from the rat tuberomammillary nucleus". *Neuroscience* 87: 797-805, 1998.

- Tanaka S., Fukui T., Yamamoto J., Shima Y., Kume T., Ohgo M. "Processing and activation of recombinant mouse mastocytoma histidine decarboxylase in the particulate fraction of Sf9 cells by porcine pancreatic elastase". *Biochem. Biophys. Acta* 1253: 9-12, 1995.
- Tardivel-Lacombe J., Morisset S., Gbahou R., Schwartz J.C. and Arrang J.M. "Chromosomal mapping and organization of the human histamine H3 receptor gene". *Neuroreport* 12: 321-324, 2001.
- Tardivel-Lacombe J., Rouleau A., Heron A., Morisset S., Pillor C., Cochois V., Schwartz J.C. and Arrang J.M. "Cloning and functional expression of the guinea pig histamine H3 receptor". *Neuroreport* 11: 755-759, 2000.
- Tasaka K., Kamei C., Akahori H. and Kitazumi K. "The effects of histamine and some related compounds on conditioned avoidance response in rats". *Life Sci.* 37: 2005-2014, 1985.
- Taylor K.M. and Snyder S.H. "Dynamics of the regulation of histamine levels in mouse brain". *J. Neurochem.* 19: 341-354, 1972.
- Thithapandha A. and Cohn V. "Brain HMT purification, mechanism of action, and inhibition by drugs". *Biochem. Pharmacol.* 27: 263, 1978.
- TIPS .Receptor and ion channel nomenclature supplement, 2000. 7th edition.
- Toledo A. Doctoral thesis entitled "Identificación y propiedades de la Histidina Descarboxilasa cerebral ligada a membranas". 1988.
- Toledo A., Sabria J., Rodriguez R., Brandner J., Rodriguez J., Palacios J.M. and Blanco I. "Properties and ontogenic development of membrane-bound histidine decarboxylase from rat brain". *J. Neurochem.* 51: 1400-1406, 1988.
- Tokumitsu H., Chijiwa T., Hagiwara M., Mizutani A., Tarasawa M. And Hidaka H. "KN-62, a specific inhibitor of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II". *J. Biol. Chem.* 265(8): 4315-4320, 1990.
- Traiffort E., Pollard H., Moreau J., Ruat M., Schwartz J.C., Martinez-Mir M.I. and Palacios J.M. "Pharmacological characterization and autoradiographic localization of histamine H2 receptors in human brain identified with [¹²⁵I]-Iodopotentidine". *J. Neurochem.* 59: 290-299, 1992.
- Traiffort E., Vizquete M.L., Tardivel L.J., Souil E., Schwartz J.C. and Ruat M. "The guinea pig histamine H2 receptor gene cloning, tissue expression and chromosomal localization of its human counterpart". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 211: 570-577, 1995.

- Tran VT. and Snyder SH. "Histidine decarboxylase. Purification from fetal rat liver, immunologic properties and histochemical localization in brain and stomach". *J. Biol. Chem.* 256: 680-686, 1981.
- Tsutsui M., Yanagihara N., Fukunaga K., Minami K., Nakashima Y., Kuroiwa A., Miyamoto E. and Izumi F. "Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II inhibitor KN-62 inhibits adrenal medullary chromaffin cell functions independent of its action on the kinase". *J. Neurochem.* 66:2517, 1996.
- Urdiales JL., Viguera E., Esteban A. And Sánchez-Jiménez F. "Aplicaciones bioquímicas y inmunológicas de una proteína de fusión glutatión transferasa-histidina descarboxilasa de rata. N". De solicitud: P9800019. País de prioridad : España. Fecha de prioridad: 8/01/98. Entidad titular : Universidad de Málaga.
- Uteshev VV., Stevens D.R. and Haas H.L. "Alpha-bungarotoxin-sensitive nicotinic responses in rat tuberomammillary neurons.". *Pflugers Arch.* 432: 607-613, 1996.
- Uvnas, B. "The molecular basis for the storage and release of HA in rat mast cell granules". *Life Sci.* 14: 2355, 1971.
- Vallee BL. And Ulmer DD. "Biochemical effects of mercury, cadmium, and lead". *Annu. Rev. Biochem. Review.* 41(10):91-128, 1972.
- Van Der Goot H. "Structural requirements for histamine H2 agonists and H2 antagonists. In: *Handbook of Experimental Pharmacology*". Ed. B. Uvnas, pp.573. Springer-Verlag, Berlin, 1991.
- Van Der Werf JF., Bijloo GJ., Van Der Vliet A., Bast A. and Timmerman H. "H3 receptor assay in electrically-stimulated superfused slices of rat brain cortex; effects of N-alkylated histamines and impromidine analogues". *Agents Actions* 20: 239-243, 1987.
- Vanni-Mercier B., Sakai K. and Jouvet M. "Specific neurons for wakefulness in the posterior hypothalamus in the cat". *C.R. Acad. Sci.* 298: 195-200, 1984.
- Verburg K. and Henry D. "HMT enzymology and functional aspects". In: *Neuromethods, Neurotransmitter Enzymes*, edited by A.Bolton. NJ: Humana, p. 147, 1986.
- Verdiere M., Rose C. and Schwartz J.C. "Synthesis and release of histamine studied on slices from rat hypothalamus". *Eur. J. Pharmacol.* 34: 157-168, 1975.
- Vizuite ML., Traiffort E., Bouthenet ML., Ruat M., Souil E. Tardivel-Lacombe J. and Schwartz JC. "Detailed mapping of the histamine H2 receptor and its gene transcripts in guinea-pig brain". *Neuroscience* 80: 321-343, 1997.

- Vollinga RC., de Koning JP., Jansen FP., Leurs R., Menge WM. and Timmerman H. “A new potent and selective histamine H3 receptor agonist, 4-(1H-imidazol-4-ylmethyl)piperidine”. *J. Med. Chem.* 37: 332-333, 1994.
- Wada H., Inagaki N., Yamatodani A. and Watanabe T. “Is the histaminergic neuron system a regulatory center for whole-brain activity?”. *Trends Neurosci.* 14: 415-418, 1991.
- Wang S., Hedrick JA., Greene J., Bayne M. and Monsma FJ. “Cloning and Characterization of a Novel Human Histamine Receptor”. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 296: 1058-1066, 2001.
- Washington B., Shaw JB., Li J., Fisher B. and Gwathney J. “In vivo histamine release from brain cortex: the effects of modulating cellular and extracellular sodium and calcium channels”. *Eur. J. Pharmacol.* 407(1-2) : 117, 2000.
- Watanabe A., Fukui T., Ohmori E. and Ichikawa A. “Purification of HDC from the rat liver of fetal rats and its immunochemical and immunohistochemical characterization”. *J. Biol. Chem.* 259:52214, 1984.
- Watanabe T., Nakamura H., Liang L., Yamatodani A. and Wada H. “Partial purification and characterization of L-histidine decarboxylase from fetal rats”. *Biochem. Pharmacol.* 28: 1149, 1979.
- Watanabe T., Taguchi Y. and Shiosaka S. “Distribution of the histaminergic neuron system in the central nervous system of rats: a fluorescent immunohistochemical analysis with histidine decarboxylase as a marker”. *Brain Res.* 295: 13-25, 1984.
- Watanabe T., Yamada M., Taguchi Y., Kubota H., Maeyama K., Yamatodani A., Fukui H., Shiosaka S., Tohyama M. and Wada H. In: “Methods in Biogenic Amine Research”. Edited by S. Parvez, T. Nagatsu, I. Nagatsu and H. Parvez. Amsterdam: Elsevier p. 689-720, 1983.
- Wayman GA., Impey S., Storm DR. “Calcium inhibition of type III adenylyl cyclase in vivo”. *J Biol. Chem.* 270(37):21480-6, 1995.
- White T. “Formation and catabolism of HA in brain tissue in vitro”. *J. Physiol. Lond.* 149: 34, 1959.
- Whittaker V.P. In “Handbook of Neurochemistry” (Lajtha A. Ed.) Vol. 2, p. 327-364. Plenum, 1969.
- Wieland K., Bongers G., Yamamoto Y., Hashimoto T., Yamatodani A., Menge WM., Timmerman H., Lovenberg TW. and Leurs R. “Constitutive activity of histamine H3

- receptors stably expressed in SK-N-MC cells: display of agonism and inverse agonism by H3 antagonists". *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 299(3): 908-914, 2001.
- Wolfe JT, Wang H., Pérez Reyes E. and Barrett PQ. "Stimulation of recombinant Ca(v)3.2, T-type, Calcium channel currents by CaMKIIgamma(C)". *J. Physiol.* 538(2): 343-355, 2002.
- Wouterlood FG., Gaykema RPA., Stein-Busch HWM., Watanabe T. and Wada H. "The connections between the septum-diagonal band complex and histaminergic neurons in the posterior hypothalamus of the rat. Anterograde tracing with Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin combined with immunocytochemistry of histidine decarboxylase". *Neuroscience* 26: 827-845, 1988.
- Wouterlood FG., Steinbusch HW., Luiten PG. and Bol JG. "Projection from the prefrontal cortex to histaminergic cell groups in the posterior hypothalamic region of the rat. Anterograde tracing with Phaseolus vulgaris leucoagglutinin combined with immunocytochemistry of histidine decarboxylase". *Brain Res.* 406: 330-336, 1987.
- Yamakami J., Sakurai E., Duramasu A., Sakurai E., Yanai K. Watanabe T. and Tanaka Y. "L-Histidine decarboxylase protein and activity in rat brain microvascular endothelial cells". *Inflamm. Res.* 49: 231-235, 2000.
- Yamamoto T., Ohi J., Daddona P.E. and Nogy JI. "Ultrastructural immunolocalization of adenosine deaminase in histaminergic neurons of the tuberomammillary nucleus of rat". *Brain Res.* 527: 335-341, 1990.
- Yamamoto Y., Mochizuki T., Okakura-Mochizuki K., Uno A. and Yamatodani A. "Thioperamide, a histamine H3 receptor antagonist, increases GABA release from the rat hypothalamus". *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.* 19: 289-298, 1997.
- Yamashita M., Fukui H., Sugama K., Horio Y., Ito S., Mizoguchi H. and Wada H. "Expresión cloning of a cDNA encoding the bovine histamine H1 receptor". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 11515-11519, 1991.
- Yamatodani A., Fukuda H and Wada H. "High-Performance Liquide Chromatographic determination of plasma and brain histamine without previous purification of biological samples: cation-exchange chromatography coupled with post-column derivatization fluorometry". *J. Chrom.* 344: 115-123, 1985.
- Yamauchi T., Nakata H. and Fujisawa H. "A new activator protein that activates tryptophan 5-monooxygenase and tyrosine 3-monooxygenase in the presence of calcium, calmodulin-dependent protein kinase. Purification and characterization". *J. Biol. Chem.* 256(11): 5404-5409, 1981.

- Yang QZ. and Hatton GI. "Electrophysiology of excitatory and inhibitory afferents to rat histaminergic tuberomammillary nucleus neurons from hypothalamic and forebrain sites". *Brain Res.* 773: 162-172, 1997.
- Yatsunami K., Tsuchikawa M., Kamada M., Hori K. and Higuchi T. "Comparative studies of human recombinant 74- and 54-kDa L-histidine decarboxylase". *J.Biol.Chem.* 270 (51): 30813, 1995.
- Yokoyama H., Onodera K., Inuma K. and Watanabe T. "Effect of thioperamide, a histamine H3 receptor antagonist, on electrically induced convulsions in mice". *Eur. J. Pharmacol.* 234: 129-133, 1993.
- Yokoyama H., Onodera K., Maeyama K., Sakurai E., Inuma K., Leurs R., Timmerman H. and Watanabe T. "Clobenpropit (VUF-9153), a new histamine H3 receptor antagonist, inhibits electrically induced convulsions in mice". *Eur. J. Pharmacol.* 260: 23-28, 1994.
- Young RC., Mitchell RC., Brown TH., Ganellin CR., Griffiths R., Jones M., Rana KK., Saunders D., Smith IR. and Sore NE. "Development of a new physiochemical model for brain penetration and its application to the design of centrally acting H2 receptor histamine antagonists". *J. Med. Chem.* 31: 656-671, 1988.
- Zhang et al. "Histamine H1-receptor antagonists". In: *Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery. Fifth Edition.* Ed. M.E. Wolff, pp. 495. John Wiley & Sons, Inc., 1997.
- Zhu Y., Michalovich D., Wu HL., Tan KB., Dtko GM., Mannan IJ., Boyce R., Alston M., Tierney LA., Li X., Herrity NC., Vawter L., Sarau HM., Ames RS., Davenport CM., Hieble JP., Wilson S., Bergsma DJ. and Fitzgerald LR. "Cloning, expression, and pharmacological characterization of a novel human histamine receptor". *Mol. Pharmacol.* 59: 434-441, 2001.
- Zingel V., Leschke C. and Schunack W. "Developments in histamine H1-receptor agonists". In: *Progress in Drug Research.* Ed. E. Jucker, pp.49. Birkhauser Verlag, Basel (Switzerland), 1995.