

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia

Ana Maria Bernal Correa

Receptores mGlu-I no MNTB modulam canais HCN e regulam a liberação de vesículas sinápticas.



Belo Horizonte
2021

Ana Maria Bernal Correa

Receptores mGlu-I no MNTB modulam canais HCN e regulam a liberação de vesículas sinápticas.

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Fisiologia.

Orientador: Prof. Dr. Christopher Kushmerick

Coorientador: Prof. Dr. Henrique von Gersdorff

Belo Horizonte

2021



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

FOLHA DE APROVAÇÃO DA DEFESA DA TESE N° 340 DE ANA MARIA BERNAL CORREA

"Receptores mGlu-I no MNTB Modulam Canais HCN e Regulam a Liberação de Vesículas Sinápticas"

ANA MARIA BERNAL CORREA

Tese de Doutorado defendida e aprovada, no dia **04 de junho de 2021**, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:

Prof. Dr. Ricardo Mauricio Xavier Leão, FMRP/Universidade de São Paulo
Profa. Dra. Emelie Katarina Svahn Leão, ICE/Universidade Federal do Rio Grande do Norte
Prof. Dr. Philippe Ribeiro Furtado de Mendonça, ICB/Universidade Federal de Minas Gerais
Profa. Dra. Luciene Bruno Vieira, ICB/Universidade Federal de Minas Gerais
Prof. Dr. Henrique von Gersdorff, Oregon Health & Science University - Coorientador
Prof. Dr. Christopher Kushmerick, ICB/Universidade Federal de Minas Gerais - Orientador

Belo Horizonte, 28 de maio de 2021.

Assinatura dos membros da banca examinadora:

	Documento assinado eletronicamente por Philippe Ribeiro Furtado de Mendonça , Professor do Magistério Superior - Visitante, em 04/06/2021, às 22:34, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020 .
	Documento assinado eletronicamente por Christopher Kushmerick , Professor do Magistério Superior, em 05/06/2021, às 07:05, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020 .
	Documento assinado eletronicamente por Luciene Bruno Vieira , Professora do Magistério Superior, em 05/06/2021, às 08:09, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020 .
	Documento assinado eletronicamente por Emelie Katarina Svahn Leao , Usuário Externo, em 07/06/2021, às 13:43, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020 .
	Documento assinado eletronicamente por Ricardo Mauricio Xavier Leão , Usuário Externo, em 07/06/2021, às 15:02, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020 .
	Documento assinado eletronicamente por Henrique Von Gersdorff , Usuário Externo, em 08/06/2021, às 18:29, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020 .
	A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orqao_acesso_externo=0 , informando o código verificador 0756390 e o código CRC 9867AA2B .

AGRADECIMENTOS

Chegar neste ponto da minha carreira acadêmica é um sonho feito realidade, mas que se tornou possível pela graça de Deus que colocou no meu caminho pessoas maravilhosas com uma paciência imensa que me ensinaram, mas ao mesmo tempo me deixaram voar para aprender de verdade.

Em primeiro lugar agradeço a meu esposo Carlos e a minha filha Juanita que desde sempre têm me apoiado nas minhas ideias de ir mais longe e descobrir novos horizontes. Vocês são meu porto, seu sorriso e suas sábias palavras em todos os momentos da vida, especialmente nos dias mais difíceis são meu alicerce para continuar. Hoje estou aqui por vocês meus amores.

Devo agradecer imensamente ao professor Dr. Christopher Kushmerick, meu mentor, quem apostou em mim e abriu as portas do seu laboratório e de seu conhecimento. Obrigada por me instruir na arte da eletrofisiologia com rigoroso detalhe e por oferecer espaços para discutir e intercambiar ideias, cada dia teve a oportunidade de aprender coisas novas. Seu apoio no desenvolvimento deste trabalho foi fundamental.

O estágio na *Oregon Health and Science University* (OHSU) foi de grande valia para meu crescimento pessoal e acadêmico, agradeço ao professor Dr. Henrique von Gersdorff e ao Dr. André Dagostin pelo apoio e pela exigência constante fazendo com que meu trabalho fosse melhor a cada dia.

Aos meus pais Maria del Pilar e César e as minhas irmãs Andrea e Paula por estarem sempre presentes desde a distância torcendo por mim, oferecendo o apoio incondicional que só podemos encontrar na família, este logro é de todos nós.

Aos meus colegas de laboratório de Eletrofisiologia Celular abrigada pelos ensinamentos, pelos momentos compartilhados que fizeram mais agradável o tempo no laboratório durante os longos dias de registro.

Aos meus amigos colombianos que estão aqui no Brasil e aos que fazem parte do GOU Estrangeiros, porque com eles sempre me senti mais perto da minha família e sei que desde o fundo do coração sempre torceram por mim.

A Pós-graduação em fisiologia e farmacologia por oferecerem todos os recursos e infraestrutura para desenvolver esta pesquisa.

Resumo

Examinamos os efeitos de receptores metabotrópicos de glutamato do Grupo I sobre a excitabilidade dos neurônios principais no núcleo medial do corpo trapezoidal (MNTB) de camundongos. Estes efeitos foram avaliados através da sua ativação por agonista exógeno e através de seu bloqueio durante liberação endógena do glutamato. Em *voltage-clamp* o agonista seletivo, *s-3,5-dihidroxyphenylglycine* (DHPG) evocou uma corrente de entrada, referida como I_{mGlu-I} , que foi estável durante o desenvolvimento desde pouco depois do nascimento (P8) até nove meses de idade. A I_{mGlu-I} teve pouca dependência de temperatura na faixa de 25-34°C, consistente com um mecanismo de canal iônico. Em registros em *current-clamp* a ativação dos mGlu-I com DHPG causou despolarização da membrana com diminuição da condutância da membrana e aumento do *sag* despolarizante. O *sag* foi dependente dos canais HCN. As medidas em *voltage-clamp* da I_h indicaram um pequeno (6%) aumento da G_{max} pelo DHPG sem alteração na dependência de voltagem, isso sugere que os canais de HCN contribuem parcialmente para o aumento da excitabilidade pelo Grupo I de receptores mGlu. A aplicação de antagonistas de receptores mGlu-I indicou que os receptores mGlu são tonicamente ativos e são sensíveis a elevações do glutamato pelo bloqueador da recaptação de glutamato *threo-β-benzyloxyaspartic acid* (DL-TBOA). Mesmo sem o uso de TBOA, durante a estimulação de alta frequência do cálice de Held a aplicação de inibidores de receptores mGlu-I causou hiperpolarização do neurônio pós-sináptico e aumentou a amplitude dos EPSP através de mecanismos relacionados à probabilidade de liberação das vesículas (Pr) e ao conteúdo quântico. Assim, a ativação de receptores mGlu do Grupo I altera a excitabilidade dos neurônios do MNTB e contribui para a fidelidade dos disparos em alta frequência neste núcleo relé auditivo através de mecanismos pré- e pós-sinápticos.

Palavras-chave: Receptores mGlu-I. Núcleo Medial do Corpo Trapezoidal. Estimulação em alta frequência. Canais HCN. Conteúdo quântico.

Abstract

We examined effects of Group I metabotropic glutamate receptors on the excitability of principal neurons in mouse medial nucleus of the trapezoid body (MNTB). These effects were evaluated when the receptors were activated with an exogenous agonist or by synaptically released endogenous glutamate. Under voltage-clamp the selective agonist, S-3,5-dihydroxyphenylglycine (DHPG) evoked an inward current, referred to as *I_{mGlu-I}*, which was developmentally stable from shortly after birth (P8) through nine months old. *I_{mGlu-I}* had low temperature dependence in the range 25–34°C, consistent with a channel mechanism. Under current-clamp recording mGlu-I receptors activation with DHPG causes membrane depolarization with decrease in the membrane conductance and increase in the depolarizing sag. The sag was dependent on HCN channels. Voltage-clamp measurements of *I_h* indicated a small (6%) increase in *G_{max}* by DHPG with no change in the voltage dependence; this suggests that HCN channels contribute partially to the increase in the excitability by Group I mGlu receptors. Application of mGlu-I receptor antagonists indicated that mGlu receptors are tonically active and are sensitive to elevations in ambient glutamate by the glutamate reuptake blocker threo-β-benzyloxyaspartic acid (DL-TBOA). Even without the use of TBOA, during high frequency stimulation of the calyx of Held application of mGlu-I receptor inhibitors caused postsynaptic membrane hyperpolarizes and increased the amplitude of EPSP through mechanisms related to *Pr* and quantal content. Thus, activation of Group I mGlu receptors modifies the excitability of MNTB neurons and contributes to the reliability of high frequency firing in this auditory relay nucleus through both pre- and post- synaptic mechanisms.

Keywords: mGlu-I receptors. Medial Nucleus of the trapezoid Body. High frequency stimulation. HCN channels. Quantal content.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ativação de receptores ionotrópicos e metabotrópicos de glutamato.....	13
Figura 2. Ativação de receptores mGlu-I modula características da membrana.....	17
Figura 3. Circuito auditivo no Complexo Olivar Superior.....	20
Figura 4. Expressão de receptores mGlu-I no MNTB muda ao longo do desenvolvimento.....	24
Figura 5. O efeito do DHPG é dependente da concentração.....	25
Figura 6. DHPG evoca uma corrente de entrada sensível a BaCl ₂ e ZD7288.....	25
Figura 7. Ativação de receptores mGlu-I aumenta a confiabilidade da neurotransmissão....	26
Figura 8. Método para analisar a amplitude dos EPSPs'.....	35
Figura 9. A I _{mGlu-I} em neurônios do MNTB é pouco sensível à temperatura.....	39
Figura 10. A I _{mGlu-I} em neurônios do MNTB é estável durante o desenvolvimento pós- natal.....	40
Figura 11. Ativação de receptores mGlu-I aumenta a resistência de entrada e o sag despolarizante.....	43
Figura 12. O inibidor de canais HCN elimina o sag despolarizante.....	45
Figura 13. Determinação do potencial de reversão da I _h em neurônios no MNTB.....	46
Figura 14. Ativação de receptores mGlu-I aumenta a condutância da I _h em neurônios do MNTB.....	47
Figura 15. Glutamato endógeno ativa os receptores mGlu-I despolarizando os neurônios do MNTB.....	49
Figura 16. Inibição da ativação tônica de receptores mGlu-I hiperpolariza neurônios do MNTB.....	50
Figura 17. Inibição de receptores mGlu-I aumenta o EPSP' em neurônios do MNTB.....	52
Figura 18. Inibição de receptores mGlu-I não altera o tamanho quântico.....	53
Figura 19. Ativação exógena de receptores mGlu-I gera uma corrente de entrada em animais adultos.....	54
Figura 20. Hiperpolarização e aumento na amplitude dos EPSPs' causada pelo bloqueio de receptores mGlu-I em camundongos adultos.....	56
Figura 21. Bloqueio de receptores mGlu-I em neurônios do MNTB de camundongos adultos não altera a cinética dos mEPSP.....	57
Figura 22. Possível aumento na Pr das vesículas causado pelo bloqueio de receptores mGlu-I.....	58

Figura 23. O bloqueio de receptores mGlu-I indica uma tendência para o aumento do conteúdo quântico do EPSP ₁ '	59
Figura 24. Mecanismos pré- e pós-sinápticos modulados por receptores mGlu-I no MNTB.....	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Características gerais de receptores metabotrópicos de Glutamato.....	14
Tabela 2: Abordagem metodológica	37
Tabela 3 Efeitos do desenvolvimento na amplitude da I_{mGlu-I}	40

LISTA DE ABREVIATURAS

aCSF	Líquido cérebro espinhal artificial	PKA	Proteína quinase A
AF	Fibras aferentes	PKC	Proteína quinase C
AP	Potencial de ação	PLC	Fosfolipase C
cAMP	Adenosina monofosfato cíclico	PLD	Fosfolipase D
CB1R	Receptor canabinoide de tipo 1	Pr	Probabilidade de liberação das vesículas sinápticas
cGMP	Guanosina monofosfato cíclico	PT	Temperatura fisiológica
CoH	Cálice de Held	RT	Temperatura ambiente
DAG	Diacilglicerol	sEPSP	EPSP espontâneo
eEPSP	EPSP evocados	SOC	Complexo Olivar Superior
EPSP	Potencial pós-sináptico excitatório	SPN	Núcleo superior paraolivar
EPSC	Corrente pós-sináptica excitatória	ss	Estado estacionário
E_{rev}	Potencial de reversão	TTX	Tetrodotoxina
GDP	Guanosina difosfato	$V_{1/2}$	Voltagem para ativação média
Gly	Glicina	VCN	Núcleo ventral coclear
G_{max}	Condutância máxima	V_m	Potencial de membrana
GPCR	Receptor acoplado à proteína G	VTB	Núcleo ventral do corpo trapezóide
GTP	Guanosina trifosfato		
HCN	Canais ativados por hiperpolarização e nucleotídeos.		
I	Corrente		
I_h	Corrente ativada por hiperpolarização		
iGluR	Receptores ionotrópicos de glutamato		
IP_3	Inositol trifosfato		
K	Fator de inclinação da curva		
Kir	Canal retificador de entrada de K^+		
LTB	Núcleo lateral do corpo trapezóide		
LSO	Núcleo lateral superior da oliva		
LTP	Potenciação de longo prazo		
LTD	Depressão de longo prazo		
m	Conteúdo quântico		
mEPSP	EPSP miniatura		
mGlu	Receptores metabotrópicos de glutamato		
MNTB	Núcleo medial do corpo trapezóide		
MSO	Núcleo Medial Superior da Oliva		
NCX	Trocador Na^+/Ca^+		
NLL	Núcleo do lemnisco lateral		
P	Idade pós-natal		

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
1.1 Receptores ionotrópicos de glutamato	12
1.2 Receptores metabotrópicos de glutamato.....	13
1.2.1 Receptores mGlu do Grupo I	15
1.3 Canais HCN.....	18
1.4 Núcleo Medial do Corpo Trapezóide.....	19
1.4.1 Cálice de Held.....	20
1.4.2 Neurônios principais do MNTB.....	22
1.4.3 Receptores mGlu no MNTB.....	23
2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS.....	27
3. METODOLOGIA.....	28
3.1 Animais.....	28
3.2 Obtenção de fatias	28
3.3 Registros eletrofisiológicos	29
3.4 Condutância e <i>sag</i> da membrana.....	31
3.5 Protocolo para correção do Vm durante a despolarização por DHPG.....	31
3.6 Estabelecimento do potencial de reversão da I_h no MNTB	32
3.7 Condutância dos canais HCN no MNTB.....	32
3.8 Estimulação das fibras aferentes.....	33
3.9 Amplitude do EPSP e mEPSP	33
3.10 Aquisição de dados e análises	36
4. RESULTADOS	38
4.1 Impacto da temperatura na corrente mGlu-I.....	38
4.2 Corrente mGlu-I em diferentes estágios de desenvolvimento.....	39
4.3 Ativação de receptores mGlu-I afeta as propriedades passivas da membrana.....	41
4.4 Receptores mGlu-I modulam a condutância I_h	44
4.5 Ativação endógena de receptores mGlu-I	48
4.5.1 Papel de receptores mGlu-I durante estimulação em alta frequência.....	49
4.5.2 Efeitos pré-sinápticos de receptores mGlu-I.....	58
5. DISCUSSÃO.....	60
5.1 Corrente mGlu-I no MNTB e sua dependência de temperatura.....	60
5.2 Persistência da corrente mGlu-I durante o desenvolvimento.....	61
5.3 Papel dos canais HCN durante ativação de receptores mGlu-I.....	62

5.4 Atividade tônica de receptores mGlu-I na sinapse do MNTB.....	65
5.5 Receptores mGlu-I modulam parâmetros pré-sinápticos no Cálice de Held.....	65
REFERÊNCIAS.....	70
AGRADECIMENTO ÀS AGÊNCIAS DE FOMENTO	82
PUBLICAÇÕES.....	83

1. INTRODUÇÃO

Esta tese explora o papel de receptores metabotrópicos de Glutamato do Grupo I (mGlu-I) no controle da excitabilidade e da neurotransmissão no Núcleo Medial do Corpo Trapezóide (MNTB), um núcleo relé importante na via auditiva no tronco encefálico. Nossos achados podem ser divididos em duas partes. A primeira parte descreve a modulação de canais catiônicos ativados por hiperpolarização e nucleotídeos (canais HCN) e como essas alterações afetam a excitabilidade. A segunda parte investiga consequências funcionais de receptores mGlu-I durante a neurotransmissão em alta frequência. Os resultados da segunda parte mostram que i) glutamato endógeno pode ativar os receptores mGlu-I nas nossas condições experimentais *in vitro* ii) que os receptores são tonicamente ativados durante atividade em alta frequência e o bloqueio destes receptores hiperpolariza o neurônio e aumenta o conteúdo quântico dos EPSPs evocados. Estes resultados são discutidos no contexto de uma dupla função de receptores mGlu-I no MNTB que, por um lado reduz a liberação de neurotransmissor do cálice de Held e desta forma limita a depressão sináptica e, por outro lado, aumenta a excitabilidade pós-sináptica o que ajuda a garantir a fiabilidade da neurotransmissão pelo MNTB.

1.1 Receptores ionotrópicos de glutamato

Identificados como iGluR, os receptores ionotrópicos para glutamato medeiam respostas sinápticas rápidas e de duração curta pela abertura direta de canais para cátions (Na^+ , K^+ e Ca^{2+}) (Figura 1). Os receptores iGluR são representados por quatro famílias de receptores (denominados AMPA, NMDA, Kainato e Delta (δ)) definidas originalmente por sua afinidade farmacológica a determinados agonistas e subsequentemente por sua similaridade na estrutura e na sequência genética. Cada uma destas famílias apresenta na sua estrutura molecular subunidades diferentes que foram identificadas e que determinam as isoformas de cada família de iGluR (Meldrum, 2000; Purves et al., 2004; Collingridge, et al., 2009). Estes receptores são o fundamento da neurotransmissão no Sistema Nervoso Central e Periférico, sendo importantes na plasticidade neuronal, como base para o aprendizado e a memória, além de terem sido estudados como alvos de fármacos no tratamento de várias doenças como epilepsia,

esquizofrenia, diabetes e Alzheimer (*Revisado por Barnes & Slevin, 2003; Balu, 2016; Wang & Reddy, 2017; Hanada, 2020*).

1.2 Receptores metabotrópicos de glutamato

Identificados como receptores mGlu. Estes receptores são membros da superfamília de receptores com sete segmentos transmembrana e acoplados à proteína G, que no caso são ativados pelo neurotransmissor glutamato. A ativação de receptores mGlu e da proteína G associada desencadeia cascatas de segundos mensageiros e vias de sinalização intracelular. Por tanto, quando comparados com receptores ionotrópicos suas respostas são geralmente mais lentas e duradouras (Figura 1).

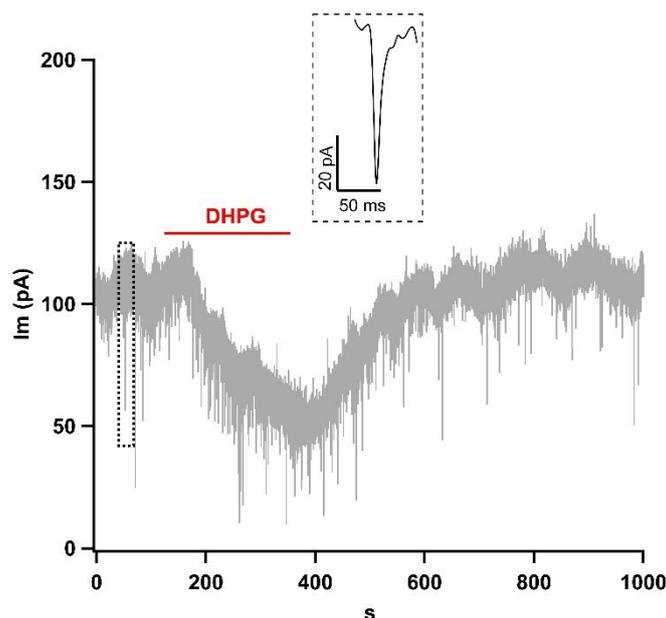


Figura 1. Ativação de receptores ionotrópicos e metabotrópicos de glutamato. Registro em voltage-clamp de um neurônio no Núcleo Medial do Corpo Trapezoide ($V_{hold} = -60$ mV). Alteração da corrente de membrana durante a aplicação de um agonista seletivo para receptores mGlu-I, DHPG ($10 \mu\text{M}$). No gráfico é possível apreciar os eventos rápidos causados pela ativação de receptores iGlu (tempo em ms, ver detalhe na parte superior). O efeito na corrente de membrana da ativação de receptores mGlu se instalou de forma lenta e duradoura.

O processo de ativação e desativação de receptores mGlu segue o mesmo ciclo dos outros receptores desta superfamília. A proteína G associada ao receptor é formada pelo complexo de três subunidades denominadas α , β e γ . No estado inativo as subunidades α , β e γ formam um complexo no qual uma molécula de guanosina difosfato (GDP) está ligada à subunidade α . A ativação da proteína G muda a conformação das subunidades permitindo que o GDP seja trocado por guanosina

trifosfato (GTP). Em seguida, o complexo se separa em duas partes: a subunidade α ligada a GTP e o complexo das subunidades β e γ . Os dois complexos, α -GTP e β - γ , se deslocam da membrana para se difundir no citoplasma onde interagem e modulam a função de várias moléculas como enzimas, canais iônicos e fatores de transcrição (Wedegaertner et al., 1996; Saini et al., 2007). Evidência tem mostrado que a proteína G, constitutiva ou ativada pelos receptores metabotrópicos, pode se deslocar livremente dentro das células, não ficando restrita à membrana plasmática (Wedegaertner P., 2012). A subunidade α possui atividade GTPase e quando o GTP é hidrolisado para GPD ocorre a reassociação do complexo $\alpha\beta\gamma$ e o término das ações iniciadas pela proteína G (Cartmell & Schoepp, 2000; Niswender & Conn, 2010).

A família de receptores metabotrópicos de glutamato é composta por oito isoformas, divididas em três grupos de acordo com a homologia entre as sequências, as semelhanças no mecanismo de transdução e suas propriedades farmacológicas, sendo eles Grupo I (mGlu1 e mGlu5), Grupo II (mGlu2 e mGlu3) e Grupo III (mGlu4, mGlu6, mGlu7 e mGlu8) (Nakanishi, 1992; Schoepp et al., 1999), a nomenclatura destes receptores está baseada no acordo NC/IUPHAR (Acher et al., 2019). Este trabalho foca nos efeitos de receptores pertencentes ao Grupo I (Tabela 1).

Tabela 1: Características gerais de receptores metabotrópicos de Glutamato.

	Isoformas	Proteína G acoplada	Mecanismo de transdução	Localização na sinapse	Agonistas Usados neste estudo	Antagonistas
mGlu-I	mGlu1	$G_{q/11}$ $G_{i/o}$ G_s	\uparrow PLC \downarrow AC \uparrow AC	Pós- Pre- ?	<i>(S)</i> -DHPG	LY367385 JNJ16259685
	mGlu5					MPEP CTEP
mGlu-II	mGlu2	G_i	\downarrow AC	Pre-	n.a	n.a
	mGlu3					n.a
mGlu-III	mGlu4	G_i	\downarrow AC	Pre-	n.a	n.a
	mGlu6					n.a
	mGlu7					n.a
	mGlu8					n.a
PLC: Fosfolipase C; AC: Adenil ciclase; n.a: não aplica ? (Peng et al., 2020)						

Adaptado de Schoepp et al., 1999; Hermans & Chaliss, 2001. Niswender & Conn, 2010

A estrutura dos receptores mGlu está dividida em três regiões: a região extracelular (dividida na região de ligação e região rica em cisteína), a região dos sete domínios transmembrana e a região intracelular. Os domínios de ligação extracelular

também são conhecidos como domínios “*Venus flytrap*” (VFDs) os quais ligam o glutamato ou outros ligantes ortostéricos. As regiões ricas em cisteína ligam os VFDs aos sete domínios transmembrana. A estrutura funcional destes receptores é dímera e até pouco tempo foram considerados como estritamente homodímeros (Romano et al., 1996; Kunishima et al., 2000). Contudo, experimentos de imunoprecipitação, microscopia de super resolução e transferência de energia por ressonância de Förster (FRET) demonstraram que podem se formar heterodímeros funcionais entre as isoformas do Grupo I (Pandya, et al., 2016) e entre as isoformas dos Grupos II e III, tanto em células transfectadas (Doumazane et al., 2011; Yin et al., 2014) quanto em neurônios nativos (Sevastyanova et al., 2014; Moreno Delgado et al., 2017). A funcionalidade dos heterodímeros mGlu1/mGlu5 só é inibida por completo na presença de antagonistas das duas isoformas (Werthmann, et al., 2020).

Estudos imunohistoquímicos têm permitido determinar a localização dos receptores mGlu do Grupo I principalmente como pós-sináptica, os receptores mGlu do Grupo III predominantemente expressos no terminal pré-sináptico, já os receptores mGlu do Grupo II estão expressos em terminais pré e pós-sinápticos (Elezgarai, et al., 2001; Puente, et al., 2005). Receptores dos Grupos II e III funcionam como autoreceptores localizados na região pré-sináptica e estão envolvidos no controle retrógrado da liberação de neurotransmissores (*Revisado por* Cartmell et al., 2000 & Niswender & Conn, 2010). A função dos receptores do Grupo I é mais complexa, com ações pré- e pós-sinápticas. A ativação desses receptores na célula pós-sináptica evoca a liberação de endocanabinóides (Varma et al., 2001; Maejima et al., 2001) e a retroinibição da liberação de neurotransmissores (Kushmerick et al., 2004), além de provocar a geração de correntes pós-sinápticas que afetam diretamente a excitabilidade celular (Ireland & Abraham, 2002; Chanda & Xu-Friedman, 2011; Pan & Rutecki, 2014; Alhadas et al., 2019).

1.2.1 Receptores mGlu do Grupo I

O mecanismo de transdução preferencial dos receptores mGlu do Grupo I (mGlu-I), ao estarem acoplados a proteína $G\alpha_q$, inclui a ativação da fosfolipase C (PLC) e a hidrólise de fosfoinosítídeos (4,5) bisfosfato gerando inositol 1,4,5-trisfosfato (IP₃) e diacilglicerol (DAG). Estes segundos mensageiros, por sua vez, causam a liberação de

Ca^{2+} do retículo endoplasmático e a ativação da proteína quinase C (PKC). No entanto, além desta via, tem sido reconhecido que receptores mGlu-I podem ativar também, ainda que com menor incidência, proteína $G_{i/o}$ e G_s através das quais são acionados outros segundos mensageiros como cAMP, diferentes enzimas como GRK, PLD, PKA e ativadas outras vias de sinalização como MAPK/ERK e MTOR/p70/S6 (Hermans & Chaliss, 2001; Ferguson, 2001; Iacovelli et al., 2003; Dhami & Ferguson, 2006; Niswender & Conn, 2010; Bhattacharyya, 2016; Reiner & Levitz, 2018)

Os receptores mGlu-I estão amplamente expressos tanto em neurônios quanto em células glia de diversas regiões do SNC. O mGlu1 tem sido identificado, nas células de Purkinje do cerebelo (Luján & Ciruela, 2001), no bulbo olfatório (Heinbockel et al., 2004), na região CA3 do hipocampo e no tálamo (Lavreysen, et al., 2004), enquanto a isoforma mGlu5 está expressa nas regiões CA1 e CA3 do hipocampo, no córtex, no estriado e no bulbo olfatório (Romano, et al., 1995). Nas células de Purkinje do cerebelo foi identificado o mGlu5 em densidade menor respeito à isoforma mGlu1 (Bordi & Ugolini, 1999). Apesar de pertencer ao mesmo grupo e estarem co-localizados em algumas regiões do cérebro, a expressão dos receptores mGlu1 e mGlu5 é regulada de forma diferente durante o desenvolvimento, o que sugere diferenças funcionais das isoformas dependendo da região em que se encontra o neurônio (Cataina et al., 1994; Simonyi et al., 2005; Lein et al., 2007).

Numerosas pesquisas indicam que o Grupo I dos mGlu podem modular a excitabilidade dos neurônios do SNC. Eles fazem isso através da modulação de correntes de membrana e condutâncias que afetam o potencial de membrana (revisado por Correa et al., 2017) (Figura 2). Foi observado que o aumento do cálcio intracelular estimula o trocador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) gerando uma corrente de entrada (em cada ciclo do trocador, 3 íons Na^+ entram e 1 íon Ca^{2+} sai) (Lee e Boden, 1997; Keele et al., 1997), este fenômeno acontece pela ativação da via da proteína $G\alpha_q$ acionando a cascata da PLC-IP₃-[Ca^{2+}]_i (Serikawa e Bonham, 2006; Jian et al., 2010). Hiperpolarização da membrana foi descrita como devida à modulação da condutância para o K^+ (Jian et al., 2010) e mais especificamente de canais para K^+ dependentes de Ca ($\text{K}_{\text{Ca}^{2+}}$) (Katayama et al., 2003). As condutâncias moduladas por receptores mGlu podem ser independentes ou dependentes de voltagem. Por exemplo, Ketunnen et al (2003) identificou que a inibição de condutâncias de vazamento causa a despolarização durante ativação de receptores mGlu-I pelo DHPG. Por outro lado, modulação de correntes de Na^+ , K^+ e Ca^{2+}

dependentes de voltagem têm sido descritas também como promotoras de correntes de entrada (Guatteo et al., 1999; Chuang et al., 2000; Heinbockel et al., 2004; Bonsi et al., 2005; Dong e Ennis, 2013).

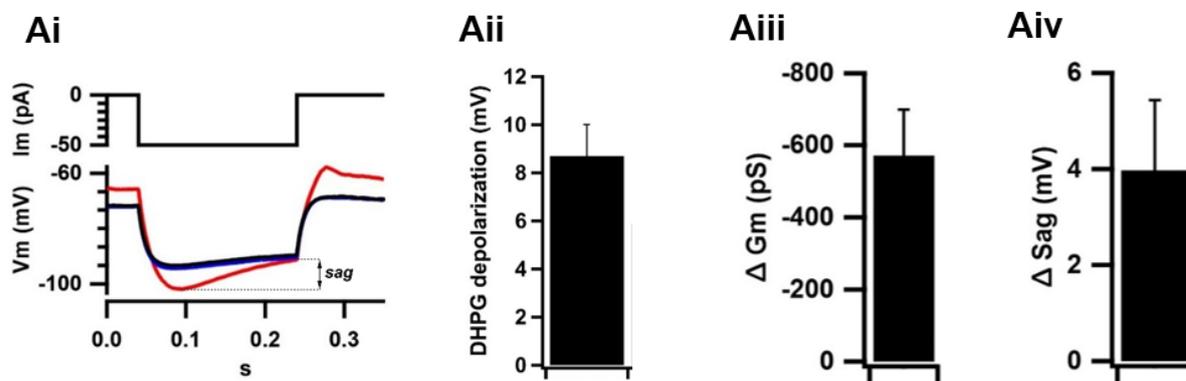


Figura 2. Ativação de receptores mGlu-I modula características da membrana. *Ai.* Registro em current-clamp no MNTB de camundongos neonatos (P8), na condição controle (preto), durante aplicação do DHPG (10 μ M, vermelho), e após a lavagem (azul). Observe-se que a ação do DHPG sobre os receptores mGlu-I causa uma despolarização da membrana (**Aii**), um aumento da resistência de entrada (**Aiii**) e um aumento do sag (**Aiv**). (Alhadas E., 2014; Bernal-Correa, 2016).

A ativação dos receptores mGlu1 e mGlu5 induz diferentes respostas que têm papéis importantes nos processos de plasticidade sináptica (*Long-term Potentiation – LTP e Long-term Depression – LTD*), que envolvem a aprendizagem, a memória e o comportamento; e ao mesmo tempo no desenvolvimento neuronal e na neurodegeneração (Malenka R.C., 1994; Malenka & Bear, 2004; Citri & Malenka, 2008).

Devido às variadas funções destes receptores, eles têm sido estudados como alvos terapêuticos para doenças neurológicas e neurodegenerativas graves, como a seqüela após isquemia ou trauma cerebral (Cozzi et al., 2002), a dor crônica (Pereira et al., 2019), as epilepsias (Moldrich et al., 2003; Pan & Rutecki, 2014), a esclerose múltipla (Geurts, 2003), a esclerose lateral amiotrófica (Giribaldi et al., 2013), doenças de Huntington (Ribeiro et al., 2010), Parkinson (Kang, et al., 2018), síndrome do X frágil (Dölen & Bear, 2008) e autismo (Modi, et al., 2018). Com isto, a criação e descoberta de moduladores tanto positivos, quanto negativos para estes receptores é um amplo alvo de estudo na atualidade (Bhattacharyya, 2016).

Tendo visto a relevância destes receptores como alvos para tratamento de doenças é importante conhecer os mecanismos básicos de funcionamento deles para compreender melhor como os fármacos dos quais são alvo os modulam. Nós

desenvolvemos os estudos sobre estes receptores em neurônios do Núcleo Medial do Corpo Trapezóide.

1.3 Canais HCN

Os canais HCN (do inglês, *Hyperpolarization-Activated Cyclic Nucleotide-Gated Channels*) foram descobertos por primeira vez em bastonetes da retina e logo foram identificados em motoneurônios e no nó sinoatrial do coração (revisado por Clapham, 1998). Posteriormente foram identificados amplamente no SNC (Moosmang et al., 1999; Monteggia et al., 2000). Sua principal característica que os distingue de canais Nav ou Kv é sua ativação durante hiperpolarização da membrana, motivo pelo qual é conhecida como corrente *h* (I_h). Uma corrente semelhante no coração é conhecida como corrente “funny” (I_f) (Pape, 1996). A corrente que flui por estes canais é mista (Na^+ e K^+), com potencial de reversão em torno de $\sim -30\text{mV}$ e não sofre inativação, contribuindo para regular o potencial de membrana, a resistência de entrada da membrana e a integração sináptica (Banks et al., 1993; Cuttle et al., 2001; Wahl-Schott & Biel, 2009; Leão et al., 2006; Khurana, et al., 2012). O cAMP e cGMP modulam a atividade destes canais, portanto neurotransmissores que se ligam a receptores acoplados à proteína G modulam a ativação destes canais (Santoro & Baram, 2003; Benarroch, 2013).

Quatro isoformas de canal HCN foram caracterizadas (HCN1 – HCN4), cada uma das quais apresenta propriedades diferentes. A cinética de ativação dos HCN1 é rápida tendo baixa modulação por cAMP, já HCN3 e HCN4 apresentam cinética lenta. Os HCN2 têm cinética intermediária e são fortemente modulados por cAMP assim como os HCN4 (Clapham, 1998; Benarroch, 2013). O pH de meio intracelular (Zong et al., 2001) e o $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ (Pian et al., 2006) também têm sido identificados como moduladores dos HCN, alterando a curva de ativação para potenciais mais negativos ou positivos, respectivamente. Estas isoformas que são amplamente distribuídas pelo SNC podem colocalizar num mesmo neurônio (Leão, et. al., 2006).

Disfunções destes canais no SNC têm sido relacionadas com alterações nos processos inflamatórios, dor neuropática, epilepsia, e hemorragia subaracnóidea (Santoro & Baram, 2003; Cao et al., 2016; Rivolta et al., 2020).

1.4 Núcleo Medial do Corpo Trapezóide

O Núcleo Medial do Corpo Trapezóide (MNTB) está localizado no tronco encefálico, este núcleo faz parte do Complexo Olivar Superior (SOC) e da via auditiva. Potenciais de ação através da via auditiva codificam a frequência, intensidade e tempo das informações sonoras. A membrana basilar localizada na cóclea, no ouvido interno, se caracteriza por apresentar regiões determinadas para sons de baixa e alta frequência, esta distribuição tonotópica é reproduzida espacialmente dentro dos núcleos auditivos, assim cada neurônio responde melhor a uma determinada faixa de frequência (Sommer et al., 1993; Kandler et al., 2009). Já a intensidade dos sons é codificada pela taxa de disparos, sendo que altas taxas representam sons altos. Diferenças de tempo ou de intensidade da informação proveniente das duas cócleas são comparados no SOC para determinar a localização a fonte sonora (Trussell, 1999; revisado por Johnston et al., 2010).

Neurônios do núcleo ventral coclear (VCN) recebem aferências do VIII nervo craniano, e enviam projeções glutamatérgicas para as células principais do MNTB contralateral (Morest, 1968) formando a sinapse conhecida como o Cálice de Held (CoH) (Held, 1893). Os neurônios do MNTB são um relé sináptico com função inversora na qual transformam os sinais excitatórios que recebem em sinais inibitórios, (glicinérgicas) que são dirigidos a regiões ipsilaterais como a oliva lateral superior (LSO) (Banks & Smith, 1992), a oliva medial superior (MSO) (Clause et al., 2014), o núcleo paraolivar superior (SPN) (Kulesza et al., 2007), o núcleo do lemnisco lateral (NLL) (revisado por Johnston et al., 2010) e os núcleos lateral e ventral do corpo trapezóide (LNTB e VNTB) (Aoki et al. 1988; Borst et al., 2012) (Figura 3). Este processamento dos sinais permite localizar a origem de sons no plano horizontal.

De forma geral, os circuitos de neurônios auditivos envolvidos em processamentos de informação sonora têm como característica a capacidade de sustentar a neurotransmissão em alta frequência. Particularmente, o MNTB se caracteriza por manter (*in vivo*) uma frequência de disparo espontânea relativamente alta (em torno de 30 Hz) e na presença de estímulos sonoros pode disparar potenciais de ação em frequências que chegam a ~300 Hz (Hermann et al., 2007; Kopp-Scheinflug et al., 2008). A manutenção de disparos em alta frequência faz deste núcleo um interessante modelo para estudar a modulação da excitabilidade. Ainda que a

característica de disparos espontâneos não seja conservada em estudos *in vitro*, é possível estimular o CoH para mimetizar a atividade *in vivo* destes neurônios.

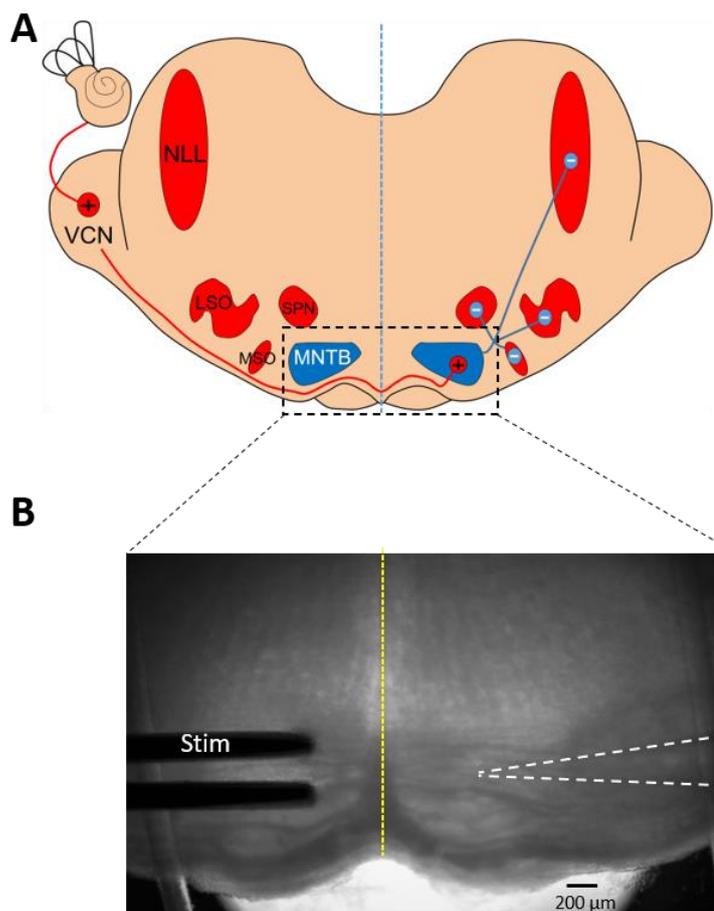


Figura 3. Circuito auditivo no Complexo Olivar Superior. **A.** Representação de uma fatia coronal contendo o SOC. O VCN recebe informações direto da cóclea através do oitavo nervo craniano. O VCN envia projeções excitatórias para o MNTB contralateral (linha vermelha, +). O MNTB emite projeções inibitórias ipsilaterais (linha azul, -) para o MSO, LSO, SPN e NLL. Estes quatro núcleos recebem entradas excitatórias do VCN ipsilateral (não mostrado). VCN, Núcleo Ventral Coclear; MNTB, Núcleo Medial do Corpo Trapezóide; MSO, Oliva Superior Medial; LSO, Oliva Superior Lateral; SPN, Núcleo Superior Paraoliviar; NLL, Núcleo Lateral do Lemnisco (Adaptado de Johnston et al., 2010). **B.** Fotografia de uma fatia durante o registro de um neurônio principal do MNTB mostrando a região indicada em A. A linha pontilhada amarela indica a linha média e as linhas pontilhadas brancas à direita mostram a posição da pipeta de registro.; Stim, Eletrodo de estimulação

1.4.1 Cálice de Held

O cálice de Held (CoH) corresponde à parte final dos axônios aferentes que se projetam desde as *Globular Bushy Cells (GBC)* no AVNC e cada um destes terminais forma uma sinapse glutamatérgica com o corpo de um único neurônio principal do MNTB (Forsythe, 1994). Durante as duas primeiras semanas de vida a morfologia do

cálice de Held se altera, iniciando como um pequeno contato com o soma (P2), posteriormente a área de contato aumenta de forma expansiva (P5) e finalmente entre os dias 13-14 o cálice amadurece formando fenestrações que recobrem o corpo de neurônio (Kandler & Friauf, 1993; Borst & van Hoesve, 2012).

O desenvolvimento deste enorme terminal pré-sináptico implica a existência de um grande número zonas ativas para liberação do neurotransmissor, estimada de ser entre 500-700 zonas ativas em cálices de Held de ratos (Sätzler et al., 2002; Taschenberger et al., 2002) e 400-500 em camundongos (Oleskevich et al., 2004). Nestes locais são recrutadas vesículas que integram o pool prontamente liberável (*RRP*), que contêm em camundongos ao redor de 1000 vesículas (Oleskevich et al., 2004; Singh et al., 2018). A liberação das vesículas por exocitose e a subsequente ativação dos iGluRs no MNTB gera os EPSC/EPSP (*Excitatory Postsynaptic Current/Potential*), a amplitude destes eventos pós-sinápticos pode ser descrita pela seguinte equação:

$$Y = N \cdot Pr \cdot q \quad \text{Eq. 1}$$

Onde Y representa a amplitude do EPSC/EPSP, N os locais de liberação do neurotransmissor, Pr a probabilidade de liberação das vesículas e q a amplitude da corrente ou do potencial quântico (revisado por Schneggenburger & Forsythe, 2006; revisado por Neher, 2017). A probabilidade de liberação depende de fatores pré-sinápticos, como a concentração do Ca^{2+} e a sensibilidade da maquinaria da exocitose para este íon, assim moduladores de corrente de Ca^{2+} no cálice, como receptores CB1 (Kushmerick, et al., 2004), GABA_B (Takahashi et al., 1998) e mGlu II/III (ver abaixo) entre outros, podem alterar o valor de Pr . O tamanho quântico (q) é um fator que depende de fatores pós-sinápticos pois está sujeito às características dos receptores (AMPA e NMDA) (Yamashita et al., 2003; Yamashita et al., 2009; Budisantoso, et al., 2013). No MNTB foi visto que a amplitude das correntes AMPA aumenta durante o desenvolvimento enquanto as NMDA diminuem consideravelmente em animais ~P16-P18 (Taschenberger & von Gersdorff, 2000; Taschenberger et al., 2002; Joshi & Wang, 2002; Steinert, et al., 2010). A quantidade de vesículas liberadas para gerar um EPSP corresponde ao conteúdo quântico (m), e pode ser calculado assim:

$$m = \frac{eEPSP}{mEPSP} \quad \text{Eq. 2}$$

Onde, *eEPSP* representa a amplitude dos eventos evocados por um potencial de ação pré-sináptico e *mEPSP* a amplitude dos eventos miniatura (uni-quânticos). Como consenso científico a amplitude dos mEPSP deve ser medida na presença de tetrodotoxina (TTX) para evitar a possibilidade de confundir eventos evocados por potenciais de ação com os eventos que representam um mEPSP genuíno. No MNTB foi visto que a amplitude dos EPSC espontâneos (sEPSC) medidos sem TTX não é diferente da amplitude dos mEPSP (Ishikawa et al., 2002; Yamashita et al., 2003; Kushmerick et al., 2006).

1.4.2 Neurônios principais do MNTB

O MNTB agrupa um único tipo de neurônio chamado de neurônio principal ou célula principal. Os neurônios principais são células ovais e compactas com um ou dois dendritos (Leão et al., 2008). Os neurônios principais do MNTB maduros apresentam especializações biofísicas que lhes permitem converter as entradas sinápticas que recebem do Cálice de Held em potenciais de ação em notável alta frequência e fidelidade temporal. Curiosamente, neurônios do MNTB recém-nascidos não apresentam estas especializações e como consequência apresentam falhas quando estimulados em alta frequência (Taschenberger & von Gersdorff, 2000). As mudanças ocorrem principalmente durante o desenvolvimento pós-natal até o início da audição (P12). O estudo da sinapse ao longo desta fase de desenvolvimento permite correlacionar modificações nas propriedades biofísicas de canais e receptores com a função fisiológica (Taschenberger & von Gersdorff, 2000).

Entre as mudanças observadas há alterações no tipo e nas propriedades dos receptores de glutamato que são expressos. Neurônios imaturos do MNTB expressam, receptores AMPA de cinética relativamente lenta, assim como alta densidade de receptores NMDA com cinética lenta. Durante o desenvolvimento, mudanças nas subunidades que compõem os receptores AMPA resulta em canais de cinética rápida e a expressão de canais NMDA é reduzida a níveis muito baixos (Taschenberger & von Gersdorff, 2000). Em animais jovens e adultos (a partir de P15) a dessensibilização de receptores AMPA é menor e contribui pouco para a depressão sináptica dentro de trens de estímulos em alta frequência (Taschenberger et al., 2002). Estas modificações permitem à célula pós-sináptica reproduzir as entradas sinápticas recebidas em alta frequência do cálice de Held.

Outras especializações identificadas nos neurônios do MNTB são os canais para Na^+ com rápida recuperação da inativação (Leão R. M., et al., 2005) ocasionando que os períodos refratários sejam curtos. Além disso, estas células expressam dois tipos de correntes de K^+ com papéis diferentes, mas igualmente importantes para manter a fidelidade de disparos em alta frequência (Brew & Forsythe, 1995; Revisado por Johnston et al., 2010). A primeira é a condutância de K^+ de baixo limiar sensível a dendrodotoxina que atua perto do potencial de repouso, limitando o número de potenciais de ação gerados por um único estímulo. Esta corrente garante que cada potencial de ação pré-sináptico gere apenas um único potencial de ação pós-sináptico. A outra corrente de K^+ , que atua em potenciais mais despolarizados apresenta cinética de ativação e inativação rápida sendo essencial para disparos em alta frequência. Juntas, estas correntes de K^+ permitem que neurônios do MNTB executem sua função como neurônio relé, seguindo fielmente as entradas sinápticas recebidas (Wang et al., 1998). Adicionalmente, os neurônios do MNTB expressam canais para potássio retificadores de entrada (Kir) e canais HCN, estes últimos ativam em potenciais próximos ou hiperpolarizados ao potencial de membrana, regulando a resistência de entrada e podendo modular a excitabilidade (Lein et al., 2007; Leão R.N. et al., 2005; Leão et al., 2006; Kim & von Gersdorff, 2012; Kopp-Scheinflug et al., 2015).

1.4.3 Receptores mGlu no MNTB

As isoformas dos receptores mGlu dos grupos II e III têm sido identificadas no terminal do cálice de Held (Barnes-Davies & Forsythe, 1995; Takahashi et al., 1996; Elezgarai, et al., 1999; Elezgarai et al., 2001; Renden et al., 2005). Tanto em rato como em camundongo foi visto que a expressão destas isoformas é regulada durante o desenvolvimento sendo constatada uma maior expressão até o dia ~9-10, nos dias seguintes a expressão dos receptores nos neurônios do MNTB diminui consideravelmente (Elezgarai, et al., 1999) e sua contribuição na inibição dos EPSC torna-se reduzida a 10% na idade adulta (Renden, et al., 2005). Devido a sua localização pré-sináptica, estes receptores têm sido classificados como autoreceptores com sua função ligada a inibição da liberação de glutamato, principalmente ao reduzir correntes de Ca^{2+} pré-sinápticas (Takahashi et al., 1996). Renden et al. (2005) mostraram que a redução na amplitude dos EPSC pela ativação destes receptores cai de 73% na idade de

P5-7, para 68% (p8-10), 36% (P12-14) e 16% (P16-18). Durante a idade adulta a participação dos receptores do grupo III na depressão sináptica está reduzida a 10% (von Gersdorff et al., 1997), tendo uma importante função na aceleração da recuperação pré-sináptica logo após de estimulação em trens de alta frequência (Billups et al., 2005).

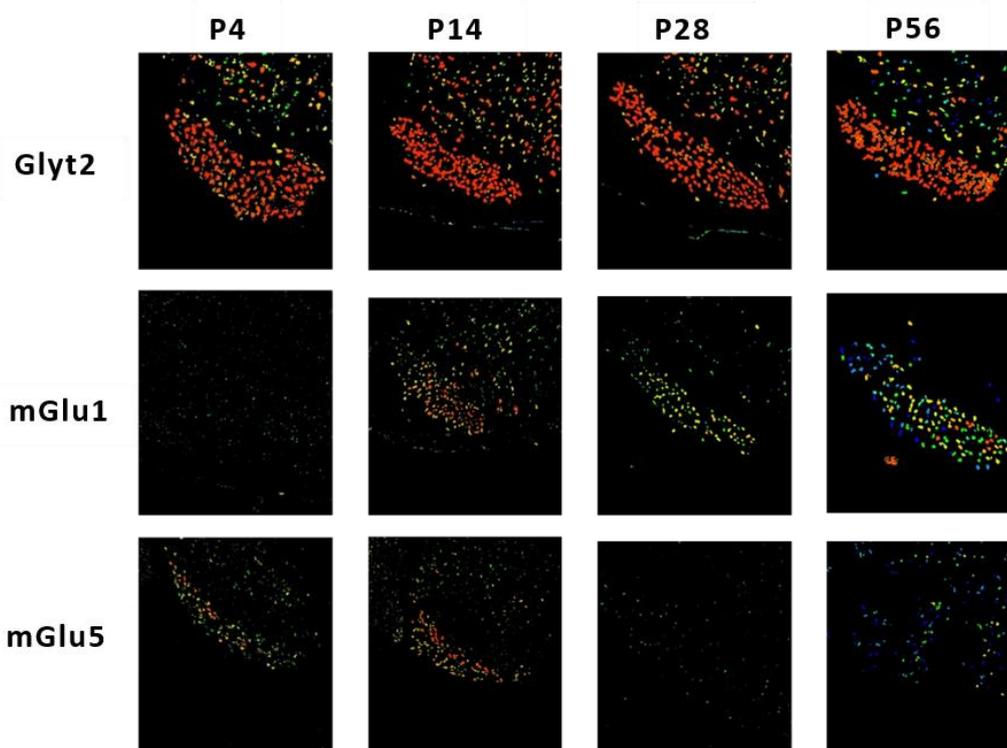


Figura 4. Expressão de receptores mGlu-I no MNTB muda ao longo do desenvolvimento. GlyT2 é o marcador para transportador vesicular de glicina que serve como marcador para neurônios do MNTB. Expressão das isoformas mGlu1 e mGlu5 aos 4, 14, 28 e 56 dias em camundongos (Fluorescência associada à marcação por hibridação *in situ*). Adaptado de Lein et al., 2007.

Receptores do grupo I têm sido identificados nos neurônios principais do MNTB (Figura 4), onde foi mostrado que a ativação de ambas as isoformas (mGlu1 e mGlu5) com o agonista seletivo (*S*)-3,5-Dihydroxyphenylglycine hydrate (DHPG) aumenta a excitabilidade dos neurônios ao despolarizar a membrana (Alhadas et al., 2019; Peng, et al., 2020). Mais recentemente vimos que a despolarização gerada pelo DHPG (Figura 5A) é dependente da concentração do agonista (Figura 5B) e se deve a uma corrente de entrada (Figura 6A). Esta corrente é sensível a BaCl^{+2} e ZD7288, o que sugere o envolvimento de canais Kir e HCN na geração da corrente (Figura 6B) (Alhadas et al., 2019).

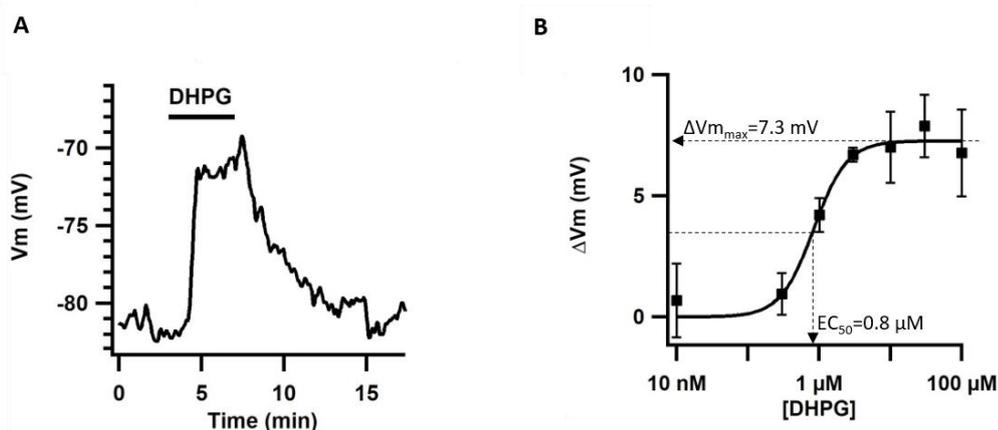


Figura 5. O efeito do DHPG é dependente da concentração. *A.* Registro representativo da despolarização da membrana evocada pelo DHPG (10 μ M) *(B)* Curva de concentração-resposta para a despolarização evocada pelo DHPG em neurônios do MNTB (para cada concentração foram registradas entre 4 – 6 células). A curva é o melhor ajuste da equação de Hill com EC_{50} em 0.8 μ M e efeito máximo de 7.3 mV (Bernal-Correa, 2016).

Estes receptores do Grupo I podem modular a liberação de neurotransmissores de diversas maneiras. Kushmerick et al. (2004) mostraram que a ativação de receptores mGlu-I causa uma retroinibição através da ativação de receptores CB1 pré-sinápticos. Evidência recente mostrou que o mGlu5 pode estar localizado no cálice de Held, onde modula a corrente persistente de sódio (INaP) resultando em um aumento da liberação espontânea de glutamato (Peng, et al., 2020). O MNTB também recebe entradas sinápticas inibitórias que são igualmente reguladas pelos receptores mGlu-I (Curry et al., 2018).

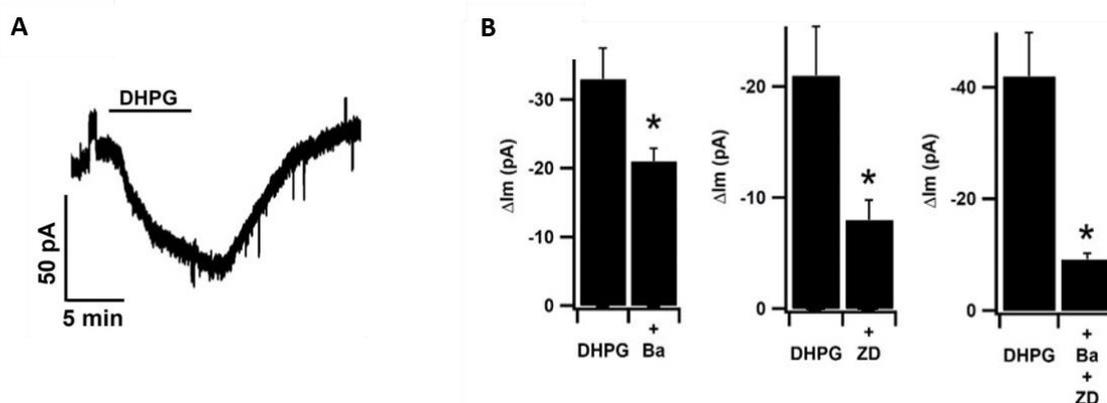


Figura 6. DHPG evoca uma corrente de entrada sensível a BaCl₂ e ZD7288. *A.* Registro representativo da corrente de entrada evocada pelo DHPG (10 μ M) em neurônios do MNTB de camundongos P8. $V_m = -60$ mV. *B.* A corrente é sensível aos bloqueadores BaCl₂ (Ba, 500 μ M) e ZD7288 (ZD, 100 μ M) (Bernal-Correa, 2016).

Adicionalmente, quando o CoH foi estimulado a 100 Hz usando aCSF com concentração reduzida de Ca^{2+} (1.2 mM) foram observadas falhas esporádicas na geração de potenciais de ação (Figura 7A). Nestas condições, a adição de DHPG aumenta a probabilidade de que o EPSP desencadeie um potencial de ação (Figura 7B), indicando que a ativação de receptores mGlu-I pode aumentar a excitabilidade intrínseca dos neurônios e desta forma melhorar o desempenho da sinapse (Alhadas et al., 2019).

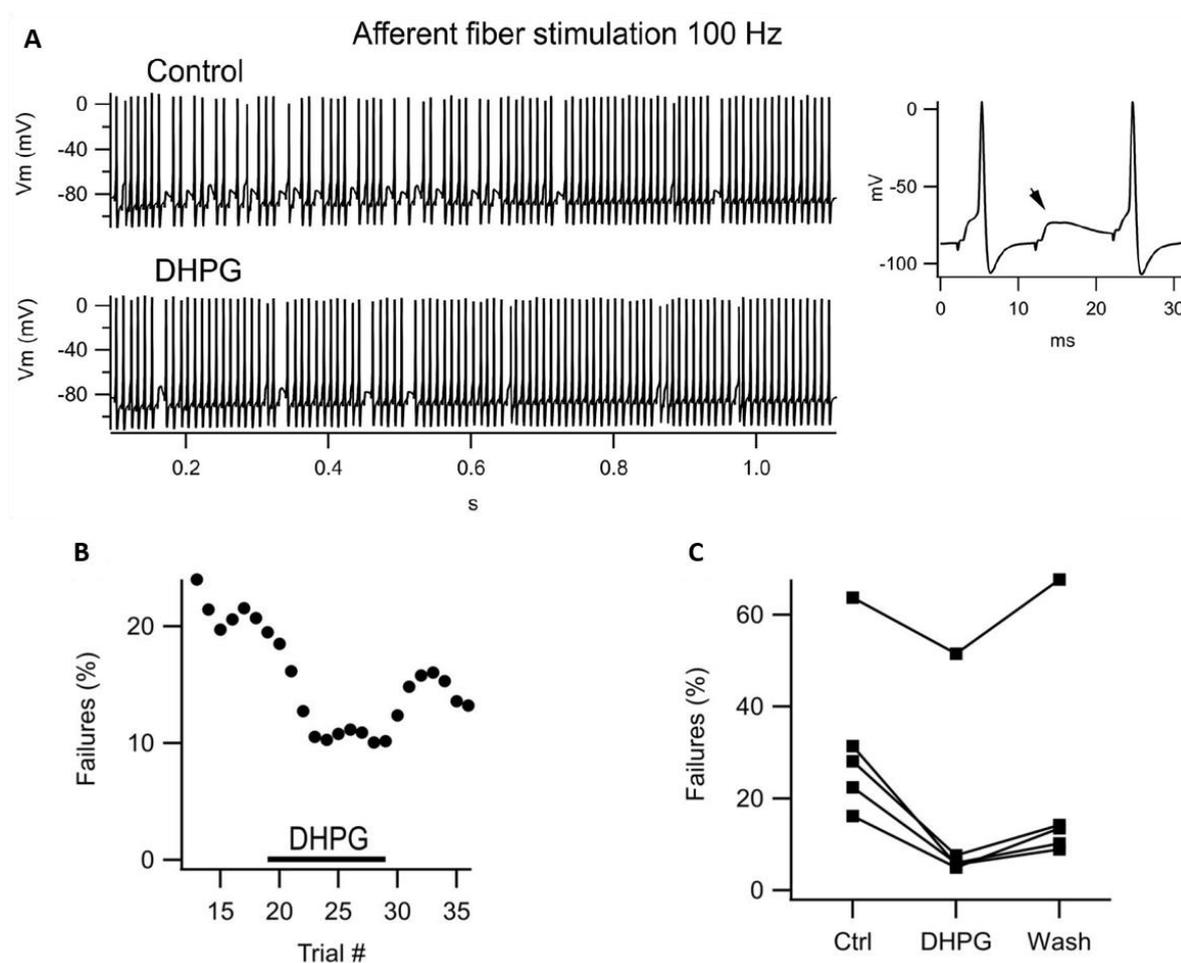


Figura 7. Ativação de receptores mGlu-I aumenta a confiabilidade da neurotransmissão. A. EPSP e potenciais de ação registrados em neurônios do MNTB (P18) durante estimulação a 100 Hz em controle e na presença do DHPG (10 μM). ACSF contendo 1.2 mM de Ca^{+2} e 1.8 mM de Mg^{+2} . Detalhe: Parte do registro expandido na escala horizontal mostrando dois EPSP-AP e entre eles uma falha pós-sináptica (indicada pela seta preta). **B.** Efeito do DHPG na frequência de falhas pós-sinápticas ao longo de um experimento. DHPG (10 μM) foi adicionado no tempo indicado pela barra preta **C.** Redução da frequência de falhas em 5 experimentos independentes. (Adaptado de Alhadas et al, 2019)

2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

Neurônios do MNTB expressam receptores mGlu do Grupo I, mas os mecanismos biofísicos que são ativados por estes receptores e o seu papel nas propriedades do MNTB são apenas parcialmente compreendidos. A dependência de temperatura de correntes de membrana pode elucidar mecanismos subjacentes, mas descrições prévias dos efeitos de receptores mGlu-I no MNTB foram realizadas na temperatura ambiente. Assim é importante saber como estes receptores funcionam em temperaturas mais próximas das condições fisiológicas. A sinapse formada entre o cálice de Held e os neurônios do MNTB expressa muitos tipos de receptores ligados à proteína G, no entanto a importância de muitos destes receptores diminui durante o desenvolvimento pós-natal e a redução na sua expressão coincide com o início da audição. Para determinar se os efeitos dos receptores mGlu do Grupo I descritos em animais neonatos persiste ao longo do desenvolvimento e na idade adulta, eles devem ser avaliados em animais mais velhos. A ativação de receptores mGlu-I aumenta o *sag* despolarizante em neurônios do MNTB, mas ainda falta uma demonstração direta do incremento da condutância da corrente *h*. Finalmente, é importante saber em quais condições estes receptores são ativados pelo glutamato endógeno que é liberado durante a neurotransmissão em alta frequência nesta sinapse. Abordaremos estas questões por meio dos seguintes objetivos específicos.

1. Determinar a dependência de temperatura da corrente mGlu-I;
2. Medir a amplitude da corrente gerada pela ativação de receptores mGlu-I em camundongos de diferentes idades (P8, P15, P30, P42, P56 dias e 9 meses);
3. Avaliar o *sag* despolarizante e a condutância de membrana em animais juvenis durante a despolarização da membrana causada pela ativação de receptores mGlu-I.
4. Identificar se as mudanças no *sag* são causadas por ativação de canais HCN;
5. Calcular o valor do potencial de reversão para a I_h em neurônios do MNTB;
6. Caracterizar a modulação que os receptores mGlu-I efetuam sobre parâmetros da condutância da corrente *h* (G_{max} , $V_{1/2}$, K).
7. Identificar alterações no potencial de repouso e no complexo EPSP/AP em neurônios do MNTB, ao inibir receptores mGlu-I durante estimulação em alta frequência.
8. Apontar possíveis alterações pré-sinápticas causadas pela ativação endógena de receptores mGlu-I durante estimulação em alta frequência.

3. METODOLOGIA

3.1 Animais

Experimentos foram realizados em neurônios do MNTB localizados em fatias do tronco encefálico, obtidas de camundongos C57BL/6 ou de camundongos CBA/CaJ. Para estudar possíveis mudanças ao longo do desenvolvimento, foram definidos grupos experimentais em diferentes faixas etárias que variaram entre 8 e 60 dias (C57Bl/6) e entre 5 e 9 meses (CBA/CaJ).

Os animais C57BL/6 de ambos os sexos foram fornecidos pelo Centro de Bioterismo (CEBIO) do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), quando necessário os animais foram mantidos no biotério de experimentação do Departamento de Fisiologia e Biofísica, acondicionados em mini-isoladores, em ciclo claro/escuro de 12/12 horas em temperatura controlada (22-24°C) e com livre acesso a ração e água. Os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Uso de Animais (CEUA) da UFMG, no protocolo No. 159/2015.

Animais CBA/CaJ de ambos os sexos foram fornecidos por *The Jackson Laboratory* e foram mantidos no biotério ao cuidado de veterinários do Departamento de Medicina Comparada do *Oregon Health and Science University* (OHSU). Todos os procedimentos feitos neste estudo foram aprovados pelo Comitê Institucional de Cuidado e Uso de Animais da OHSU, no protocolo No. TR01_IP00000637.

3.2 Obtenção de fatias

Os registros foram feitos em neurônios principais do Núcleo Medial do Corpo trapezóide (MNTB) presentes em cortes coronais do tronco encefálico (170 – 200 μm), de camundongos (machos e fêmeas). Os animais foram profundamente anestesiados com isoflourano e em seguida decapitados, o cérebro foi removido rapidamente e submerso em Fluido Cérebro Espinhal artificial (aCSF, do inglês *artificial Cerebro Spinal Fluid*) gelado e borbulhado com mistura gasosa de “carbogênio” contendo 5%CO₂/95%O₂. O aCSF para corte continha (em mM): NaCl (125), KCl (2.5), CaCl₂ (0.1), MgCl₂ (3), NaHCO₃ (25), NaH₂PO₄ (1.25), Glicose (25), Ácido ascórbico (0.4), Piruvato de sódio (2) e Myo-inositol (3). O bloco de cérebro contendo a região de interesse foi colado com adesivo à base de cianoacrilato, dentro da câmara de fatiamento sobre o

prato magnético do micrótomo de lâmina vibratória (*VT1000S ou VT1200S; Leica*). A câmara foi preenchida com aCSF para corte gelado. Fatias contendo o MNTB foram obtidas e logo incubadas a 37°C durante 45 min em aCSF para registro. O aCSF para registro foi idêntico ao aCSF para corte, exceto pelas concentrações de CaCl₂ e MgCl₂ que foram 2 mM e 1 mM, respectivamente. Excepcionalmente para os registros de estimulação das fibras aferentes a concentração do CaCl₂ foi 1.2 mM. Ambos os tipos de aCSF foram borbulhados com carbogênio. Nessas condições apresentaram pH de 7.3 – 7.4. Depois as fatias foram mantidas na temperatura ambiente (25 ± 1°C) por no máximo 5 horas ou até serem usadas para os registros.

Para os experimentos as fatias foram transferidas para a câmara de registro no setup de eletrofisiológica e perfundidas com aCSF para registro num fluxo constante de 2.0 – 2.5 mL/min utilizando uma bomba peristáltica (*Pharmacia Biotech Pump P-1*). Os registros foram feitos na temperatura fisiológica (33 – 34 °C) usando um aquecedor de soluções (modelo TC-324C, *Warner Instruments*). As fatias foram observadas usando objetivas de 4x e 40x da Olympus, esta última de imersão, e iluminação de contraste diferencial (DIC) infravermelho no microscópio Modular MRK100 (Siskiyou, Oregon, USA); captadas através da câmara acoplada IR-1000 (DAGE-MTI, Indiana, USA) e visualizadas no PC usando o software ENLTV-FM3 (Encore Electronics, USA).

Os sais e fármacos utilizados foram obtidos das companhias Sigma Chemical Company (St. Luis, MO, EUA) e Tocris (EUA).

3.3 Registros eletrofisiológicos

Todos os registros no MNTB foram feitos na configuração *Whole-cell*, nas modalidades *voltage-clamp* e *current-clamp* usando os amplificadores Axopatch 200, Multiclamp 700B (ambos da Axon Instruments, Califórnia, USA) ou EPC-9 (HEKA Elektronik, Lambrecht, Germany). Para os registros foram usados dois tipos de capilares, capilares de vidro (Patch Clamp Glass, PG52151-4, World Precision Instruments) transformados em micropipetas usando um estirador vertical de pipetas de dois estágios (PP830 Narishige, Tokyo, Japan) ou capilares de vidro de borosilicato padrão (WPI) transformados em micropipetas usando estirado de pipetas horizontal P97 (Sutter Instruments). As pipetas foram cobertas com cera dental e preenchidas com solução interna contendo (em mM): gluconato de potássio (125), KCl (20), fosfocreatina

de Na₂ (10), EGTA (0.5), HEPES (10), MgATP (4) e Na₂GTP (0.3). Para os experimentos de estimulação das fibras aferentes a solução interna continha (em mM): gluconato de potássio (130), KCl (20), fosfocreatina de Na₂ (5), EGTA (5), HEPES (10), MgATP (4) e GTP (0.5), com pH ajustado em 7.3 com KOH. Quando preenchidas com a solução interna e imersas no aCSF de registro as pipetas apresentavam resistência entre 2.0 e 4.0 MΩ. O potencial de junção líquido (-9 mV ou -15 mV, em registros de estimulação das fibras aferentes) foi corrigido imediatamente antes que a ponta da pipeta tivesse contato com a membrana celular. Unicamente registros com resistência em série < 20 MΩ foram incluídos nas análises.

Para ativar os receptores metabotrópicos de glutamato do Grupo I foi usado o agonista seletivo (*S*)-3,5-Dihydroxyphenylglycine hydrate (DHPG). Esta droga apresenta afinidade similar para as duas isoformas do Grupo I, mGlu1 e mGlu5 (EC₅₀: 6 μM e 2 μM, respectivamente), enquanto não tem efeito sobre outros receptores mGlu dos Grupos II e III (Schoepp et al., 1999; Acher, 2011). Previamente, determinamos que o EC₅₀ deste agonista para gerar despolarização em neurônios do MNTB é de 0.8 μM e que a concentração de 10 μM é suficiente para gerar o efeito máximo (Bernal-Correa, 2016) (Figura 5B) assim, a concentração padrão usada para estes experimentos foi de 10 μM.

Foram usados antagonistas para as duas isoformas dos receptores mGlu-I. Para mGlu5, 2-Methyl-6-(phenylethynyl) pyridine hydrochloride (MPEP, 10 μM) e 2-Chloro-4-((2,5-dimethyl-1-(4-(trifluoromethoxy) phenyl)-1H-imidazol-4-yl)ethynyl)pyridine (CTEP, 30 μM). Para mGlu1, (*S*)-(+)-α-Amino-4-carboxy-2-methylbenzeneacetic acid (LY367385, 100 μM) e 3,4-Dihydro-2H-pyrano[2,3-b]quinolin-7-yl)-(cis-4-methoxycyclohexyl)-methanone (JNJ16259685, 500nM).

Para observar a ação endógena do glutamato sobre os receptores mGlu-I foi adicionada à perfusão o inibidor de transportadores do glutamato *DL-threo-β-Benzyloxyaspartic acid* (DL-TBOA, 200 μM). Nestes experimentos, receptores AMPA e NMDA foram bloqueados usando, *DL-2-Amino-5-phosphonopentanoic acid*, (AP5 50 μM) ou *5S,10R*-(+)-5-Methyl-10,11-dihydro-5H-dibenzo[*a,d*]cyclohepten-5,10-imine maleate (MK801 20 μM) e *6-Cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione disodium salt hydrate* (CNQX 20 μM) e *1,2,3,4-Tetrahydro-6-nitro-2,3-dioxo-benzo[*f*]quinoxaline-7-sulfonamide disodium salt hydrate* (NBQX 20 μM). Quando indicado nas figuras, bloqueadores para receptores

ionotrópicos glicinérgicos (estricnina, 0.5 μM) e GABAérgicos (SR95531, 10 μM) foram adicionados no banho.

Para bloquear canais HCN foi usado o fármaco ZD7288 (*4-Ethylphenylamino-1,2-dimethyl-6-methylaminopyrimidinium chloride*) (10 μM , incluído na solução de pipeta). Todas as drogas foram mantidas sob refrigeração, até serem adicionadas à perfusão do aCSF de registro ou à solução interna.

3.4 Condutância e *sag* da membrana

O método para medir a condutância e o *sag* despolarizante da membrana consistiu em fazer registros em *current-clamp* aplicando um pulso hiperpolarizante (duração de 200 - 400 ms) de amplitude variável. A amplitude do pulso escolhida para cada célula, em cada condição, foi aquela que gerou uma hiperpolarização com pico entre -110 e -120 mV, isto com o intuito de analisar a amplitude do *sag* (Figura 1Bi) em voltagens semelhantes na mesma célula.

A condutância corresponde com o inverso da resistência de entrada, assim:

$$R_{in} = \frac{\Delta V}{\Delta I} \quad \text{Eq. 3}$$

$$G_{in} = \frac{1}{R_{in}} \quad \text{Eq. 4}$$

Onde, R_{in} é a resistência de entrada, ΔV a variação de voltagem gerada pela amplitude do pulso de corrente aplicado (ΔI) e G_{in} é a condutância.

Os valores do potencial de membrana durante injeção de corrente foram corrigidos pela resistência em série,

$$Vm_{corr} = Vm - (I \cdot R_s) \quad \text{Eq. 5}$$

Onde, Vm indica o valor de voltagem gravado no registro, I é a corrente aplicada no pulso e R_s a resistência em série.

O *sag* foi medido como a diferença entre a voltagem nos últimos 20 ms do pulso e a voltagem no pico da hiperpolarização (Figura 2Bi).

3.5 Protocolo para correção do Vm durante a despolarização por DHPG.

Para avaliar se a variação do *sag* dependia da despolarização da membrana durante a ativação de receptores mGlu-I com DHPG, utilizamos um protocolo para corrigir o potencial de repouso e o pico da hiperpolarização. Prévio à aplicação de

DHPG, foi observado o valor do potencial de repouso e do pico da hiperpolarização. Durante a aplicação de DHPG, aplicamos uma corrente negativa constante com amplitude suficiente para restaurar o potencial de repouso ao valor registrado na condição controle. Ao mesmo tempo, a amplitude do degrau de corrente hiperpolarizante foi ajustado para garantir que o valor do pico da hiperpolarização na presença do DHPG aproximava-se ao valor observado em condições controle.

3.6 Estabelecimento do potencial de reversão da I_h no MNTB

O potencial de reversão foi medido usando o método descrito por Bayliss et al. (1994) e por Funahashi et al. (2003). Em registros em *voltage-clamp* ($V_{hold} = -60$ mV) foi aplicado um protocolo de ativação, que consta de pulsos de voltagem entre -110 e -60 mV (1 s), seguido de um protocolo de desativação que consta de um prepulso a -110 mV com duração de 2 s e imediatamente depois pulsos a diferentes voltagens entre -110 e -60 mV durante 1 s. Os dados da corrente na fase instantânea (I_{in}) obtidos dos protocolos de ativação e inativação foram plotados num gráfico I vs. V. Para cada célula os dados de cada protocolo foram ajustados a uma reta e o ponto de interseção entre as duas retas foi considerado como o potencial de reversão para a I_h .

3.7 Condutância dos canais HCN no MNTB

Para determinar a condutância dos canais HCN em diferentes potenciais de membrana foi usada a seguinte equação:

$$G = \frac{I}{(V_{corr} - E_{rev})} \quad Eq. 6$$

Onde, I corresponde à amplitude da corrente ($\Delta I_h = I_{ss} - I_{in}$) em determinada voltagem (V_{corr}) e E_{rev} é o potencial de reversão da I_h . V_{corr} representa o valor real da voltagem aplicada ao ser corrigida pela resistência em série (Rs) (Eq.5)

$$V_{corr} = V_{cmd} - (I \cdot Rs) \quad Eq. 7$$

Os valores de condutância em cada voltagem para cada célula foram ajustados a equação de Boltzmann,

$$G_{HCN} = \frac{G_{max}}{1 + \exp\left[\frac{V - V_{1/2}}{K}\right]} \quad Eq. 8$$

Onde, G_{max} é a condutância máxima, $V_{1/2}$ a voltagem que ativa 50% da condutância máxima e K o fator que determina a inclinação da curva e está relacionado com a sensibilidade do canal à voltagem.

3.8 Estimulação das fibras aferentes

Um eletrodo de estimulação de tungstênio foi colocado sobre as fibras aferentes na região contralateral da posição da pipeta de registro (Figura 3B). Estímulos de voltagem (1-15 V) com duração de 70 μ s foram aplicados através de um estimulador de voltagem isolado (modelo DS2A; Digitimer) controlado diretamente pela interface Patchmaster. Para identificar células responsivas, uma pipeta preenchida com aCSF de registro foi pressionada sobre o neurônio para obter um selo de ~ 10 M Ω . A presença de uma deflexão negativa após o artefato de estimulação (intervalo entre 0.7 – 1.2 ms) era considerado como indicativo de uma célula conectada e adequada para o registro. O limiar foi medido para cada célula, e a intensidade do estímulo ajustado para 1.5 - 2.0 vezes o limiar. Após identificar o neurônio conectado, continuou-se com o procedimento para fazer registro em *whole-cell current-clamp*. Os neurônios foram estimulados com cinco repetições de 50 pulsos em frequência de 10, 100 e 500 Hz nas condições controle, durante inibição de receptores mGlu-I e durante a lavagem. O intervalo entre cada repetição foi de 20 - 25 segundos. Para registrar as mudanças do potencial membrana ao longo de todo o experimento trens de 50 estímulos em 500Hz com intervalo de 30 segundos foram aplicados durante a perfusão dos bloqueadores e posteriormente durante a lavagem.

3.9 Amplitude do EPSP e mEPSP

Devido a cinética rápida do potencial de ação em temperaturas próximas aos valores fisiológicos (33 – 34 °C) a separação dos componentes do complexo EPSP/AP é necessária para determinar a amplitude de cada EPSP. Desta forma cada trem de 50 estímulos foi diferenciado e a sua primeira derivada (dVm/dt) foi plotada ao longo do tempo. O EPSP' correspondeu com o primeiro pico após cada artefato de estimulação (Figura 8A e 8B) e assim a amplitude do EPSP' correspondeu ao valor máximo do dVm/dt. A amplitude do EPSP₁' e EPSP_{ss}' (últimos cinco eventos do trem 46-50) corresponde aos valores medidos em cinco trens de estímulo. Este método já tem sido

implementado por outros grupos para separação entre eEPSP e AP (Lorteije et al., 2009; Geng-Lin et al., 2014). Para validar o método comparamos o eEPSP' (V/s) com o eEPSP (mV) durante falhas pós-sinápticas. As amplitudes dos eEPSP foram corrigidas pela somação não linear assumindo o potencial de reversão para a corrente sináptica em 0 mV, assim:

$$eEPSP_{corr} = \frac{eEPSP}{1 - \left(\frac{eEPSP}{Vm_{rest}}\right)} \quad Eq. 9$$

Onde Vm_{rest} é o potencial de repouso da membrana. O eEPSP' foi correlacionado com os valores eEPSP corrigidos pela somação linear (Figura 8Di). Da mesma forma o mEPSP' teve uma forte correlação com mEPSP (Figura 8Dii). Prévio a esta análise, o ruído foi reduzido com 10 passos de um filtro binomial (Marchand & Marmet, 1983) usando a função “smooth” do programa Igor Pro.

Para calcular o conteúdo quântico pelo método direto (Eq. 2) utilizamos o valor máximo de dVm/dt de mEPSPs identificados como descrito a seguir. Os eventos identificados como sendo uni-quânticos e que utilizamos para medir o conteúdo quântico foram medidos sem o uso de tetrodotoxina ou outro tratamento para bloquear potenciais de ação. Por este motivo, seria mais correto chamar esses eventos de espontâneos. Contudo, estudos prévios têm mostrado que em neurônios principais do MNTB a amplitude dos sEPSC medidos sem TTX não é diferente da amplitude dos mEPSP medidos com TTX (Ishikawa et al., 2002; Yamashita et al., 2003). Estes eventos miniaturas foram identificados nos registros usando uma rotina no programa Igor que foi gentilmente cedida pelo Dr. Taro Ishikawa (Departamento de farmacologia, Universidade Jikei de Medicina). De cada célula foram analisados 150 eventos miniaturas em cada condição (Ctrl e na presença dos bloqueadores para receptores mGlu-I). A amplitude dos mEPSP foi corrigida pelas diferenças no potencial de repouso,

$$mEPSP_{corr} = mEPSP \cdot \left(\frac{Vm_{Ctrl}}{Vm_{mEPSP}}\right) \quad Eq. 10$$

Onde, Vm_{Ctrl} foi o valor do potencial de repouso da membrana prévio aplicação dos bloqueadores e Vm_{mEPSP} é o valor de potencial de membrana logo antes de cada evento.

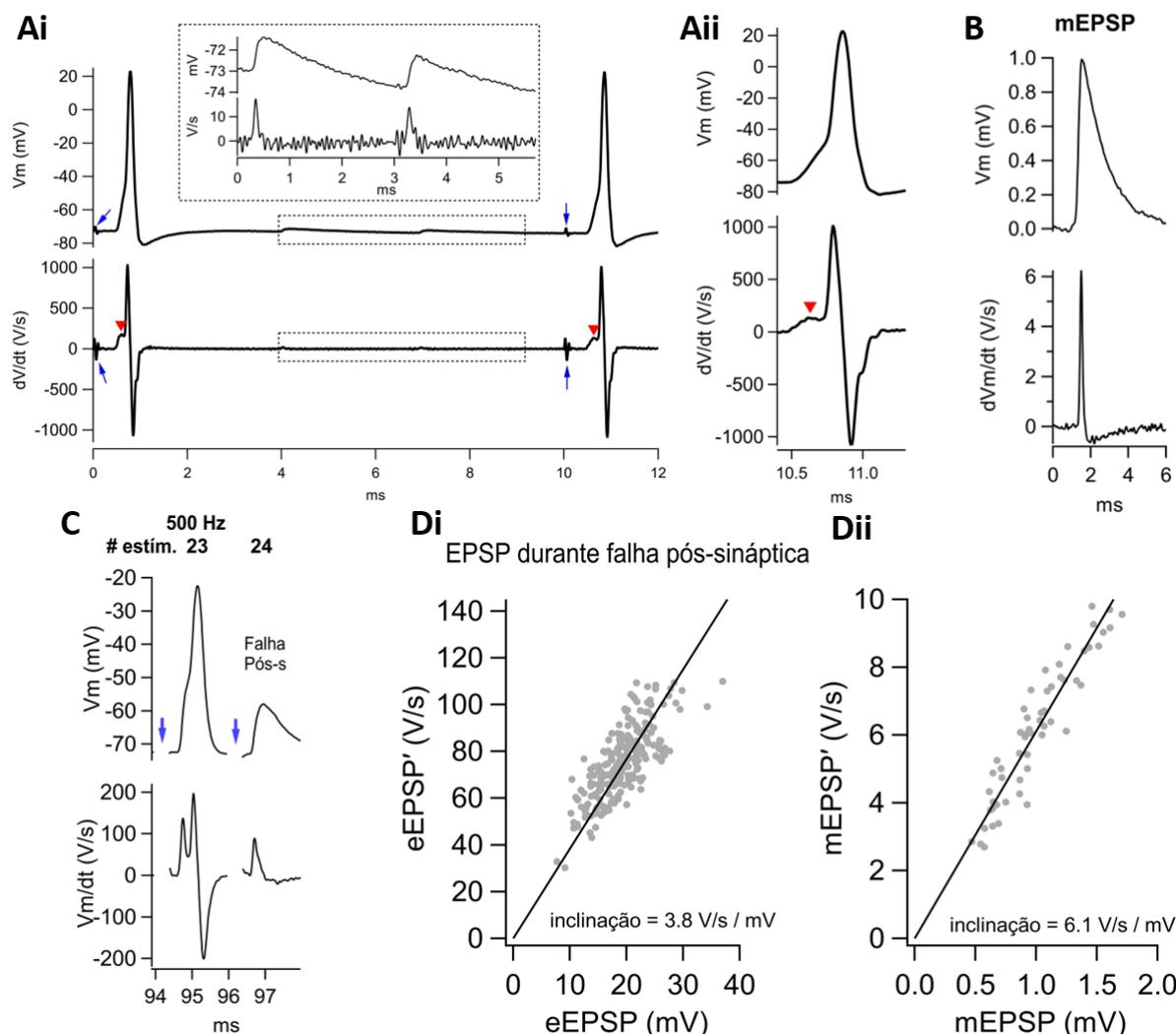


Figura 8. Método para analisar a amplitude dos EPSPs'. **Ai.** Traçado superior, segmento de registro do potencial de membrana de um neurônio do MNTB. A fibra aferente foi estimulada a 100 Hz gerando o complexo EPSP-AP logo após do artefato do estímulo (seta azul). Traçado inferior, derivada do potencial de membrana dV_m/dt . O ponto máximo de dV_m/dt durante o EPSP está marcado com a ponta de seta vermelha. Detalhe: ampliação de dois mEPSP registrados no intervalo entre os complexos EPSP-AP, mostrados como variação de V_m (superior) e dV_m/dt (inferior) **Aii.** Exemplo do complexo EPSP-AP em maior aumento. **B.** Amplitude média de 50 mEPSP e seu correspondente valor máximo do dV_m/dt . **C.** Traçado representativo mostrando a resposta do neurônio do MNTB a dois estímulos consecutivos em 500 Hz. O estímulo #24 causou falha pós-sináptica (falha pós-s) sendo possível avaliar a amplitude absoluta do eEPSP (mV) e correlacioná-lo com o dV_m/dt máximo (V/s). O artefato de estimulação foi removido (seta azul) **D.** Correlação dos valores absolutos da amplitude (mV) de eEPSP (**Di**) ou mEPSP (**Dii**) com os correspondentes valores máximos do dV_m/dt (eEPSP' ou mEPSP'). Em **Di** os valores de eEPSP foram corrigidos pela somação no linear.

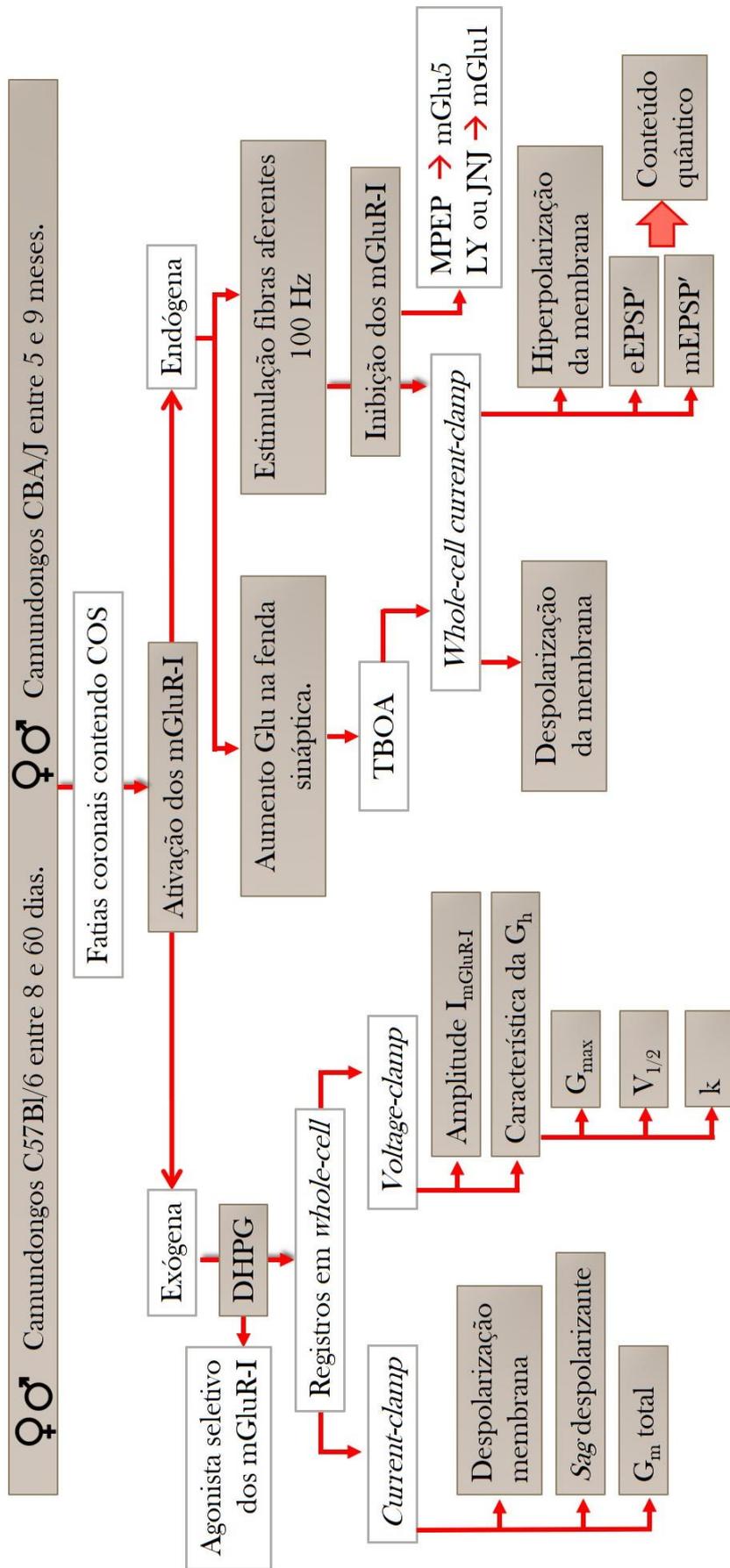
3.10 Aquisição de dados e análises

Registros em *whole-cell current-clamp* e *voltage-clamp* correspondentes as Figuras 9 a 14 foram obtidos usando um amplificador Axopatch 200 e Figura 15 usando o amplificador Multiclamp 700B (ambos da Axon Instruments, Califórnia, USA). Os sinais foram filtrados a 5kHz usando o filtro interno do Axopatch, e digitalizados a 40 kHz usando um conversor análogo-digital (Digidata 1322A, Molecular Devices) gerenciado pelo software WinWCP e WinEDR (Strathclyde Electrophysiology Software, gentilmente fornecido pelo John Dempster, University of Strathclyde). Registros em *current* e *voltage-clamp* correspondentes as Figuras 16 a 23 foram obtidos usando um amplificador HEKA EPC-9 controlado pelo software Patchmaster software (HEKA) e os sinais foram filtrados a 2.9 kHz. Todos os sinais foram digitalizados numa taxa mínima de 50 kHz. Os dados foram analisados com os programas *Clampfit* (Version 10) e Igor Pro 7 (Wavemetrics, Lake Oswego, OR, USA).

Durante os registros em *voltage-clamp*, o potencial de membrana foi mantido em -60 mV. A amplitude de corrente gerada pela ativação de receptores mGlu-I (I_{mGlu-I}) foi calculada como a diferença entre a média da corrente na presença de DHPG e antes da sua aplicação.

Uma fatia foi usada para apenas um experimento. As análises estatísticas foram feitas no software GraphPad Prism versão 8 para Windows. Os gráficos foram construídos no Prism ou no Igor e os traçados representativos foram recriados no Igor. Os resultados foram apresentados como valor da média \pm Erro padrão da média (S.E.M). A análise foi baseada na comparação dos valores da média da corrente induzida por DHPG em condições controle vs. a corrente induzida por DHPG após tratamento com bloqueadores. A normalidade dos dados foi avaliada com o teste ShapiroWilk ($\alpha < 0.05$). O nível de significância estatística foi estabelecido em $p < 0.05$ e foi indicado nas figuras pelos asteriscos (* $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, *** $p < 0.001$). A estatística utilizada para avaliar dois grupos foi o teste t de *Student* (pareado e não pareado, dependendo dos grupos). Para comparar três ou mais grupos foi usado o ANOVA *one-way* seguido pelo teste de comparações múltiplas de Tukey. Os resultados foram apresentados como valor da média para cada um dos experimentos.

Tabela 2: Abordagem metodológica



4. RESULTADOS

4.1 Impacto da temperatura na corrente mGlu-I

Como descrito na introdução, ativação de receptores mGlu-I no MNTB gera uma corrente de entrada (despolarizante) que é sensível aos íons Ba^{2+} e a ZD7288, sugerindo a participação de canais para K^+ do tipo retificadores de entrada e canais HCN. Contudo, os receptores mGlu-I podem gerar efeitos excitatórios através de outros diversos mecanismos, incluindo a ativação de bombas trocadoras e transportadores (Correa et al., 2017). Para identificar melhor esta corrente, nós caracterizamos a sua sensibilidade às mudanças de temperatura. Estes experimentos foram desenvolvidos por dois motivos. Primeiro, a sensibilidade de uma corrente a temperatura pode prover informação sobre os mecanismos subjacentes, já que o movimento de um íon por eletrodifusão em um canal é um processo com sensibilidade à temperatura relativamente pequena quando comparado com proteínas transportadoras ou bombas trocadoras. Segundo, porque por motivos técnicos muitos experimentos prévios sobre os receptores mGlu-I no MNTB foram feitos na temperatura ambiente (≈ 25 °C). Para compreender o papel destes receptores nas condições fisiológicas, nós consideramos importante medir os efeitos numa temperatura próxima à temperatura corporal.

Quando DHPG foi aplicado aos neurônios do MNTB de camundongos P30 na temperatura 33-34 °C, observamos uma corrente de entrada que foi completamente revertida durante a lavagem da droga do banho (Figura 9A). A amplitude da corrente evocada pelo DHPG nestas condições foi similar aos valores registrados em 25 °C (Figura 9B; RT, $I_{mGlu-I} = -42.8 \pm 8.9$ pA vs. PT, $I_{mGlu-I} = -54.6 \pm 8.7$, $p=0.38$). Suportados nestes dados, concluímos que i) a corrente evocada pela ativação de receptores mGlu-I com DHPG está presente na temperatura fisiológica e ii) a baixa sensibilidade da corrente a mudanças de temperatura favorece a hipótese de que os efeitos causados pela aplicação do DHPG são mediados por canais iônicos mais que por trocadores ou bombas iônicas.

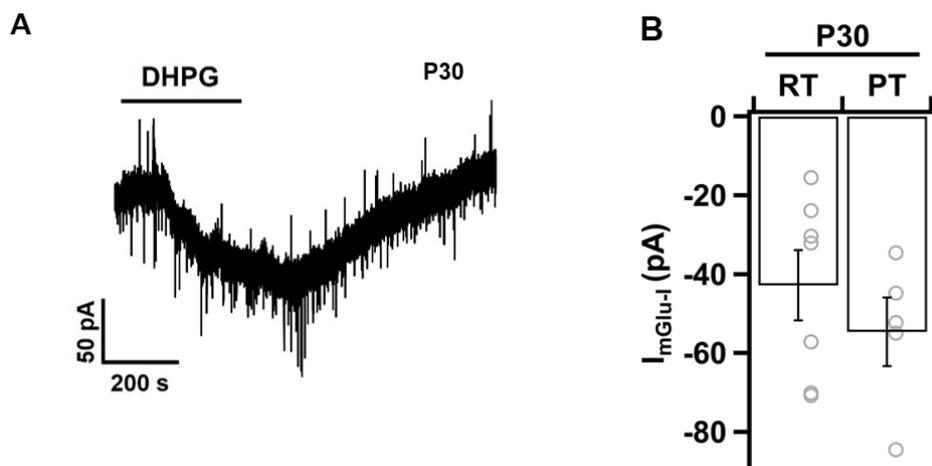


Figura 9. *A* I_{mGlu-I} em neurônios do MNTB é pouco sensível à temperatura. *A.* Traçado representativo da corrente de entrada gerada pelo DHPG ($10 \mu M$) em neurônios de camundongo de 30 dias a $33-34^{\circ}C$. *B.* A magnitude da corrente evocada por DHPG é similar quando registrada na temperatura de $25 - 26^{\circ}C$ (RT) ou em temperaturas próximas do valor fisiológico (PT, $33 - 34^{\circ}C$) ($P = 0.38$). $V_{m_{hold}}$: $-60 mV$. Teste t não pareado.

4.2 Corrente mGlu-I em diferentes estágios de desenvolvimento

A segunda questão relacionada à importância fisiológica da corrente mGlu-I se relaciona a sua expressão em diferentes estágios de desenvolvimento. Outros tipos de receptores metabotrópicos são fortemente expressos em neurônios do MNTB ou no CoH no momento do nascimento ou logo depois. No entanto, para muitos desses tipos de receptores, sua expressão diminui durante o desenvolvimento pós-natal. Estes incluem os receptores mGlu dos grupos II e III (Barnes-Davies & Forsythe, 1995; Takahashi et al., 1996; Elezgarai, et al., 1999; Elezgarai et al., 2001; Renden et al., 2005), receptores $\alpha 2$ adrenérgicos (Leão & von Gersdorff, 2002) e receptores serotoninérgicos 5-HT1 (Mizutani et al., 2006). Para determinar se os receptores mGlu-I são funcionalmente expressos em camundongos C57Bl/6, desenvolvemos experimentos similares no MNTB de animais de diferentes idades, até P56. Ainda que houve algumas variações em diferentes idades, o DHPG evoca de maneira consistente uma corrente em todas as idades testadas (Figura 10D; Tabela 3). Assim, ao contrário do que foi encontrado para o caso de receptores acoplados à proteína G mencionados acima, nós não observamos evidência de diminuição na funcionalidade de receptores mGlu-I em camundongos C57Bl/6. Da mesma forma, fizemos experimentos em camundongos CBA/CaJ entre 5-9 meses de idade obtendo resultados similares (estes serão descritos

na seção 4.5.1). Deste modo, os efeitos de receptores mGlu-I em neurônios principais do MNTB apresentam estabilidade ao longo do desenvolvimento desde o período pós-natal (P8) até a maturidade.

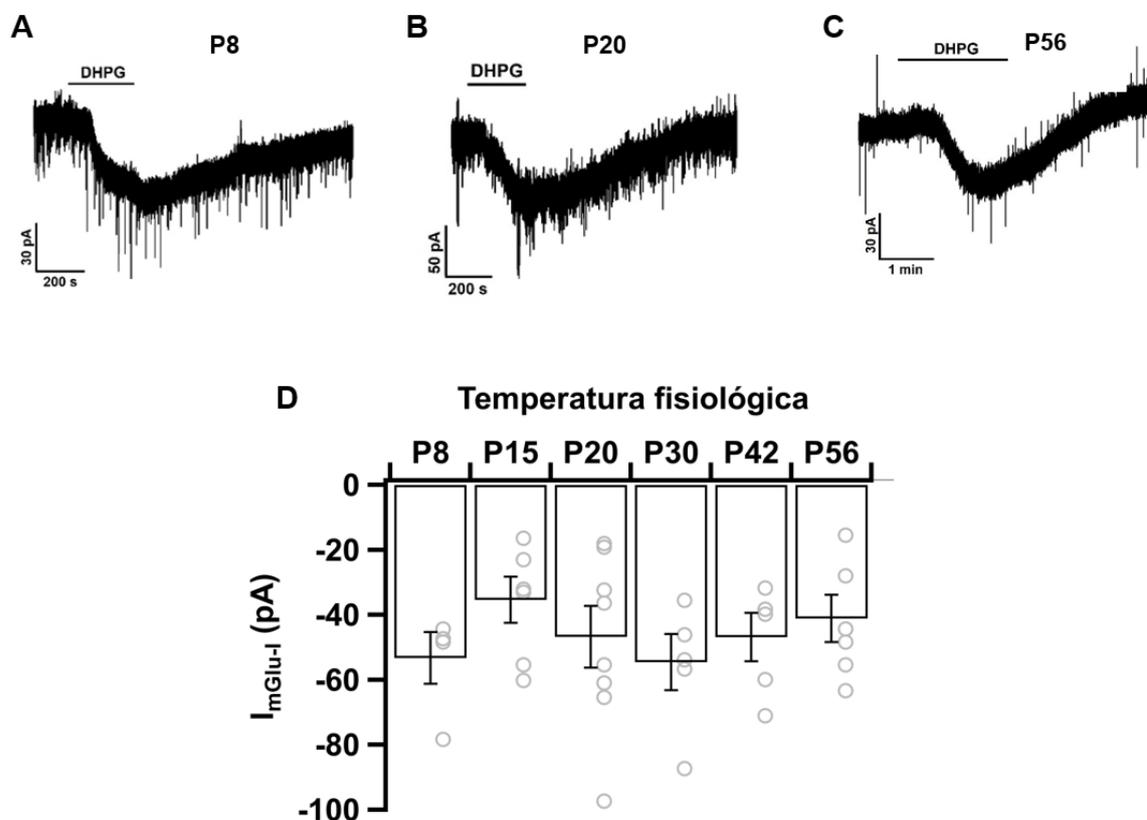


Figura 10. A I_{mGlu-I} em neurônios do MNTB é estável durante o desenvolvimento pós-natal. Traçados representativos da corrente de entrada (I_{mGlu-I}) registrados na temperatura de 33 – 34 °C em animais de 8 dias (A), 20 dias (B) ou 56 dias (C). D. A Corrente medida em neurônios de camundongos de 8, 15, 20, 30, 42 ou 56 dias não apresenta diferenças significativas ($F(5, 28)=0.682$; $p=0.641$). $V_{m_{hold}}$: -60 mV. Teste ANOVA.

Tabela 3 Efeitos do desenvolvimento na amplitude da I_{mGlu-I}

Idade (dias)	I_{mGlu-I} (pA)	N células/animais
8	-53.3 ± 8	4/2
15	-35.3 ± 7.1	6/6
20	-46.8 ± 9.5	8/3
30	-56.6 ± 8.7	5/3
42	-46.8 ± 7.4	5/2
56	-41.1 ± 7.3	6/4

Todos os registros foram feitos na temperatura 33 -34 °C

4.3 Ativação de receptores mGlu-I afeta as propriedades passivas da membrana.

Em seguida, examinamos os efeitos da ativação de receptores mGlu-I com DHPG no potencial de repouso e nas propriedades passivas da membrana de neurônios do MNTB mantidos em *current-clamp* ($I=0$). Foram observados três efeitos. Primeiramente, DHPG causa uma despolarização da membrana (Figura 11Ai, Detalhe). Este efeito, bem como seu impacto na reobase para a geração dos potenciais de ação tem sido descrito no MNTB de animais P8 registrados a 25 °C (Alhadas et al., 2019). Aqui, verificamos que estes efeitos persistem em camundongos P20, após o desenvolvimento pós-natal associado com o início da audição durante registros a 33-34 °C.

O segundo efeito causado pela presença do DHPG foi uma redução da condutância de membrana (Figura 11Aii; Ctrl: $G_m=5.74 \pm 0.46$ nS vs. DHPG: $G_m=4.97 \pm 0.46$ nS, $p=0.0005$), calculada como o inverso da resistência de entrada ($1/R_m$) medida durante injeção de corrente hiperpolarizante. Para medir a resistência de membrana, consideramos a diferença entre o pico da hiperpolarização, antes do início do *sag*, relativo ao potencial de repouso, em cada condição. O aumento na resistência de entrada causado pelo DHPG pode ser observado na Figura 10Ai como uma maior hiperpolarização para uma mesma intensidade de corrente negativa injetada, bem como um aumento da constante de tempo da membrana ($\tau=R_m \cdot C_m$). Neste exemplo específico, o pico da hiperpolarização obtido na condição controle coincidiu com o valor obtido na presença do DHPG, sem precisar ajustar a intensidade do pulso de corrente hiperpolarizante. Por tanto, a alteração da resistência de membrana não foi causada por uma diferença no potencial de membrana no ponto em que foi medido o ΔV_m . O aumento da resistência de entrada pode estar relacionado à sensibilidade da corrente mGlu-I aos íons Ba^{2+} porque, como mencionado na introdução, Ba^{2+} é conhecido por ser um inibidor de canais para K^+ retificadores de entrada.

O terceiro efeito do DHPG foi o incremento da despolarização lenta que segue uma hiperpolarização da membrana, efeito conhecido como *sag* despolarizante (Figura 11Aiii; Ctrl: *sag* = 11.67 ± 2.30 mV vs. DHPG: *sag* = 14.54 ± 2.62 mV, $p=0.0062$). A amplitude do *sag* foi medida como a diferença de voltagem entre o pico e o estado estacionário durante a hiperpolarização. O efeito da ativação de receptores mGlu-I no *sag* pode ser visto no exemplo mostrado na Figura 10Ai como a diferença no potencial de membrana no estado estacionário comparando as condições controle e DHPG.

Estes três efeitos da ativação de receptores mGlu-I, despolarização da membrana, aumento da resistência de entrada e incremento no *sag* foram observados essencialmente em todas as células testadas. Ainda que houve uma variação significativa nos valores controle de cada parâmetro assim como na magnitude da alteração induzida pelo DHPG, as diferenças foram estatisticamente significativas quando comparadas por meio do teste t de *Student* pareado.

Nós consideramos a possibilidade de que parte do efeito do DHPG na resistência de entrada e no *sag* poderia ser uma consequência indireta da despolarização da membrana. Para abordar esta questão, nós registramos as respostas das células a pulsos de corrente hiperpolarizante em três condições: i) controle, ii) durante ativação de receptores mGlu-I, e iii) injetando corrente negativa constante (≈ -40 pA) na presença do DHPG para restaurar o potencial de repouso para próximo dos valores na situação controle (Figura 11Bi). Na terceira fase destes experimentos, além da injeção negativa de corrente, a amplitude do pulso hiperpolarizante foi reduzida para manter constante o potencial do pico da hiperpolarização. Nestas condições, a resistência de membrana e o *sag* continuaram sendo maiores na presença do DHPG comparados com o controle (Figura 11Bii e Biii).

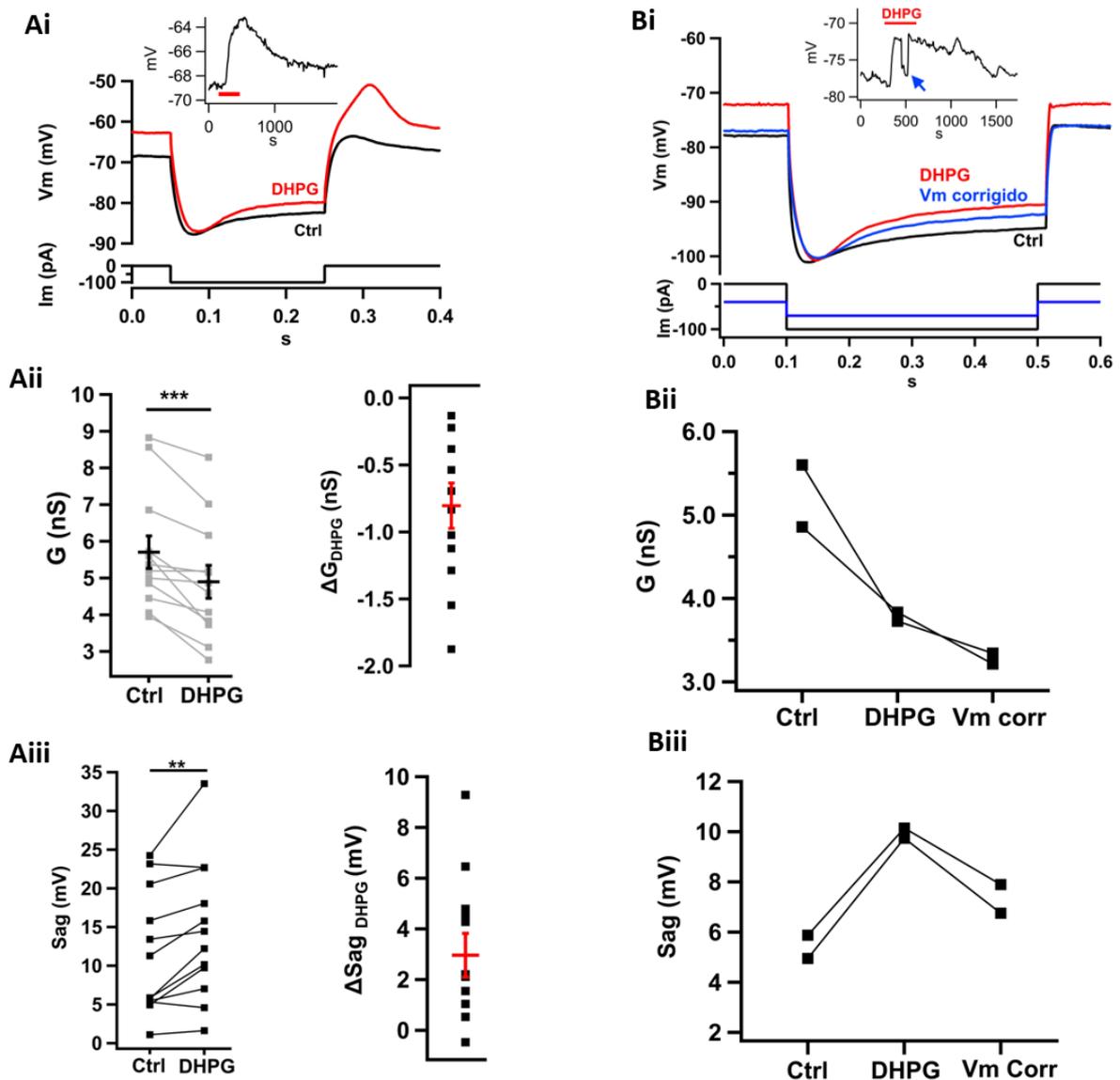


Figura 11. Ativação de receptores mGlu-I aumenta a resistência de entrada e o sag despolarizante. **Ai.** Registro da resposta da membrana à corrente hiperpolarizante (-100 pA) em neurônios de camundongos P20 a 33-34 °C, na condição controle (CTRL, traçado preto) e durante ativação de receptores mGlu-I (DHPG (10 μ M), traçado vermelho). Detalhe: potencial de repouso do neurônio, DHPG foi aplicado no tempo indicado pela barra vermelha. **Aii.** Efeito do DHPG na condutância de membrana. **Aiii.** Efeito do DHPG na amplitude do sag despolarizante. **Bi.** Registro da resposta da membrana a corrente hiperpolarizante na condição controle (CTRL, traçado preto), durante ativação de receptores mGlu-I (DHPG (10 μ M), traçado vermelho) e durante injeção adicional de corrente para restaurar o potencial de membrana a valores similares ao controle (traçado azul). Detalhe: potencial de repouso do neurônio, DHPG foi aplicado no tempo indicado pela barra vermelha. Na presença do DHPG o potencial de membrana foi restaurado por injeção de corrente ($I_m = 40$ pA) (seta azul) e o pulso de corrente hiperpolarizante foi ajustado para atingir valores semelhantes àqueles observados no pico da hiperpolarização. **Bii.** O DHPG reduz a condutância da membrana e esse efeito não foi revertido pela correção do potencial de membrana. **Biii.** O sag despolarizante aumenta na presença do DHPG e permanece aumentado durante a restauração do Vm. **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$, test t de Student pareado.

4.4 Receptores mGlu-I modulam a condutância I_h .

O *sag* despolarizante é atribuído à ativação de canais HCN de cinética lenta que são sensíveis ao ZD7288 (Mayer & Westbrook, 1983; Harris & Constanti, 1995; Leão et al., 2006). Previamente, nós demonstramos que parte da corrente evocada pelo DHPG podia ser inibida por ZD7288 (ver seção 1.4.3 introdução). Estas evidências sugerem que o DHPG pode afetar a amplitude do *sag* pelo aumento na atividade dos canais HCN. Para avaliar esta hipótese, primeiro verificamos que o *sag* medido nos neurônios é, de fato, dependente de canais HCN. Os neurônios foram perfundidos intracelularmente com ZD7288 e observamos que nestas condições, o *sag* é completamente abolido durante a hiperpolarização da membrana (Figura 12A e C). Estes resultados indicam que, como esperado, o *sag* nos neurônios do MNTB depende de canais HCN. Também observamos que durante o bloqueio dos canais HCN, o potencial de repouso (V_m) de células tratadas com ZD7288 não foi significativamente diferente de células controle (Figura 12B; Ctrl: $V_m = 69.8 \pm 1.8$ mV vs. ZD: $V_m = 67.4 \pm 3$ mV, $p=0.7$). ZD7288 também não alterou o efeito do DHPG na condutância da membrana (Figura 12Dii; sem ZD7288, $\Delta G_m = -0.76 \pm 0.16$ nS vs. na presença do ZD7288, $\Delta G_m = -0.92 \pm 0.48$ nS, $p=0.5$) e não alterou o tamanho da despolarização de membrana causada pelo DHPG (Figura 12Diii; DHPG sem ZD7288, $\Delta V_m = 5.8 \pm 0.9$ mV vs. DHPG na presença do ZD7288 $\Delta V_m = 5.4 \pm 1.3$ mV, $p=0.8$). Assim, fica evidente que existem múltiplos mecanismos contribuindo para os efeitos da ativação de receptores mGlu-I, alguns deles sensíveis e outros insensíveis ao ZD7288.

Para estudar os efeitos do DHPG nos canais HCN, realizamos registros na modalidade *voltage-clamp* medindo a amplitude e a dependência de voltagem da I_h (Figuras 13-14). Para medir I_h , usamos protocolos em *voltage-clamp* como mostrado na Figura 13Ai. As células foram mantidas em -60 mV e estimuladas com pulsos de voltagem entre -70 a -110 mV, iremos chamar a esta primeira parte do protocolo como as curvas de ativação (Figura 13Aii). Na segunda parte do protocolo, o potencial da membrana foi mantido em -110 mV durante 2 s para garantir a completa ativação dos canais HCN, logo a membrana foi restituída para potenciais entre -110 a 60 mV. Esta parte do protocolo será denominada como curvas de desativação (Figura 13Aiii).

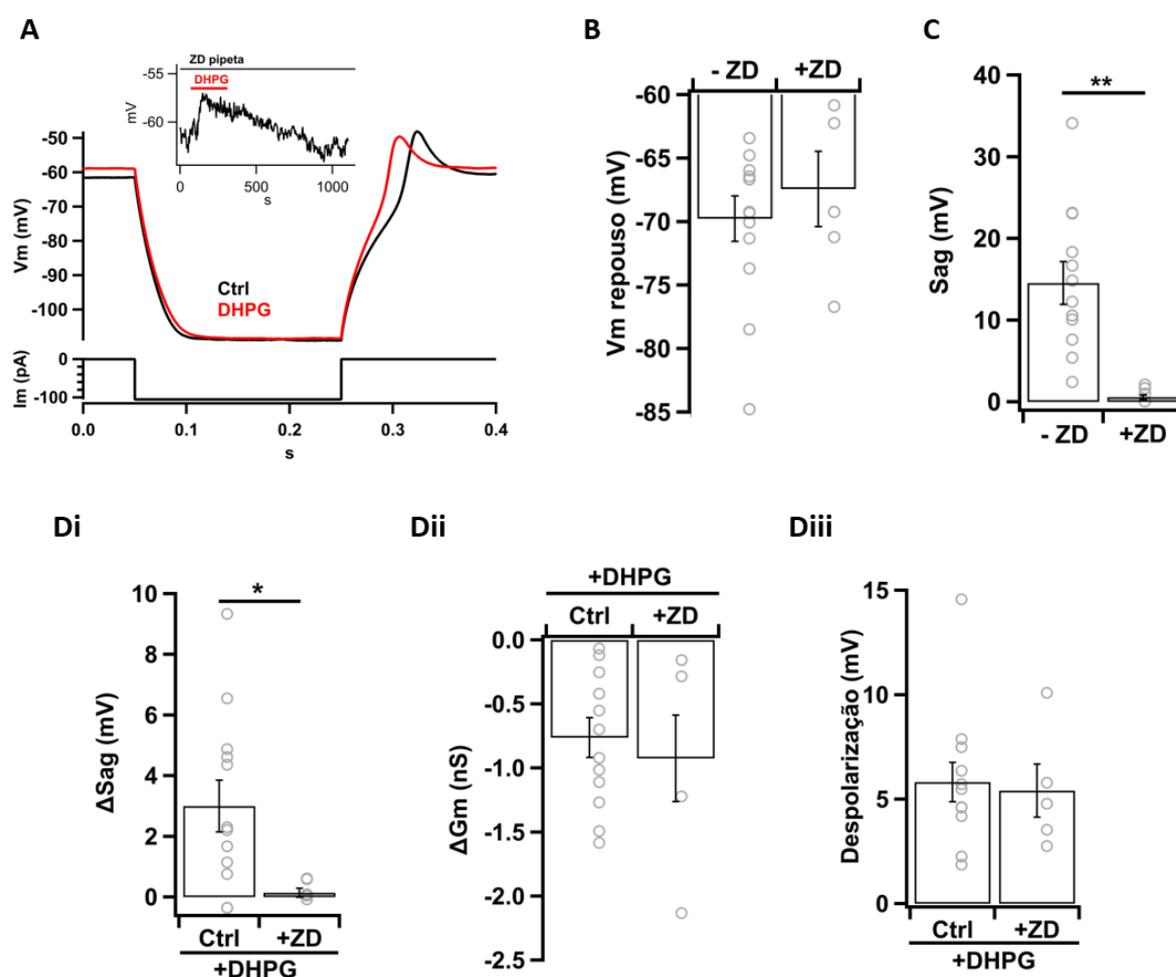


Figura 12. O inibidor de canais HCN elimina o sag despolarizante. **A.** Resposta da membrana ao pulso de corrente hiperpolarizante registrado na presença do ZD7288 (ZD, 10 μ M incluído na solução pipeta) na condição controle (traçado preto) ou durante o tratamento com DHPG (traçado vermelho). Detalhe: Potencial de repouso do neurônio. O DHPG foi aplicado no tempo indicado pela barra. **B.** Efeito do inibidor ZD no potencial de repouso dos neurônios do MNTB. **C.** Efeito do ZD no sag despolarizante. O bloqueador ZD7288 inibe o aumento do sag (**Di**) mas não afeta a diminuição da condutância da membrana (**Dii**) ou a despolarização do potencial de repouso causados pelo DHPG (**Diii**). *, $p \leq 0,05$; **, $p \leq 0,01$, teste t de Student não pareado.

As curvas de ativação foram medidas em dois pontos: i) no começo do traçado logo depois dos transientes capacitivos, e ii) no final do traçado, onde a corrente se encontra na fase estacionária. A primeira medida nos permite medir o vazamento passivo da membrana, e a diferença da corrente medida na fase estacionária e no primeiro ponto corresponde com a amplitude da I_h ativada pelo protocolo. As curvas de desativação foram medidas nos mesmos pontos e foram usadas para medir a corrente de cauda I_h . Isso permitiu estabelecer duas curvas I-V, uma para corrente de vazamento da membrana e outra para a soma da corrente de vazamento e a I_h . O ponto de

intersecção, entre estas duas relações, foi considerado como o potencial de reversão para a I_h (Figura 13B). O valor médio foi de -36 mV (Figura 13C), similar a outras estimativas (Banks et al., 1993; Cuttle et al., 2001; Leão et al., 2006; Khurana, et al., 2012).

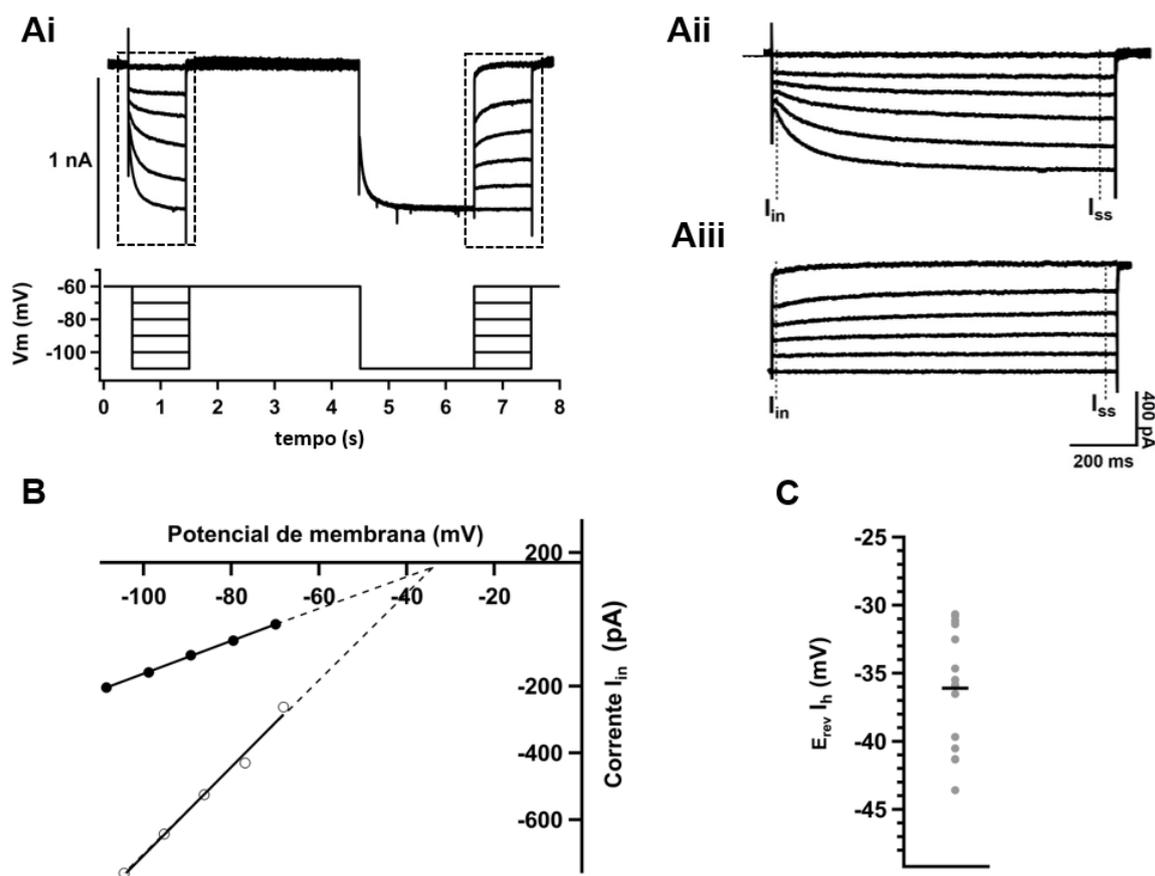


Figura 13. Determinação do potencial de reversão da I_h em neurônios no MNTB. **Ai.** Corrente de membrana registrada durante protocolos de ativação e de desativação da I_h . Para a ativação, foram aplicados pulsos quadrados de voltagem entre -110 e 60 mV com duração de 1 s. Em seguida, foi aplicado um pulso de -110 mV (durante 2 s) seguido por variações de voltagem entre -110 e -60 mV (1 s). **Aii** Detalhe das correntes obtidas durante a fase de ativação. **Aiii**, Detalhe das correntes obtidas na fase de desativação. **B.** Para determinar o potencial de reversão da I_h , ajustamos uma reta aos valores da corrente instantânea registrada em cada potencial durante a fase de ativação e de desativação. O ponto de intersecção entre as linhas determina o potencial de reversão da corrente I_h , que, para esta célula, foi $E_{rev} = -35$ mV. **C.** Valores do E_{rev} da I_h em neurônios do MNTB ($n = 14$), o valor médio (-36 ± 1.2 mV) está indicado pela linha preta. Registros feitos em neurônios de animais de $20 - 30$ dias na temperatura de $33-34$ °C

Usando as correntes medidas com os protocolos de *voltage-clamp* descritos acima junto com os dados do potencial de reversão, calculamos a condutância dos canais HCN e sua dependência de voltagem. Na situação controle e na presença do DHPG

a voltagem na qual foi ativada 50% da corrente ($V_{1/2}$) ocorre em -89.1 ± 1.8 mV e -88.2 ± 1.7 mV ($p=0.13$) respectivamente (Figura 14B), com um fator de inclinação (k) de 5.9 ± 0.5 mV no controle e 6.1 ± 0.7 mV com DHPG ($p=0.53$; Figura 14C). Portanto, o tratamento com DHPG não altera o ponto de ativação médio ou o fator de inclinação da curva de condutância da I_h . No entanto, DHPG causou um aumento significativo no valor de G_{max} de 6 ± 1.6 % (Ctrl, $G_{max} = 6.47 \pm 0.89$ nS vs. DHPG, $G_{max} = 6.80 \pm 0.90$ nS, $p=0.023$; Figura 14D).

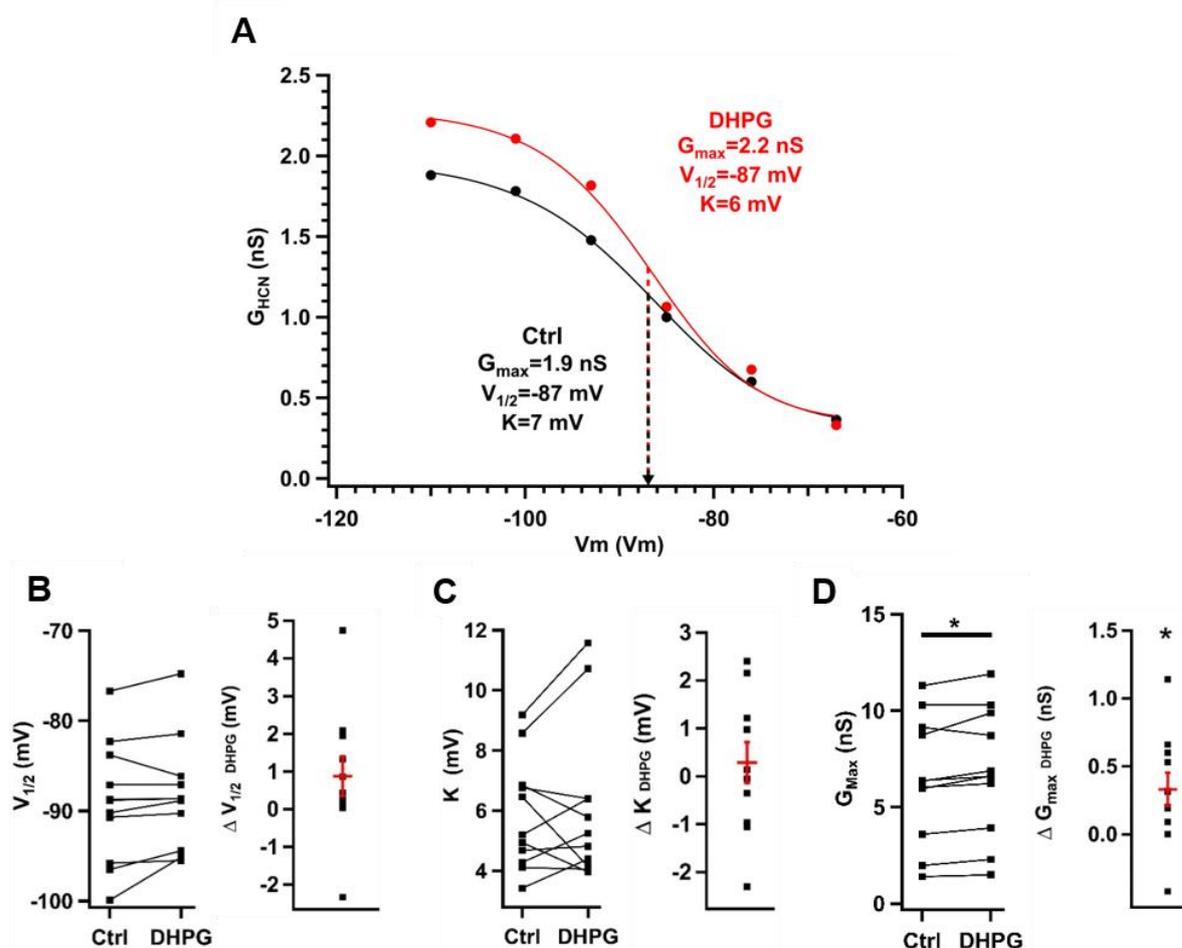


Figura 14. Ativação de receptores mGlu-I aumenta a condutância da I_h em neurônios do MNTB. A. Exemplo representativo da curva de ativação dependente de voltagem da I_h . Os valores de $V_{1/2}$ e K foram determinados pelo ajuste da Equação de Boltzmann (Eq. 8). Os valores de $\Delta V_{1/2}$ (B), ΔK (C) e ΔG_{max} (D) foram calculados como a diferença entre o valor na presença do DHPG e o valor na condição controle. O DHPG causa um aumento significativo na G_{max} da I_h . Registros feitos em neurônios de animais de 20 – 30 dias na temperatura de 33-34 °C. *, $p \leq 0,05$, teste t de Student pareado.

Os dados descritos acima sugerem que o aumento do *sag* despolarizante está associado à ativação de receptores mGlu-I que causam um aumento da condutância máxima dos canais HCN. No entanto, o tamanho do efeito na condutância máxima foi

modesto quando comparado com o tamanho do aumento do *sag* (35%) observado durante o tratamento com DHPG nos registros em *current-clamp*. Na discussão, será considerado como as alterações simultâneas na resistência de entrada podem amplificar o efeito da mudança de uma determinada condutância nas respostas observadas em *current-clamp*.

4.5 Ativação endógena de receptores mGlu-I

Resultados mostrados acima demonstram que a ativação de receptores mGlu do Grupo I têm vários efeitos nos neurônios do MNTB que podem ser observados em registros de *current-clamp* ou de *voltage-clamp*. Estes resultados foram obtidos pela aplicação do agonista exógeno DHPG. Assim, a seguinte questão foi se os receptores poderiam ser ativados pelo glutamato endógeno. Uma opção para responder esta questão é pela elevação da concentração basal de glutamato na fatia usando um inibidor do transportador de glutamato. Para estes experimentos, foram bloqueados os receptores AMPA e NMDA pela adição de CNQX ou NBQX (20 μ M) e MK801 (20 μ M) ou AP5 (50 μ M) na solução extracelular e as células foram registradas em *current-clamp* ($I=0$) para medir o potencial de repouso. Nessas condições aplicamos TBOA (200 μ M), um inibidor competitivo e não seletivo de transportadores de glutamato da família dos EAAT (Shimamoto, et al., 1998). TBOA causou uma despolarização reversível nos neurônios do MNTB (Figura 15Bi). A amplitude da despolarização causada pelo TBOA foi bastante similar à despolarização evocada pelo DHPG em condições similares, e foi inibido significativamente pela combinação de LY367385 (180 μ M) e CTEP (30 μ M) (Figura 15Bii), bloqueadores dos receptores mGlu1 e mGlu5 ($\Delta V_{mTBOA} = 4.5 \pm 0.5$ mV vs. com bloqueadores mGlu-I, $\Delta V_{mTBOA} = 0.87 \pm 0.7$ mV, $p=0.014$; Figura 15C). Juntos estes resultados indicam que quando os transportadores de glutamato são bloqueados, o glutamato endógeno ativa os receptores mGlu-I no MNTB e que a despolarização causada pela ativação por glutamato é muito parecida com a despolarização observada com o uso de DHPG.

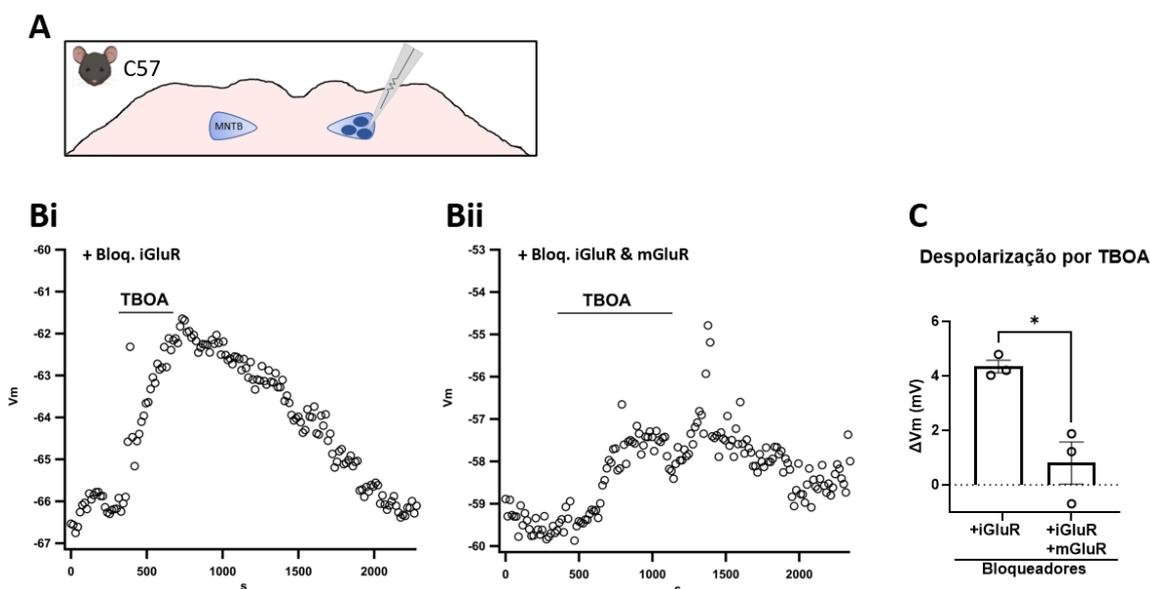


Figura 15. Glutamato endógeno ativa os receptores mGlu-I despolarizando os neurônios do MNTB. **A.** Abordagem experimental: foram feitos registros em whole-cell na modalidade current-clamp dos neurônios do MNTB. Receptores AMPA e NMDA foram bloqueados com CNQX (20 μ M) e MK801 (20 μ M). **B.** A inibição do transportador de glutamato com DL-TBOA (200 μ M) causa despolarização dos neurônios do MNTB (**Bi**) que foi reduzido na presença conjunta de bloqueadores dos mGlu1 e mGlu5 (LY 180 μ M, CTEP 30 μ M) (**Bii**). **C.** O bloqueio de receptores mGlu do grupo I reduz significativamente a despolarização causada pelo TBOA. *, $p < 0.05$ teste *t* de Student não pareado.

4.5.1 Papel de receptores mGlu-I durante estimulação em alta frequência.

Para estudar a ativação de receptores mGlu-I pelo glutamato endógeno em condições mais fisiológicas, sem o uso do TBOA, avaliamos os efeitos de antagonistas seletivos de receptores mGlu-I durante a estimulação das fibras aferentes que levam aos terminais do cálice de Held (Figura 3A). Trens de potenciais de ação pré-sinápticos (100 Hz) foram gerados resultando na geração de eEPSP e potenciais de ação pós-sinápticos (complexo EPSP-AP, Figura 16B e C). Durante esta atividade evocada, os antagonistas de receptores mGlu-I foram aplicados, e observamos dois efeitos principais. Primeiro, os antagonistas causaram uma hiperpolarização da membrana, que foi reversível (Figura 16D). Isto sugere que o glutamato liberado do cálice de Held ativa receptores mGlu do Grupo I em neurônios do MNTB. Foram testadas quatro condições de inibição: LY367385 (100 μ M), MPEP (10 μ M), LY367385 + MPEP, e JNJ16259685 (500 nM). Em todas as condições testadas foi observada uma significativa hiperpolarização da membrana dos neurônios do MNTB (Figura 16E; $\Delta V_m = 2.8 \pm 0.6$ mV, $p = 0.00089$). O

segundo efeito observado foi uma mudança no complexo EPSP-AP mostrando um incremento do valor máximo de dV_m/dt durante o EPSP (Figura 17C, Detalhe). Este efeito será detalhado a seguir.

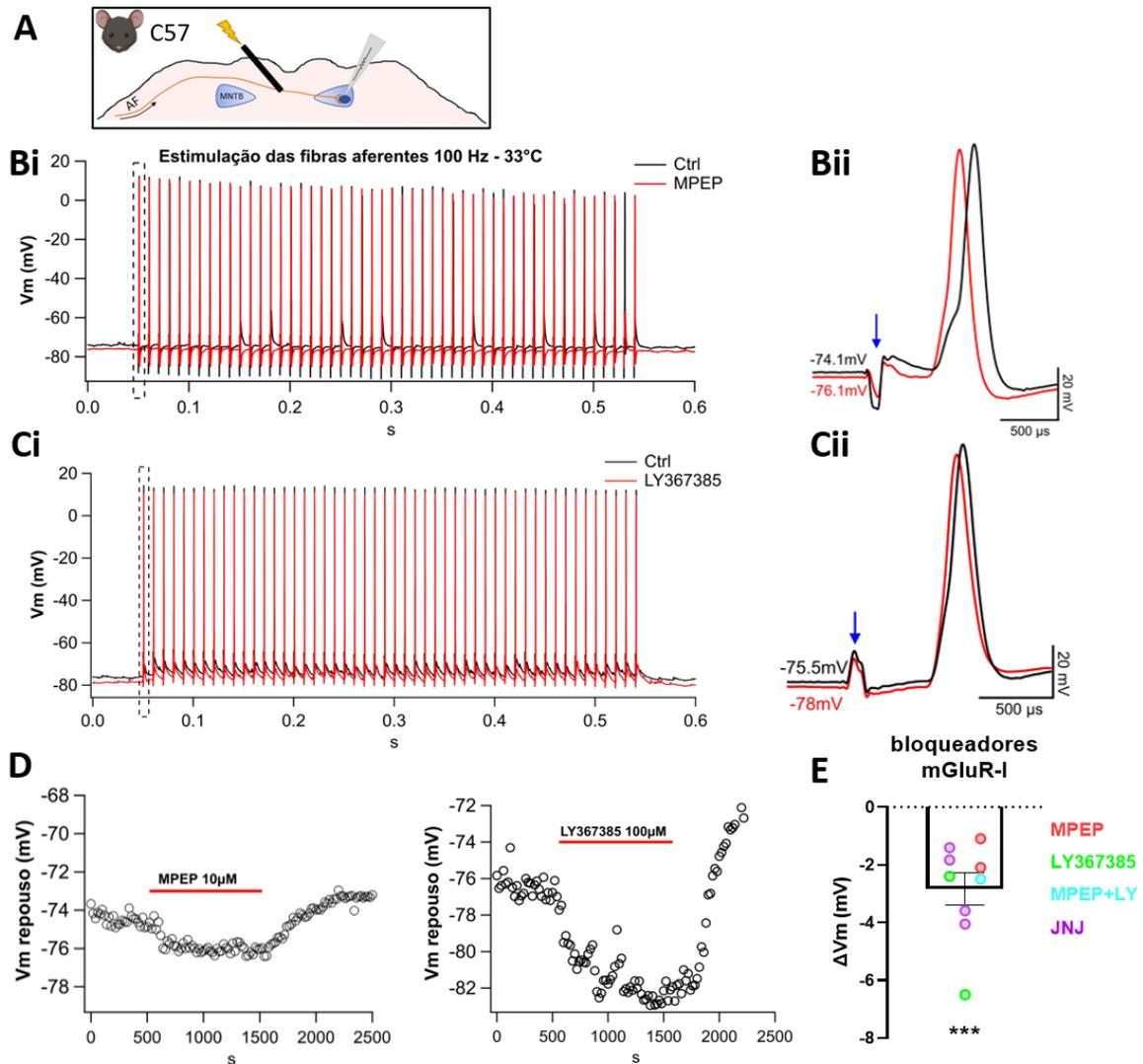


Figura 16. Inibição da ativação tônica de receptores mGlu-I hiperpolariza neurônios do MNTB. **A.** Abordagem experimental: as fibras aferentes (AF) que formam o cálice de Held foram estimuladas e potenciais pós-sinápticos e potenciais de ação pós-sinápticos registrados. **B** e **C** Resposta dos neurônios à estimulação em alta frequência (100 Hz) na situação controle (preto) e na presença do MPEP (10 μ M) (**Bi**) ou do LY367385 (100 μ M) (**Ci**). No lado direito de cada traçado, o primeiro PA de cada trem de estímulos está mostrado em detalhe no controle (preto) e na presença de DHPG (10 μ M, vermelho). A seta azul em **Bii** e **Cii** indica o artefato do estímulo. **D.** Curso temporal da despolarização do neurônio do MNTB quando tratado com inibidores de mGlu5 (MPEP) ou mGlu1 (LY367385). **E.** Em animais C57 o bloqueio de receptores mGlu-I com os diversos antagonistas mGlu causa uma hiperpolarização do potencial da membrana. Cada círculo representa o registro de um neurônio na presença de antagonistas segundo a cor indicada. $***$, $p \leq 0,001$, test t de Student pareado

Para estudar estas alterações no complexo EPSP-AP usamos gráficos de fase nos quais foram plotados o dV_m/dt versus V_m (Figura 17B). Como mostrado, ambos o LY367385 e o MPEP aumentam de forma significativa o dV/dt na parte da curva que corresponde ao EPSP. Para avaliar este aumento de forma mais precisa plotamos o dV_m/dt versus o tempo para assim identificar o valor máximo para cada EPSP (Figura 17C). No restante do texto nos referiremos à amplitude deste pico, medido em unidades de V/s, como EPSP'. Como mostrado na figura 17D, o EPSP' aumentou nas quatro condições de inibição de receptores mGlu-I, tanto para o primeiro EPSP' do trem (Ctrl 265.7 ± 24 V/s vs. mGlu-I_{bloq} 326.8 ± 30.9 V/s, $p=0.00053$) como para os últimos 5 EPSP' (Ctrl 179.4 ± 31.4 V/s vs. mGlu-I_{bloq} 198 ± 33.7 V/s, $p=0.033$), quando a depressão sináptica já tinha alcançado seu platô (Figura 17E). Nós avaliamos a depressão sináptica durante o trem de estimulação e a razão do pulso pareado (EPSP'₂/EPSP'₁). Ainda que houve uma tendência para aumentar a depressão (Figura 17F; Ctrl 34.6 ± 9.1 % vs. mGlu-I_{bloq} 42.2 ± 6.2 %, $p=0.076$) e reduzir a razão do pulso pareado na presença dos inibidores (Figura 17G; Ctrl, PPR = 1.00 ± 0.04 vs. mGlu-I_{bloq}, PPR = 0.91 ± 0.03 , $p=0.10$), esta diferença não foi estatisticamente significativa.

Nós consideramos que o incremento do EPSP' poderia ser causado por um aumento na excitose (maior conteúdo quântico) ou aumento do tamanho quântico. Medimos então vários parâmetros dos mEPSPs registrados nas condições controle e na presença dos inibidores (Figura 18A). Observamos que a amplitude (Figura 18B; Amplitude, Ctrl = 1.18 ± 0.08 mV vs. mGlu-I_{bloq} = 1.24 ± 0.13 , $p=0.31$), o tempo de decaimento (Figura 18C; tempo de decaimento, Ctrl = 2.75 ± 0.48 mV vs. mGlu-I_{bloq} = 2.97 ± 0.62 , $p=0.19$) e o tempo de subida (Figura 18D; tempo de subida 20-80%, Ctrl = 101.9 ± 8.6 μ s vs. mGlu-I_{bloq} = 112.4 ± 12.4 , $p=0.09$) dos mEPSP não foram alterados pela inibição dos receptores mGlu-I, da mesma forma a frequência dos mEPSP não variou durante o tratamento (Figura 18E; Frequência, Ctrl = 65.93 ± 11.1 Hz vs. mGlu-I_{bloq} = 65.92 ± 16.8 , $p=0.99$). Assim, concluímos que mudanças na sensibilidade pós-sináptica não podem explicar o aumento no EPSP' causado pela inibição de receptores mGlu do Grupo I.

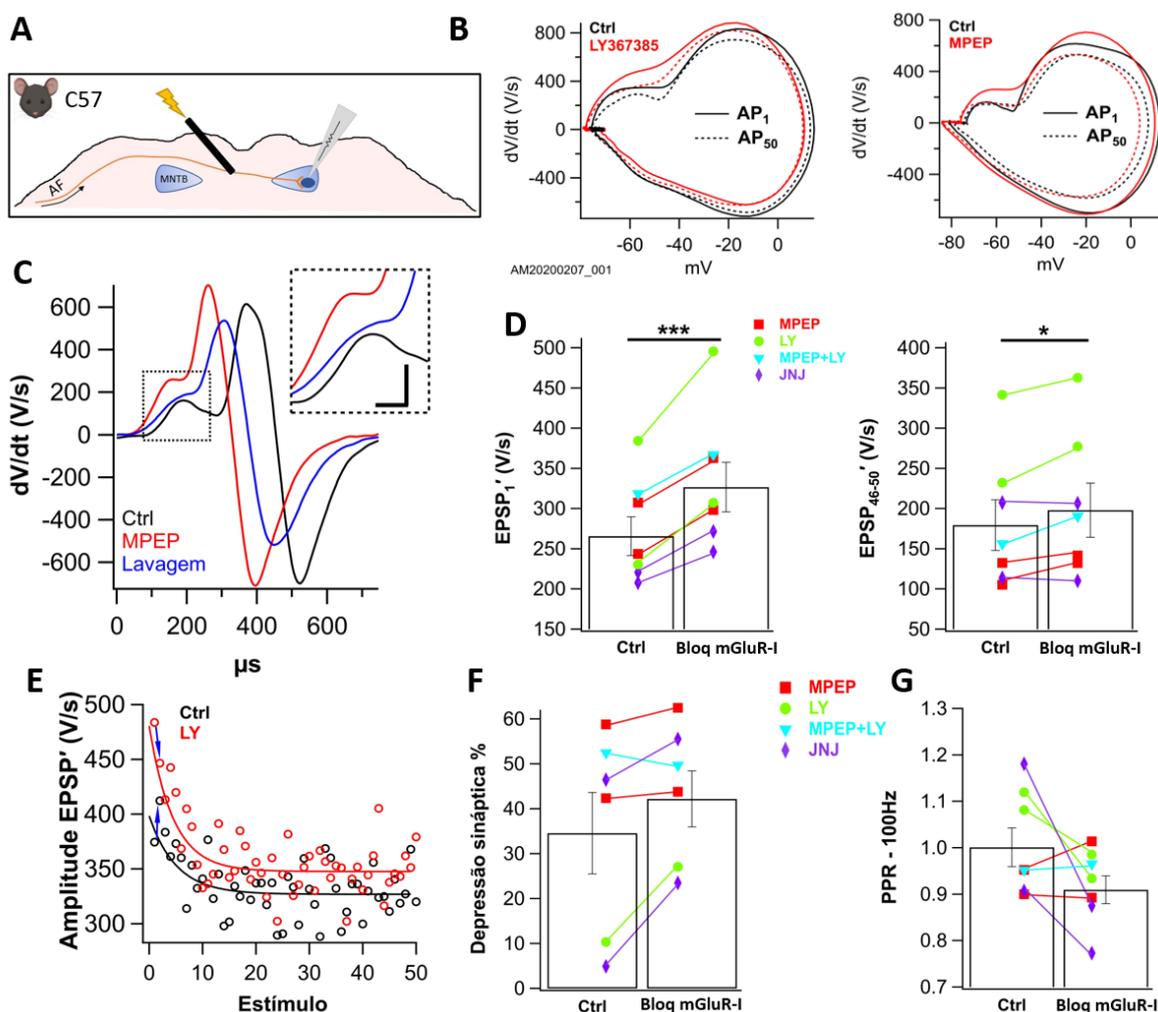


Figura 17. Inibição de receptores mGlu-1 aumenta o EPSP' em neurônios do MNTB. *A.* Abordagem experimental em camundongos C57Bl/6 P20 durante registros em whole-cell. *B.* Diagramas de fase do primeiro (AP_1) e o último potencial de ação (AP_{50}) durante estimulação em alta frequência (100Hz), nas condições controle e na presença do antagonista do mGlu1 (LY367385) ou mGlu5 (MPEP). Nota-se o aumento da amplitude do EPSP na presença dos antagonistas. *C.* Traçado do dV/dt do trem de estímulos em 100 Hz mostrando o primeiro EPSP-AP nas condições controle, na presença do antagonista do receptor mGlu5 e durante a lavagem. Detalhe: mostrando a variação na amplitude do EPSP' nas três condições, barra de escala: 100V/s e 50 μs . *D.* Variação na amplitude do EPSP' causada pelo bloqueio de receptores mGlu-1. À esquerda, o primeiro EPSP e à direita no estado estacionário ($EPSP_{ss}'$, últimos cinco EPSPs do trem). *E.* Curso de variação na amplitude do EPSP' ao longo de 50 estímulos em 100Hz. As setas azuis indicam a variação entre o primeiro e o segundo EPSP' do trem. *F.* Depressão sináptica é medida como a diferença entre $EPSP_{46-50}'$ e $EPSP_1'$, expressado como % EPSP $_1'$, na condição controle e na presença de três diferentes antagonistas de receptores mGlu-1. *G.* Alteração na razão do pulso pareado ($EPSP_2'/EPSP_1'$) causado pelo bloqueio de receptores mGlu-1. *, $p \leq 0.05$; ***, $p \leq 0.001$, teste t de Student pareado.

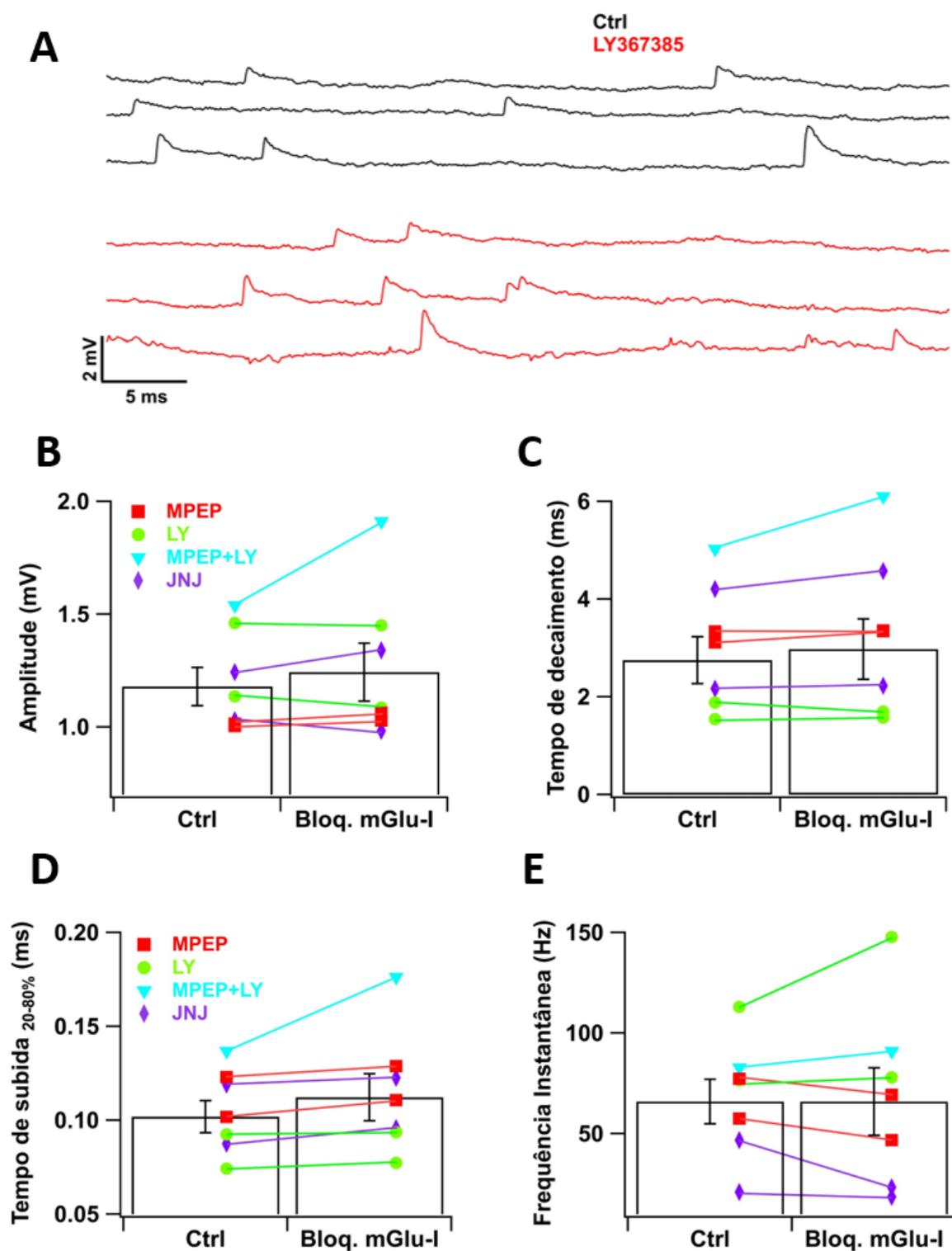


Figura 18. Inibição de receptores mGlu-I não altera o tamanho quântico. *A.* Traçado representativo dos mEPSP registrados na condição controle e na presença do antagonista mGlu1, LY367385 (100 μ M). *B-E.* Propriedades dos mEPSP registrados na presença de antagonistas de receptores mGlu-I, **B** amplitude; **C** tempo de decaimento; **D** tempo de subida (20-80%); **E** frequência dos minis. *, $p \leq 0.05$, teste *t* de Student pareado.

Em seguida, avaliamos se as ações de receptores mGlu na função sináptica dos neurônios do MNTB estaria presente em camundongos adultos totalmente maduros. Neste grupo de experimentos, trocamos a linhagem C57Bl/6 pela CBA/CaJ. O motivo da mudança do modelo animal foi pelo fato que os camundongos C57Bl/6 apresentam perda auditiva a partir do terceiro mês de vida (Mikaelian, 1979), e como o MNTB faz parte da via auditiva, esta perda de audição poderia mascarar alterações na função do MNTB. Por outro lado, camundongos CBA/CaJ apresentam audição normal durante toda a etapa adulta (Erway et al., 1993; Willot et al., 1994).

Primeiro, verificamos se animais adultos da linhagem CBA/CaJ são sensíveis a aplicação do agonista exógeno de receptores mGlu-I (DHPG, 50 μ M). As células foram mantidas em *voltage-clamp* e DHPG aplicado no banho (Figura 19B). Assim como já foi mostrado para animais C57Bl/6 o DHPG causou uma corrente de entrada em neurônios do MNTB de animais CBA/CaJ (Figura 19C). A amplitude da corrente ($\Delta I_{mDHPG} = -45.5 \pm 17.2$) foi similar aos valores obtidos nos camundongos C57Bl/6.

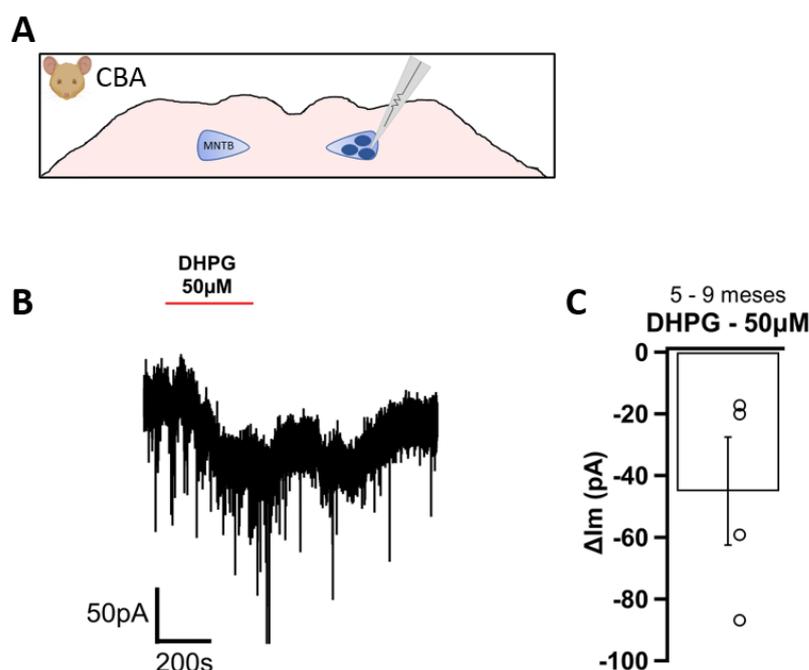


Figura 19. Ativação exógena de receptores mGlu-I gera uma corrente de entrada em animais adultos. *A.* Abordagem experimental: registros em whole-cell voltage clamp ($V_{mhold} = -60mV$) de neurônios do MNTB de camundongos CBA/CaJ de 5 e 9 meses de idade. *B.* Corrente de entrada causada pela aplicação do agonista de receptores mGlu-I (DHPG, 50 μ M). *C.* Ativação de receptores mGlu-I com agonista exógeno causa uma corrente de entrada com valor médio de -45 pA.

O seguinte passo foi estimular as fibras aferentes para gerar potenciais de ação pré-sinápticos e observar as alterações quando os receptores mGlu-I foram inibidos com MPEP + JNJ16259685 (Figura 20). Nestes experimentos, incluímos estriçnina (0.5 μ M) e SR95531 (gabazina, 10 μ M) (Gynther & Curtis, 1986; Ueno et al., 1997) para bloquear sinapses glicinérgicas e GABAérgicas e assim conseguir examinar eventos de natureza glutamatérgica unicamente. Como mostrado anteriormente em animais C57Bl/6, a inibição de receptores mGlu-I causou uma hiperpolarização da membrana (Figura 20B; ΔV_{mDHPG} -2.15 ± 0.8 mV, $p=0.076$). Embora o tamanho deste efeito foi muito parecido com os dados apresentados acima, não foi estatisticamente significativa por causa de uma das células que apresentou uma hiperpolarização maior, causando um aumento considerável na variância dos dados.

Posteriormente avaliamos o complexo EPSP-AP (Figura 20C) e observamos uma forte tendência para aumentar a amplitude do EPSP' (Figura 20D; EPSP_{1'}: Ctrl 217.1 ± 20.6 V/s vs. mGlu-I_{bloq} 258 ± 16.7 V/s, $p=0.063$; EPSP_{ss'}: Ctrl 129 ± 13.4 V/s vs. mGlu-I_{bloq} 136 ± 9.1 V/s, $p=0.24$). Houve também uma tendência para incrementar a depressão sináptica dos EPSP' (Figura 20F; Ctrl 34.4 ± 15.4 % vs. mGlu-I_{bloq} 45.2 ± 7.3 %, $p=0.35$) e diminuir a razão do pulso pareado (Figura 20G; Ctrl 1.07 ± 0.16 vs. mGlu-I_{bloq} 0.862 ± 0.05 %, $p=0.23$), mas estas diferenças não foram estatisticamente significativas.

Medimos também a amplitude e características dos mEPSPs nestas sinapses, na presença de gabazina e estriçnina (Figura 21A). Não observamos mudanças na amplitude (Figura 21B; Amplitude, Ctrl = 1.07 ± 0.13 mV vs. mGlu-I_{bloq} = 1.05 ± 0.09 mV, $p=0.60$), no tempo de decaimento (Figura 21C; Tempo de decaimento, Ctrl = 1.37 ± 0.58 ms vs. mGlu-I_{bloq} = 1.62 ± 0.48 ms, $p=0.41$), no tempo de subida (Figura 21D; tempo de subida 20-80%, Ctrl = 72.2 ± 9.5 μ s vs. mGlu-I_{bloq} = 83.6 ± 4.0 μ s, $p=0.40$) nem na frequência dos mEPSP (Figura 21E; Frequência, Ctrl = 68.82 ± 40.1 Hz vs. mGlu-I_{bloq} = 51.24 ± 27.7 Hz, $p=0.29$). Assim como observado em camundongos C57Bl/6 a falta de alteração na amplitude dos mEPSP indica pouco ou nenhuma alteração pós-sináptica que possa explicar o incremento no EPSP'.

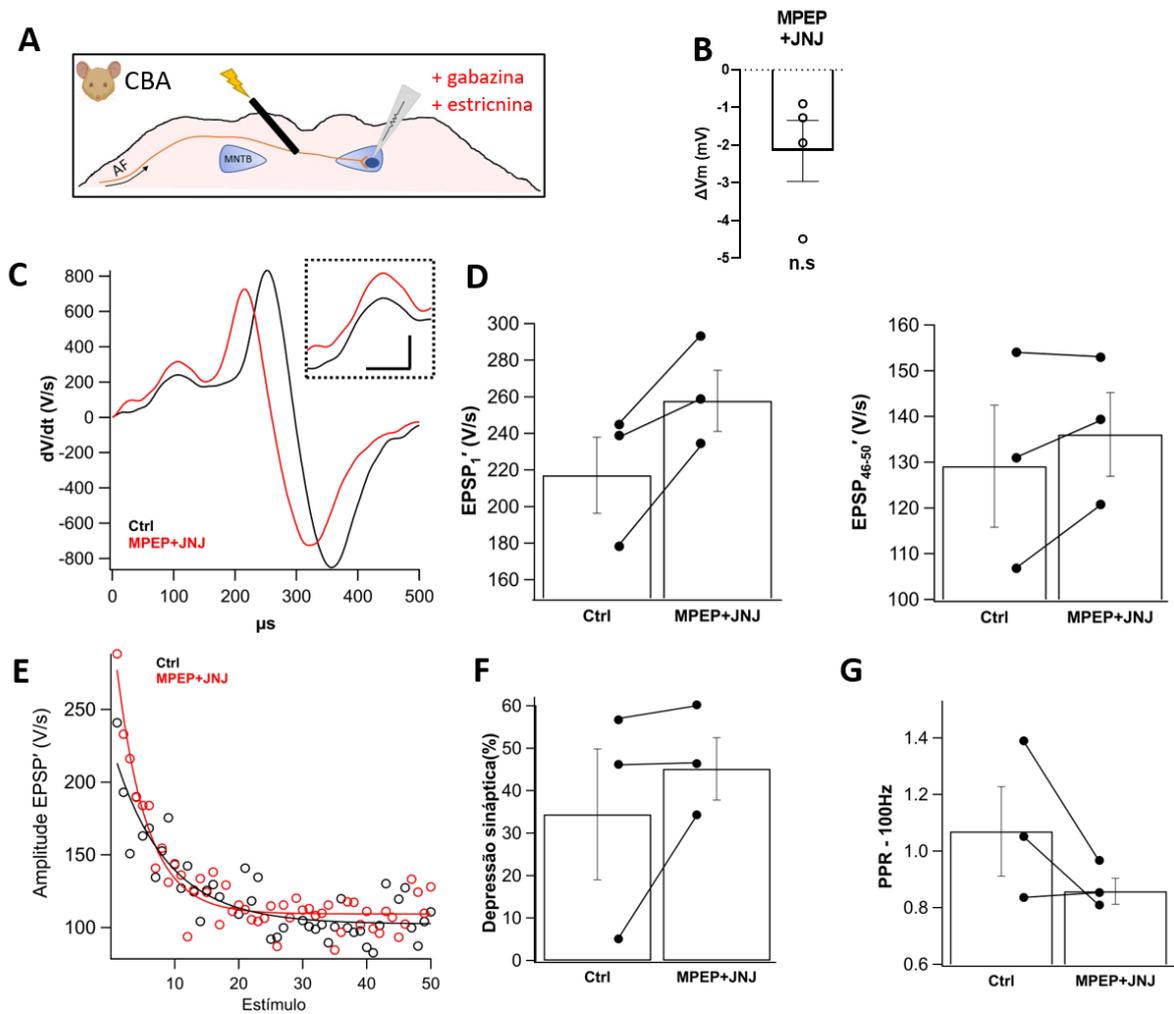


Figura 20. Hiperpolarização e aumento na amplitude dos EPSPs' causada pelo bloqueio de receptores mGlu-I em camundongos adultos. **A.** Abordagem experimental em camundongos CBA/CaJ (5 e 9 meses), foram feitos registros em whole-cell current-clamp em neurônios do MNTB que respondiam à estimulação das fibras aferentes. Os registros foram feitos na presença de gabazina ($10 \mu\text{M}$) e estricnina ($0.5 \mu\text{M}$). **B.** Em camundongos CBA o bloqueio de receptores mGlu-I com os antagonistas para mGlu5 (MPEP, $10 \mu\text{M}$) e mGlu1 (JNJ, 500nM) causa uma hiperpolarização do potencial da membrana. **C.** Traçado do dV_m/dt do trem de estímulos a 100 Hz mostrando o primeiro EPSP-AP nas condições controle e na presença dos bloqueadores de receptores mGlu-I. Detalhe: Variação na amplitude do EPSP' nas duas condições. Barra de escala: 100V/s e $50\mu\text{s}$. **D.** Variação na amplitude do EPSP' causada pelo bloqueio de receptores mGlu-I. Esquerda, o primeiro EPSP' e à direita variação no estado estacionário (últimos cinco EPSPs' do trem). **E.** Curso de variação na amplitude do EPSP' ao longo dos 50 estímulos do trem em 100Hz . **F.** Depressão sináptica expressada pela taxa de diminuição entre a amplitude dos EPSPs' no estado estacionário comparados com o primeiro EPSP' na condição controle e na presença de bloqueadores de receptores mGlu-I. **G.** Alteração na relação do pulso pareado causado pelo bloqueio de receptores mGlu-I.

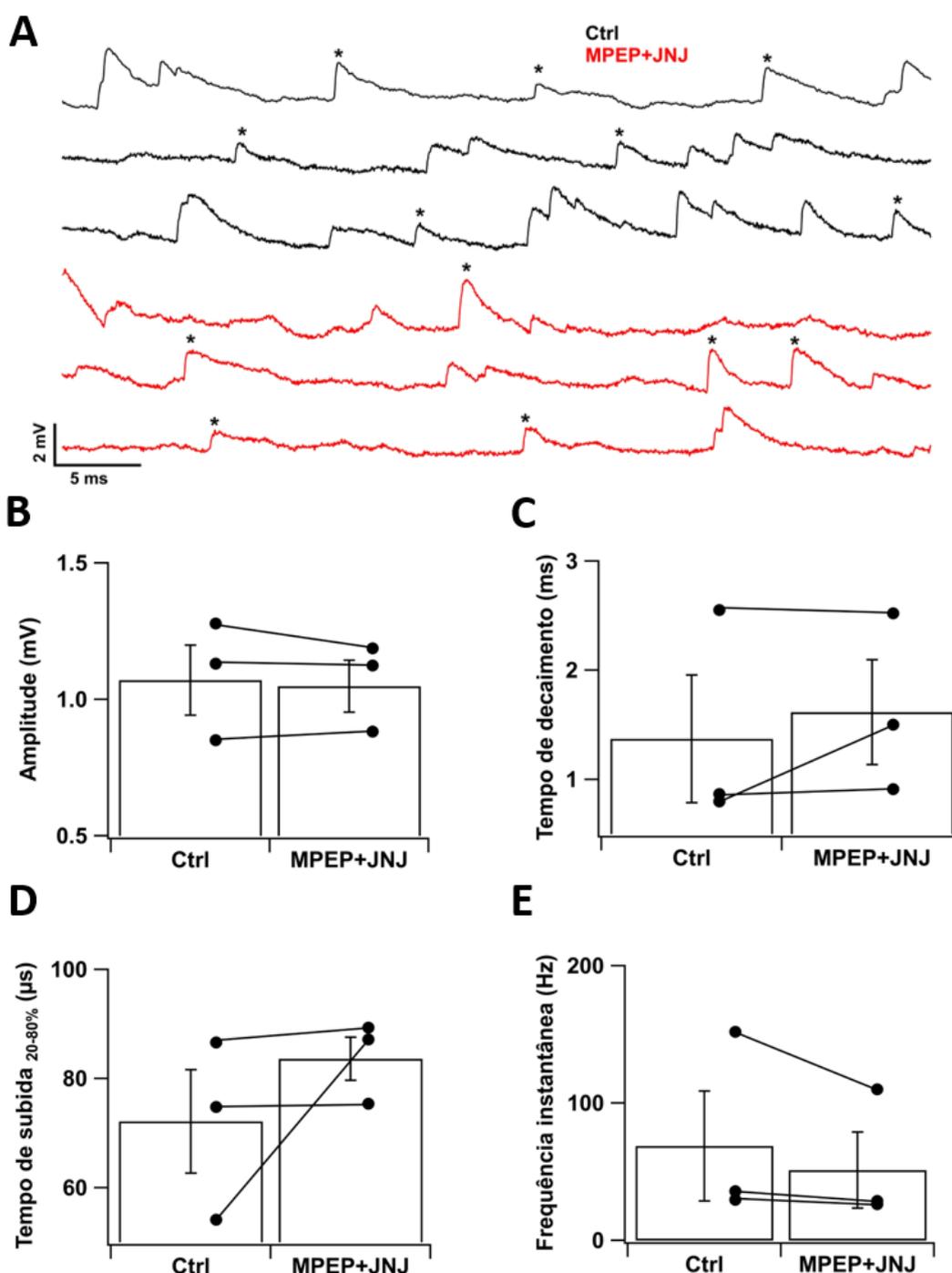


Figura 21. Bloqueio de receptores mGlu-I em neurônios do MNTB de camundongos adultos não altera a cinética dos mEPSP. *A*. Traçado representativo dos mEPSP registrados durante perfusão com bloqueadores ionotrópicos (Gabazina e Estricnina) na condição controle e na presença de bloqueadores de receptores mGlu-I em animais CBA, (*) indicam os mEPSP selecionados para avaliar o conteúdo quântico (Fig. 23). Comparação das características dos mEPSP observados nas duas condições, em **B** amplitude, em **C** tempo de decaimento, em **D** tempo de subida (20-80%) e em **E** frequência dos minis. *, $p \leq 0,05$, teste *t* de Student pareado.

4.5.2 Efeitos pré-sinápticos de receptores mGlu-I

Experimentos clássicos utilizando alterações na concentração de Ca^{2+} têm mostrado uma relação entre a probabilidade de liberação de vesículas, razão do pulso pareado e o grau de depressão sináptica (Katz & Miledi, 1968; Hubbard, et al., 1968; Charlton, et al., 1982; Dittman, et al., 2000; Revisado por Regehr, 2012). De forma geral, sinapses com baixa probabilidade de liberação apresentam menor depressão sináptica e valores maiores da razão do pulso pareado, e vice-versa (Zucker & Regehr, 2002). Nós estudamos esta relação plotando os valores pareados de PPR versus o EPSP_1' para todos os dados obtidos combinando registros de camundongos C57Bl/6 e CBA/CaJ, tanto na condição controle como na presença dos inibidores. Esses dados caem numa curva hiperbólica, formando o que parecem ser dois grupos separados de pontos (Figura 22). Estes dados sugerem que o aumento observado no EPSP_1' na presença dos bloqueadores de receptores mGlu-I pode ser causado por mudanças no conteúdo quântico dos EPSP.

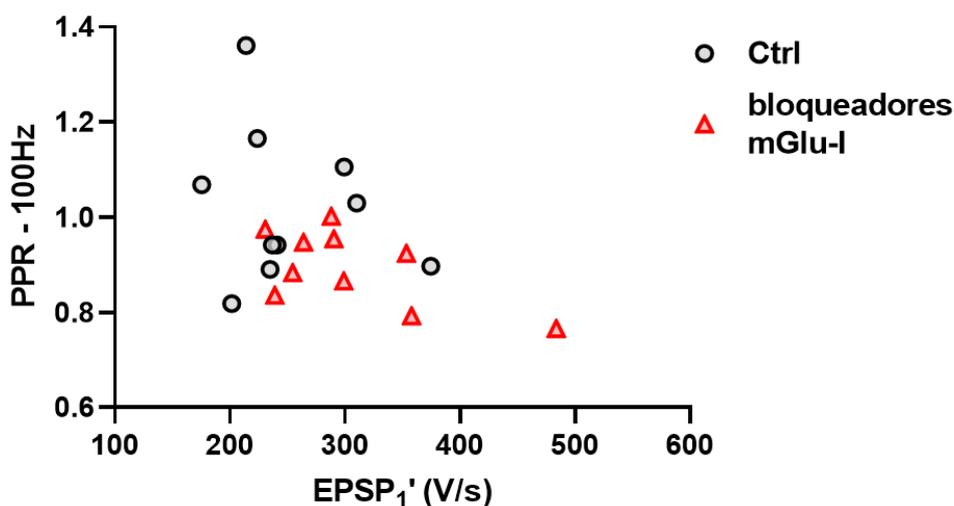


Figura 22. Possível aumento na Pr das vesículas causado pelo bloqueio de receptores mGlu-I. Neste gráfico estão contemplados todos os registros tanto em animais C57 como CBA ($n = 10$). Razão de pulso pareado em função da amplitude o EPSP_1' . O símbolo cinza representa a condição controle e triângulos vermelhos representam os EPSPs' registrados na presença dos bloqueadores de receptores mGlu-I. As alterações no PPR e no EPSP' causadas pelos bloqueadores são significativamente diferentes, $p \leq 0.0001$ e $p \leq 0.05$, respectivamente. Teste t de Student não pareado.

A seguir calculamos o conteúdo quântico pelo método direto, dividindo o EPSP' pelo mEPSP' de cada célula na condição controle e na presença dos bloqueadores de receptores mGlu-I. Para esta análise, só foram incluídos os dados de animais CBA/CaJ porque estes foram coletados na presença de estricnina e gabazina, assim temos certeza de que os mEPSP correspondem com eventos glutamatérgicos (provavelmente originados no cálice). Estes dados mostraram uma clara tendência em incrementar o conteúdo quântico na presença dos bloqueadores de receptores mGlu-I (Figura 23).

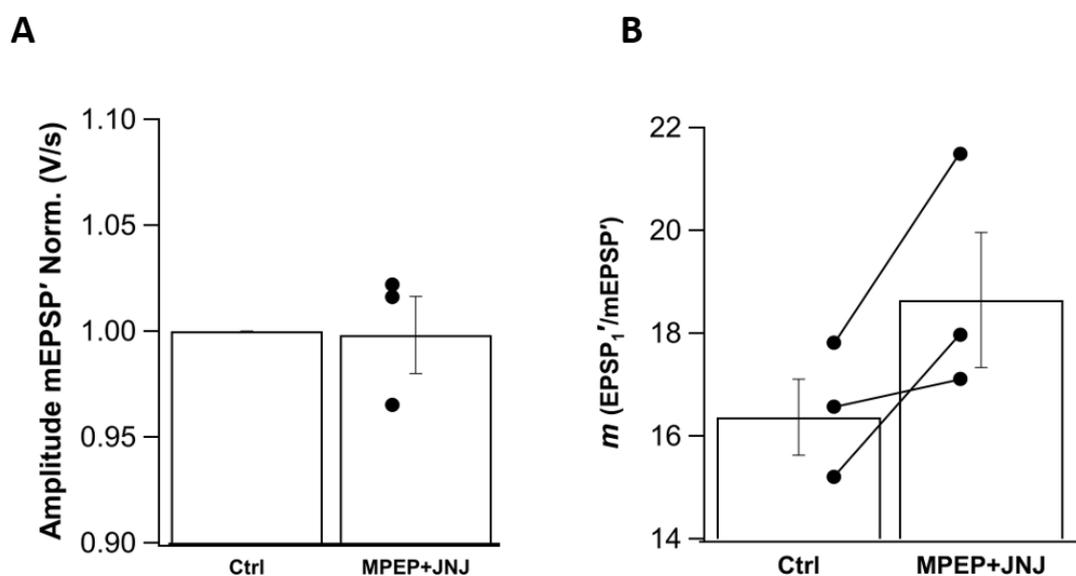


Figura 23. O bloqueio de receptores mGlu-I indica uma tendência para o aumento do conteúdo quântico do EPSP₁'. **A.** Estimativa da amplitude dos mEPSP (dV/dt) em animais CBA na condição controle e durante o bloqueio de receptores mGlu-I. **B.** Comparação do conteúdo quântico do primeiro EPSP durante o controle e durante o bloqueio de receptores mGlu-I nos registros em animais CBA.

5. DISCUSSÃO

Este estudo descreve efeitos tanto pré-sinápticos como pós-sinápticos da ativação por via exógena e endógena de receptores mGlu-I em neurônios principais do MNTB. Durante a ativação exógena de receptores mGlu-I, com o agonista seletivo DHPG (Ito, et al., 1992), observamos um aumento da condutância dos canais HCN. Ao inibir os receptores mGlu-I durante liberação endógena do glutamato, no cálice de Held, mostramos que estes receptores desenvolvem um papel importante na manutenção do potencial de repouso e ao mesmo tempo modulam a liberação de vesículas influenciando o conteúdo quântico. Estes achados demonstram alguns dos mecanismos por meio dos quais os receptores mGlu-I contribuem para modular a excitabilidade dos neurônios do MNTB (dos Santos e Alhadas, 2019).

5.1 Corrente mGlu-I no MNTB e sua dependência de temperatura.

Em estudos anteriores, demonstramos que a ativação de receptores mGlu-I com DHPG modula a excitabilidade dos neurônios do MNTB gerando uma corrente de entrada despolarizante (dos Santos e Alhadas, 2019). Por motivos técnicos estes dados foram coletados em animais neonatos, além de terem sido registrados na temperatura ambiente.

A atividade no cálice de Held é fortemente afetada pela temperatura. Comparada com medidas feitas na temperatura ambiente, em temperaturas mais próximas do fisiológico a reciclagem das vesículas é mais eficiente reduzindo a depressão sináptica (Kushmerick et al., 2006). Por outro lado, a atividade de canais e receptores pós-sinápticos é também aumentada em temperatura fisiológica (Postlethwaite et al., 2007; Kim & von Gersdorff, 2012). Estes fatos enfatizam a importância de corroborar nossos achados sobre modulação da excitabilidade neuronal no MNTB em condições de temperatura mais fisiológicas.

Ao comparar a amplitude da corrente mGlu-I nas condições RT (25 °C) e PT (~33.5 °C) não foi observada diferença significativa, sugerindo que o mecanismo através do qual surge esta corrente é pouco susceptível às variações de temperatura. A leve tendência de aumento da corrente com aumento da temperatura sustenta nossa hipótese de que este fenômeno não estaria sendo causado por proteínas trocadoras (i.e. bomba $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$) (Blaustein & Lederer, 1999). Este resultado é consistente com nossos

achados prévios mostrando que canais Kir e HCN são responsáveis por esta corrente (Bernal-Correa, 2016).

5.2 Persistência da corrente mGlu-I durante o desenvolvimento.

A corrente de entrada e o aumento na excitabilidade que resultam da ativação de receptores mGlu do Grupo I no MNTB foram inicialmente descritos em animais neonatos (Alhadas E. D., 2014; Bernal-Correa, 2016). No entanto, devido às grandes alterações morfológicas e funcionais que a sinapse do MNTB sofre durante as duas primeiras semanas pós-natais (Kandler & Friauf, 1993; Taschenberger & von Gersdorff, 2000; Borst & van Hoeve, 2012) foi necessário avaliar o efeito da ativação de receptores mGlu-I em animais maduros e na temperatura fisiológica para descobrir se a corrente está presente nos animais adultos com audição normal.

Para resolver esta questão medimos a amplitude da corrente evocada pela ativação de receptores mGlu-I com o agonista DHPG em temperatura próxima ao valor fisiológico (33 – 34 °C). Ao comparar a corrente medida em animais C57Bl/6 adultos com a corrente registrada em camundongos P8, encontramos valores semelhantes em todas as idades testadas. Assim, ao contrário de outros receptores como mGlu-II/III (von Gersdorff et al., 1997; Elezgarai, et al., 1999; Elezgarai I. , et al., 2001; Renden, et al., 2005), α -adrenérgicos (Leão & von Gersdorff, 2002) e serotoninérgicos (Mizutani et al., 2006), não observamos sinais de regulação negativa de receptores mGlu-I durante os primeiros dois meses de vida.

Também avaliamos a função de receptores mGlu-I em animais totalmente maduros. Para isto alteramos a linhagem de camundongos C57Bl/6, toda vez que estes são conhecidos por apresentarem perda auditiva a partir do terceiro mês de vida (Mikaelian, 1979), isto devido a fatores genéticos que causam perda de fibrócitos e degeneração precoce do ligamento espiral da cóclea que conseqüentemente leva a perda de células ciliadas (Erway et al., 1993; Johnson, et al., 1997; Hequembourg & Liberman, 2001). Escolhemos a linhagem CBA/CaJ porque estes camundongos preservam uma boa audição durante toda a vida adulta (Erway et al., 1993; Willot et al., 1994; Hequembourg & Liberman, 2001). Assim, ao avaliar a corrente mGlu-I em animais CBA/CaJ de até 9 meses demonstramos que esta corrente persiste ao longo da vida adulta.

Dados sobre a funcionalidade dos receptores mGlu-II/III no cálice de Held indicam que como autoreceptores contribuem de forma importante para inibição dos eEPSC durante as duas primeiras semanas de vida, enquanto são ajustados mecanismos de controle da liberação e captação de glutamato. Posteriormente na vida adulta a sua expressão (Renden et al., 2005) e funcionalidade são reduzidas (von Gersdorff et al., 1997) quando comparados com a etapa neonatal. Em conjunto, nossos resultados mostram que a função de receptores mGlu-I é preservada durante todos os estágios de desenvolvimento dos camundongos, diferente do que acontece com receptores mGlu dos grupos II e III.

Ainda que nossos dados mostrem a funcionalidade consistente de receptores mGlu do Grupo I, é plausível que a expressão das suas duas isoformas (mGlu1 e mGlu5) sejam reguladas de forma diferente ao longo do desenvolvimento. Dados obtidos do Allen Brain Maps (Lein et al., 2007) indicam que a expressão do mGlu5 é contínua desde o nascimento até o dia ~15 pós-natal, diminuindo de forma significativa com o início do aparecimento do mGlu1 (dia ~10) o qual permanece até a idade adulta. Este tipo de regulação, onde o mGlu1 tem uma ação supressora na expressão do mGlu5 já foi descrita no cerebelo de camundongos (Notartomaso, et al., 2018).

5.3 Papel dos canais HCN durante ativação de receptores mGlu-I.

Canais HCN contribuem para modular a excitabilidade dos neurônios e estão amplamente distribuídos em vários núcleos do SOC (Banks et al., 1993; Leão, et al., 2006; Hassfurth, et al., 2009; Khurana, et al., 2012; Kopp-Scheinflug et al., 2015). As isoformas HCN2 e HCN4 são expressas no MNTB e caracterizam-se por serem de ativação lenta, quando comparada com a isoforma HCN1 (Leão, et al., 2006; Kopp-Scheinflug et al., 2015). O balanço entre canais HCN e canais para potássio de baixo limiar regula a integração sináptica sublimiar e por tanto o disparo unitário ou múltiplo de potenciais de ação no terminal pós-sináptico do MNTB (Leão R.N. et al., 2005).

Registros na modalidade *current-clamp* apresentam a vantagem de mostrar o comportamento biofísico do neurônio em condições mais próximas à situação fisiológica ao permitir flutuações normais do potencial de membrana. Usando este tipo de registro demonstramos que a ativação de receptores mGlu-I causa três efeitos no neurônio do MNTB: i) despolarização do potencial de repouso, ii) diminuição

significativa da condutância e iii) aumento do *sag* despolarizante, sendo este último um forte indicativo da atividade dos canais HCN (Banks et al., 1993).

Nós consideramos possíveis cenários nos quais um ou vários destes efeitos poderiam estar vinculados. Por exemplo, a despolarização do potencial de membrana tenderia a desativar a pequena fração dos canais HCN abertos no potencial de repouso. Isto por si só poderia incrementar o *sag* despolarizante observado durante os pulsos de corrente hiperpolarizante. Não obstante, quando ajustamos o protocolo para restaurar o potencial de repouso durante a despolarização vimos que o *sag* permanece aumentado em essa condição (Figura 11Biii) e o bloqueio total deste fenômeno pelo inibidor ZD7288 confirmou que este fenômeno é causado pelos canais HCN, provavelmente sendo ativados por vias de sinalização de receptores mGlu-I.

Em alguns núcleos do complexo olivar superior como o AVCN, MSO e LSO a inibição dos canais HCN despolariza o potencial de repouso dos neurônios (Khurana, et al., 2012; Leão et al., 2006). Nós não detectamos diferença significativa no potencial de repouso quando ZD7288 foi incluído na solução pipeta, sugerindo que nos neurônios do MNTB os canais HCN têm pouca participação no estabelecimento do potencial de repouso. Similarmente, estudos prévios em camundongos CBA (P14) têm mostrado que a contribuição dos canais HCN no potencial de repouso e na resistência de entrada é mínima (Leão R.N. et al., 2005; Leão et al., 2006).

Canais HCN contribuem para modular a excitabilidade de neurônios em núcleos das vias auditivas (Shaikh & Finlayson, 2003; Rusznák, et al., 2013; Tang & Trussell, 2015) e especificamente em neurônios principais do MNTB (Cuttle et al., 2001; Leão R.N. et al., 2005; Leão et al., 2006; Hassfurth et al., 2009; Kim & von Gersdorff, 2012). Estes canais podem ser modulados pelas vias de sinalização da proteína G, tipicamente G_s e G_i (Bobker & Williams, 1989; Banks et al., 1993; Wainger, et al., 2001; Tang & Trussell, 2015). Segundos mensageiros como cAMP, cGMP (Banks et al., 1993; Wainger, et al., 2001) ou fosfoinosítídeos como o PIP_2 (Pian et al., 2006) e inclusive o óxido nítrico (Kopp-Scheinflug et al., 2015) modulam canais HCN2, sendo o principal efeito o deslocamento da curva de ativação. Ainda que as vias de sinalização de receptores mGlu-I, através da proteína G, possam envolver o PIP_2 ou cAMP, nós não observamos alterações no valor médio de ativação ou na inclinação da curva de condutância. Os valores que nós reportamos ($V_{1/2} = -89.1$ mV e $k = 5.8$ mV) coincidem com as faixas de valores previamente descritos por outros grupos sendo o $V_{1/2}$ entre -75 e -96 mV e k

entre 5 e 8 mV (Banks et al., 1993; Leão R.N. et al., 2005; Leão et al., 2006; Kopp-Scheinflug et al., 2015).

A curva de ativação mostrou que durante o potencial de repouso dos neurônios do MNTB (-60 a -70 mV) só há uma pequena contribuição de canais HCN que corresponde, em média, a menos do 14% da condutância máxima destes canais. Este dado é semelhante ao reportado por Banks et al. (1993) mostrando que há pouca contribuição da I_h durante o potencial de repouso. Estes achados justificam o fato que o inibidor ZD não tenha alterado o potencial de repouso destas células.

Nós observamos que o efeito do DHPG sobre a I_h , obedece a um incremento da condutância máxima dos canais HCN. Este aumento corresponde a 6%, um valor que é pequeno quando comparado com o aumento de 35% que foi observado no *sag* despolarizante. A G_{max} entre as células registradas variou entre 2 e 13 nS, semelhantes a valores descritos em outros núcleos do complexo olivar superior (Kopp-Scheinflug et al., 2015; Ceballos et al., 2016). Esta dispersão pode estar associada à distribuição tonotópica interna dos núcleos envolvidos no processamento auditivo (Revisado por Kandler et al., 2009) como foi demonstrado no MSO (Baumann et al., 2013). Assim as alterações da G_{max} durante ativação de receptores mGlu-I poderia ser ainda maior na região medial no MNTB, que está associada com processamento de sons de alta frequência.

Ainda que 6% de aumento da G_{max} seja um valor reduzido, o impacto desta variação na amplitude *sag* despolarizante dependerá da resistência da membrana. O aumento na resistência da membrana causada pelo DHPG, que é independente de canais HCN, dá lugar a que correntes pequenas possam ter um efeito amplificado. Um efeito similar foi descrito em neurônios fusiformes do núcleo dorsal coclear onde o impacto da G_h no potencial de repouso mostrou uma relação inversa com a condutância dos canais Kir (Ceballos et al., 2016). De forma geral, o efeito da variação de uma condutância na resistência de membrana depende da sua amplitude relativa a outras condutâncias presentes e o impacto no potencial de membrana é descrito pela equação de condutância de Millman (equação de corda). Assim, quanto menor a condutância total da membrana, maior será o impacto do aumento de uma determinada condutância no potencial de membrana. Previamente vimos que em camundongos P8, o bloqueio de canais Kir é responsável por parte da corrente de entrada evocada pela ativação de receptores mGlu-I (Bernal-Correa, 2016). Nossa hipótese é que o bloqueio dos canais

Kir causa um aumento significativo da resistência de membrana que por si só contribui para amplificar o aumento da G_{\max} dos canais HCN e assim incrementa o *sag* despolarizante.

5.4 Atividade tônica de receptores mGlu-I na sinapse do MNTB.

Experimentos bloqueando os transportadores de glutamato com TBOA mostraram que os receptores mGlu-I dos neurônios do MNTB são sensíveis às alterações de glutamato endógeno. Dados similares foram obtidos nas células globulares do AVCN onde a despolarização causada pelo TBOA foi abolida na presença de bloqueadores ionotrópicos e metabotrópicos para o glutamato (Chanda & Xu-Friedman, 2011). Contudo, caberia a possibilidade que a ativação destes fosse causado pelo transbordamento do glutamato, fora da sinapse, implicando que a localização dos receptores poderia ser extra sináptica. Esta possibilidade foi avaliada pelo uso de inibidores de receptores mGlu-I durante estimulação do cálice de Held em alta frequência, sem o uso de TBOA. Os resultados mostraram que os receptores devem estar localizados na região sináptica onde apresentam uma atividade tônica que contribui para manter o potencial de repouso dos neurônios do MNTB. Este mesmo fenômeno acontece nos neurônios do AVCN (Chanda & Xu-Friedman, 2011) e em outras regiões do SNC como no hipocampo (Chuang et al., 2000) e no cerebelo (Kelly et al., 2009).

5.5 Receptores mGlu-I modulam parâmetros pré-sinápticos no Cálice de Held.

De forma geral, para avaliar as características sinápticas são registradas EPSC/IPSC. No entanto, sabendo que a corrente da membrana, I_m , está relacionada com alterações do potencial de membrana, V_m , e da capacitância da membrana, C_m , de acordo com $I_m = C_m \frac{dV_m}{dt}$, podemos obter informações proporcionais à corrente sináptica a partir da análise da primeira derivada, $\frac{dV_m}{dt}$, de registros do EPSP em *current-clamp*. Através desta abordagem observamos que houve incremento na amplitude dos EPSP' ao inibir os receptores mGlu-I durante a estimulação em alta frequência.

O cálice de Held proporciona a maior parte das entradas sinápticas glutamatérgicas aos neurônios do MNTB (Barnes-Davies & Forsythe, 1995; Takahashi, et al., 1996). Durante as primeiras semanas de vida a amplitude das correntes AMPA

aumenta enquanto as NMDA diminuem consideravelmente no final da segunda semana de vida (Joshi & Wang, 2002; Steinert, et al., 2010). Desta forma os eventos excitatórios no MNTB em animais adultos são considerados AMPAérgicos.

Considerando que o potencial de reversão das correntes AMPA seja aproximadamente 0 mV e lembrando que o DHPG causa uma hiperpolarização dos neurônios do MNTB, o aumento da força eletromotriz para I_{AMPA} poderia explicar, pelo menos em parte, o aumento do EPSP' pela ativação de receptores mGlu-I. Sendo que a relação I-V da corrente AMPA é linear (Joshi & Wang, 2002) esperaríamos que o impacto na diferença de potencial e no aumento dos EPSP' fosse similar. No entanto, o aumento do tamanho do EPSP' foi em torno de 20%, enquanto o aumento da força eletromotriz para I_{AMPA} foi apenas de 3-4%. Assim vemos que não há uma correspondência destes dois parâmetros e por tanto a contribuição do aumento da força eletromotriz da corrente AMPA não deveria ser a principal causa responsável pelo aumento dos EPSP'.

A origem do aumento na amplitude do EPSP' poderia derivar de alterações pré- ou pós-sinápticas. Ao nível pós-sináptico poderiam surgir como resultado de mudanças na cinética dos canais AMPA (Ishikawa et al., 2002; Postlethwaite, et al., 2007). Contudo, não observamos nenhuma alteração significativa na cinética dos mEPSP que poderia explicar o aumento do EPSP'. Estes dados são coerentes com recentes achados revelando que a ativação exógena de receptores mGlu-I não altera a cinética dos sEPSC, mais precisamente o tempo de subida e o tempo de decaimento (Peng, et al., 2020).

Entre os mecanismos de regulação pré-sinápticos, podemos citar a ação da I_{NaP} , que é ativada pela despolarização pré-sináptica gerada pelos receptores mGlu-I no cálice, resultando em um aumento da frequência e amplitude dos sEPSP e sEPSC, sem alterar os eEPSC (Peng, et al., 2020). Nos animais C57BL/6 há uma tendência para a redução na frequência dos mEPSP, no entanto em animais CBA/J não observamos este mesmo efeito. Assim é necessário aumentar o número de observacionais para corroborar se há uma diminuição na frequência dos mEPSP que estaria sendo mediada por receptores mGlu-I localizados no terminal pré-sináptico. Como a amplitude dos mEPSP não foi alterada, isto sugere que o tamanho quântico se mantém constante durante inibição de receptores mGlu-I.

A relação do pulso pareado (PPR) é uma medida de plasticidade de curto prazo que aponta variações na *Pr* de vesículas sinápticas (Oleskevich, et al., 2000). Juntos, os

dados de camundongos CBA/CaJ e C57Bl/6 mostraram redução no PPR e aumento no EPSP₁' quando os receptores mGlu-I foram bloqueados. Esta variação é um indicativo de que o aumento do EPSP' durante a inibição de receptores mGlu-I foi causada por um aumento da *Pr* (Zucker & Regehr, 2002). Em neurônios do MNTB a ativação de receptores mGlu-I causa retroinibição no cálice de Held por meio da ativação de receptores CB1 (Kushmerick et al., 2004). Ativação de receptores CB1 resulta em inibição de correntes de cálcio (Sullivan, 1999; Brown et al., 2003; Brown et al., 2004) que por sua vez reduzem a probabilidade de liberação de vesículas e o conteúdo quântico dos EPSP (revisado por Schneggenburger & Forsythe, 2006; revisado por Neher, 2017). Assim, o efeito que observamos na *Pr* quando inibimos os receptores mGlu pode ser consequência da falta de ativação dos CB1R, resultando em desinibição de canais Ca_v e um aumento do número de vesículas liberadas.

As nossas observações de EPSP' maiores, *Pr* aumentada e tamanho quântico constante poderiam indicar que o conteúdo quântico teria mudado durante o tratamento. Desta forma avaliamos pelo método direto a possibilidade de variações no conteúdo quântico (ver Eq. 2).

Em registros *in vitro* em *current-clamp* de camundongos C57Bl/6J P30, foi reportado um valor de *m* de 22; já em registros *in vivo* este valor foi de 17 (Lorteije, et al., 2009). Na linhagem CBA, em camundongos jovens (P15) foi reportado *m* = 120 (Oleskevich et al., 2004), porém estes registros foram feitos em concentração extracelular de Ca²⁺ de 2 mM, enquanto nossos dados e os reportados por Lorteije et al. (2009) foram registrados em concentração de Ca²⁺ 1.2 mM. Nossas análises em camundongos CBA/CaJ entre 5 e 9 meses de idade revelaram que o *m* variou entre 15 e 18. A divergência deste valor com reportes anteriores pode estar relacionada com dois fatores: i) como mostrado na figura 8D apesar das amplitudes dos mEPSP e eEPSP estarem fortemente correlacionados com o mEPSP' e eEPSP', ao estimar o *m* (Eq. 2) era de esperar valores ~25% menores, e ii) em nossas condições experimentais houve liberação multiquântica, caracterizada pela sobreposição de eventos miniaturas (Figura 21A), contribuindo para que a amplitude dos mEPSP' fosse superestimada. Desta forma nossa análise subestima o valor de *m*, sendo preciso realizar esses experimentos inibindo parcialmente a I_{Ca} (aumentando o Mg²⁺ extracelular ou adicionando Cd²⁺) para obter uma melhor estimativa do *m*. Apesar destes fatores que dificultam uma estimativa precisa do valor absoluto de *m*, em experimentos pareados observamos um aumento do

conteúdo quântico durante a inibição de receptores mGlu-I, suportando a evidência prévia de que a *Pr* das vesículas poderia estar aumentada.

Na figura 22 é possível observar heterogeneidade das sinapses ao avaliar o PPR, sendo que na situação controle 50% delas apresentaram potenciação e o restante depressão. Durante o tratamento com os inibidores de receptores mGlu-I a variedade desta resposta é abolida e todas as sinapses apresentaram depressão no pulso pareado. Ao comparar as amplitudes dos EPSP_{ss}' na condição controle e durante o tratamento não houve alteração significativa ($P=0.6$). Resultados semelhantes foram obtidos por Taschenberger et al. (2016) ao aplicar um análogo do DAG, PdBu, enquanto a sinapse foi estimulada em 100 e 200 Hz. O PdBu, ao agir como análogo do DAG, desencadeia dois efeitos, i) se ligar em diversos sítios da proteína Munc13 alterando sua conformação (Rhee, et al., 2002) ou ii) ativar PKC que por sua vez fosforila Munc18 (Genç et al., 2014). Em ambos os casos, o tratamento com PdBu acaba ativando a maquinaria da exocitose. Estes dados sugerem que a inibição de receptores mGlu-I poderia estar ativando a via de sinalização PLC-DAG e este mecanismo contribuiria com o aumento do número de vesículas "*superprimed*" as quais são liberadas no início da resposta a trens de estímulos em alta frequência (Taschenberger et al., 2016).

Ainda que o aumento dos EPSP que observamos durante inibição de receptores mGlu-I seja consideravelmente semelhante ao descrito por Taschenberger et al. (2016) o bloqueio de receptores mGlu-I implica inibição da sinalização pela proteína Gq, o que estaria em contradição com o mecanismo de ação do PdBu. Uma hipótese menos provável poderia ser que outro receptor também acoplado a proteína G, por exemplo, o CB1R que pode ativar diversos tipos de proteína G (revisado por Turu & Hunyady, 2010), tivesse sua conformação alterada sendo mais propícia a ativação de proteína G α q.

Considerando que a ativação de receptores mGlu-I pode ativar a via da proteína G α q produzindo PLC e DAG e a partir deste o 2AG, isto implica que os receptores CB1 teriam uma atividade basal inibindo a liberação de vesículas no cálice de Held. Ao bloquear os receptores mGlu-I a função inibitória dos CB1 estaria comprometida, assim o influxo de Ca²⁺ através dos canais P/Q (Iwasaki & Takahashi, 1998; Forsythe et al., 1998), seria maior e conseqüentemente a probabilidade de liberação das vesículas aumentaria, como foi visto nos nossos experimentos (Figura 24).

A função do MNTB como relé sináptico inibitório é crucial para localização da origem dos sons. Para manter a precisão na transmissão dos sinais o potencial de repouso destes neurônios deve ser cuidadosamente controlado. Os receptores mGlu-I contribuem de forma importante na função do MNTB ajustando de forma tônica o potencial de membrana, adicionalmente a condutância de canais HCN é aumentada contribuindo para elevar a excitabilidade dos neurônios (Figura 24). Estes efeitos são complementados com mudanças pré-sinápticas, dado que através da ativação e inibição de receptores CB1 a amplitude dos EPSP é diminuída ou elevada garantindo fiabilidade na transmissão de sinais em alta frequência.

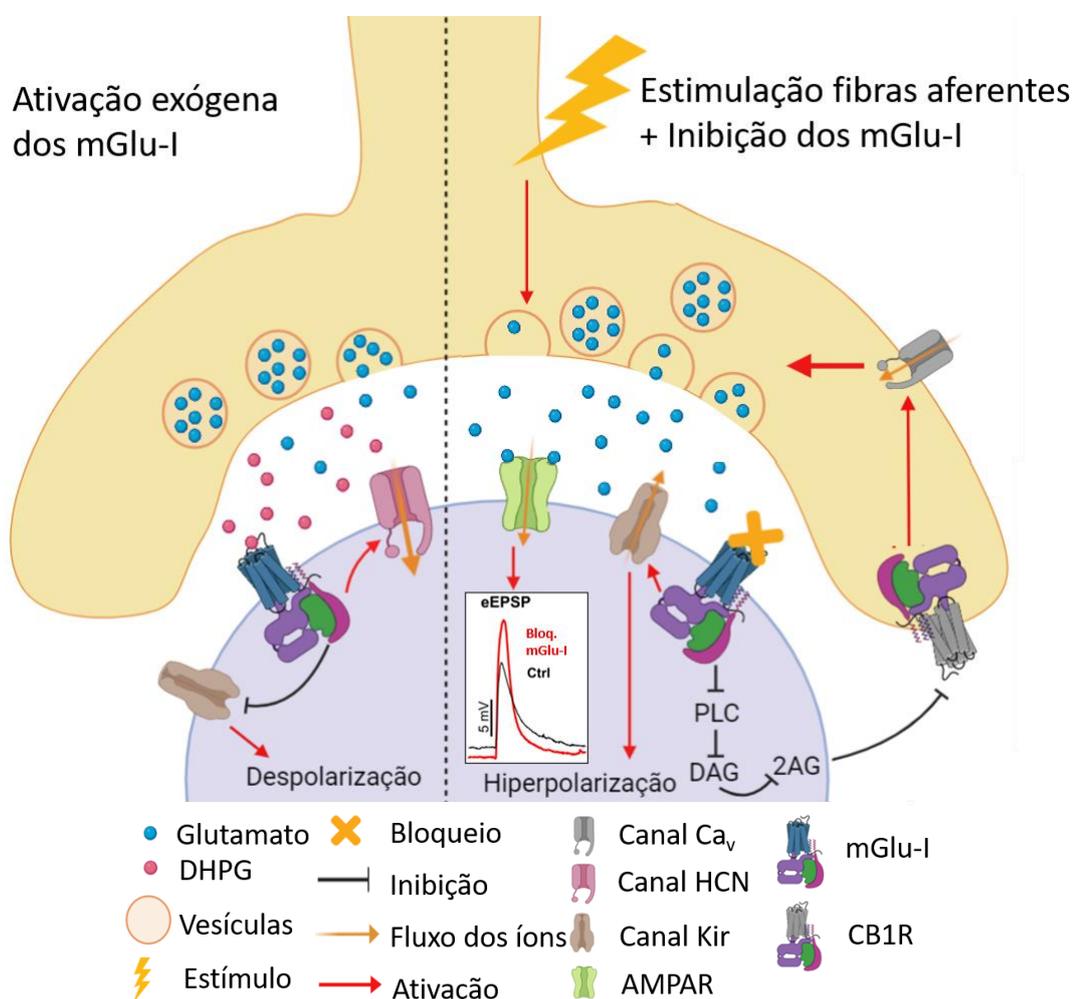


Figura 24. Mecanismos pré- e pós-sinápticos modulados por receptores mGlu-I no MNTB. À esquerda, a ativação de receptores mGlu-I com DHPG apontou que estes receptores aumentam a condutância dos canais HCN e ao mesmo tempo inibem, provavelmente, canais Kir causando aumento da resistência da membrana e a despolarização do neurônio do MNTB. À direita, o bloqueio da ativação tônica de receptores mGlu-I poderia desinibir canais Kir hiperpolarizando o neurônio pós-sináptico. Paralelamente a redução na liberação de endocanabinoides resulta na desativação de receptores CB1 pré-sinápticos (Kushmerick et al, 2004), desinibindo canais Ca_v do tipo P/Q (Iwasaki & Takahashi, 1998) e aumentando a Pr das vesículas sinápticas, gerando assim um maior eEPSP.

REFERÊNCIAS

- Acher, F. (2011). Metabotropic Glutamate Receptors Molecular Pharmacology. *Tocris Bioscience Scientific Review Series*.
- Acher, F., Battaglia, G., Braüner-Osborne, H., Conn, P., Duvoisin, R., Ferraguti, F., . . . Tateyama, M. (2019). Metabotropic glutamate receptors (version 2019.4) in the IUPHAR/BPS Guide to Pharmacology Database. *IUPHAR/BPS Guide to Pharmacology*, <https://doi.org/10.2218/gtopdb/F40/2019.4>.
- Alhadas, E. D. (2014). Ativação dos receptores metabotrópicos para glutamato do Grupo I depolarizam e aumentam a excitabilidade de neuronios no Corpo Trapezóide de camundongos neonatos. *Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia)*. Instituto de Ciências Biológicas. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- Alhadas, E. D., Correa, A. M., Naves, L., & Kushmerick, C. (2019). Mechanisms and functional impact of Group I metabotropic glutamate receptor modulation of excitability in mouse MNTB neurons. *Synapse*.
- Aoki, E., Semba, R., Keino, H., Kato, K., & Kashiwamata, S. (1988). Glycine-like immunoreactivity in the auditory pathway. *Brain Research*, 63-71.
- Balu, D. (2016). The NMDA Receptor and Schizophrenia: From Pathophysiology to Treatment. *Advances in Pharmacology*, 351-382.
- Banks, M., & Smith, P. (1992). Intracellular Recording from Neurobiotin-labeled Cells in Brain Slices of the Rat Medial Nucleus of the Trapezoid Body. *The Journal of Neuroscience*, 2819-2837.
- Banks, M., Pearce, R., & Smith, P. (1993). Hyperpolarization-Activated Cation Current (I_h) in Neurons of the Medial Nucleus of the Trapezoid Body: Voltage-Clamp Analysis and Enhancement by Norepinephrine and cAMP Suggest a Modulatory Mechanism in the Auditory Brain Stem. *Journal of Neurophysiology*.
- Barnes, G., & Slevin, J. (2003). Ionotropic Glutamate Receptor Biology: Effect on Synaptic Connectivity and Function in Neurological Disease. *Current Medicinal Chemistry*, 2059-2072.
- Barnes-Davies, M., & Forsythe, I. (1995). Pre- and postsynaptic glutamate receptors at a giant excitatory synapse in rat auditory brainstem slice. *Journal of Physiology*, 387-406.
- Baumann, V., Lehnert, S., Leibold, C., & Koch, U. (2013). Tonotopic organization of the hyperpolarization-activated current (I_h) in the mammalian medial superior olive. *Frontiers in Neural Circuits*, 1-14.
- Bayliss, D., Viana, F., Bellingham, M., & Berger, A. (1994). Characteristics and postnatal development of a Hyperpolarization-activated inward current in rat hypoglossal motoneurons in vitro. *Journal of Neurophysiology*, 119-128.
- Benarroch, E. E. (2013). HCN channel: Function and clinical implications. *Neurology*.
- Bernal-Correa, A. (2016). Isoforma de receptor e canais iônicos responsáveis pela corrente ativada por receptores metabotrópicos de glutamato em neurônios do

- MNTB. *Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia)*. Instituto de Ciências Biológicas. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- Bhattacharyya, S. (2016). Inside story of Group I Metabotropic Glutamate Receptors (mGluRs). *Int J Biochem Cell Biol*, 1-8.
- Billups, B., Graham, B., Wong, A., & Forsythe, I. (2005). Unmasking group III metabotropic glutamate autoreceptor function at excitatory synapses in the rat CNS. *Journal of Physiology*, 885-896.
- Blaustein, M., & Lederer, W. (1999). Sodium/Calcium Exchange: Its Physiological Implications. *Physiological Reviews*.
- Bobker, D., & Williams, J. (1989). Serotonin Augments the Cationic Current Ih in Central Neurons. *Neuron*, 1535-1540.
- Bonsi, P., Cuomo, D., De Persis, C., Centonze, D., Bernardi, G., Calabresi, P., & Pinasi, A. (2005). Modulatory action of metabotropic glutamate receptor (mGluR) 5 on mGluR1 function in striatal cholinergic interneurons. *Neuropharmacology*, 104-113.
- Bordi, F., & Ugolini, A. (1999). Group I metabotropic glutamate receptors: Implications for brain diseases. *Progress in Neurobiology*, 55-79.
- Borst, G., & van Hoesve, J. (2012). The Calyx of Held Synapse: From Model Synapse to Auditory Relay. *The Annual Review of Physiology*, 199-224.
- Brew, H., & Forsythe, I. (1995). Two Voltage-Dependent K⁺ Conductances with Complementary Functions in Postsynaptic Integration at a Central Auditory Synapse. *The Journal of Neuroscience*, 8011-8022.
- Brown, S. P., Safo, P. K., & Regehr, W. G. (2004). Endocannabinoids Inhibit Transmission at Granule Cell to Purkinje Cell Synapses by Modulating Three Types of Presynaptic Calcium Channels. *The Journal of Neuroscience*, 5623-5631.
- Brown, S., Brenowitz, S., & Regehr, W. (2003). Brief presynaptic bursts evoke synapse-specific retrograde inhibition mediated by endogenous cannabinoids. *Nature Neuroscience*.
- Budisantoso, T., Harada, H., Kamasawa, N., Fukazawa, Y., Shigemoto, R., & Matsui, K. (2013). Evaluation of glutamate concentration transient in the synaptic cleft of the rat calyx of Held. *Journal of Physiology*, 219-239.
- Cao, Y., Pang, J., & Zhou, P. (2016). HCN Channels as Therapeutic Targets for Heart Failure and Pain. *Current topics in medicinal chemistry*, 1855-1861.
- Cartmell, J., & Schoepp, D. (2000). Regulation of Neurotransmitter Release by Metabotropic Glutamate Receptors. *Journal of Neurochemistry*, 889-907.
- Catania, M., Landwehrmeyer, G., Testa, C., Standaert, D., Penney Jr, J., & Young, A. (1994). Metabotropic glutamate receptors are differentially regulated during development. *Neuroscience*, 481-495.
- Ceballos, C., Li, S., Roque, A., Tzounopoulos, T., & Leão, R. (2016). Ih Equalizes Membrane Input Resistance in a Heterogeneous Population of Fusiform Neurons in the Dorsal Cochlear Nucleus. *Frontiers in Cellular Neuroscience*.

- Chanda, S., & Xu-Friedman, M. (2011). Excitatory Modulation in the Cochlear Nucleus through Group I Metabotropic Glutamate Receptor Activation. *The Journal of Neuroscience*, 7450-7455.
- Charlton, M., Smith, S., & Zucker, R. (1982). Role of Presynaptic Calcium Ions and Channels in Synaptic Facilitation and Depression at the Squid Giant Synapse. *Journal of Physiology*, 173-193.
- Chuang, S., Bianchi, R., & Wong, R. (2000). Group I mGluR Activation Turns on a Voltage-Gated Inward Current in Hippocampal Pyramidal Cells. *Journal of Neurophysiology*, 2844-2853.
- Citri, A., & Malenka, R. (2008). Synaptic plasticity: multiple forms, functions, and mechanisms. *Neuropsychopharmacology*, 18-41.
- Clapham, D. (1998). Pacing Channels Are Cloned. *Neuron*, 5-7.
- Clause, A., Sturm, J., Altieri, S., Maricich, S., & Kandler, K. (2014). Development of mammalian primary sound localization circuits. Em R. Raymond, & I. Varela-Nieto, Romand, & I. Varela-Nieto, *Development of auditory and vestibular systems* (pp. 249-285). Elsevier.
- Collingridge, G., Olsen, R., Peters, J., & Spedding, M. (2009). A nomenclature for ligand-gated ion channels. *Neuropharmacology*, 2-5.
- Correa, A., Guimarães, J., Alhadas, E., & Kushmerick, C. (2017). Control of neuronal excitability by Group I metabotropic glutamate receptors. *Biophysical Reviews*.
- Cozzi, A., Meli, E., Carla, V., Pellicciari, R., Moroni, F., & Pellegrini-Giampietro, D. (2002). Metabotropic glutamate 1 (mGlu1) receptor antagonist enhance GABAergic neurotransmission: a mechanism for the attenuation of post-ischemic injury and epileptiform activity? *Neuropharmacology*, 119-130.
- Curry, R., Peng, K., & Lu, Y. (2018). Neurotransmitter- and Release-Mode-Specific Modulation of Inhibitory Transmission by Group I Metabotropic Glutamate Receptors in Central Auditory Neurons of the Mouse. *The Journal of Neuroscience*, 8187-8199.
- Cuttle, M., Rusznák, Z., Wong, A., Owens, S., & Forsythe, I. (2001). Modulation of a presynaptic hyperpolarization-activated cationic current (I_h) at an excitatory synaptic terminal in the rat auditory brainstem. *Journal of Physiology*, 733-744.
- Dhami, G., & Ferguson, S. (2006). Regulation of metabotropic glutamate receptor signaling, desensitization and endocytosis. *Pharmacology & Therapeutics*, 260-271.
- Dittman, J., Kreitzer, A., & Regehr, W. (2000). Interplay between Facilitation, Depression, and Residual Calcium at Three Presynaptic Terminals. *The Journal of Neuroscience*, 1374-1385.
- Dölen, G., & Bear, M. (2008). Role for metabotropic glutamate receptor 5 (mGluR5) in the pathogenesis of fragile X syndrome. *The Journal of Physiology*, 1503-1508.
- Dong, H.-W. & (2013). Activation of group I metabotropic Glutamate receptors enhances persistent sodium current and rhythmic bursting in main olfactory bulb external tufted cells. *Journal of Neurophysiology*, 641-647.

- dos Santos e Alhadas, É. (2019). Modulação excitatória das células principais do núcleo medial do corpo trapezoidal por receptores metabotrópicos glutamatérgicos do Grupo I. *Tese (Doutorado em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia)*. Instituto de Ciências Biológicas. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- Doumazane, E., Scholler, P., Awier, J., Trinquet, E., Rondard, P., & Pin, J. (2011). A new approach to analyze cell surface protein complexes reveals specific heterodimeric metabotropic glutamate receptors. *FASEB J*, 66-77.
- Elezgarai, I., Benitez, R., Mateos, J., Lázaro, E., Osorio, A., Azkue, J., . . . Grandes, P. (1999). Developmental Expression of the Group III Metabotropic Glutamate Receptor mGluR4a in the Medial Nucleus of the Trapezoid Body of the Rat. *The Journal of Comparative Neurology.*, 431-440.
- Elezgarai, I., Bilbao, A., Mateos, J., Azkue, J., Benítez, R., Osorio, A., . . . Grandes, P. (2001). Group II metabotropic glutamate receptors are differentially expressed in the medial nucleus of the trapezoid body in the developing and adult rat. *Neuroscience*, 487-498.
- Erway, L. C., Willot, J. F., Archer, J. R., & Harrison, D. E. (1993). Genetics of age-related hearing loss in mice: I. Inbred and F1 hybrid strains. *Hearing Research*, 125-132.
- Ferguson, S. (2001). Evolving concepts in G Protein-coupled Receptor endocytosis: The role in receptor desensitization and signaling. *Pharmacological Reviews*, 1-24.
- Forshyte, I. (1994). Direct patch recording from identified presynaptic terminals mediating glutamatergic EPSCs in the rat CNS, in vitro. *Journal of Physiology*, 381-387.
- Forsythe, I., Tsujimoto, T., Barnes-Davies, M., Cuttle, M., & Takahashi, T. (1998). Inactivation of Presynaptic Calcium Current Contributes to Synaptic Depression at a Fast Central Synapse. *Neuron*, 797-807.
- Funahashi, M., Mitoh, Y., Kohjitani, A., & Matsuo, R. (2003). Role of the hyperpolarization-activated cation current (I_h) in pacemaker activity in area postrema neurons of rat brain slices. *Journal of Physiology.*, 135-148.
- Genç, Ö., Kochubey, O., Toonen, R., Verhage, M., & Schneggenburger, R. (2014). Munc18-1 is a dynamically regulated PKC target during short-term enhancement of transmitter release. *eLife*.
- Geng-Lin, L., Cho, S. C., & von Gersdorff, H. (2014). Phase-Locking Precision Is Enhanced by Multiquantal Release at an Auditory Hair Cell Ribbon Synapse. *Neuron*, 1404-1417.
- Geurts, J., Wolswijk, G., Bö, L., van der Valk, P., Polman, C., Troost, D., & Aronica, E. (2003). Altered expression patterns of group I and II metabotropic glutamate receptors in multiple sclerosis. *Brain*, 1755-1766.
- Giribaldi, F., Milanese, M., Bonifacino, T., Rossi, P., S., D. P., Pittaluga, A., . . . Bonanno, G. (2013). Group I metabotropic glutamate autoreceptors induce abnormal glutamate exocytosis in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neuropharmacology.*, 253-263.
- Guatteo, E., Mercuri, N., Bernardi, G., & Knopfel, T. (1999). Group I metabotropic Glutamate receptors mediated an inward current in rat Substantia nigra

- dopamine neurons that is independent from calcium mobilization. *Journal of Neurophysiology*, 1974-1981.
- Gynther, B., & Curtis, D. (1986). Pyridazinyl-GABA derivatives as GABA and Glycine antagonists in the spinal cord of the cat. *Neuroscience Letters*, 211-215.
- Hanada, T. (2020). Ionotropic Glutamate Receptors in Epilepsy: A Review Focusing on AMPA and NMDA Receptors. *Biomolecules*.
- Harris, N. C., & Constanti, A. (1995). Mechanism of Block by ZD7288 of the Hyperpolarization-Activated Inward Rectifying Current in Guinea Pig Substantia Nigra Neurons In Vitro. *Journal of Neurophysiology*, 2366-2378.
- Hassfurth, B., Magnusson, A., Grothe, B., & Koch, U. (2009). Sensory deprivation regulates the development of the hyperpolarization-activated current in auditory brainstem neurons. *European Journal of Neuroscience*, 1227-1238.
- Heinbockel, T., Heyward, P., Conquet, F., & Ennis, M. (2004). Regulation of Main Olfactory Bulb Mitral Cell Excitability by Metabotropic Glutamate Receptor mGluR1. *Journal of Neurophysiology*, 3085-3096.
- Held, H. (1893). Die centrale Gehörleitung. *Arch. Anat. Physiol. Anat. Abt.*, 201-248.
- Hequembourg, S., & Liberman, M. (2001). Spiral Ligament Pathology: A major Aspect of Age-Related Cochlear Degeneration in C57BL/6 Mice. *Journal of the Association for Research in Otolaryngology*, 118-129.
- Hermann, J., Pecka, M., H. v. G., Grothe, B., & Klug, A. (2007). Synaptic transmission at the Calyx of Held under in vivo-like activity levels. *Journal of Neurophysiology*, 807-820.
- Hermans, E., & Chaliss, R. (2001). Structural, signalling and regulatory properties of the group I metabotropic glutamate receptors: prototypic family C G-protein-coupled receptors. *Biochemical Journal*, 465-484.
- Hubbard, J., Jones, S., & Landau, E. (1968). On the Mechanism by which Calcium and Magnesium Affect the Release of Transmitter by Nerve Impulses. *Journal of Physiology*, 75-86.
- Iacovelli, L., Salvatore, L., Capobianco, L., Picascia, A., Barletta, E., Storto, M., . . . De Blasi, A. (2003). Role of G protein-coupled receptor kinase 4 and beta-arrestin 1 in agonist-stimulated metabotropic glutamate receptor 1 internalization and activation of mitogen-activated protein kinases. *The Journal of Biological Chemistry*, 12433-12442.
- Ireland, D., & Abraham, W. (2002). Group I mGluRs Increase Excitability of Hippocampal CA1 Pyramidal Neurons by a PLC-Independent Mechanism. *Journal of Neurophysiology*.
- Ishikawa, T., Sahara, Y., & Takahashi, T. (2002). A Single Packet of Transmitter Does Not Saturate Postsynaptic Glutamate Receptors. *Neuron*, 613-621.
- Ito, I., Kohda, A., Tanabe, S., Hirose, E., Hayashi, M., Mitsunaga, S., & Sugiyama, H. (1992). 3,5-Dihydroxyphenyl-glycine: a potent agonist of metabotropic glutamate receptors. *Neuroreport*, 1013-1019.

- Iwasaki, S., & Takahashi, T. (1998). Developmental changes in calcium channel types mediating synaptic transmission in rat auditory brainstem. *Journal of Physiology*, 419-423.
- Jian, K., Cifelli, P., Pignatelli, A., Frigato, E., & Belluzi, O. (2010). Metabotropic glutamate receptors 1 and 5 differentially regulate bulbar dopaminergic cell function. *Brain Research*, 47-63.
- Johnson, K., Erway, L., Cook, S., Willot, J., & Zheng, Q. (1997). A major gene affecting age-related hearing loss in C57BL/6J mice. *Hearing Research*, 83-92.
- Johnston, J., Forsythe, I., & Kopp-Scheinflug, C. (2010). Going native: voltage-gated potassium channels controlling neuronal excitability. *Journal of Physiology*, 3187-3200.
- Joshi, I., & Wang, L.-Y. (2002). Developmental profiles of glutamate receptors and synaptic transmission at a single synapse in the mouse auditory brainstem. *Journal of Physiology*, 861-873.
- Kandler, K., & Friauf, E. (1993). Pre- and Postnatal Development of Efferent Connections of the Cochlear Nucleus in the Rat. *The Journal of Comparative Neurology*, 161-184.
- Kandler, K., Clause, A., & Noh, J. (2009). Tonotopic reorganization of developing auditory brainstem circuits. *Nature Neuroscience*, 711-717.
- Kang, Y., Henchcliffe, C., Verma, A., Shankar, V., Bin, H., Kothari, P., . . . Mozley, P. (2018). 18F-FPEB PET/CT Shows mGluR5 Upregulation in Parkinson's Disease. *Journal of Neuroimaging*.
- Katayama, J., Akaike, N., & Nabekura, J. (2003). Characterization of pre- and post-synaptic metabotropic glutamate receptor-mediated inhibitory responses in substantia nigra dopamine neurons. *Neuroscience Research*, 101-115.
- Katz, B., & Miledi, R. (1968). The Role of Calcium in Neuromuscular Facilitation. *Journal of Physiology*, 481-492.
- Keele, N., Arvanov, V., & Shinnick-Gallagher, P. (Journal of Physiology). Quisqualate-preferring metabotropic glutamate receptor activates Na⁺-Ca²⁺ exchange in rat basolateral amygdala neurones. 1997, 87-104.
- Kelly, L., Farrant, M., & Cull-Candy, S. (2009). Synaptic mGluR activation drives plasticity of calcium-permeable AMPA receptors. *Nature Neuroscience*, 593-601.
- Kettunen, P., Hess, D., & El Manira, A. (2003). mGluR1, but not mGluR5, mediates depolarization of spinal cord neurons by blocking a leak current. *Journal of Neurophysiology*, 2341-2348.
- Khurana, S., Liu, Z., Lewis, A., Rosa, K., Chetkovich, D., & Golding, N. (2012). An Essential Role for Modulation of Hyperpolarization-Activated Current in the Development of Binaural Temporal Precision. *The Journal of Neuroscience*, 2814-2823.
- Kim, J., & von Gersdorff, H. (2012). Suppression of spikes during posttetanic hyperpolarization in auditory neurons: the role of temperature, Ih currents, and the Na⁺-K⁺-ATPase pump. *Journal of Neurophysiology*, 1924-1932.

- Kopp-Scheinflug, C., Pigott, B. M., & Forsythe, I. D. (2015). Nitric oxide selectively suppresses Ih currents mediated by HCN1-containing channels. *Journal of Physiology*, 1685-1700.
- Kopp-Scheinflug, C., Tolnai, S., Malmierca, M., & Rubsamen, R. (2008). The medial nucleus of the trapezoid body: comparative physiology. *Neuroscience*, 160-170.
- Kulesza, R., Kadner, A., & Berrebi, A. (2007). Distinct Roles for Glycine and GABA in Shaping the Response Properties of Neurons in the Superior Paraolivary Nucleus of the Rat. *Journal of Neurophysiology*, 1610-1620.
- Kunishima, N., Shimada, Y., Tsuji, Y., Sato, T., Yamamoto, M., Kumasaka, T., . . . Morikawa, K. (2000). Structural basis of glutamate recognition by a dimeric metabotropic glutamate receptor. *Nature*, 971-977.
- Kushmerick, C., Price, G., Taschenberger, H., Puente, N., Renden, R., & Wadiche, J. (2004). Retroinhibition of presynaptic Ca²⁺ currents by endocannabinoids released via postsynaptic mGluR activation at a calyx synapse. *J Neurosci*, 5955-5565.
- Kushmerick, C., Renden, R., & von Gersdorff, H. (2006). Physiological Temperatures Reduce the Rate of Vesicle Pool Depletion and Short-Term Depression via an Acceleration of Vesicle Recruitment. *The Journal of Neuroscience*, 1366-1377.
- Lavreysen, H., Pereira, S., Leysen, J., Langlois, X., & Lesage, A. (2004). Metabotropic glutamate 1 receptor distribution and occupancy in the rat brain: a quantitative autoradiographic study using [3H]R214127. *Neuropharmacology*, 609-619.
- Leão R. M., Kushmerick, C., Pinaud, R., Renden, R., Li, G.-L., Taschenberger, H., . . . von Gersdorff, H. (2005). Presynaptic Na⁺ Channels: Locus, Development, and Recovery from Inactivation at High-Fidelity Synapse. *The Journal of Neuroscience*, 3724-3738.
- Leão R. N., Svahn, K., Berntson, A., & Walmsley, B. (2005). Hyperpolarization-activated (Ih) currents in auditory brainstem neurons of normal and congenitally deaf mice. *European Journal of Neuroscience*, 147-157.
- Leão, K., Leão, R., Sun, H., Fyffe, R., & Walmsley, B. (2006). Hyperpolarization-activated currents are differentially expressed in mice brainstem auditory nuclei. *Journal of Physiology*, 849-864.
- Leão, R., & von Gersdorff, H. (2002). Noradrenaline Increases High-Frequency Firing at the Calyx of Held Synapse During Development by Inhibiting Glutamate Release. *Journal of Neurophysiology*, 2297-2306.
- Leão, R., Leão, R., da Costa, L., Levinson, R., & Walmsley, B. (2008). A novel role for MNTB neuron dendrites in regulating action potential amplitude and cell excitability during repetitive firing. *European Journal of Neuroscience*, 3095-3108.
- Lee, K., & Boden, P. (1997). Characterization of the inward current induced by metabotropic glutamate receptor stimulation in rat ventromedial hypothalamic neurones. *Journal of Physiology*, 649-663.
- Lein, E., Hawrylycz, M., Ao, N., Ayres, M., Bensinger, A., Bernard, A., . . . Jones, A. (2007). Genome-wide atlas of gene expression in the adult mouse brain. *Nature*, 168-176.

- Lorteije, J., Rusu, S., Kushmerick, C., & Borst, J. (2009). Reliability and Precision of the Mouse Calyx of Held Synapse. *The Journal of Neuroscience*, 13770-13784.
- Luján, R., & Ciruela, F. (2001). Immunocytochemical localization of metabotropic glutamate receptor type 1a and tubulin in rat brain. *NeuroReport*.
- Maejima, T., Hashimoto, K., Yoshida, T., Aiba, A., & Kano, M. (2001). Presynaptic Inhibition Caused by Retrograde Signal from Metabotropic Glutamate to Cannabinoid Receptors. *Neuron*, 463-475.
- Malenka, R. (1994). Synaptic plasticity in the hippocampus: LTD and LTP. *Cell*, 535-538.
- Malenka, R., & Bear, M. (2004). LTP and LTD: an embarrassment of riches. *Neuron*, 5-21.
- Marchand, P., & Marmet, L. (1983). Binominal smoothing filter: A way to avoid some pitfalls of leastsquares polynomial smoothing. *Review of Scientific Instruments*.
- Mayer, M., & Westbrook, G. (1983). A Voltage-Clamp Analysis of Inward (Anomalous) Rectification in Mouse Spinal Sensory Ganglion Neurons. *Journal of Physiology*, 19-45.
- Meldrum, B. (2000). Glutamate as a Neurotransmitter in the Brain: Review of Physiology. *Journal of Nutrition*, 1007S-1015S.
- Mikaelian, D. (1979). Developmental and Degeneration of Hearing in the C57/Bl6 Mouse: Relation of Electrophysiologic Responses From the Round Window and Cochlear Nucleus to Cochlear Anatomy and Behavioral Responses. *The Laryngoscope*.
- Mizutani, H., Hori, T., & Takahashi, T. (2006). 5-HT_{1B} receptor-mediated presynaptic inhibition at the calyx of Held immature rats. *European Journal of Neuroscience*, 1946-1954.
- Modi, M., Brooks, J., Guilmette, E., Beyna, M., Graf, R., Reim, D., . . . Buhl, D. (2018). Hyperactivity and Hypermotivation Associated With Increased Striatal mGluR1 Signaling in a Shank2 Rat Model of Autism. *Frontiers in Molecular Neuroscience*.
- Moldrich, R., Chapman, A., De Sarro, G., & Meldrum, B. (2003). Glutamate metabotropic receptors as targets for drug therapy in epilepsy. *European Journal of Pharmacology*, 3-16.
- Monteggia, L., Eisch, A., Tang M. D., Kaczmarek, L., & Nestler, E. (2000). Cloning and localization of the hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel family in rat brain. *Molecular Brain Research*.
- Moosmang, S., Biel, M., Hofmann, F., & Ludwig, A. (1999). Differential distribution of four hyperpolarization-activated cation channels in mouse brain. *Biological chemistry*, 975-980.
- Moreno-Delgado, D., Moller, T., Ster, J., Giraldo, J., Maurel, D., Rovira, X., . . . Pin, J.-P. (2014). Pharmacological evidence for a metabotropic Glutamate receptor heterodeimer in neuronal cells. *eLife*.
- Morest, D. (1968). The growth of synaptic endings in the mammalian brain: a study of the calyces of the trapezoid body. *Z Anat Entwicklungsqesch*, 201-220.
- Nakanishi, S. (1992). Molecular diversity of Glutamate receptors and implications for brain function. *Science*, 597-602.

- Neher, E. (2017). Some Subtle Lessons from the Calyx of Held Synapse. *Biophysical Perspective*, 215-223.
- Niswender, C., & Conn, P. (2010). Metabotropic Glutamate Receptors: Physiology, Pharmacology and disease. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 295-322.
- Notartomaso, S., Nakao, H., Mascio, G., Scarselli, P., Cannella, M., Zapulla, C., . . . Nicoletti, F. (2018). mGlu1 Receptors Monopolize the Synaptic Control of Cerebellar Purkinje Cells by Epigenetically Down-Regulating mGlu5 Receptors. *Scientific Reports*.
- Oleskevich, S., Clements, J., & Walmsley, B. (2000). Release probability modulates short-term plasticity at a rare giant terminal. *Journal of Physiology*, 513-523.
- Oleskevich, S., Youssoufian, M., & Walmsley, B. (2004). Presynaptic plasticity at two giant auditory synapses in normal and deaf mice. *The Journal of Physiology*, 709-719.
- Pan, Y.-Z., & Rutecki, P. (2014). Enhanced excitatory synaptic network activity following transient group I metabotropic glutamate activation. *Neuroscience*.
- Pandya, N., Klaassen, R., van der Schors, R., Slotman, J., Houtsmuller, A., Smit, A., & Li, K. (2016). Group 1 metabotropic glutamate receptors 1 and 5 form a protein complex in mouse hippocampus and cortex. *Proteomics*, 2698-2705.
- Pape, H.-C. (1996). Queer current and pacemaker: The Hyperpolarization-Activated Cation Current in Neurons. *Annual Reviews Physiology*, 299-327.
- Peng, K., Wang, X., Wang, Y., Li, D., Huang, H., & Lu, K. (2020). Mechanisms underlying enhancement of spontaneous glutamate release by group I mGluRs at a central auditory synapse. *The Journal of Neuroscience*.
- Pereira, V., & Goudet, C. (2019). Emerging trends in pain modulation by metabotropic Glutamate receptors. *Frontiers in Molecular Neuroscience*.
- Pian, P., Bucci, A., Robinson, R., & Siegelbaum, S. (2006). Regulation of Gating and Rowndown of HCN Hyperpolarization-activated Channels by Exogenous and Endogenous PIP2. *The Journal of General Physiology*, 593-604.
- Postlethwaite, M., Hening, M., Steinert, J., Graham, B., & Forsythe, I. (2007). Acceleration of AMPA receptor kinetics underlies temperature-dependent changes in synaptic strength at the rat calyx of Held. *The Journal of Physiology*, 69-84.
- Puente, N., Herminda, D., Azque, J. J., Bilbao, A., Elezgarai, I., Díez, J., . . . Grandes, P. (2005). Immunoreactivity for the Group III Receptor Subtype mGluR4a in the Visual Layers of the Rat Superior Colliculus. *Neuroscience*, 627-633.
- Purves, D., & al., e. (2004). Neurotransmitters and their receptors. *Em Neuroscience* (pp. 137-142). Sunderland: Sinauer Associates, Inc.
- Regehr, W. (2012). Short-Term Presynaptic Plasticity. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*.
- Reiner, A., & Levitz, J. (2018). Glutatergic Signaling in the Central Nervous System: Ionotropic and Metabotropic Receptors in Concert. *Neuron*, 1080-1098.

- Renden, R., Taschenberger, H., Pueste, N., Rusakov, D., Duvoisin, R., Wang, L.-Y., . . . von Gersdorff, H. (2005). Glutamate Transporter Studies Reveal the Pruning of Metabotropic Glutamate Receptors and Absence of AMPA Receptor Desensitization at Mature Calyx of Held Synapse. *The Journal of Neuroscience*, 8482-8497.
- Rhee, J.-S., Betz, A., Pyott, S., Reim, K., Varoqueaux, F., Augustin, I., . . . Brose, N. (2002). β Phorbol Ester- and Diacylglycerol-Induced Augmentation of Transmitter Release Is Mediated by Munc13s and Not by PKCs. *Cell*, 121-133.
- Ribeiro, F., Paquet, M., Ferreira, L., T., C., Swan, P., Cregar, S., & S., F. (2010). Metabotropic glutamate receptor-mediated cell signalling pathways are altered in a mouse model of Huntington's disease. *Journal of Neuroscience*, 316-324.
- Rivolta, I., Binda, A., Masi, A., & DiFrancesco, J. (2020). Cardiac and neuronal HCN Channelopathies. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*.
- Romano, C., Sesma, M., McDonald, C., O'Malley, K., Van Del Pol, A., & Olney, J. (1995). Distribution of Metabotropic Glutamate Receptor mGluR5 Immunoreactivity in Rat Brain. *The Journal of Comparative Neurology*, 455-469.
- Romano, C., Yang, W.-L., & O'Malley, K. (1996). Metabotropic Glutamate Receptor 5 Is a Disulfide-linked Dimer. *The Journal of Biological Chemistry*, 28612-28616.
- Rusznák, Z., Pál, B., Kószeghy, A., Szücs, G., & Paxinos, G. (2013). The hyperpolarization-activated non-specific cation current I_{h} adjusts the membrane properties, excitability, and activity pattern of the giant cells in the rat dorsal cochlear nucleus. *European Journal of Neuroscience*, 876-890.
- Saini, D., Kalyanaraman, V., Chisari, M., & Gautam, N. (2007). A Family of G Protein Subunits Translocate Reversibly from the Plasma Membrane to Endomembranes on Receptor Activation. *The Journal of Biological Chemistry*, 24099-24108.
- Santoro, B., & Baram, T. Z. (2003). The multiple personalities of h-channels. *Trends in Neuroscience*, 550-554.
- Sätzler, K., Söhl, L., Bollmann, J., Borst, J., Frostcher, M., Sakmann, B., & Lübke, J. (2002). Three-Dimensional Reconstruction of a Calyx of Held and Its Postsynaptic Principal Neuron in the Medial Nucleus of the Trapezoid Body. *The Journal of Neuroscience*, 10567-10579.
- Schneggenburger, R., & Forsythe, I. (2006). The calyx of Held. *Cell Tissue Res*, 311-337.
- Schoepp, D., Jane, D., & Moon, J. (1999). Pharmacological agents acting at subtypes of metabotropic glutamate receptors. *Neuropharmacology*, 1431-1476.
- Serikawa, S.-i., & Bonham, A. (2006). Group I Metabotropic Glutamate Receptors on Second-Order Baroreceptor Neurons Are Tonically Activated and Induce a Na^+ - Ca^{2+} Exchange Current. *J Neurophys*, 882-992.
- Sevastyanova, T., & Kammermeier, P. (2014). Cooperative Signaling between Homodimers of Metabotropic Glutamate Receptors 1 and 5. *Molecular Pharmacology*, 492-504.
- Shaikh, A., & Finlayson, P. (2003). Hyperpolarization-activated (I_{h}) conductances affect brainstem auditory neuron excitability. *Hear Res*, 183(1-2), 126-136.

- Shimamoto, K., Lebrun, B., Yasuda-Kamatani, Y., Sakaitani, M., Shigeri, Y., Yumoto, N., & Nakajima, T. (1998). DL-threo- β -Benzyloxyaspartate, A Potent Blocker of Excitatory Amino Acid Transporters. *Molecular Pharmacology*, 195-201.
- Simonyi, A., Ngomba, R., Storto, M., Cataina, M., Miller, L., Youngs, B., . . . Sun, G. (2005). Expression of Groups I and II metabotropic Glutamate receptors in the rat brain during aging. *Brain Research*, 95-106.
- Singh, M., Lujan, B., & Renden, R. (2018). Presynaptic GCaMP expression decreases vesicle release probability at the calyx of Held. *Synapse*.
- Sommer, I., Lingenhöhl, K., & Friauf, E. (1993). Principal cells of the rat medial nucleus of the trapezoid body: an intracellular in vivo study of their physiology and morphology. *Experimental Brain Research*, 223-239.
- Steinert, J., Postlethwaite, M., Jordan, M., Chernova, T., Robinson, S., & Forsythe, I. (2010). NMDAR-mediated EPSCs are maintained and accelerate in time course during maturation of mouse and rat auditory brainstem in vitro. *Journal of Physiology*, 447-463.
- Sullivan, J. (1999). Mechanisms of cannabinoid-receptor-mediated inhibition of synaptic transmission in cultured hippocampal pyramidal neurons. *The Journal of Neurophysiology*, 1286-1294.
- Takahashi, T., Forsythe, I., Tsujimoto, T., Barnes-Davies, M., & Kayoko, O. (1996). Presynaptic Calcium Current Modulation by a Metabotropic Glutamate Receptor. *Science*.
- Takahashi, T., Kajikawa, Y., & Tsujimoto, T. (1998). G-Protein-Coupled Modulation of Presynaptic Calcium Currents and Transmitter Release by a GABAB Receptor. *The Journal of Neuroscience*, 3138-3146.
- Tang, Z.-Q., & Trussell, L. (2015). Serotonergic Regulation of Excitability of Principal Cells of the Dorsal Cochlear Nucleus. *The Journal of Neuroscience*, 4540-4551.
- Taschenberger, H., & von Gersdorff, H. (2000). Fine-Tuning an Auditory Synapse for Speed and Fidelity: Developmental changes in Presynaptic Waveform, EPSC Kinetics, and Synaptic Plasticity. *The Journal of Neuroscience*, 9162-9173.
- Taschenberger, H., Leão, R., Rowland, K., Spirou, G., & von Gersdorff, H. (2002). Optimizing Synaptic Architecture and Efficiency for High-Frequency Transmission. *Neuron*, 1127-1143.
- Taschenberger, H., Woehler, A., & Neher, E. (2016). Superpriming of synaptic vesicles as a common basis for intersynapse variability and modulation of synaptic strength. *PNAS*, 4548-4557.
- Trussell, L. (1999). Synaptic Mechanisms for Coding Timing in Auditory Neurons. *Annual Review of Physiology*, 477-496.
- Turu, G., & Hunyady, L. (2010). Signal transduction of the CB1 cannabinoid receptor. *Journal of Molecular Endocrinology*, 75-85.
- Ueno, S., Bracamontes, J., Zorumski, C., Weiss, D., & Steinbach, J. (1997). Bicuculline and Gabazine Are Allosteric Inhibitors of Channel Opening of the GABAA Receptor. *The Journal of Neuroscience*, 625-634.

- Varma, N., Carlson, G., Ledent, C., & Alger, B. (2001). Metabotropic Glutamate Receptors Drive the Endocannabinoid System in Hippocampus. *The Journal of Neuroscience*, 1-5.
- von Gersdorff, H., Schneggenburger, R., Weis, S., & Neher, E. (1997). Presynaptic Depression at a Calyx Synapse: The Small Contribution of Metabotropic Glutamate Receptors. *The Journal of Neuroscience*, 8137-8146.
- Wahl-Schott, C., & Biel, M. (2009). HCN channels: Structure, cellular regulation and physiological function. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 470-494.
- Wainger, B., DeGennaro, M., Santoro, B., Siegelbaum, S., & Tibbs, G. (2001). Molecular mechanisms of cAMP modulation of HCN pacemaker channels. *Nature*, 805-810.
- Wang, R., & Reddy, P. (2017). Role of Glutamate and NMDA Receptors in Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, 1041-1048.
- Wang, L.-Y., Gan, L., Forsythe, I., & Kaczmarek, L. (1998). Contribution of the Kv3.1 potassium channel to high-frequency firing in mouse auditory neurones. *Journal of Physiology*, 183-194.
- Wedegaertner, P. (2012). G Protein Trafficking. *Subcellular Biochemistry*, 193-223.
- Wedegaertner, P., Bourne, H., & von Zastrow, M. (1996). Activation-induced subcellular redistribution of Gs alpha. *Molecular Biology of the Cell*, 1225-1233.
- Werthmann, R., Tzouros, M., Lamerz, J., Augustin, A., Fritzius, T., Trovo, L., . . . Bettler, B. (2020). Symmetric signal transduction and negative allosteric modulation of heterodimeric mGlu1/5 receptors. *Neuropharmacology*.
- Willot, J., Bross, L., & McFadden, S. (1994). Morphology of the inferior colliculus in C57BL/6J and CBA/J Mice Across the life Span. *Neurobiology of aging*, 175-183.
- Yamashita, T., Ishikawa, T., & Takahashi, T. (2003). Developmental increase in vesicular glutamate content does not cause saturation of AMPA receptors at the calyx of Held synapse. *Journal of Neuroscience*, 3633-3638.
- Yamashita, T., Kanda, T., Eguchi, K., & Takahashi, T. (2009). Vesicular glutamate filling and AMPA receptor occupancy at the calyx of Held synapse of immature rats. *Journal of Physiology*, 2327-2339.
- Yin, S., Noetzel, M., Johnson, K., Zamorano, R., Jalan-Sakrikar, N., Gregory, K., & Conn, P. (2014). Selective actions of novel allosteric modulators reveal functional heteromers of metabotropic Glutamate receptors in the CNS. *The Journal of Neuroscience*, 79-94.
- Zong, X., Stieber, J., Ludwing, A., Hofmann, F., & Biel, M. (2001). A Single Histidine Residue Determines the pH Sensitivity of the Pacemaker Channel HCN2. *The Journal of Biological Chemistry*, 6313-6319.
- Zucker, R., & Regehr, W. (2002). Short-term synaptic plasticity. *Annual Review of Physiology*.

AGRADECIMENTO ÀS AGÊNCIAS DE FOMENTO

Este trabalho foi desenvolvido com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) que custeou minha bolsa de estudos aqui no Brasil e durante o estágio sanduiche no exterior. O Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) financiaram a execução do projeto.

Received: 11 September 2019 | Revised: 27 September 2019 | Accepted: 30 September 2019

DOI: 10.1002/syn.22137



RESEARCH ARTICLE

SYNAPSE WILEY

Mechanisms and functional impact of Group I metabotropic glutamate receptor modulation of excitability in mouse MNTB neurons

Éverton dos Santos e Alhadass¹ | Ana Maria Bernal Correa¹ | Ligia Araújo Naves² | Christopher Kushmerick²

¹Graduate Program in Physiology and Pharmacology, ICB, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

²Department of Physiology and Biophysics, ICB, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

Correspondence

Christopher Kushmerick, DFIB, ICB, UFMG, Av Antônio Carlos 6627, CEP 31.270-901 Belo Horizonte, MG, Brasil.
Email: kushmerick@ufmg.br

Funding information

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais, Grant/Award Number: APQ-02013-15; Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Grant/Award Number: 306087/2016-2; Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Proex

Abstract

We examined effects of Group I metabotropic glutamate receptors on the excitability of mouse medial nucleus of the trapezoid body (MNTB) neurons. The selective agonist, S-3,5-dihydroxyphenylglycine (DHPG), evoked a dose-dependent depolarization of the resting potential, increased membrane resistance, increased sag depolarization, and promoted rebound action potential firing. Under voltage-clamp, DHPG evoked an inward current, referred to as I_{DHPG} , which was developmentally stable through postnatal day P56. I_{DHPG} had low temperature dependence in the range 25–34°C, consistent with a channel mechanism. However, the I-V relationship took the form of an inverted U that did not reverse at the calculated Nernst potential for K^+ or Cl^- . Thus, it is likely that more than one ion type contributes to I_{DHPG} and the mix may be voltage dependent. I_{DHPG} was resistant to the Na^+ channel blockers tetrodotoxin and amiloride, and to inhibitors of iGluR (CNQX and MK801). I_{DHPG} was inhibited 21% by Ba^{2+} (500 μM), 60% by ZD7288 (100 μM) and 73% when the two antagonists were applied together, suggesting that KIR channels and HCN channels contribute to the current. Voltage clamp measurements of I_H indicated a small (6%) increase in G_{max} by DHPG with no change in the voltage dependence. DHPG reduced action potential rheobase and reduced the number of post-synaptic AP failures during high frequency stimulation of the calyx of Held. Thus, activation of post-synaptic Group I mGlu receptors modifies the excitability of MNTB neurons and contributes to the reliability of high frequency firing in this auditory relay nucleus.

KEYWORDS

HCN channel, KIR channel, metabotropic glutamate receptor, MNTB, resting potential

1 | INTRODUCTION

This paper describes increases in the excitability of mouse medial nucleus of the trapezoid body (MNTB) principal neurons when Group I metabotropic glutamate (mGlu) receptors are activated, explores specific channel mechanisms involved and the functional consequences for reliability of high-frequency neurotransmission through this auditory relay synapse.

Éverton dos Santos e Alhadass and Ana Maria Bernal Correa contributed equally to this study.

The MNTB is a group of glycinergic neurons localized in the auditory brainstem. Its principal neurons receive excitatory inputs from the contralateral cochlear nucleus and make inhibitory projections to several auditory nuclei in the superior olivary complex and lateral lemniscus (reviewed by Borst & Soria van Hoeve, 2012). MNTB neurons receive a strong excitatory input from a giant nerve terminal called the calyx of Held, as well as anatomically conventional excitatory and inhibitory afferents (Albrecht, Dondzillo, Mayer, Thompson, & Klug, 2014; Awatramani, Turecek, & Trussell, 2004, 2005; Dondzillo, Thompson, & Klug, 2016; Guinan & Li, 1990; Kuwabara & Zook, 1991; Smith, Joris, & Yin, 1998). Although synaptic inputs are required to generate post-synaptic action potentials, an equally important factor is the state of intrinsic excitability of the principal neuron, which directly affects the safety factor for neurotransmission and which, as we show in this study, is subject to modulation by Group I mGlu receptors.

mGlu receptors are expressed in both the MNTB principal neuron and in its major synaptic input, the calyx of Held (Barnes-Davies & Forsythe, 1995; Billups, Graham, Wong, & Forsythe, 2005; von Gersdorff, Schneggenburger, Weis, & Neher, 1997; Kushmerick et al., 2004; Renden et al., 2005; Takahashi, Forsythe, Tsujimoto, Barnes-Davies, & Onodera, 1996). In the calyx, Group II/III mGlu autoreceptors are negatively coupled to neurotransmitter release providing short loop negative feedback (Billups et al., 2005; von Gersdorff et al., 1997). The calyx also expresses CB1 receptors that are functionally coupled to inhibition of glutamate release (Kushmerick et al., 2004). Activation of presynaptic CB1R by endocannabinoids released from the principal neuron during Group I mGlu receptor activation provides an additional possibility for negative feedback. Together, these mechanisms may fine tune glutamate release from the calyx of Held during high frequency activity.

In addition to its role in endocannabinoid-mediated feedback inhibition, Group I mGlu receptors have excitatory effects in many types of neurons. Although primarily associated with the $G_{\alpha_{q/11}}$ G protein subunit, Group I mGlu receptors can also couple through pertussis sensitive (presumably $G_{\alpha_{i/o}}$) G proteins (Bertaso et al., 2010; Holohean, Hackman, & Davidoff, 1999; Kreibich, Chalasani, & Raper, 2004; Linn, 2000). Furthermore, some actions of Group I mGlu receptor activation appear to be independent of G protein (Guérineau, Bossu, Gähwiler, & Gerber, 1995). Thus, in any given cell type, there are multiple possible signaling pathways involved with a correspondingly large number of possible effector molecules responsible for changes to membrane excitability, including ion channels and electrogenic transport proteins (see Correa, Guimarães, e Alhadass, & Kushmerick, 2017, for review). Understanding Group I mGlu changes to excitability requires the identification of the effector proteins, which, as just described, may be highly variable across different cells types.

2 | METHODS

2.1 | Material

Salts and drugs were from Sigma.

2.2 | Animals

C57Bl/6 mice of either sex were provided by the CEBIO facility of Universidade Federal de Minas Gerais. All animal procedures followed were approved by the local animal care commission (protocol CEUA-UFMG 159/2015), following institutional guidelines. Age of animals varied from post-natal day P8 to P90, depending on the experimental group (see Section 3).

2.3 | Preparation of brain slices

On the day of the experiment, animals were removed from their home cage, anesthetized with isoflurane and decapitated. The brainstem was removed and mounted with cyanoacrylate glue onto the tray of a vibrating microtome (Leica VT1000S). The tray was immersed in ice-cold low Ca^{2+} artificial CSF (aCSF) containing (in mM): 125 NaCl, 2.5 KCl, 3 $MgCl_2$, 0.1 $CaCl_2$, 25 glucose, 25 $NaHCO_3$, 1.25 NaH_2PO_4 , 0.4 ascorbic acid, 3 myo-inositol, 2 Na-pyruvate, pH 7.4, when bubbled with carbogen (95% O_2 , 5% CO_2). Coronal slices (170–200 μm) containing the MNTB were obtained and incubated in standard aCSF (as described above except with 2 mM Ca^{2+} and 1 mM Mg^{2+}) at 37°C for 45 min, and subsequently maintained at room temperature (~24°C) for no more than an additional 6 hr.

2.4 | Electrophysiology

Slices were transferred to chamber on the stage of a Modular MRK100 microscope (Siskiyou, Oregon, USA) and kept in place with a platinum harp strung with nylon thread where they were continuously perfused with standard aCSF at a rate of 2.1 ml/min. In some experiments, recordings used aCSF with 1.2 mM Ca^{2+} . In these cases, Mg^{2+} was increased to 1.8 mM to maintain constant the concentration of divalent cations. Recordings were made at $25 \pm 0.5^\circ C$ or $34 \pm 0.5^\circ C$ as indicated in the text using an inline heater (Warner Instruments model TC-324C). Cells were visualized with a 40 \times objective using infrared illumination through a video camera (IR-1000, DAGE-MTI, Indiana, USA) and video frame grabber and software (ENLTV-FM3, Encore Electronics, USA) in a PC. Drugs were included in the perfusing solution at the

final concentrations listed. S-3,5-dihydroxyphenylglycine (DHPG) was maintained as 10 mM stock in water. When DMSO was used as a drug vehicle, its concentration never exceeded 0.1%, and the same concentration of DMSO was always included in the control phase of the experiment. Each slice was used for only a single recording.

Whole-cell current-clamp and voltage-clamp recordings were obtained using an Axopatch 200 amplifier (Axon Instruments, California, USA). The signals were filtered (low pass, 5 kHz) before being sampled every 24 μ s by an A/D converter (Digidata 1322A, Axon Instruments, California, USA), managed by Strathclyde Electrophysiology Software (kindly provided by John Dempster, University of Strathclyde). Pipettes were fabricated from glass capillaries (Patch Clamp Glass, PG52151-4 World Precision Instruments) using a vertical two-stage pipette puller (PP830 Narishige, Tokyo, Japan). Open tip resistance was 2–3 M Ω . Pipettes were coated with dental wax to reduce noise and pipette capacitance. The internal solution contained (in mM): potassium gluconate 125, KCl 20, Na₂ phosphocreatine 10, EGTA 0.5, HEPES 10, Mg₂ ATP 4, Na₂ GTP 0.3, pH 7.2 (adjusted with KOH). The calculated liquid junction potential of –9 mV was corrected on-line. Series resistance was < 20 M Ω (6.6 ± 0.4 M Ω). Series resistance was not compensated during recording. However, membrane potential was corrected off-line for series resistance errors as $V_m = V_{nom} - IR_s$ where V_m is the corrected membrane potential, V_{nom} is the nominal potential, either V_{cmd} in voltage clamp experiments or electrode potential in current clamp experiments, I is pipette current and R_s is the series resistance. In voltage clamp recordings, holding current in control conditions at $V_m = -60$ mV was $+43 \pm 10$ pA.

To record calyx EPSPs and APs, a bipolar stimulating electrode was placed at the midline and constant voltage pulses were applied (<5 V, duration of 200 μ s) at 50% above threshold, determined individually for each synapse tested. High frequency stimulation consisted of trains of 101 stimuli applied at 100 Hz. The interval between stimulus trains was 60 s.

2.5 | Electrophysiological protocols, analysis and statistics

Input resistance was measured based on the peak hyperpolarization achieved during a hyperpolarizing current injection. Depolarizing sag was the difference between the final membrane potential, at the end of a hyperpolarizing pulse, and the peak. Rheobase was measured during depolarizing current injections at a resolution of 10 pA. Voltage threshold was the voltage at which dV_m/dt passed 10 V/s at the base of the action potential when the neuron was stimulated at rheobase.

I_H and its voltage dependence were measured and analyzed based on methods described previously (Bayliss, Viana, Bellingham, & Berger, 1994; Funahashi, Mitoh, Kohjitani, & Matsuo, 2003). To determine reversal potential, voltage steps from –110 to –40 mV were applied from a holding potential of –60 mV (activation curves) and then after a pre-pulse hyperpolarization to –110 mV (deactivation curves). In both cases, current was measured immediately after the capacitive transient had settled. The intersection of these curves gives the reversal potential. I_H at different test potentials was the difference between the final and initial current obtained from the activation curves. I_H conductance was calculated by dividing current amplitude by driving force, where driving force was calculated using the reversal potential determined as described above. A Boltzmann function was adjusted to the G – V curves for each cell individually, yielding the midpoint of activation ($V_{1/2}$), the steepness of the voltage dependence (K) and the maximum HCN conductance of each cell in control and during treatment with DHPG.

Differences in mean values were evaluated using either paired or unpaired Student's t test. Proportion of cells with rebound action potentials was evaluated using the Chi-squared test. Variations in I_{DHPG} in MNTB from animals of different ages was evaluated by One-way ANOVA.

3 | RESULTS

3.1 | Activation of Group I mGluR depolarizes MNTB principal neurons

To determine the effects of Group I mGlu receptor activation on the electrical excitability of MNTB principal neurons, we first measured changes to resting potential using whole-cell current clamp (Figure 1). In MNTB from P20 animals at 34°C, under control conditions, resting potential was -69 ± 2 mV ($N = 11$ cells from 9 animals). Activation of Group I mGlu receptors with S-3,5-dihydroxyphenylglycine (DHPG, 10 μ M) caused a rapid and reversible depolarization of the membrane, by 5.9 ± 1 mV (Figure 1a,b1, $N = 11$ cells from 9 animals, $p < 10^{-3}$). Similar results were obtained in MNTB from P8 mice measured at 25°C, for which the membrane resting potential was -72 ± 1 mV and DHPG provoked a depolarization of $\Delta V_m = 7.5 \pm 0.6$ mV (Figure 1b2, $N = 24$ cells from 15 animals, $p < 10^{-6}$). The effect of DHPG was dose-dependent in the range 10 nM to 100 μ M (Figure 1c), with an IC₅₀ of ~ 0.8 μ M and was strongly attenuated by 5 min pretreatment with a combination of the selective mGlu1 and mGlu5 antagonists LY367385 (240 μ M) and MPEP (10 μ M) (Figure 1c, round symbol).

3.2 | Depolarization by DHPG is accompanied by an increase in membrane resistance

The depolarization that DHPG causes could be generated by the activation of a depolarizing conductance or, alternatively, by inhibition of a standing hyperpolarizing conductance, or both. To test these possibilities, we measured membrane conductance using hyperpolarizing current injections in control and in the presence of DHPG (10 μ M, Figure 2). We observed that the depolarization caused by DHPG (Figure 2a,

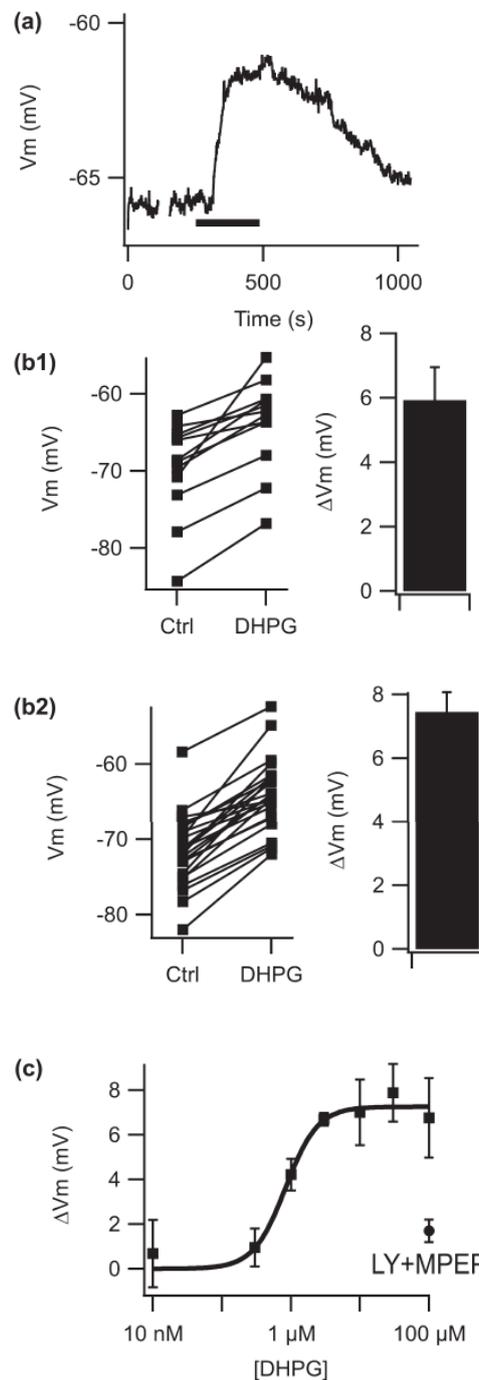


FIGURE 1 Activation of Group I mGlu receptors causes a dose-dependent membrane depolarization in MNTB neurons. (a) Time course of changes to membrane resting potential in a representative P20 MNTB neuron at 34°C in response to the selective Group I mGlu agonist DHPG (10 μ M, indicated by the bar). During the brief gap in the recording from 114–153 s, current injection protocols were applied which prevented measurement of resting potential. (b1) All-cell plot and summary of effect of DHPG on membrane resting potential in MNTB from P20 animals recorded at 34°C. (b2) As for b1, except that recordings were made in MNTB from P8 animals at 25°C RT. (c) Dose-response curve for the effect of DHPG on membrane potential. Calculated EC₅₀ was 0.8 μ M

inset) was accompanied by an increase in input resistance, evidenced by greater peak hyperpolarization evoked by the same intensity current injection. In cells from P20 MNTB at 34°C, membrane resistance was 188 ± 14 M Ω in control conditions and increased to 225 ± 22 M Ω in the presence of DHPG (Figure 2d1, $N = 11$ cells from 9 animals, $p < 10^{-2}$), a reduction in membrane conductance of $\Delta G_m = -0.8 \pm 0.18$ nS. Similar results were obtained in MNTB from P8 mice measured at 25°C, for which membrane resistance rose from 345 ± 27 M Ω to 427 ± 40 M Ω (Figure 2d2, $N = 14$ cells from 10 animals, $p < .02$), a decrease in membrane conductance of $\Delta G_m = -0.52 \pm 0.12$ nS. This result suggests that DHPG causes membrane depolarization, at least in part, by inhibiting a hyperpolarizing conductance active at rest.

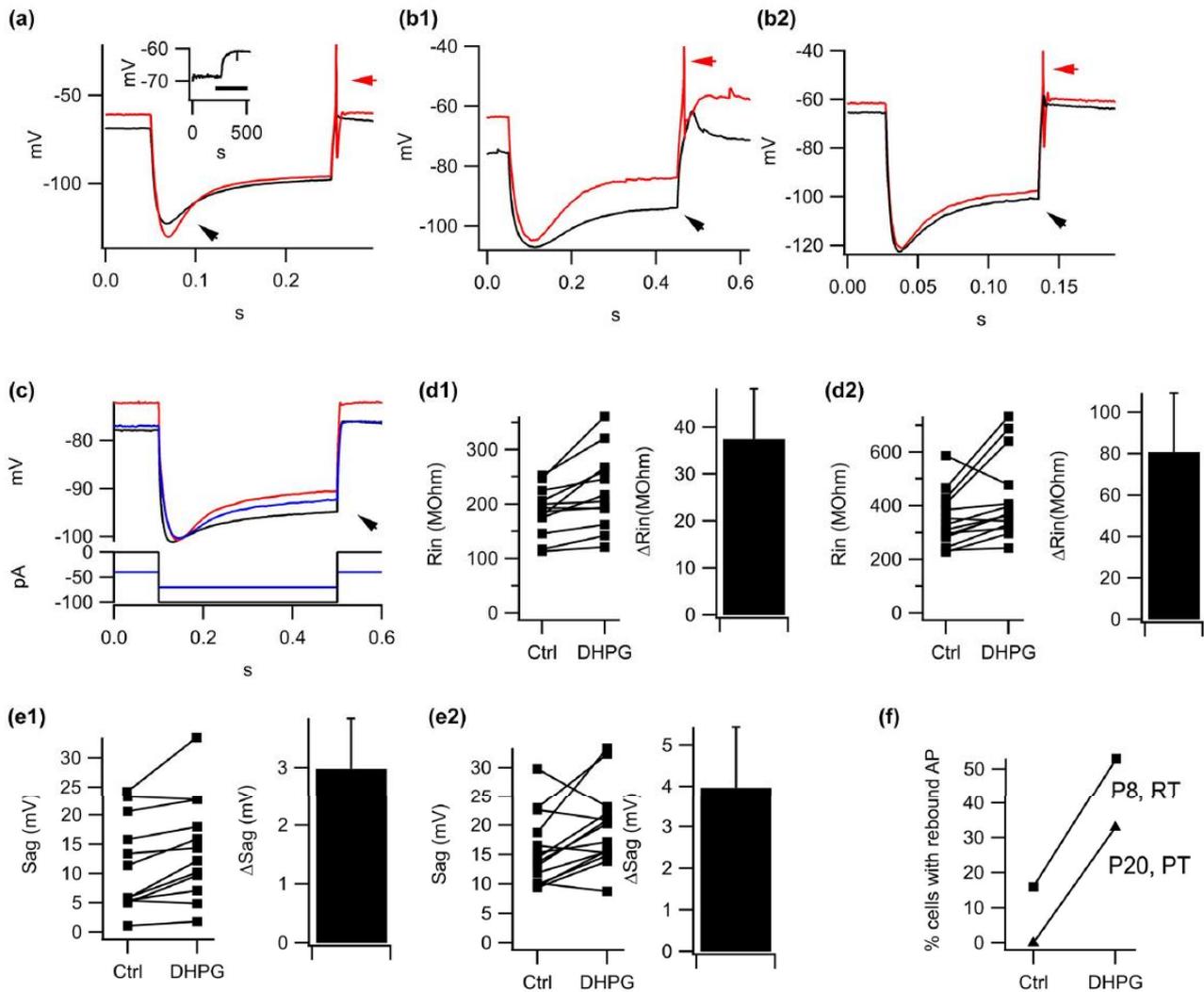


FIGURE 2 Activation of Group I mGlu receptors increases membrane resistance, increases the amount of depolarizing sag, and promotes the generation of rebound action potentials. (a) Response to hyperpolarizing current injection (-100 pA) in a representative P20 MNTB neuron recorded at 34°C in control conditions (black trace) and in the presence of DHPG (10 μM, red trace). Inset: time course of change to membrane potential evoked by DHPG, indicated by black bar. Black arrowhead indicates increase in depolarizing sag during treatment with DHPG. Red arrowhead indicates rebound action potential generated in the presence of DHPG. (b) Examples of cells for which DHPG produced an increase in depolarizing sag without an increase in peak hyperpolarization. (b1) Cell from P8 MNTB recorded at 25°C. (b2) Cell from P20 MNTB recorded at 34°C. (c) Example of experiment in which current injection protocol was changed during treatment with DHPG to restore resting potential and equalize the peak hyperpolarization (blue trace). P20, 34°C. (d) All cell plot and mean effect size for DHPG on input resistance in P8 MNTB at 25°C (d1) and P20 MNTB at 34°C (d2). (e) Effect of DHPG on the depolarizing sag in P8 MNTB at 25°C (e1) and P20 MNTB at 34°C (e2). (f) Effect of DHPG on the percent of cells firing rebound action potential

3.3 | DHPG increase sag depolarization during hyperpolarizing current injection

In addition to increasing membrane resistance, DHPG also increased the depolarizing sag, normally attributable to activation of HCN channels (Figure 2). In cells from P20 MNTB at 34°C, the change in sag ($V_{\text{sag,DHPG}} - V_{\text{sag,Ctrl}}$) was 3 ± 0.8 mV (Figure 2e1, $N = 11$ cells from 9 animals, $p < 10^{-2}$). Similar results were observed in MNTB from P8 animals at 25°C (Figure 2e2, $V_{\text{sag,DHPG}} - V_{\text{sag,Ctrl}} = 4 \pm 1.4$ mV, $N = 14$ cells from 10 animals, $p < .02$). For the example shown in Figure 2a, the peak hyperpolarization was more negative in DHPG than in control. Evidently, for this cell the increase in input resistance more than compensated the membrane depolarization leading to greater hyperpolarization for the same current injection. However, we also observed several examples of cells for which the peak hyperpolarization in DHPG was less than or equal to control. For these cells, DHPG still increased the sag (Figure 2b). Could membrane depolarization explain the increased sag? To answer this question we modified our current injection protocol, adding a negative DC offset current to restore resting potential during treatment with

DHPG back to control values. We also reduced the amplitude of the current injection, to guarantee the same peak hyperpolarization in control and DHPG. Under these conditions, we still observed an increase in sag with DHPG (Figure 2c). Therefore, neither membrane depolarization nor greater peak hyperpolarization can explain the increase in depolarizing sag caused by DHPG.

3.4 | DHPG promotes generation of rebound action potentials

Activation of Group I mGlu receptors also promoted rebound firing after hyperpolarizing (Figure 2, red arrows). In 18 cells (from 11 animals) from MNTB from younger mice (P8), 3 cells (16%, from 3 animals) exhibited rebound action potentials under control conditions. Of the remaining 15 cells (from 11 animals), 8 cells (53%, from 7 animals) started firing rebound action potentials in the presence of DHPG ($p = .03$). Similar results were obtained in more mature mice (P20). In 12 cells from 8 animals tested in this group, none exhibited rebound firing in control conditions and 33% started to fire rebound action potentials in the presence of DHPG (Figure 2f, $p = .03$).

3.5 | Inward current activated by DHPG

Under voltage clamp ($V_m = -60$ mV), DHPG (10 μ M) activated an inward current, herein denominated I_{DHPG} (Figure 3; Table 1). Like the depolarization induced by DHPG, I_{DHPG} showed little sign of desensitization during 5 min of DHPG application, and was completely reversible upon washout.

We applied slow ramp protocols (-110 to -30 mV, 45 mV/s) to determine the I - V relationship of I_{DHPG} . Ramps were applied in control aCSF, during treatment with DHPG and after washout of DHPG from the bath (vertical lines in Figure 3a1). The resulting I - V relationship thus obtained from five cells from 5 animals are shown in Figure 3a2. DHPG reversibly shifted the zero-current potential by $+8.1 \pm 1.5$ mV. To calculate the I - V curve for I_{DHPG} , we subtracted the I - V measurements during treatment with DHPG from control. The resulting difference current exhibited an inverted U shaped I - V curve as shown in Figure 3a3. The current amplitude reached a minimum near -80 mV, and did not reverse at the Nernst potential for K^+ (-104 mV) or Cl^- (-49 mV), suggesting that multiple ions types contribute to I_{DHPG} , and that the mix is voltage dependent.

3.6 | Developmental stability of I_{DHPG}

In recordings from P8 MNTB at 25°C, the amplitude of I_{DHPG} was -38 ± 3 pA ($N = 54$ cells from 37 animals). To test for developmental changes to I_{DHPG} at more physiological temperature, we measured the current at 34°C in MNTB neurons from animals of different ages, P8, P15, P20, P30, P42, P56, and at 25°C up to P90. There was no statistically significant difference in the intensity of I_{DHPG} over the age range studied ($F(5, 22) = 1.385$, $p = .26$). These experiments indicate that I_{DHPG} is developmentally stable from pre-hearing neonatal mice up to adult (Figure 3b, Table 1).

3.7 | Ba^{2+} -sensitive and ZD7288-sensitive components of I_{DHPG}

I_{DHPG} was not significantly altered by pretreatment with tetrodotoxin (TTX, 1 μ M), CNQX (10 μ M), MK801 (10 μ M) or amiloride (100 μ M), indicating that NaV channels, AMPA and NMDA iGlu receptors, and Acid Sensing Ion Channels are not required to generate I_{DHPG} (Figure 3c). In contrast, Ba^{2+} (500 μ M) inhibited I_{DHPG} by 30%, ZD7288 (100 μ M) inhibited I_{DHPG} by 60% and when applied together, Ba^{2+} and ZD7288 inhibited I_{DHPG} by 73% (Figure 3c). Taken together, these data suggest that Ba^{2+} -sensitive K^+ channels and ZD7288-sensitive HCN channels contribute to the current activated by DHPG.

To test directly the involvement of HCN current to the effects described above, we measured changes to I_H when Group I mGlu receptors were activated with DHPG (10 μ M, Figure 4). The reversal potential of I_H was measured (-36 ± 1.2 mV, $N = 14$ cells from 4 animals, Figure 4a,b) and used to convert I_H current values to conductance and to generate G_H - V curves (Figure 4c). To visualize the effect of DHPG on the midpoint of activation ($V_{1/2}$) and the steepness of voltage dependence (K), data were plotted as G/G_{max} (Figure 4c1). DHPG did not cause a significant change to the midpoint of G_H activation (Control, $V_{1/2} = -91.6 \pm 1.9$ mV vs. DHPG, $V_{1/2} = -90.8 \pm 1.3$ mV, $p = .3$, $N = 8$ cells from 7 animals) or the steepness of the G_H - V curve (Control, $K = 6.5 \pm 0.6$ mV vs. DHPG, $K = 6.6 \pm 1.0$ mV, $p = .8$, $N = 8$ cells from 7 animals). However, DHPG did cause a small but statistically significant increase in the maximal conductance, G_{H-max} , by $6 \pm 2\%$ (Figure 4c2, $N = 16$ cells from 11 animals; $p = .02$).

3.8 | DHPG reduces action potential rheobase but not threshold

We next measured the impact of mGluR-I activation on action potential current threshold (Figure 5). In control conditions, rheobase was 101 ± 9 pA. In the presence of DHPG, rheobase fell to 56 ± 8 pA ($N = 14$ cells from 9 animals, $p < 10^{-6}$), and recovered to 79 ± 7.7 pA upon washout ($p < 10^{-4}$ compared to DHPG). In contrast, DHPG did not alter the voltage threshold for AP generation, which was -45.1 ± 1.8 mV in control and -45.0 ± 1.7 mV during treatment with DHPG ($N = 13$ cells from 9 animals, $p = .9$).

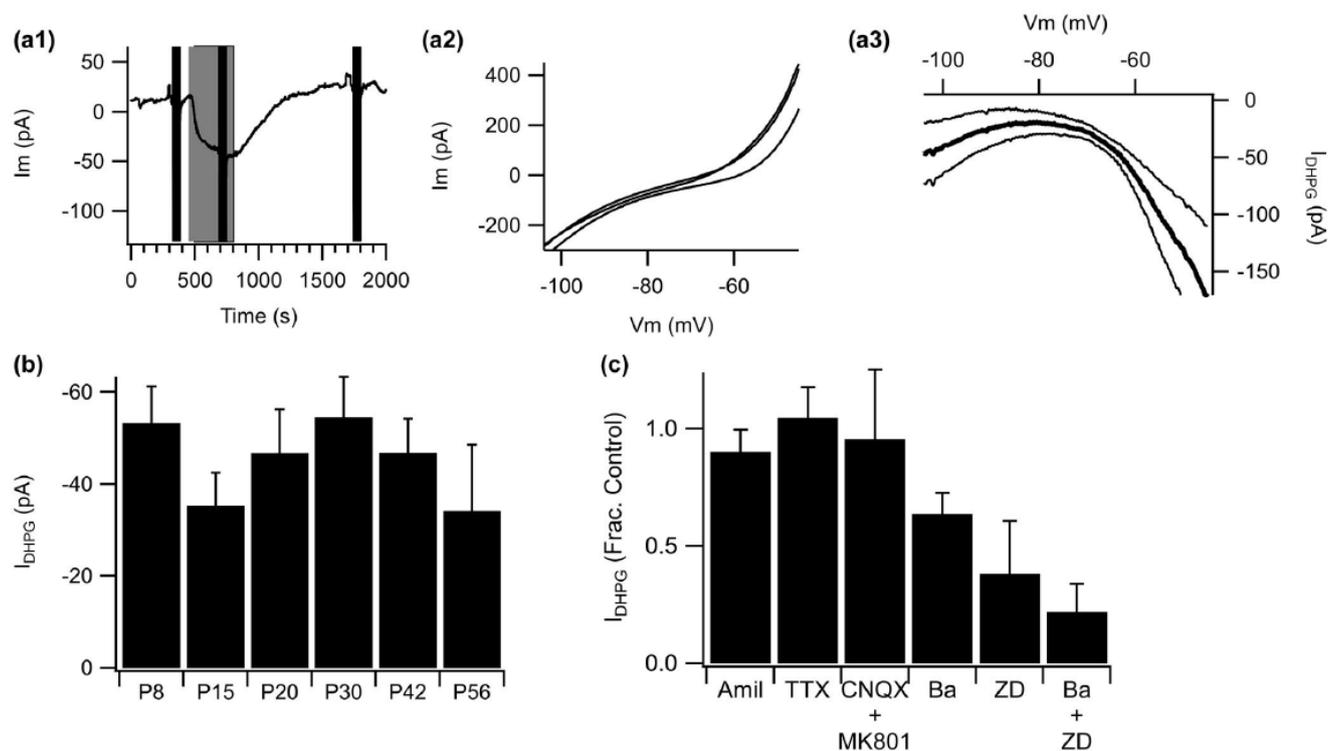


FIGURE 3 Properties of the inward current generated by Group I mGlu receptors in MNTB. (a) Time course of current and I - V relationship. (a1) Membrane current was recorded under voltage clamp ($V_m = -60$ mV) before, during, and after application of DHPG ($10 \mu\text{M}$, gray band). Black vertical lines are currents generated by ramp protocols (-110 mV to -30 mV, 45 mV/s) and used to determine the I - V relationship. (a2) Averaged ramp currents obtained in control (black) during DHPG (red) and after recovery (blue). (a3) Inverted U -shaped I - V relationship of the DHPG sensitive current, determined by subtraction of the ramp current obtained during treatment with DHPG from control. Black line, data averaged from 5 cells. Gray lines, average \pm SEM. (b) Summary of DHPG current recorded at 34°C in MNTB from animals ranging in age from P8 to P56. See also Table 1. (c) I_{DHPG} amplitude, relative to respective controls, when recorded in the presence of amiloride ($100 \mu\text{M}$), tetrodotoxin (TTX, $1 \mu\text{M}$), CNQX ($10 \mu\text{M}$) + MK801 ($10 \mu\text{M}$), Ba^{2+} ($500 \mu\text{M}$), ZD7288 ($100 \mu\text{M}$) and Ba^{2+} + ZD7288 (P8, 25°C)

TABLE 1 Effects of temperature and developmental stage on I_{DHPG}

Age (day)	Temperature	I_{DHPG} (pA)	N cells/animals
8	RT	-38 ± 2.6	54/37
	PT	-53 ± 8	4/2
15	RT	-45 ± 12	5/3
	PT	-35 ± 7	6/6
20	RT	-46 ± 16	2/1
	PT	-47 ± 10	8/6
30	RT	-49 ± 9	9/4
	PT	-55 ± 9	5/3
42	RT	NT	
	PT	-47 ± 7	5/2
56	RT	NT	
	PT	-34 ± 14	3/2
90	RT	-41	1/1
	PT	NT	

Note: RT: 25°C ; PT: 34°C ; NT: Not tested.

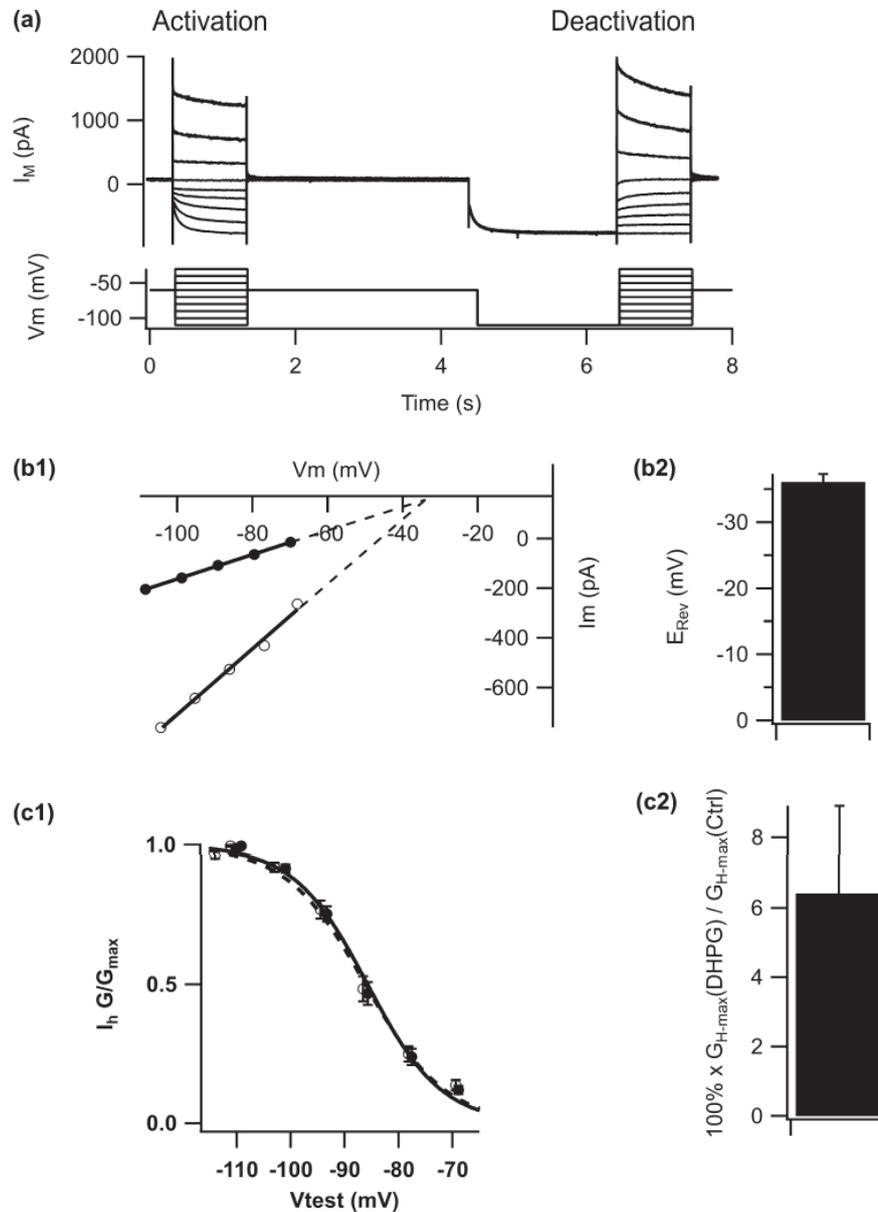


FIGURE 4 Effect of Group I mGlu receptor activation on I_H in MNTB neurons. (a) Voltage clamp protocol used to measure I_H . Voltage steps ranging from -110 mV to -40 mV and 1 s duration were applied from a holding potential of -60 mV (referred to herein as activation curves) or after 2 s prepulse conditioning at -110 mV (deactivation curves). (b) Determination of reversal potential for I_H . The instantaneous current, recorded immediately after the capacitive transient had settled, for the activation curves (black circles) or deactivation curves (white circles) were plotted versus membrane potential. (b1) Data from one representative experiment. (b2) Mean reversal potential, obtained from the projected intersection of the I - V curves as shown in b1, across $N = 14$ experiments. (c) Conductance-voltage relationship for I_H in MNTB neurons. (c1) G/G_{max} -voltage relationship in MNTB neurons in control (white circles) or in the presence of DHPG (10 μ M, black circles) indicates no significant change to the voltage dependence of activation. (c2) Maximum HCN conductance was increased during treatment with DHPG (P20, 34°C)

3.9 | DHPG increases the reliability of neurotransmission in the MNTB

To test the functional impact of Group I mGluR activation on neurotransmission in the MNTB, whole-cell recordings were made from P18 MNTB neurons at 25°C while the afferent fibers were stimulated at the midline. The Ca^{2+} concentration in the aCSF was reduced to 1.2 mM to lower release probability (divalent cation concentration was maintained by increasing the concentration of Mg^{2+} to 1.8 mM). Neurons were stimulated with trains of 100 Hz lasting 1 s, with 60 s intervals between successive trains (Figure 6). The first few stimuli of each train always generated a post-synaptic action potential, with transmission failures appearing for later stimuli. Application of DHPG (10 μ M) reduced the number of failures during the train. Under control conditions, failure rate was $32 \pm 8\%$ and in the presence of DHPG (10 μ M), failure rate fell

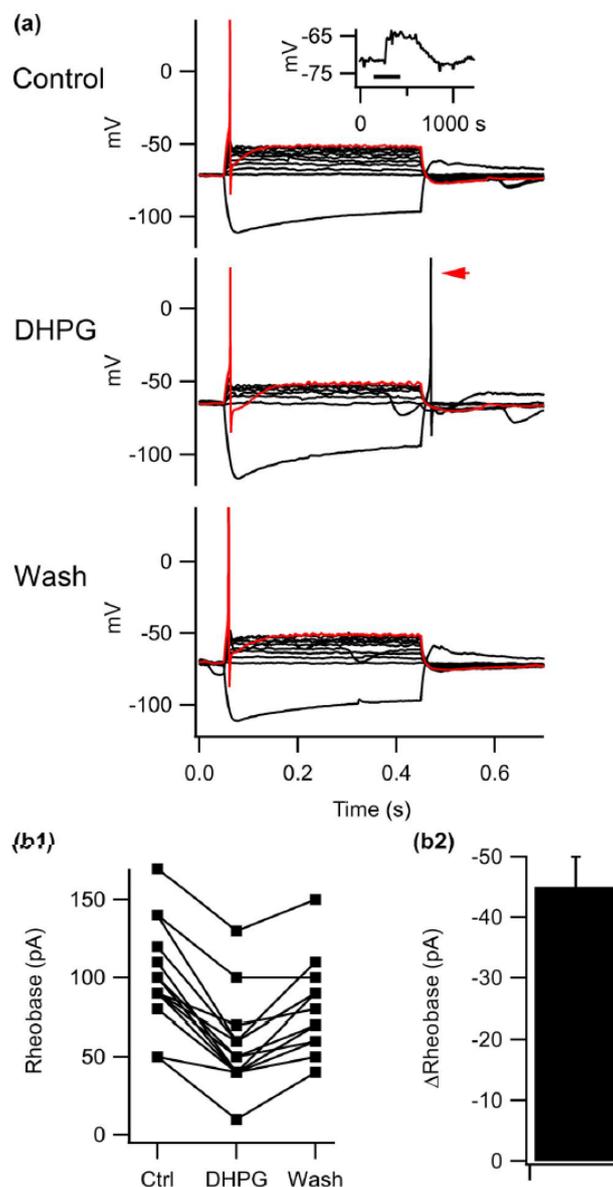
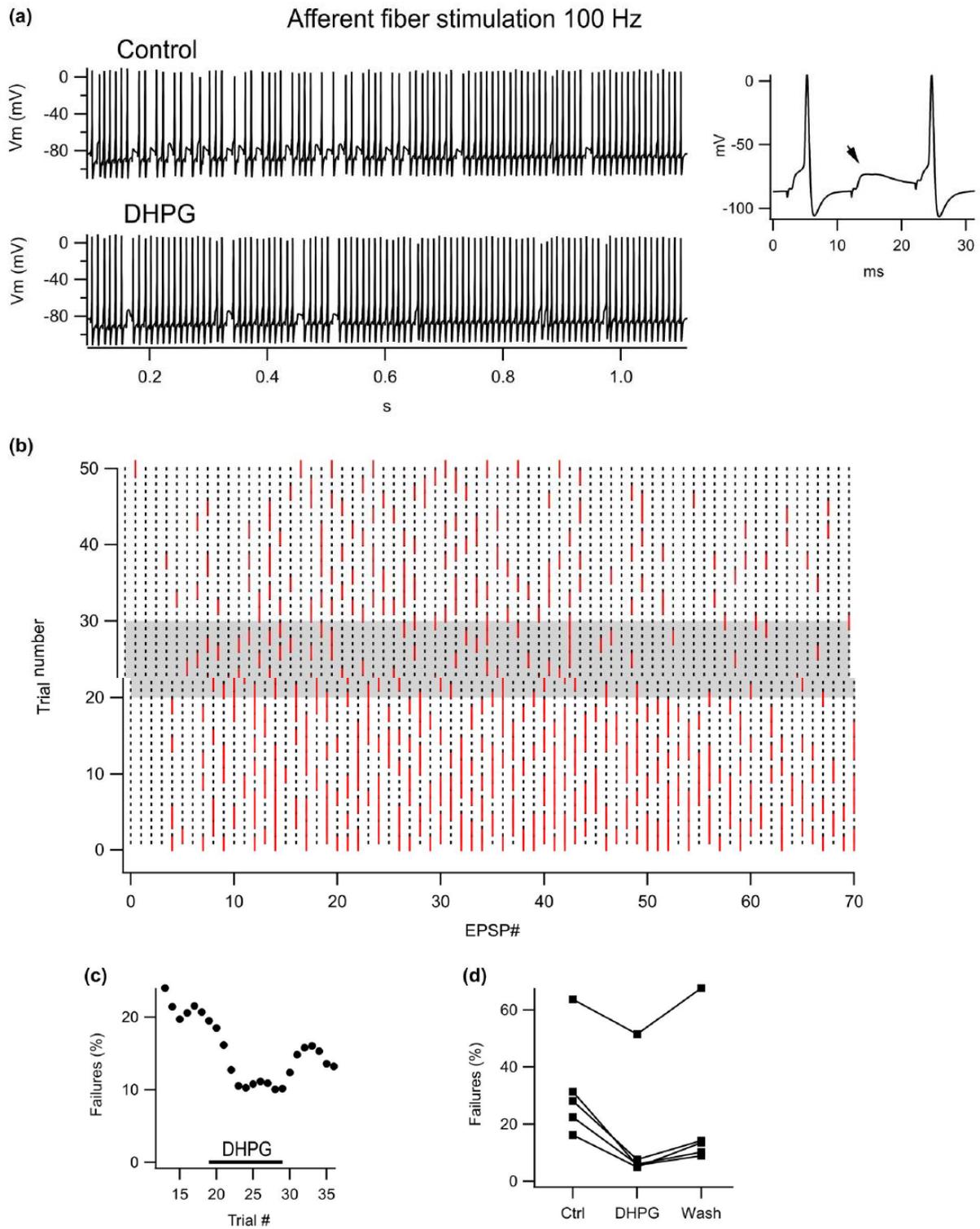


FIGURE 5 Activation of Group I mGlu receptors reduces the current threshold to generate action potentials in MNTB neurons. (a) Membrane potential response to current injection in control (rheobase = 90 pA) in the presence of DHPG (10 μM, rheobase = 50 pA) and after recovery (rheobase = 90 pA). Inset: time course of membrane depolarization induced by DHPG (10 μM). Red arrowhead indicates rebound action potential following hyperpolarizing current injection. (b) All-cell plot and mean effect size of DHPG on rheobase ($N = 14$, P8, 25°C)

to $15 \pm 9\%$ ($p < 10^{-2}$, $N = 5$ cells from 5 animals). Thus activation of Group I mGlu receptors can improve the safety margin for high frequency firing in the MNTB.

4 | DISCUSSION

We demonstrate that mouse MNTB neurons express mGluR receptors that are functionally coupled to the regulation of cellular excitability. Previous studies of Group I mGlu receptors in the MNTB have focused on the regulation of neurotransmitter release by the nerve terminals that form synapses onto MNTB principal neurons, namely the calyx of Held giant nerve terminal as well as conventional glycinergic, and GABAergic nerve terminals. Activation of Group I mGlu receptors modulates release from these terminals, an effect mediated by endocannabinoids (Curry, Peng, & Lu, 2018; Kushmerick et al., 2004). Here, we focus on changes to post-synaptic excitability when Group I mGlu receptors



EA20180410_001

FIGURE 6 Activation of Group I mGlu receptors increases the reliability of neurotransmission during 100 Hz afferent fiber stimulation. (a) EPSP and action potential recorded in representative P18 MNTB neuron during 100 Hz afferent fiber stimulation in control (black) and in the presence of DHPG (10 μ M, red). **Inset:** detail of recording showing two EPSP-APs flanking an isolated EPSP (post-synaptic AP failure, black arrowhead). Small downward deflections are the stimulation artefacts. (b) Raster plot from a representative experiment. Cell was treated with DHPG during the times indicated by the gray shading. Black symbols represent stimuli that were followed by an EPSP/AP and red lines indicate events that contained an EPSP but no AP (i.e., post-synaptic failures). (c) Time course of the effect of DHPG on the proportion of AP Failures. (d) In 5 cells tested, DHPG significantly reduced the rate of AP failures (P18, 25°C)

are activated by the agonist DHPG. The effects observed, which include membrane depolarization, increase in input resistance, reduction of rheobase, and increased depolarizing sag likely contribute to the observed increased reliability of high-frequency neurotransmission.

4.1 | Nature of the conductance changes

Activation of Group I mGlu receptors caused depolarization of the MNTB neuron and generated an inward shift in membrane current under voltage clamp while reducing membrane conductance. These effects indicate that activation of these receptors inhibits a standing hyperpolarizing conductance. This hypothesis is supported by the observation that Ba^{2+} ions, which block inward rectifier channels, partially occluded the effects of DHPG in the MNTB, and by the fact that mRNA for KIR3.1 has been detected in mouse MNTB principal neurons (Lein et al., 2007). This KIR isoform plays an important role in the regulation of cellular excitability by GPCRs (reviewed by (Lüscher & Slesinger, 2010)) including Group I mGlu receptors (Kramer & Williams, 2016; Sharon, Vorobiov, & Dascal, 1997).

In addition to the effects just described, DHPG also increased the depolarizing sag, generally considered to be a hallmark of activation of HCN channels. Previous studies have shown that HCN channels contribute to the excitability of auditory brain stem neurons (Shaikh & Finlayson, 2003), including in the MNTB (Kim & von Gersdorff, 2012; Kim, Sizov, Dobretsov, & von Gersdorff, 2007; Leao, Svahn, Berntson, & Walmsley, 2005). Moreover, these channels can be regulated by $G\alpha_q$ -coupled receptors (reviewed by He, Chen, Li, & Hu, 2014; Wahl-Schott & Biel, 2009). The increase in sag during treatment with DHPG suggested an increase in HCN conductance. Our measurements of I_H indicate an increase in G_{H-max} of 6%, which was much smaller than the observed 40% increase in sag. The likely explanation for this discrepancy is that the increase of membrane resistance caused by DHPG amplifies the impact of HCN conductance on membrane potential. A similar effect of background membrane conductance was described in fusiform neurons of the dorsal cochlear nucleus, for which the impact of G_H on membrane potential was inversely related to the background KIR conductance (Ceballos, Li, Roque, Tzounopoulos, & Leão, 2016). In general, the impact of a given change in conductance on membrane resistance depends on its amplitude relative to all other conductances present, and its impact on membrane potential is described by the chord conductance equation. In this context, our working model is that activation of Group I mGluR by DHPG inhibits a standing Ba^{2+} -sensitive hyperpolarizing conductance, likely mediated by KIR channels. This causes membrane depolarization and increased membrane resistance. Increased membrane resistance, by itself, will increase the sag produced for a given HCN conductance, and will amplify the impact of the observed increase in HCN G_{max} .

When applied together, antagonists of KIR channels and HCN channels (Ba^{2+} ion and ZD7288, respectively) inhibited I_{DHPG} by 70%. Thus, other mechanisms are probably also involved. Group I mGlu receptors can change membrane conductance and excitability by many different mechanisms that include channels and electrogenic transport mechanisms (see Correa et al., 2017, for review). The relatively weak temperature sensitivity of I_{DHPG} is suggestive of a channel mechanism, rather than a transporter, however its $I-V$ relationship does not show a reversal potential in the range studied that allows the determination of its ionic basis. Regardless of the specific mechanisms, the actions of Group I mGluR on excitability are predicted to promote firing in MNTB neurons, as observed during afferent fiber stimulation.

4.2 | Impact on neurotransmission

The MNTB is a relay synapse in the ascending auditory pathway between the bushy cells of the contralateral cochlear nucleus and its several projections to ipsilateral auditory nuclei (Guinan & Li, 1990, reviewed by Borst & Soria van Hove, 2012). When studied under standard brain slice conditions, stimulation of the calyx of Held excitatory input generates strong synaptic currents that generate EPSPs with a large safety factor for neurotransmission. However, at higher frequency, the calyx input exhibits marked short term depression (for review, see von Gersdorff & Borst, 2002; Neher & Sakaba, 2008), suggesting that the MNTB may function principally as a phasic synapse. In contrast, *in vivo* recordings indicate a lower release probability for the calyx, resulting in calyx EPSPs that are, on average, only modestly above threshold (Lorteije, Rusu, Kushmerick, & Borst, 2009). One consequence of this is lower synaptic depression allowing the MNTB to function as a tonic synapse. A second consequence are neurotransmission failures due to stochastic variability of the quantal content of EPSPs, among other causes. In this context, it is clear that changes to post-synaptic excitability that promote AP generation are likely to have significant impact on the reliability of neurotransmission in the MNTB and therefore to auditory processing which requires high fidelity information transfer across multiple brainstem nuclei.

Our results indicate that activation of Group I mGluR increases the reliability of neurotransmission in the MNTB, seen as a decrease in the frequency of post-synaptic failures during 100 Hz stimulation. The aCSF used for these recordings contained 1.2 mM Ca^{2+} to reduce release probability. The rate of failures we observed are higher than previously reported by Lujan, Dagostin, and von Gersdorff (2019). One possible explanation for this difference is that we used 1.8 mM Mg^{2+} , higher than the standard 1 mM, in order to counteract the reduction in Ca^{2+} and maintain the concentration of divalent cations constant. Increased Mg^{2+} concentration will reduce release probability further through inhibition of Ca^{2+} current. A second possible explanation for the difference is that we maintained the current clamp command at $I = 0$ and did not use pipette current to maintain the membrane potential at a predetermined value. This may have added extra variability to our data set, because of

differences in resting potential from cell to cell. However, since we measured relative effects in which each neuron served as its own control, it is unlikely that such cell to cell variability will affect our conclusions.

We have previously reported that activation of Group I mGlu receptors in MNTB principal neurons inhibits glutamate release from the rat Calyx of Held nerve terminal through liberation of endocannabinoids, activation of presynaptic CB1 receptors, inhibition of pre-synaptic Ca^{2+} channels and culminating in a reduction in vesicle release probability (Kushmerick et al., 2004). It is unknown if the same mechanisms operate in the mouse MNTB. However, our present results indicate the possibility of a dual mode of action of Group I receptors in the control of this synapse whereby presynaptic inhibition of transmitter release is compensated by changes to post-synaptic excitability.

Unlike the Group II and III mGluR and α_2 -adrenergic receptors, which undergo developmental downregulation in the MNTB (Leão & Von Gersdorff, 2002; Renden et al., 2005; Takahashi et al., 1996), the present study demonstrates that I_{DHPG} is present in the MNTB in adult animals. This result, together with a recent study of Group I mGlu receptor modulation of inhibitory inputs to the MNTB (Curry et al., 2018), indicate that these receptors modulate neurotransmission in the MNTB from around the onset of hearing up to and including developmentally mature animals.

ACKNOWLEDGMENTS

Funded by FAPEMIG (APQ-02013-15), CNPq (306087/2016-2), CAPES-PROEX.

CONFLICT OF INTEREST

Authors declare no conflict of interest.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

ORCID

Christopher Kushmerick  <https://orcid.org/0000-0001-5251-3025>

REFERENCES

- Albrecht, O., Dondzillo, A., Mayer, F., Thompson, J. A., & Klug, A. (2014). Inhibitory projections from the ventral nucleus of the trapezoid body to the medial nucleus of the trapezoid body in the mouse. *Frontiers in Neural Circuits*, 8, 83. <https://doi.org/10.3389/fncir.2014.00083>
- Awatramani, G. B., Turecek, R., & Trussell, L. O. (2004). Inhibitory control at a synaptic relay. *The Journal of Neuroscience*, 24(11), 2643–2647. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5144-03.2004>
- Awatramani, G. B., Turecek, R., & Trussell, L. O. (2005). Staggered development of GABAergic and glycinergic transmission in the MNTB. *Journal of Neurophysiology*, 93(2), 819–828. <https://doi.org/10.1152/jn.00798.2004>
- Barnes-Davies, M., & Forsythe, I. D. (1995). Pre- and postsynaptic glutamate receptors at a giant excitatory synapse in rat auditory brainstem slices. *The Journal of Physiology*, 488(2), 387–406. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1995.sp020974>
- Bayliss, D. A., Viana, F., Bellingham, M. C., & Berger, A. J. (1994). Characteristics and postnatal development of a hyperpolarization-activated inward current in rat hypoglossal motoneurons in vitro. *Journal of Neurophysiology*, 71(1), 119–128. <https://doi.org/10.1152/jn.1994.71.1.119>
- Bertaso, F., Roussignol, G., Worley, P., Bockaert, J., Fagni, L., & Ango, F. (2010). Homer1a-dependent crosstalk between NMDA and metabotropic glutamate receptors in mouse neurons. *PLoS ONE*, 5(3), e9755. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009755>
- Billups, B., Graham, B. P., Wong, A. Y. C., & Forsythe, I. D. (2005). Unmasking Group III metabotropic glutamate autoreceptor function at excitatory synapses in the rat CNS. *The Journal of Physiology*, 565(Pt 3), 885–896. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2005.086736>
- Borst, J. G. G., & Soria van Hoeve, J. (2012). The calyx of Held synapse: From model synapse to auditory relay. *Annual Review of Physiology*, 74, 199–224. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-020911-153236>
- Ceballos, C. C., Li, S., Roque, A. C., Tzounopoulos, T., & Leão, R. M. (2016). Ih equalizes membrane input resistance in a heterogeneous population of fusiform neurons in the dorsal cochlear nucleus. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 10, 249. <https://doi.org/10.3389/fncel.2016.00249>
- Correa, A. M. B., Guimarães, J. D. S., e Alhadad, E. D. S., & Kushmerick, C. (2017). Control of neuronal excitability by Group I metabotropic glutamate receptors. *Biophysical Reviews*, 9(5), 835–845. <https://doi.org/10.1007/s12551-017-0301-7>
- Curry, R. J., Peng, K., & Lu, Y. (2018). Neurotransmitter- and release-mode-specific modulation of inhibitory transmission by Group I metabotropic glutamate receptors in central auditory neurons of the mouse. *The Journal of Neuroscience*, 38(38), 8187–8199. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0603-18.2018>
- Dondzillo, A., Thompson, J. A., & Klug, A. (2016). Recurrent inhibition to the medial nucleus of the trapezoid body in the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). *PLoS ONE*, 11(8), e0160241. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160241>
- Funahashi, M., Mitoh, Y., Kohjitani, A., & Matsuo, R. (2003). Role of the hyperpolarization-activated cation current (Ih) in pacemaker activity in area postrema neurons of rat brain slices. *The Journal of Physiology*, 552(Pt 1), 135–148. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.047191>

- Guérineau, N. C., Bossu, J. L., Gähwiler, B. H., & Gerber, U. (1995). Activation of a nonselective cationic conductance by metabotropic glutamatergic and muscarinic agonists in CA3 pyramidal neurons of the rat hippocampus. *The Journal of Neuroscience*, 15(6), 4395–4407. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7790916>. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.15-06-04395.1995>
- Guinan, J. J., & Li, R. Y. (1990). Signal processing in brainstem auditory neurons which receive giant endings (calyces of Held) in the medial nucleus of the trapezoid body of the cat. *Hearing Research*, 49(1–3), 321–334. [https://doi.org/10.1016/0378-5955\(90\)90111-2](https://doi.org/10.1016/0378-5955(90)90111-2)
- He, C., Chen, F., Li, B., & Hu, Z. (2014). Neurophysiology of HCN channels: From cellular functions to multiple regulations. *Progress in Neurobiology*, 112, 1–23. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2013.10.001>
- Holohean, A. M., Hackman, J. C., & Davidoff, R. A. (1999). Mechanisms involved in the metabotropic glutamate receptor-enhancement of NMDA-mediated motoneurone responses in frog spinal cord. *British Journal of Pharmacology*, 126(1), 333–341. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0702263>
- Kim, J. H., Sizov, I., Dobretsov, M., & von Gersdorff, H. (2007). Presynaptic Ca²⁺ buffers control the strength of a fast post-tetanic hyperpolarization mediated by the $\alpha 3$ Na⁺/K⁺-ATPase. *Nature Neuroscience*, 10(2), 196–205. <https://doi.org/10.1038/nn1839>
- Kim, J. H., & von Gersdorff, H. (2012). Suppression of spikes during posttetanic hyperpolarization in auditory neurons: The role of temperature, I_h currents, and the Na⁺-K⁺-ATPase pump. *Journal of Neurophysiology*, 108(7), 1924–1932. <https://doi.org/10.1152/jn.00103.2012>
- Kramer, P. F., & Williams, J. T. (2016). Calcium release from stores inhibits GIRK. *Cell Reports*, 17(12), 3246–3255. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.11.076>
- Kreibich, T. A., Chalasani, S. H., & Raper, J. A. (2004). The neurotransmitter glutamate reduces axonal responsiveness to multiple repellents through the activation of metabotropic glutamate receptor 1. *The Journal of Neuroscience*, 24(32), 7085–7095. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0349-04.2004>
- Kushmerick, C., Price, G. D., Taschenberger, H., Puente, N., Renden, R., Wadiche, J. I., ... Von Gersdorff, H. (2004). Retroinhibition of presynaptic Ca²⁺ currents by endocannabinoids released via postsynaptic mGluR activation at a calyx synapse. *Journal of Neuroscience*, 24(26), 5955–5965. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0768-04.2004>
- Kuwabara, N., & Zook, J. M. (1991). Classification of the principal cells of the medial nucleus of the trapezoid body. *The Journal of Comparative Neurology*, 314(4), 707–720. <https://doi.org/10.1002/cne.903140406>
- Leao, R. N., Svahn, K., Berntson, A., & Walmsley, B. (2005). Hyperpolarization-activated (I_h) currents in auditory brainstem neurons of normal and congenitally deaf mice. *The European Journal of Neuroscience*, 22(1), 147–157. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2005.04185.x>
- Leão, R. M., & Von Gersdorff, H. (2002). Noradrenaline increases high-frequency firing at the calyx of Held synapse during development by inhibiting glutamate release. *Journal of Neurophysiology*, 87(5), 2297–2306. <https://doi.org/10.1152/jn.2002.87.5.2297>
- Lein, E. S., Hawrylycz, M. J., Ao, N., Ayres, M., Bensinger, A., Bernard, A., ... Jones, A. R. (2007). Genome-wide atlas of gene expression in the adult mouse brain. *Nature*, 445(7124), 168–176. <https://doi.org/10.1038/nature05453>
- Linn, C. L. (2000). Second messenger pathways involved in up-regulation of an L-type calcium channel. *Visual Neuroscience*, 17(3), 473–482. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10910113>
- Lorteije, J. A. M., Rusu, S. I., Kushmerick, C., & Borst, J. G. G. (2009). Reliability and precision of the mouse calyx of Held synapse. *Journal of Neuroscience*, 29(44), 13770–13784. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3285-09.2009>
- Lujan, B., Dagostin, A., & von Gersdorff, H. (2019). Presynaptic diversity revealed by Ca²⁺-permeable AMPA receptors at the calyx of held synapse. *The Journal of Neuroscience*, 39(16), 2981–2994. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2565-18.2019>
- Lüscher, C., & Slesinger, P. A. (2010). Emerging roles for G protein-gated inwardly rectifying potassium (GIRK) channels in health and disease. *Nature Reviews Neuroscience*, 11(5), 301–315. <https://doi.org/10.1038/nrn2834>
- Neher, E., & Sakaba, T. (2008). Multiple roles of calcium ions in the regulation of neurotransmitter release. *Neuron*, 59(6), 861–872. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.08.019>
- Renden, R., Taschenberger, H., Puente, N., Rusakov, D. A., Duvoisin, R., Wang, L.-Y., ... von Gersdorff, H. (2005). Glutamate transporter studies reveal the pruning of metabotropic glutamate receptors and absence of AMPA receptor desensitization at mature calyx of Held synapses. *The Journal of Neuroscience*, 25(37), 8482–8497. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1848-05.2005>
- Shaikh, A. G., & Finlayson, P. G. (2003). Hyperpolarization-activated (I_h) conductances affect brainstem auditory neuron excitability. *Hearing Research*, 183(1–2), 126–136. [https://doi.org/10.1016/s0378-5955\(03\)00224-7](https://doi.org/10.1016/s0378-5955(03)00224-7)
- Sharon, D., Vorobiov, D., & Dascal, N. (1997). Positive and negative coupling of the metabotropic glutamate receptors to a G protein-activated K⁺ channel, GIRK, in *Xenopus* oocytes. *The Journal of General Physiology*, 109(4), 477–490. <https://doi.org/10.1085/jgp.109.4.477>
- Smith, P. H., Joris, P. X., & Yin, T. C. (1998). Anatomy and physiology of principal cells of the medial nucleus of the trapezoid body (MNTB) of the cat. *Journal of Neurophysiology*, 79(6), 3127–3142. <https://doi.org/10.1152/jn.1998.79.6.3127>
- Takahashi, T., Forsythe, I. D., Tsujimoto, T., Barnes-Davies, M., & Onodera, K. (1996). Presynaptic calcium current modulation by a metabotropic glutamate receptor. *Science (New York, N.Y.)*, 274(5287), 594–597. <https://doi.org/10.1126/science.274.5287.594>
- von Gersdorff, H., & Borst, J. G. G. (2002). Short-term plasticity at the calyx of Held. *Nature Reviews Neuroscience*, 3(1), 53–64. <https://doi.org/10.1038/nrn705>
- von Gersdorff, H., Schneggenburger, R., Weis, S., & Neher, E. (1997). Presynaptic depression at a calyx synapse: The small contribution of metabotropic glutamate receptors. *The Journal of Neuroscience*, 17(21), 8137–8146. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9334389>. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.17-21-08137.1997>
- Wahl-Schott, C., & Biel, M. (2009). HCN channels: Structure, cellular regulation and physiological function. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 66(3), 470–494. <https://doi.org/10.1007/s00018-008-8525-0>

How to cite this article: dos Santos e Alhadas É, Correa AMB, Naves LA, Kushmerick C. Mechanisms and functional impact of Group I metabotropic glutamate receptor modulation of excitability in mouse MNTB neurons. *Synapse*. 2019;00:e22137. <https://doi.org/10.1002/syn.22137>



REVIEW

Control of neuronal excitability by Group I metabotropic glutamate receptors

Ana Maria Bernal Correa¹ · Jennifer Diniz Soares Guimarães¹ · Everton dos Santos e Alhadad¹ · Christopher Kushmerick^{1,2} 

Received: 1 June 2017 / Accepted: 27 July 2017

© International Union for Pure and Applied Biophysics (IUPAB) and Springer-Verlag GmbH Germany 2017

Abstract Metabotropic glutamate (mGlu) receptors couple through G proteins to regulate a large number of cell functions. Eight mGlu receptor isoforms have been cloned and classified into three Groups based on sequence, signal transduction mechanisms and pharmacology. This review will focus on Group I mGlu receptors, comprising the isoforms mGlu₁ and mGlu₅. Activation of these receptors initiates both G protein-dependent and -independent signal transduction pathways. The G-protein-dependent pathway involves mainly G α_q , which can activate PLC β , leading initially to the formation of IP₃ and diacylglycerol. IP₃ can release Ca²⁺ from cellular stores resulting in activation of Ca²⁺-dependent ion channels. Intracellular Ca²⁺, together with diacylglycerol, activates PKC, which has many protein targets, including ion channels. Thus, activation of the G-protein-dependent pathway affects cellular excitability through several different effectors. In parallel, G protein-independent pathways lead to activation of non-selective cationic currents and metabotropic synaptic currents and potentials. Here, we provide a survey of the membrane transport proteins responsible for these electrical effects of Group I metabotropic glutamate receptors.

Keywords Neuron · mGlu receptor · Action potential · HCN channels · KIR channels · TRPC channels · Na⁺/Ca²⁺ exchanger · SK channels

Introduction

This article reviews actions of Group I metabotropic glutamate receptors (mGlu) on neuronal excitability. This group of receptors, comprising mGlu₁ and mGlu₅, share sequence homology, coupling through protein G $\alpha_{q/11}$, pharmacology, and post-synaptic localization that distinguish them from the other six mGlu isoforms found in the mammalian genome (Cartmell and Schoepp 2000; Foord et al. 2005; Nakanishi 1992). Our focus is on short-term changes in membrane current that directly result from Group I mGlu receptor activation and the subsequent mobilization of second messenger systems. The goal is an understanding of how these currents affect neuronal excitability and of their physiological roles.

In addition to direct modulation of post-synaptic membrane currents and excitability described here, Group I mGlu receptors have many other important roles in the nervous system. Their activation can trigger release of endocannabinoids that feed back onto the nerve terminal, inhibiting the presynaptic Ca²⁺ transient and neurotransmitter release, a form of presynaptic short-term plasticity (Kreitzer and Regehr 2001; Kushmerick et al. 2004; Maejima et al. 2001; Morishita et al. 1998; Ohno-Shosaku et al. 2002; Varma et al. 2001; Yoshida et al. 2002). Group I mGlu receptors are also involved in the generation of long-term synaptic plasticity, often in partnership with pre-synaptic CB1 receptors (Chevalleyre and Castillo 2004; Edwards et al. 2006; Gladding et al. 2009; Kano and Wantanabe 2017; Olmo et al. 2016). Finally, Group I mGlu receptors also play a trophic role in development and maintenance of the nervous system and are

This article is part of a Special Issue on 'Latin America' edited by Pietro Ciancaglini and Rosangela Itri.

✉ Christopher Kushmerick
c.kushmerick@gmail.com

¹ Graduate Program in Physiology and Pharmacology, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

² Departamento de Fisiologia e Biofísica – ICB, UFMG, Av. Pres. Antônio Carlos, 6627 – Pampulha, Belo Horizonte, MG 31270-901, Brazil

involved in disease processes (Kano and Watanabe 2017; Ribeiro et al. 2017; Uesaka et al. 2015).

Structure of mGlu receptors

Metabotropic glutamate receptors are the prototypic members of Class 3 (now Class C) GPCR (Alexander et al. 2015; Foord et al. 2005), sharing little amino acid similarity with rhodopsin-like receptors or the secretin family. Alternative splicing produces several variants of mGlu₁ and mGlu₅ with long (mGlu_{1a}, mGlu_{5a-b}) or short (mGlu_{1b-d}, mGlu_{5d}) carboxyl terminals with differences in cellular localization, and G-protein signaling efficacy and desensitization (Grandes et al. 1994; Malherbe et al. 2002; Mary et al. 1998). Although no complete crystal structure exists for any mGlu receptor, standard biochemical analysis of the primary structure, together with high-resolution structures determined separately for key parts of the protein, allow a plausible overall structural model to be pieced together.

Like all known GPCR, the mGlu receptors contain seven transmembrane α -helices that form the 7TM domain (Nakanishi 1992). Besides its obvious structural role to anchor the receptor in the membrane, the 7TM domain contains binding sites for allosteric modulators (Dorée et al. 2014; Wu et al. 2014) and for the G-protein (Pin et al. 1994). The extracellular N terminal contains a large structure called the “Venus flytrap domain”, first described for GABA_B receptors (Galvez et al. 1999), which contains the orthosteric ligand binding site (Kunishima et al. 2000; Muto et al. 2007; Tsuchiya et al. 2002). The Venus flytrap domain is connected to the 7TM domain by a rigid cysteine-rich linker that communicates orthosteric ligand binding to receptor activation (Muto et al. 2007). After the seventh transmembrane segment, the 7TM domain gives way to a large intracellular C-terminal domain. As mentioned above, splice variants have either long or short C-terminal domains. These domains contain binding sites for many binding partners. Unfortunately, there are no crystal structures for either the long or short forms of the intracellular C-terminal, possibly because these domains are more flexible and unstructured in the absence of specific binding partners (Enz 2012). Nonetheless, magnetic resonance and molecular dynamics simulations provide models of its interactions with other proteins including Homer (Enz 2012).

Like the other Class C GPCR, mGlu receptors are functional dimers (Jingami et al. 2003; Kunishima et al. 2000). When extracted from plasma membranes, mGlu₁ and mGlu₅ purify as homodimers linked through cysteine–cysteine bridges in the N-terminal extracellular domain (Romano et al. 1996). In these experiments, covalently linked heterodimers were not observed. Later, FRET experiments demonstrated that some mGlu subunits (including mGlu₁ and mGlu₅), when coexpressed, come

close enough together that they may form a functional heterodimer (Doumazane et al. 2011). In addition, the isolated extracellular N-terminal domain from mGlu₁ appears to bind to the N-terminal of mGlu₅ (and vice versa) (Beqollari and Kammermeier 2010). These two findings open the possibility that co-expressed mGlu₁ and mGlu₅ may form functional heterodimers.

Pharmacology

The development and characterization of selective agonists and antagonists for mGlu receptors has greatly facilitated the study of their role in physiological and pathological responses (Hovelsø et al. 2012; Maksymetz et al. 2017; Nicoletti et al. 2011; Niswender and Conn 2010; Zou et al. 2017). Metabotropic glutamate receptors have binding sites for two classes of ligands. The orthosteric binding site for glutamate and competitive ligands is located on the large extracellular N-terminal Venus flytrap domain (O’Hara et al. 1993; Takahashi et al. 1993; Costantino et al. 1999). Conformational changes to this domain that occur when an orthosteric agonist binds communicate through the rigid cysteine-rich linker to the 7TM domain. This process results in receptor activation (Costantino et al. 1999; Rondard and Pin 2015; Takahashi et al. 1993). The other binding site, for positive and negative allosteric modulators, is located within the 7TM domain (Carroll et al. 2001; Gregory and Conn 2015; Litschig et al. 1999). Binding of a negative allosteric modulator to this site results in non-competitive inhibition of the receptor. Positive allosteric modulators do not activate the receptor, but can change the EC₅₀ for an orthosteric agonist or increase its maximum effect (Ellaithy et al. 2015; Kinney et al. 2005; Knoflach et al. 2001; Layton 2005; Sengmany et al. 2017). The history of mGlu receptor pharmacology and drug development, as well as comprehensive lists of disclosed compounds with orthosteric or allosteric activity, is well documented (Alexander et al. 2011; Ferraguti et al. 2008; Pin et al. 1999; Schoepp et al. 1999). Here, we will review the pharmacology of mGlu receptors only as it pertains to the electrophysiological results that follow.

Orthosteric agonists used to study Group I mGlu receptors include ACPD, quisqualate, and DHPG. ACPD is selective for mGlu over ionotropic (iGlu) receptors, but does not discriminate between mGlu isoforms (Aramori and Nakanishi 1992; Schoepp and Conn 1993). Quisqualate is selective for Group I among the mGlu receptors, but it also potently activates AMPA receptors (Home and Simmonds 1989), a fact that limits its usefulness for studying the role of mGlu receptors in the nervous system. The lead Group I orthosteric agonist is (s)-3,5-dihydroxyphenylglycine (DHPG) (see review in Wiśniewski and Car 2002). DHPG activates mGlu₁ and mGlu₅ with EC₅₀ \approx 10 μ M (Chen et al. 2016; Gao et al.

2015; Li et al. 2016; Sekizawa and Bonham 2006), with no significant effect on any other mGlu isoforms (Ito et al. 1992; Schoepp et al. 1994). Within Group I, isoform-selective agonists are very limited. CHPG is selective for mGlu₅ over mGlu₁, but it has a very low potency (Doherty et al. 1997), and has been reported to inhibit mGlu₁ receptors overexpressed in sympathetic neurons (Kammermeier 2012). Selective mGlu₁ agonists are still lacking.

Several competitive or non-competitive (i.e. orthosteric or allosteric) antagonists have been used to study Group I mGlu receptors. MCPG, AIDA, and LY367385 are competitive mGlu receptor antagonists. MCPG is non-selective (Hayashi et al. 1994), AIDA is selective for mGlu₁ over mGlu₅ (Moroni et al. 1997), and LY367385 is selective for mGlu₁ (Clark et al. 1997). Selective non-competitive inhibitors (negative allosteric modulators) include CPCCOEt for mGlu₁ (Litschig et al. 1999) and MPEP and MTEP for mGlu₅ (Brodkin et al. 2002; Gasparini et al. 1999; Lea and Faden 2006).

In addition to the agonists and antagonists listed above, several other drugs that are commonly used to study specific signaling pathways and downstream effectors are useful tools to characterize mGlu receptor functions. The involvement of G proteins can be tested with GDPβS or GTPγS. These non-hydrolysable GTP analogs non-selectively inactivate or hyperactivate, respectively, G-protein-mediated pathways (Heuss et al. 1999). Selective inhibition of G α_i or G α_q can be achieved with pertussis toxin (PTX) and UBO-QIC, respectively (Schrage et al. 2015), although these two drugs will also affect Gβγ functions (Gao and Jacobson 2016). The involvement of G α_s can be probed with cholera toxin, which leads to its constitutive activation. Downstream of the G-protein, several drugs are available to inhibit specific signaling pathways. For example, U73122 inhibits the phospholipase C and there are selective inhibitors for protein kinases PKA, PKC, and PKG, among others (Brager and Jonston 2007; Ji et al. 2012; Li et al. 2016; Nugent et al. 2009; Sekizawa et al. 2006; Shen and Johnson 2013; Shim et al. 2016). Finally, Ca²⁺-dependent signaling can be blocked by intracellular application of strong Ca²⁺ buffering, such as millimolar BAPTA (Kushmerick et al. 2004; Li et al. 2016; Sekizawa and Bonham et al. 2006). The use of these drugs has permitted the characterization of Group I signaling pathways (see below).

Signal transduction pathways

Activation of the Group I metabotropic glutamate receptors triggers an increase in the production of IP₃, a hallmark of coupling through the G $\alpha_{q/11}$ G-protein subunit (Berridge and Irving 1984; Sladeczek et al. 1985). Despite this apparent preference for protein G $\alpha_{q/11}$,

pertussis toxin, a highly selective inhibitor of G $\alpha_{i/o}$, inhibits responses of Group I mGlu receptors overexpressed in *Xenopus* oocytes (Houamed et al. 1991; Masu et al. 1991; Sugiyama et al. 1987) and natively expressed in neurons (Bertaso et al. 2010; Holohean et al. 1999; Kreibich et al. 2004; Linn 2000). Moreover, some effects mediated by Group I mGlu receptors persist even after disabling G-protein function with GDPβS (e.g., Guérineau et al. 1995). It is thus clear that activated Group I mGlu receptors can engage multiple parallel G-protein-dependent and -independent signaling pathways.

The canonical pathway begins with the binding of an orthosteric agonist to mGlu₁ or mGlu₅ receptors that activates the G $\alpha_{q/11}$ G-protein subunit. A major target of activated G $\alpha_{q/11}$ is PLCβ, which catalyzes the hydrolysis of the membrane phospholipid PI(4,5)P₂, forming soluble IP₃ and membrane-bound DAG (Abdul-Ghani et al. 1996; Krueger et al. 2010). Activation of PLC and hydrolysis of PI(4,5)P₂ has two major consequences. The first involves mobilization of Ca²⁺, as released IP₃ can open ligand-gated Ca²⁺ channels (IP₃R) in the endoplasmic reticulum, releasing Ca²⁺ to the cytoplasm. Ca²⁺ released from the reticulum can interact with many different cellular Ca²⁺ sensors, potentially causing a large number of complex effects (Berridge and Irving 1984). The second consequence of PLCβ activation is depletion of PI(4,5)P₂ from the plasma membrane which will affect channels that require PI(4,5)P₂. Native cells express several types of well-characterized ion channels that are gated by cytoplasmic Ca²⁺ (Faber 2009; Latorre et al. 2016), and ion channels that require PI(4,5)P₂ in the plasma membrane to open (Suh and Hille 2008). Thus, both the rise in free Ca²⁺ and the depletion of PI(4,5)P₂ from the plasma membrane can change the membrane conductance. In addition to these two mechanisms, a third pathway for changes in membrane conductance is through the actions of the Gβγ dimer released during G protein activation that can modulate ion channels (Logothetis et al. 1987). Finally, an increase in cytoplasmic Ca²⁺ may stimulate electrogenic Na⁺/Ca²⁺ exchanger currents (Blaustein and Lederer 1999), providing yet another mechanism for current generation through the canonical pathway.

Activated GPCR are targets for phosphorylation by G-protein-coupled receptor kinases and binding by β-arrestin (Wisler et al. 2014), which can lead to desensitization through receptor endocytosis. In addition to its well-known role in promoting clathrin-mediated desensitization, β-arrestin can also promote interactions with other signaling molecules, notably Src, which can lead to G protein-independent actions of Group I mGlu receptors (Heuss et al. 1999). Activation of Group I mGlu receptors can also lead to G-protein-independent pathways, leading to changes in membrane excitability, notably activation of

TRPC channels. This subject will be addressed below in the context of the cerebellar Purkinje cell.

Direct excitatory effects of mGlu receptors

Acute activation of Group I mGlu receptors have electrophysiological effects in a number of cell types. These actions, which can be excitatory or inhibitory, express themselves in several different ways, including depolarization or hyperpolarization of the resting potential, changes in the frequency of action potentials, and changes to the resting membrane resistance. To quantify these effects, measurements of membrane current under voltage clamp provide a direct measurement of underlying conductance changes. On the other hand, judging the impact of such conductance changes on cellular function usually requires the recording of membrane potentials under current clamp. When possible, we will compare results obtained using these two recording configurations.

A second set of important variables are species and age. The studies reviewed here were carried out in rat or mouse. For technical reasons, experiments on brain slices are often carried out in younger animals. During the post-natal period, expression patterns of mGlu receptors changes in several brain areas (von Gersdorff and Borst 2002; López-Bendito et al. 2002). Electrophysiological effects described below may relate either to a role of mGlu receptors in developmental changes of synaptic structure or play a physiological role in the adult animal (or both) depending on the age ranges in which they are expressed.

A third important question relates to the physiological or pathophysiological role of mGlu receptors in neuronal and synaptic function. Many of the effects of mGlu receptors described below were provoked with synthetic agonists. This raises two questions. The first is pharmacological: are the drugs full and unbiased agonists when compared to the natural endogenous ligand L-glutamate? The second relates to physiological function: under what conditions can these receptors be activated by endogenous glutamate, either at ambient levels or released synaptically? Observing effects of synaptically released glutamate on mGlu receptors is difficult because the maximal amplitude of mGlu currents are usually < 10% of iGlu currents at the same synapse (often < 1%). Thus, measurement of mGlu currents requires the use of high concentrations of iGlu receptor blockers, and interpretation of results often depends on the assumption that iGlu receptor responses are completely blocked. Another concern is that synaptic activation of mGlu receptor is sometimes only apparent when evoked in the presence of glutamate reuptake inhibitors such as TBOA or DHK (Gueler et al. 2007). One explanation is that, in brain slice experiments in which surface cells are

preferentially studied, bath perfusion prevents the build-up of ambient glutamate to the extent that may occur in an intact brain. Although plausible, this idea is difficult to test.

Electrogenic Na⁺/Ca²⁺ exchanger

The Na⁺/Ca²⁺ exchanger is a ubiquitous plasma membrane protein important for control of cytoplasmic Ca²⁺ (Blaustein and Lederer 1999). This protein mediates secondary active transport of Ca²⁺ using the Na⁺ gradient for energy, with a stoichiometry of 3 Na⁺ ions for each Ca²⁺ ion transported. Thus, transport of Ca²⁺ out of the cell by Na⁺/Ca²⁺ exchange generates inward current. The mammalian nervous system amply expresses three NCX isoforms (Nicoll et al. 1990, 1996; Li et al. 1994), and therefore Na⁺/Ca²⁺ exchange currents are expected whenever cytoplasmic Ca²⁺ is elevated, including in response to activation of Group I mGlu receptors.

Despite this simple logic, there are some reasons to question the relevance of Na⁺/Ca²⁺ exchange as an explanation for Group I mGlu receptor-dependent membrane current. In general, active transporters like the Na⁺/Ca²⁺ exchanger generate fluxes that are orders of magnitude lower than open ion channels. Therefore, the relative contribution of Na⁺/Ca²⁺ exchange to Group I mGlu receptor currents will depend on the level of exchanger expression and the Ca²⁺ concentrations achieved. A second concern is with regard to specificity. In cells that express more than one type of G_q-coupled receptor (not to mention the numerous other mechanisms that may generate Ca²⁺ transients), it is difficult to understand how Na⁺/Ca²⁺ exchange could generate a specific response. Finally, the limited number of pharmacological tools to study Na⁺/Ca²⁺ exchange has hindered conclusive testing. Substitution of Na⁺ by Li⁺ or choline inhibits Na⁺/Ca²⁺ exchange, but will also inhibit other Na⁺-dependent transporters. Selective block of Na⁺/Ca²⁺ exchange can be obtained with the 20-aa peptide XIP (Li et al. 1991), although its use in live cells is made difficult by the fact that it binds to an intracellular site on the exchanger with only moderate affinity (k_d = 5 μM; Hale et al. 1997). Another drug used to block the exchanger, KB-R7943, is much more potent for reverse mode transport (Iwamoto et al. 1996). To block normal mode transport requires concentrations that may generate non-selective effects (Santo-Domingo et al. 2007).

Despite these caveats and difficulties, convincing evidence for a role of Na⁺/Ca²⁺ exchange in mediating Group I mGlu receptor currents has been reported for neurons of the basal lateral amygdala. These cells have complex regulation by mGlu receptors. The non-selective agonist trans-ACPD causes a biphasic response consisting of an initial hyperpolarization followed by a later depolarization (Rainnie et al. 1994). The initial hyperpolarization is caused by activation of a Ca²⁺-activated K⁺ conductance and is mediated by Group II mGlu

receptors (Holmes et al. 1996; Rainnie et al. 1994). Selective Group I agonists (i.e. quisqualate or DHPG) provoke only the secondary depolarization (Holmes et al. 1996). The current activated by selective Group I mGlu receptor agonists in BLA neurons is not associated with a change in membrane resistance, shows little voltage dependence, and can be blocked by (1) intracellular BAPTA, (2) substitution of extracellular Na^+ by Li^+ or choline, and (3) intracellular XIP peptide (Keele et al. 1997). Together, these results implicate $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange as the mechanism for Group I mGlu receptor current in BLA neurons. Low mM concentrations of CHPG also evoked this current, suggesting that activation of mGlu₅ is responsible for these effects (Keele et al. 2000).

In olfactory bulb dopaminergic neurons, DHPG generates an inward current and membrane depolarization without a change in membrane conductance. These excitatory effects of DHPG are blocked by intracellular BAPTA, U73122 and, critically, KB-R7943, which, taken together, implicate electrogenic $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ current as the effector (Jian et al. 2010). Interestingly, although these cells express both mGlu₁ and mGlu₅, activation of $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange current by DHPG was specifically associated with mGlu₁. Selective activation of mGlu₅, achieved by using either DHPG in the presence of the selective mGlu₁ antagonist CPCCOEt or the selective mGlu₅ agonist CHPG, resulted in inhibition rather than excitation of the neuron.

TRPC channels

Transient receptor potential (TRP) channels are a superfamily of cation channels. Gating of TRP channels is controlled by a broad range of physical and chemical stimuli that vary between and within TRP families. Common elements among TRP channels are their Ca^{2+} permeability and potentiation by receptors coupled to G_q (reviewed by Wu et al. 2010). Members of the TRPC family (C for “classic” or “canonical”) are expressed in the brain where they participate in synaptic functions mediated by mGlu receptors (reviewed by Hartmann and Konnerth 2015). As described below, Group I mGlu receptors activate TRPC channels in several brain regions including the hippocampus (CA3 and oriens/alveus interneurons), cerebellum (Purkinje cells and molecular layer interneurons) and striatal cholinergic interneurons.

In the hippocampus, synaptic glutamate and selective Group I mGlu receptor agonists activate a non-selective cation current. Surprisingly, activation of this current was not blocked by GDP β S or GTP γ S, indicating that G-proteins were not required to couple activation of the mGlu receptor to its effector (Guérineau et al. 1995). Rather, activation of this Group I mGlu receptor current depends on Src family protein tyrosine Kinases (Heuss et al. 1999). Using the selective agonist DHPG, Gee et al. (2003) showed that activation of Group

I mGlu receptors in CA3 can also activate cation currents in a G-protein and Ca^{2+} -dependent manner. Interestingly, in this case, activation of both mGlu₁ and mGlu₅ receptors was required for full activation of the current; when applied separately, both LY367385 (mGlu₁ antagonist) and MPEP (mGlu₅ antagonist) significantly reduced the Group I mGlu receptor current. DHPG has been reported to be a biased toward the canonical G-protein/PCL/IP₃ pathway compared to glutamate (Emery et al. 2012; Hathaway et al. 2015). This may explain some of the differences observed when receptors are stimulated with DHPG versus synaptic glutamate. Identification of the cation conductance in CA3 neurons as a TRPC channel was made based on the shape of the I–V curve as well as its sensitivity to (non-selective) TRPC antagonists (La^{3+} , MDL12,330A and 2APB).

The co-existence of G-protein-dependent and -independent pathways linked to cationic current was also observed in hippocampal oriens/alveus interneurons. In this case, G-protein-independent and Src/ERK-dependent activation of TRPC channels contributes a distinct fast component to responses generated by mGlu₁ but not by mGlu₅ (Topolnik et al. 2006).

In the cerebellum, glutamate released from parallel fiber synapses onto Purkinje cells causes a slow EPSC mediated by mGlu receptors and G proteins (Hirono et al. 1998, 2001; Tempia et al. 1998). This current can be mimicked by ACPD or DHPG (Hartmann et al. 2008), but unlike other Group I-mediated responses is resistant or partially resistant to strong intracellular Ca^{2+} buffering (BAPTA), inhibition of PLC (U-73122), and inhibition of PKC. Kim et al. (2003) presented convincing evidence that mGlu₁ can regulate TRPC1 both in heterologous expression systems and in Purkinje cells. However, later studies showed that the Group I mGlu receptor current is reduced by the selective TRPC3 antagonist Pry3 (Ady et al. 2014), is absent in TRPC3 KO mice and present in TRPC1 KO mice (Hartmann et al. 2008). Together, these data indicate that TRPC3 channels are responsible, at least partially, for the Group I mGlu receptor current at the cerebellar parallel fiber to the Purkinje cell synapse.

In addition to Purkinje cells, Group I mGlu receptors generate slow inward currents in other cerebellar cell types. DHPG increases the firing rate of cerebellar molecular layer GABAergic interneurons (basket cells and stellate cells), and synaptically released glutamate generates a slow inward current sensitive to mGlu₁ inhibitors (Karakossian and Otis 2004). The biophysical and pharmacological properties of this current implicate TRPC1 channels in this response. Just as for Purkinje cells, Group I mGlu receptor current in cerebellar molecular layer interneurons is resistant to inhibition of PLC (Kubota et al. 2014). It is also partially resistant to blocking of G protein signaling with GDP β S, and sensitive to Src and ERK protein kinase inhibitors (Kubota et al. 2014), similar to that observed in hippocampal CA3 (see above). Thus, like in CA3, Group I mGlu receptors in cerebellar molecular layer

interneurons activate both Gq-dependent and -independent pathways that converge to activate TRPC channels.

Similar results were observed in striatal cholinergic interneurons. In these cells, DHPG generates a TRPC current (based on its I–V relationship and sensitivity to FFA) (Berg et al. 2007). Thus, expression of mGlu receptors-mediated activation of TRPC cationic current occurs in a representative cell type of at least three neurochemical cell types: glutamatergic (hippocampal CA3, cerebellar Purkinje cells), GABAergic (hippocampal oriens/alveus interneurons, cerebellar molecular layer interneurons) and cholinergic (striatal interneurons).

The coupling mechanism whereby activation of Group I mGlu receptors activates TRPC channels is only partially understood (Hartmann and Konnerth 2015). TRPC1 channels can be activated by diacylglycerol (DAG), but at least in the cerebellum PLC does not appear to be necessary for TRPC3 activation (Glitsch 2009; Hirono et al. 1998). Another source for DAG is PLD, which can activate TRPC channels. Group I mGlu receptors can activate PLD through the Rho protein (Kanumilli et al. 2002), and, unlike PLC, inhibition of PLD blocks the slow EPSC in cerebellar Purkinje cells (Glitsch 2009). In cerebellar Purkinje cells from stromal interaction molecule 1 KO animals, Group I mGlu receptor-mediated calcium transients and TRPC3-mediated slow EPSCs are absent, indicating an essential role for this ER calcium sensor in Group I mGlu receptor signaling (Hartmann et al. 2014).

HCN channels

Hyperpolarization and cyclic nucleotide (HCN)-activated ion channels mediate I_h cation currents in excitable cells (Biel 2009). These channels activate in response to hyperpolarization, and this voltage dependence gives rise to a characteristic “sag” during long depolarizations (i.e. a slow partial return toward resting membrane potential). HCN currents can be identified based on their slow activation by hyperpolarizing voltage steps and selective blockade by ZD7288. Sensitivity to cAMP makes I_h currents susceptible to modulation by GPCRs, perhaps most famously exemplified by the effect of adrenaline acting through B-adrenergic receptors and cardiac HCN channels to accelerate the heart rate (Brown et al. 1979). HCN isoforms are expressed in the brain (Ludwig et al. 1998; Santoro et al. 1998) where they modulate excitability and action potential firing patterns (reviewed by Shah 2014). In addition to modulation by cAMP, HCN channels are inhibited by PKC-dependent pathways (Brager and Johnston 2007; Cathala and Paupardin-Tritsch 1997; Williams et al. 2015). The ability of Group I mGlu receptors to activate PKC and protein tyrosine kinase, provides opportunity for modulation of HCN channels by Group I mGlu receptors in cells that coexpress these proteins.

Two examples of acute modulation of HCN channels by mGlu₁ activation are found in retinal ganglion cells (Li et al. 2016) and cingular cortex pyramidal neurons (Gao et al. 2016). Both cell types coexpress HCN channels and mGlu₁. Activation of Group I mGlu receptors with DHPG causes inhibition of I_h and an increase in excitability in these cells via a pathway that depends on PKC. Retinal ganglion cells appear to be under tonic inhibition by Group I mGlu receptors because application of antagonists increased firing in the absence of exogenous agonist (Li et al. 2016). A third example of modulation of HCN channels and I_h by Group I mGlu receptor modulation is found in cerebellar Purkinje cells. In these cells, increased levels of mGlu₁ caused an increase of I_h and hypoexcitability via a pathway dependent on PKA. Interestingly, this effect of mGlu₁ on Purkinje cells was due to its basal (i.e. agonist-independent) activity because it was blocked by an inverse agonist (Bay 36–7620) but not by the non-competitive antagonist CPCCOEt (Shim et al. 2016). The mechanism by which mGlu₁ activates PKA was not determined, but may be by direct activation of G_s Protein.

SK channels

Small-conductance Ca^{2+} -activated potassium channels are widely expressed in the nervous system (Faber 2009). They underlie part of the after-hyperpolarization in CA1 pyramidal neurons (Bond et al. 2004) and are modulated by Group I mGlu receptor agonists (Anwyl 1999). In dopaminergic neurons of the ventral tegmental area and substantia nigra, synaptic glutamate acts through mGlu₁ receptors to release stored Ca^{2+} that activates SK channels resulting in a slow glutamatergic IPSP (Fiorillo and Williams 1998). A similar result has been observed in primary culture of cerebellar Purkinje cells (Netzeband and Gruol 2008).

Kir channels

Inwardly-rectifying K channels (Kir) produce currents that activate at voltages near or more negative to the resting potential, and deactivate with depolarization. As such, they stabilize the resting potential and oppose subthreshold depolarizations. However, unlike a pure leak K^+ conductance, inward rectification by KIR results in progressive decline of repolarization force for larger depolarizations, and eventual release by deactivation. Inhibition of Kir channels may therefore lead to depolarization as well as a generalized increase of excitability. Kir channels lack the voltage-sensing domains of KV channels. Their apparent voltage dependence arises from involves voltage-dependent block by intracellular ions. They can also be blocked from the extracellular side by low concentrations of the ions Ba^{2+} and Cs^+ (Hibino et al. 2010).

Cloned Kir channels have been classified into seven families numbered Kir1.x–Kir7.x (Hibino et al. 2010). The Kir3.x family are also known as GIRK channels because they require the binding of $G_{i/o}$ beta-gamma subunits to activate. Activation of Kir3 channels by binding $G_{i/o}$ beta gamma subunits is perhaps the best-characterized mechanism of action of neurotransmitter action through a GPCR. In contrast to activation by $G_{i/o}$ beta gamma, G_q coupled receptors inhibit Kir channels (Sharon et al. 1997), apparently through multiple mechanisms. KIR channels require $PI(3,4)P_2$ for activation (Hille et al. 2014). Activation of PLC downstream of a G_q protein-coupled receptor can therefore inhibit these channels by depleting $PI(3,4)P_2$ from the plasma membrane (Kammermeier 2012; Kobrinsky et al. 2000) in addition to activating PKC (Keselman et al. 2007). Besides these G_q -protein-dependent mechanisms, Group I mGlu receptors can also inhibit Kir3 channels through a G-protein-independent mechanism that appears to require only an increase in intracellular Ca^{2+} (Kramer and Williams 2016).

Retinal ganglion cells coexpress KIR2 channels and mGlu₁ (Li et al. 2016). As mentioned in “HCN channels” above, Group I mGlu receptor agonists depolarize these cells and increase the firing rate. Voltage clamp experiments demonstrate that activation of Group I mGlu receptors inhibits two components of current activated by hyperpolarization, one sensitive to ZD7288 (i.e., HCN current) and the other sensitive to Ba^{2+} , (i.e., a putative KIR current). Retinal Muller cells also coexpress Group I mGlu receptors and KIR channels. In these cells, Kir4.1 current is inhibited by DHPG acting through mGlu₅ (Ji et al. 2012). In both retinal cell types, the response to DHPG appears to be Ca^{2+} -dependent because it can be blocked by intracellular BAPTA. In ganglion cells, pharmacological inhibition of PLC, PKC, and CaMKII inhibited the response, whereas in Muller cells, CaMKII was not required.

Conclusions

We have attempted to provide a survey of the membrane transport proteins (mostly channels) that are modulated by Group I mGlu receptors and account for their effects on membrane potential and excitability. Many questions remain. For example, despite much progress, the pathway that links mGlu₁ to activation of TRPC3 in cerebellar Purkinje cells is still unclear. Also unclear are the desensitization mechanisms that can generate opposite responses when short synaptic-like pulses of agonist versus long steady-state applications are employed to activate receptors. What is clear is the wide range of cell types in which activation of Group I mGlu receptors leads to rapid changes in membrane excitability. Surely, other examples remain to be discovered.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest Ana Maria Bernal Correa declares that she has no conflicts of interest. Jennifer Diniz Soares Guimarães declares that she has no conflicts of interest. Everton dos Santos e Alhadad declares that he has no conflicts of interest. Christopher Kushmerick declares that he has no conflicts of interest.

Ethical approval This article does not contain any studies with human participants or animals performed by any of the authors.

References

- Abdul-Ghani MA, Valiante TA, Carlen PL, Pennefather PS (1996) Metabotropic glutamate receptors coupled to IP3 production mediate inhibition of IAHP in rat dentate granule neurons. *J Neurophysiol* 76:2691–2700
- Ady V, Perroy J, Tricoire L et al (2014) Type I metabotropic glutamate receptors (mGlu1) trigger the gating of GluD2 delta glutamate receptors. *EMBO Rep*. <https://doi.org/10.1002/embr.201337371>
- Alexander S, Mathie A, Peters JA (2011) Guide to receptors and channels (GRAC). *Br J Pharmacol* 164:S1–S324. https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01649_1.x
- Alexander SP, Davenport AP, Kelly E et al (2015) The concise guide to PHARMACOLOGY 2015/16: G protein-coupled receptors. *Br J Pharmacol* 172:5744–5869. <https://doi.org/10.1111/bph.13348>
- Anwyl R (1999) Metabotropic glutamate receptors: electrophysiological properties and role in plasticity. *Brain Res Brain Res Rev* 29:83–120. [https://doi.org/10.1016/S0165-0173\(98\)00050-2](https://doi.org/10.1016/S0165-0173(98)00050-2)
- Aramori I, Nakanishi S (1992) Signal transduction and pharmacological characteristics of a metabotropic glutamate receptor, mGluR1, in transfected CHO cells. *Neuron* 8:757–765. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(92\)90096-V](https://doi.org/10.1016/0896-6273(92)90096-V)
- Beqollari D, Kammermeier PJ (2010) Venus fly trap domain of mGluR1 functions as a dominant negative against group I mGluR signaling. *J Neurophysiol* 104:439–448. <https://doi.org/10.1152/jn.00799.2009>
- Berg AP, Sen N, Bayliss DA (2007) TrpC3/C7 and Slo2.1 are molecular targets for Metabotropic glutamate receptor signaling in rat Striatal cholinergic Interneurons. *J Neurosci* 27:8845–8856. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0551-07.2007>
- Berridge MJ, Irvine RF (1984) Inositol trisphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. *Nature* 312:315–321. <https://doi.org/10.1038/312315a0>
- Bertaso F, Roussignol G, Worley P et al (2010) Homer1a-dependent crosstalk between NMDA and metabotropic glutamate receptors in mouse neurons. *PLoS ONE* 5:e9755. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009755>
- Biel M (2009) Cyclic Nucleotide-Regulated Cation Channels. In: *Handbook of Cell Signaling*. Elsevier, pp 9017–21. <https://doi.org/10.1074/jbc.R800075200>
- Blaustein MP, Lederer WJ (1999) Sodium/calcium exchange: its physiological implications. *Physiol Rev* 79:763–854
- Bond CT, Herson PS, Strassmaier T et al (2004) Small conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channel knock-out mice reveal the identity of calcium-dependent afterhyperpolarization currents. *J Neurosci* 24:5301–5306. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0182-04.2004>
- Bragar DH, Johnston D (2007) Plasticity of intrinsic excitability during long-term depression is mediated through mGluR-dependent changes in I(h) in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J Neurosci* 27:13926–13937. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3520-07.2007>
- Brodin J, Bradbury M, Busse C et al (2002) Reduced stress-induced hyperthermia in mGluR5 knockout mice. *Eur J Neurosci* 16:2241–2244. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2002.02294.x>

- Brown HF, DiFrancesco D, Noble SJ (1979) How does adrenaline accelerate the heart? *Nature* 280:235–236. <https://doi.org/10.1038/280235a0>
- Carroll FY, Stolle A, Beart PM et al (2001) BAY36-7620: a potent non-competitive mGlu1 receptor antagonist with inverse agonist activity. *Mol Pharmacol* 59:965–973. <https://doi.org/10.1124/mol.59.5.965>
- Cartmell J, Schoepp DD (2000) Regulation of neurotransmitter release by Metabotropic glutamate receptors. *J Neurochem* 75:889–907. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2000.0750889.x>
- Cathala L, Paupardin-Tritsch D (1997) Neurotensin inhibition of the hyperpolarization-activated cation current (I_h) in the rat substantia nigra pars compacta implicates the protein kinase C pathway. *J Physiol* 503:87–97
- Chen A, Hu WW, Jiang XL et al (2016) Molecular mechanisms of group I metabotropic glutamate receptor mediated LTP and LTD in basolateral amygdala in vitro. *Psychopharmacology* 234:681–694. <https://doi.org/10.1007/s00213-016-4503-7>
- Chevalyere V, Castillo PE (2004) Endocannabinoid-mediated metaplasticity in the hippocampus. *Neuron*. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.08.036>
- Clark BP, Baker SR, Goldsworthy J et al (1997) (+)-2-methyl-4-Carboxyphenylglycine (LY367385) selectively Antagonises Metabotropic glutamate mGluR1 receptors. *Bioorganic Med Chem Lett* 7:2777–2780. [https://doi.org/10.1016/S0960-894X\(97\)10071-3](https://doi.org/10.1016/S0960-894X(97)10071-3)
- Costantino G, Macchiarulo A, Pellicciari R (1999) Modeling of amino-terminal domains of group I metabotropic glutamate receptors: structural motifs affecting ligand selectivity. *J Med Chem* 42:5390–5401. <https://doi.org/10.1021/jm990353c>
- Doherty AJ, Palmer MJ, Henley JM et al (1997) (RS)-2-Chloro-5-Hydroxyphenylglycine(CHPG) activates mGlu5, but not mGlu1, receptors expressed in CHO cells and potentiates NMDA responses in the hippocampus. *Neuropharmacology* 36:265–267. [https://doi.org/10.1016/S0028-3908\(97\)00001-4](https://doi.org/10.1016/S0028-3908(97)00001-4)
- Doré AS, Okrasa K, Patel JC et al (2014) Structure of class C GPCR metabotropic glutamate receptor 5 transmembrane domain. *Nature* 511:557–562. <https://doi.org/10.1038/nature13396>
- Doumazane E, Scholler P, Zwier JM et al (2011) A new approach to analyze cell surface protein complexes reveals specific heterodimeric metabotropic glutamate receptors. *FASEB J* 25:66–77. <https://doi.org/10.1096/fj.10-163147>
- Edwards DA, Kim J, Alger BE (2006) Multiple mechanisms of Endocannabinoid response initiation in hippocampus. *J Neurophysiol* 95:67–75. <https://doi.org/10.1152/jn.00813.2005>
- Ellaithy A, Younkin J, Gonzalez-Maeso J, Logothetis DE (2015) Positive Allosteric modulators of Metabotropic glutamate 2 receptors in schizophrenia treatment. *Trends Neurosci* 38:506–516. <https://doi.org/10.1016/j.bbame.2015.02.010.Cationic>
- Emery AC, DiRaddo JO, Miller E et al (2012) Ligand bias at Metabotropic glutamate 1a receptors: molecular determinants that distinguish β -Arrestin-mediated from G protein-mediated signaling. *Mol Pharmacol* 82:291–301. <https://doi.org/10.1124/mol.112.078444>
- Enz R (2012) Structure of metabotropic glutamate receptor C-terminal domains in contact with interacting proteins. *Front Mol Neurosci*. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2012.00052>
- Faber ES (2009) Functions and modulation of neuronal SK channels. *Cell Biochem Biophys* 55:127–139. <https://doi.org/10.1007/s12013-009-9062-7>
- Ferraguti F, Crepaldi L, Nicoletti F (2008) Metabotropic glutamate 1 receptor: current concepts and perspectives. *Pharmacol Rev* 60:536–81. <https://doi.org/10.1124/pr.108.000166>
- Fiorillo CD, Williams JT (1998) Glutamate mediates an inhibitory post-synaptic potential in dopamine neurons. *Nature* 394:78–82. <https://doi.org/10.1038/27919>
- Foord SM, Bonner TI, Neubig RR, et al (2005) International Union of Pharmacology. XLVI. G Protein-coupled receptor list. *Pharmacol Rev* 57: 279–288. <https://doi.org/10.1124/pr.57.2.5>
- Galvez T, Parmentier ML, Joly C et al (1999) Mutagenesis and modeling of the GABAB receptor extracellular domain support a venus flytrap mechanism for ligand binding. *J Biol Chem* 274:13362–13369. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.19.13362>
- Gao F, Li F, Miao Y et al (2015) Group I metabotropic glutamate receptor agonist DHPG modulates Kir4.1 protein and mRNA in cultured rat retinal Müller cells. *Neurosci Lett* 588:12–17. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2014.12.048>
- Gao Z-G, Jacobson KA (2016) On the selectivity of the $G\alpha_q$ inhibitor UBO-QIC: a comparison with the $G\alpha_i$ inhibitor pertussis toxin. *Biochem Pharmacol* 107:59–66. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2016.03.003>
- Gao SH, Wen HZ, Shen LL, Zhao YD, Ruan HZ (2016) Activation of mGluR1 contributes to neuronal hyperexcitability in the rat anterior cingulate cortex via inhibition of HCN channels. *Neuropharmacology* 105:361–377. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2016.01.036>
- Gasparini F, Lingenhohl K, Stoehr N et al (1999) 2-methyl-6-(phenylethynyl)-pyridine (MPEP), a potent, selective and systemically active mGlu5 receptor antagonist. *Neuropharmacology* 38:1493–1503. [https://doi.org/10.1016/S0028-3908\(99\)00082-9](https://doi.org/10.1016/S0028-3908(99)00082-9)
- Geer CE, Benquet P, Gerber U (2003) Group I metabotropic glutamate receptors activate a calcium-sensitive transient receptor potential-like conductance in rat hippocampus. *J Physiol* 546:655–664. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2002.032961>
- Gladding CM, Fitzjohn SM, Molnar E (2009) Metabotropic glutamate receptor-mediated long-term depression: molecular mechanisms. *Pharmacol Rev*. <https://doi.org/10.1124/pr.109.001735>
- Glitsch MD (2009) Activation of native TRPC3 cation channels by phospholipase D. *FASEB J* 24:318–325. <https://doi.org/10.1096/fj.09-134973>
- Grandes P, Mateos JM, Rüegg D et al (1994) Differential cellular localization of three splice variants of the mGluR1 metabotropic glutamate receptor in rat cerebellum. *Neuroreport* 5:2249–2252
- Gregory KJ, Conn PJ (2015) Molecular insights into Metabotropic glutamate receptor Allosteric modulation s. *Mol Pharmacol* 88:188–202
- Gueler N, Kukley M, Dietrich D (2007) TBOA-sensitive uptake limits glutamate penetration into brain slices to a few micrometers. *Neurosci Lett* 419:269–272. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2007.04.035>
- Guérineau NC, Bossu JL, Gähwiler BH, Gerber U (1995) Activation of a nonselective cationic conductance by metabotropic glutamatergic and muscarinic agonists in CA3 pyramidal neurons of the rat hippocampus. *J Neurosci* 15(6):4395–4407
- Hale CC, Bliker S, Quinn TP, Peletskaya EN (1997) Localization of an exchange inhibitory peptide (XIP) binding site on the cardiac sodium-calcium exchanger. *Biochem Biophys Res Commun*. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1997.6912>
- Hartmann J, Dragicevic E, Adelsberger H et al (2008) TRPC3 channels are required for synaptic transmission and motor coordination. *Neuron*. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.06.009>
- Hartmann J, Karl RM, Alexander RPD et al (2014) STIM1 controls neuronal Ca^{2+} signaling, mGluR1-dependent synaptic transmission, and Cerebellar motor behavior. *Neuron* 82:635–644. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.03.027>
- Hartmann J, Konnerth A (2015) TRPC3-dependent synaptic transmission in central mammalian neurons. *J Mol Med*. <https://doi.org/10.1007/s00109-015-1298-7>
- Hathaway HA, Pshenichkin S, Grajkowska E et al (2015) Pharmacological characterization of mGlu1 receptors in cerebellar granule cells reveals biased agonism. *Neuropharmacology*. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2015.02.007>

- Hayashi Y, Sekiyama N, Nakanishi S et al (1994) Analysis of agonist and antagonist activities of phenylglycine derivatives for different cloned metabotropic glutamate receptor subtypes. *J Neurosci* 14: 3370–3377
- Heuss C, Scanziani M, Gähwiler BH, Gerber U (1999) G-protein-independent signaling mediated by metabotropic glutamate receptors. *Nat Neurosci* 2:1070–1077. <https://doi.org/10.1038/15996>
- Hibino H, Inanobe A, Furutani K et al (2010) Inwardly rectifying potassium channels: their structure, function, and physiological roles. *Physiol Rev* 90:291–366. <https://doi.org/10.1152/physrev.00021.2009>
- Hille B, Dickson EJ, Kruse M et al (2014) Phosphoinositides regulate ion channels. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids* 1851:844–856. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2014.09.010>
- Hirono M, Konishi S, Yoshioka T (1998) Phospholipase C-independent group I Metabotropic glutamate receptor-mediated inward current in mouse Purkinje cells. *Biochem Biophys Res Commun*. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1998.9465>
- Hirono M, Yoshioka T, Konishi S (2001) GABAB receptor activation enhances mGluR-mediated responses at cerebellar excitatory synapses. *Nature Neurosci* 4:1207–1216. <https://doi.org/10.1038/mn764>
- Holmes KH, Keele NB, Shinnick-Gallagher P (1996) Loss of mGluR-mediated hyperpolarizations and increase in mGluR depolarizations in basolateral amygdala neurons in kindling-induced epilepsy. *J Neurophysiol* 76(4):2808–2812
- Holohean AM, Hackman JC, Davidoff RA (1999) Mechanisms involved in the metabotropic glutamate receptor-enhancement of NMDA-mediated motoneurone responses in frog spinal cord. *Br J Pharmacol* 126:333–341. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0702263>
- Home AL, Simmonds MA (1989) The pharmacology of quisqualate and ampa in the cerebral cortex of the rat in vitro. *Neuropharmacology* 28:1113–1118. [https://doi.org/10.1016/0028-3908\(89\)90125-1](https://doi.org/10.1016/0028-3908(89)90125-1)
- Houamed KM, Kuijper JL, Gilbert TL et al (1991) Cloning, expression, and gene structure of a G protein-coupled glutamate receptor from rat brain. *Science* 252:1318–1321
- Hovelso N, Sotty F, Montezinho LP et al (2012) Therapeutic potential of metabotropic glutamate receptor modulators. *Curr Neuropharmacol* 10:12–48. <https://doi.org/10.2174/157015912799362805>
- Ito I, Kohda A, Tanabe S, Hirose E (1992) 3, 5-Dihydroxyphenylglycine: a potent agonist of metabotropic glutamate receptors. *Neuroreport* 3: 1013–1016
- Iwamoto T, Watano T, Shigekawa M (1996) A novel isothiourea derivative selectively inhibits the reverse mode of Na⁺/Ca²⁺ exchange in cells expressing NCX1. *J Biol Chem* 271:22391–22397. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.37.22391>
- Ji M, Miao Y, Dong L-D et al (2012) Group I mGluR-mediated inhibition of Kir channels contributes to retinal Müller cell gliosis in a rat chronic ocular hypertension model. *J Neurosci* 32:12744–12755. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1291-12.2012>
- Jian K, Cifelli P, Pignatelli A et al (2010) Metabotropic glutamate receptors 1 and 5 differentially regulate bulbar dopaminergic cell function. *Brain Res* 1354:47–63. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2010.07.104>
- Jingami H, Nakanishi S, Morikawa K (2003) Structure of the metabotropic glutamate receptor. *Curr Opin Neurobiol*. [https://doi.org/10.1016/S0959-4388\(03\)00067-9](https://doi.org/10.1016/S0959-4388(03)00067-9)
- Kammermeier PJ (2012) The orthosteric agonist 2-chloro-5-hydroxyphenylglycine activates mGluR5 and mGluR1 with similar efficacy and potency. *BMC Pharmacol* 12:6. <https://doi.org/10.1186/1471-2210-12-6>
- Kano M, Watanabe T (2017) Open Peer Review Type-I metabotropic glutamate receptor signaling in cerebellar Purkinje cells in health and disease [version 1; referees: 3 approved]. <https://doi.org/10.12688/fl000research.10485.1>
- Kanumilli S, Toms NJ, Venkateswarlu K et al (2002) Functional coupling of rat metabotropic glutamate 1a receptors to phospholipase D in CHO cells: involvement of extracellular Ca²⁺, protein kinase C, tyrosine kinase and rho-a. *Neuropharmacology*. [https://doi.org/10.1016/S0028-3908\(01\)00161-7](https://doi.org/10.1016/S0028-3908(01)00161-7)
- Karakossian MH, Otis TS (2004) Excitation of cerebellar interneurons by group I metabotropic glutamate receptors. *J Neurophysiol* 92:1558–1565. <https://doi.org/10.1152/jn.00300.2004>
- Keele NB, Arvanov VL, Shinnick-Gallagher P (1997) Quisqualate-preferring metabotropic glutamate receptor activates Na-Ca²⁺ exchange in rat basolateral amygdala neurones. *J Physiol* 499:87–104. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1997.sp021913>
- Keele NB, Zinebi F, Neugebauer V, Shinnick-Gallagher P (2000) Epileptogenesis up-regulates metabotropic glutamate receptor activation of sodium-calcium exchange current in the amygdala. *J Neurophysiol* 83:2458–2462
- Keselman I, Fribourg M, Felsenfeld DP, Logothetis DE (2007) Mechanism of PLC-mediated Kir3 current inhibition. *Channels* 1: 113–123. <https://doi.org/10.4161/chan.4321>
- Kim SJ, Kim YS, Yuan JP et al (2003) Activation of the TRPC1 cation channel by metabotropic glutamate receptor mGluR1. *Nature* 426: 285–291. <https://doi.org/10.1038/nature02162>
- Kinney GG, Brien JAO, Lemaire W et al (2005) A novel selective positive Allosteric modulator of Metabotropic glutamate receptor subtype 5 has in vivo activity and antipsychotic-like effects in rat behavioral models. *J Pharmacol Exp Ther* 313:199–206. <https://doi.org/10.1124/jpet.104.079244.tive>
- Knoflach F, Mutel V, Jolidon S et al (2001) Positive allosteric modulators of metabotropic glutamate 1 receptor: characterization, mechanism of action, and binding site. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:13402–13407. <https://doi.org/10.1073/pnas.231358298>
- Kobrinisky E, Mirshahi T, Zhang H et al (2000) Receptor-mediated hydrolysis of plasma membrane messenger PIP2 leads to K⁺-current desensitization. *Nat Cell Biol* 2:507–514. <https://doi.org/10.1038/35019544>
- Kramer PF, Williams JT (2016) Calcium release from stores inhibits GIRK. *Cell Rep* 17:3246–3255. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.11.076>
- Kreibich TA, Chalasani SH, Raper JA (2004) The neurotransmitter glutamate reduces axonal responsiveness to multiple repellents through the activation of metabotropic glutamate receptor 1. *J Neurosci* 24:7085–7095. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0349-04.2004>
- Kreitzer AC, Regehr WG (2001) Retrograde inhibition of presynaptic calcium influx by endogenous cannabinoids at excitatory synapses onto Purkinje cells. *Neuron* 29:717–727. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(01\)00246-X](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(01)00246-X)
- Krueger DD, Osterweil EK, Bear MF (2010) Activation of mGluR5 induces rapid and long-lasting protein Kinase D Phosphorylation in Hippocampal neurons. *J Mol Neurosci* 42:1–8. <https://doi.org/10.1007/s12031-010-9338-9>
- Kubota H, Nagao S, Obata K, Hirono M (2014) mGluR1-mediated excitation of cerebellar GABAergic interneurons requires both G protein-dependent and Src-ERK1/2-dependent signaling pathways. *PLoS ONE* 9:e106316. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106316>
- Kunishima N, Shimada Y, Tsuji Y et al (2000) Structural basis of glutamate recognition by a dimeric metabotropic glutamate receptor. *Nature* 407:971–977. <https://doi.org/10.1038/35039564>
- Kushmerick C (2004) Retroinhibition of Presynaptic Ca²⁺ currents by Endocannabinoids released via postsynaptic mGluR activation at a calyx synapse. *J Neurosci*. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0768-04.2004>
- Latorre R, Castillo K, Carrasquel-Ursulaez W, Sepulveda RV, Gonzalez-Nilo F, Gonzalez C, Alvarez O (2016) Molecular determinants of

- BK Channel functional diversity and functioning. *Physiol Rev* 97: 39–87. <https://doi.org/10.1152/physrev.00001.2016>
- Layton ME (2005) Subtype-selective noncompetitive modulators of metabotropic glutamate receptor subtype 1 (mGluR1). *Curr Top Med Chem* 5:859–867. <https://doi.org/10.2174/1568026054750245>
- Lea PM IV, Faden AI (2006) Metabotropic glutamate receptor subtype 5 antagonists MPEP and MTEP. *CNS Drug Rev* 12:149–166. <https://doi.org/10.1111/j.1527-3458.2006.00149.x>
- Li Q, Cui P, Miao Y et al (2016) Activation of group I metabotropic glutamate receptors regulates the excitability of rat retinal ganglion cells by suppressing Kir and I_h. *Brain Struct Funct* 222:813–830. <https://doi.org/10.1007/s00429-016-1248-3>
- Li Z, Matsuoka S, Hryshko LV et al (1994) Cloning of the NCX2 isoform of the plasma membrane Na⁺-Ca²⁺ exchanger. *J Biol Chem* 269: 17434–17439
- Li Z, Nicoll DA, Collins A et al (1991) Identification of a peptide inhibitor of the cardiac sarcolemmal Na⁺-Ca²⁺ exchanger. *J Biol Chem* 266:1014–1020
- Linn CL (2000) Second messenger pathways involved in up-regulation of an L-type calcium channel. *Vis Neurosci* 17:473–482. <https://doi.org/10.1164/ajrcm.159.3.9607099>
- Litschig S, Gasparini F, Rueegg D et al (1999) CPCCOEt, a non-competitive metabotropic glutamate receptor 1 antagonist, inhibits receptor signaling without affecting glutamate binding. *Mol Pharmacol* 55:453–461. <https://doi.org/10.1164/ajrcm.159.3.9607099>
- Logothetis DE, Kurachi Y, Galper J et al (1987) The βγ subunits of GTP-binding proteins activate the muscarinic K⁺ channel in heart. *Nature* 325:321–326. <https://doi.org/10.1038/325321a0>
- López-Bendito G, Shigemoto R, Fairén A, Luján R (2002) Differential distribution of group I metabotropic glutamate receptors during rat cortical development. *Cereb Cortex* 12:625–638
- Ludwig A, Zong X, Jeglitsch M et al (1998) A family of hyperpolarization-activated mammalian cation channels. *Nature* 393:587–591. <https://doi.org/10.1038/31255>
- Maejima T, Hashimoto K, Yoshida T et al (2001) Presynaptic inhibition caused by retrograde signal from metabotropic glutamate to cannabinoid receptors. *Neuron*. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(01\)00375-0](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(01)00375-0)
- Maksymetz J, Moran SP, Conn PJ (2017) Targeting metabotropic glutamate receptors for novel treatments of schizophrenia. *Mol Brain* 10: 15. <https://doi.org/10.1186/s13041-017-0293-z>
- Malherbe A, Kew JNC, Richards JG et al (2002) Identification and characterization of a novel splice variant of the metabotropic glutamate receptor 5 gene in human hippocampus and cerebellum. *Mol Brain Res* 109:168–178. [https://doi.org/10.1016/S0169-328X\(02\)00557-0](https://doi.org/10.1016/S0169-328X(02)00557-0)
- Mary S, Gomeza J, Prézeau L et al (1998) A cluster of basic residues in the carboxyl-terminal tail of the short metabotropic glutamate receptor 1 variants impairs their coupling to phospholipase C. *J Biol Chem*. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.1.425>
- Masu M, Tanabe Y, Tsuchida K et al (1991) Sequence and expression of a metabotropic glutamate receptor. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/349760a0>
- Morishita W, Kirov SA, Alger BE (1998) Evidence for metabotropic glutamate receptor activation in the induction of depolarization-induced suppression of inhibition in hippocampal CA1. *J Neurosci* 18:4870–4882
- Moroni F, Lombardi G, Thomsen C et al (1997) Pharmacological characterization of 1-aminoindan-1,5-dicarboxylic acid, a potent mGluR1 antagonist. *J Pharmacol Exp Ther* 281:721–729
- Muto T, Tsuchiya D, Morikawa K, Jingami H (2007) Structures of the extracellular regions of the group II/III metabotropic glutamate receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. <https://doi.org/10.1073/pnas.0611577104>
- Nakanishi S (1992) Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain function. *Science* 258:597–603. <https://doi.org/10.1126/science.1329206>
- Netzeband JG, Gruol DL (2008) mGluR1 agonists elicit a Ca²⁺ signal and membrane hyperpolarization mediated by apamin-sensitive potassium channels in immature rat Purkinje neurons. *J Neurosci Res* 86:293–305. <https://doi.org/10.1002/jnr.21493>
- Nicoletti F, Bockaert J, Collingridge GL et al (2011) Metabotropic glutamate receptors: from the workbench to the bedside. *Neuropharmacology* 60:1017–1041. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2010.10.022>
- Nicoll DA, Longoni S, Philipson KD (1990) Molecular cloning and functional expression of the cardiac sarcolemmal Na⁺-Ca²⁺ exchanger. *Science* 250:562–565. <https://doi.org/10.1126/science.1700476>
- Nicoll DA, Quednau BD, Qui Z et al (1996) Cloning of a third mammalian Na⁺-Ca²⁺ exchanger, NCX3. *J Biol Chem* 271:24914–24921. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.40.24914>
- Niswender CM, Conn PJ (2010) Metabotropic glutamate receptors: physiology, pharmacology, and disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 50:295–322. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.011008.145533.Metabotropic>
- Nugent FS, Niehaus JL, Kauer JA (2009) PKG and PKA signaling in LTP at GABAergic synapses. *Neuropsychopharmacology* 34:1829–1842. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.371>
- O'Hara PJ, Sheppard PO, Thorgersen H et al (1993) The ligand-binding domain in metabotropic glutamate receptors is related to bacterial periplasmic binding proteins. *Neuron* 11:41–52. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(93\)90269-W](https://doi.org/10.1016/0896-6273(93)90269-W)
- Ohno-Shosaku T, Shosaku J, Tsubokawa H, Kano M (2002) Cooperative endocannabinoid production by neuronal depolarization and group I metabotropic glutamate receptor activation. *Eur J Neurosci*. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2002.01929.x>
- Olmo IG, Ferreira-Vieira TH, Ribeiro FM (2016) Dissecting the signaling pathways involved in the crosstalk between metabotropic glutamate 5 and Cannabinoid type 1 receptors. *Mol Pharmacol*. <https://doi.org/10.1124/mol.116.104372>
- Pin J-P, De Colle C, Bessis A-S, Acher F (1999) New perspectives for the development of selective metabotropic glutamate receptor ligands. *Eur J Pharmacol* 375:277–294. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(93\)90269-W](https://doi.org/10.1016/0896-6273(93)90269-W)
- Pin J-P, Joly C, Heinemann SF, Bockaert J (1994) Domains involved in the specificity of G protein activation in phospholipase C-coupled metabotropic glutamate receptors. *EMBO J* 13:342–348
- Rainnie DG, Holmes KH, Shinnick-Gallagher P (1994) Activation of postsynaptic metabotropic glutamate receptors by trans-ACPD hyperpolarizes neurons of the Basolateral Amygdala. *J Neurosci* 14: 7208–7220
- Ribeiro FM, Vieira LB, Pires RGW et al (2017) Metabotropic glutamate receptors and neurodegenerative diseases. *Pharmacol Res*. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2016.11.013>
- Romano C, Yang WL, O'Malley KL (1996) Metabotropic glutamate receptor 5 is a disulfide-linked dimer. *J Biol Chem* 271:28612–28616. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.45.28612>
- Rondard P, Pin JP (2015) Dynamics and modulation of metabotropic glutamate receptors. *Curr Opin Pharmacol* 20:95–106. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2014.12.001>
- Santo-Domingo J, Vay L, Hernández-SanMiguel E et al (2007) The plasma membrane Na⁺/Ca²⁺ exchange inhibitor KB-R7943 is also a potent inhibitor of the mitochondrial Ca²⁺ uniporter. *Br J Pharmacol* 151:647–654. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707260>
- Santoro B, Liu DT, Yao H et al (1998) Identification of a gene encoding a Hyperpolarization-activated Pacemaker Channel of brain. *Cell* 93: 717–729. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81434-8](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81434-8)

- Schoepp DD, Conn PJ (1993) Metabotropic glutamate receptors in brain function and pathology. *Trends Pharmacol Sci* 14:13–20. [https://doi.org/10.1016/0165-6147\(93\)90107-U](https://doi.org/10.1016/0165-6147(93)90107-U)
- Schoepp DD, Goldsworthy J, Johnson BG et al (1994) 3,5-dihydroxyphenylglycine is a highly selective agonist for phosphoinositide-linked metabotropic glutamate receptors in the rat hippocampus. *J Neurochem* 63:769–772. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1994.63020769.x>
- Schoepp DD, Jane DE, Monn JA (1999) Pharmacological agents acting at subtypes of metabotropic glutamate receptors. *Neuropharmacology* 38:1431–1476. [https://doi.org/10.1016/S0028-3908\(99\)00092-1](https://doi.org/10.1016/S0028-3908(99)00092-1)
- Schrage R, Schmitz A-L, Gaffal E et al (2015) The experimental power of FR900359 to study Gq-regulated biological processes. *Nat Commun* 6:10156. <https://doi.org/10.1038/ncomms10156>
- Sekizawa S, Bonham AC (2006) Group I metabotropic glutamate receptors on second-order baroreceptor neurons are tonically activated and induce a Na^+ - Ca^{2+} exchange current. *J Neurophysiol* 95:882–892. <https://doi.org/10.1152/jn.00772.2005>
- Sengmany K, Singh J, Stewart GD et al (2017) Biased allosteric agonism and modulation of metabotropic glutamate receptor 5: implications for optimizing preclinical neuroscience drug discovery. *Neuropharmacology* 115:60–72. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2016.07.001>
- Shah MM (2014) Cortical HCN channels: function, trafficking and plasticity. *J Physiol* 592:2711–2719. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2013.270058>
- Sharon D, Vorobiov D, Dascal N (1997) Positive and negative coupling of the Metabotropic glutamate receptors to a G protein-activated K^+ channel, GIRK, in *Xenopus* Oocytes. *J Gen Physiol* 109:477–490. <https://doi.org/10.1085/jgp.109.4.477>
- Shen K-Z, Johnson SW (2013) Group I mGluRs evoke K^+ -ATP current by intracellular Ca^{2+} mobilization in rat subthalamus neurons. *J Pharmacol Exp Ther* 345:139–150. <https://doi.org/10.1124/jpet.112.201566>
- Shim HG, Jang S-S, Jang DC et al (2016) mGlu 1 receptor mediates homeostatic control of intrinsic excitability through I_h in cerebellar Purkinje cells. *J Neurophysiol* 115:2446–2455. <https://doi.org/10.1152/jn.00566.2015>
- Sladeczek F, Pin JP, Récasens M et al (1985) Glutamate stimulates inositol phosphate formation in striatal neurones. *Nature* 317:717–719
- Suh B-C, Hille B (2008) PIP2 is a necessary cofactor for ion channel function: how and why? *Annu Rev Biophys* 37:175–195. <https://doi.org/10.1146/annurev.biophys.37.032807.125859>
- Sugiyama H, Ito I, Hirono C (1987) A new type of glutamate receptor linked to inositol phospholipid metabolism. *Nature* 325:531–533. <https://doi.org/10.1038/325531a0>
- Takahashi K, Tsuchida K, Tanabe Y et al (1993) Role of the large extracellular domain of metabotropic glutamate receptors in agonist selectivity determination. *J Biol Chem* 268:19341–19345
- Tempia F, Miniaci MC, Anchisi D, Strata P (1998) Postsynaptic current mediated by metabotropic glutamate receptors in cerebellar Purkinje cells. *J Neurophysiol* 80:520–528
- Topolnik L, Azzi M, Morin F et al (2006) mGluR1/5 subtype-specific calcium signalling and induction of long-term potentiation in rat hippocampal oriens/alveus interneurons. *J Physiol* 575:115–131. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2006.112896>
- Tsuchiya D, Kunishima N, Kamiya N et al (2002) Structural views of the ligand-binding cores of a metabotropic glutamate receptor complexed with an antagonist and both glutamate and Gd^{3+} . *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:2660–2665. <https://doi.org/10.1073/pnas.052708599>
- Uesaka N, Uchigashima M, Mikuni T et al (2015) Retrograde signaling for climbing fiber synapse elimination. *Cerebellum* 14:4–7. <https://doi.org/10.1007/s12311-014-0615-y>
- Varma N, Carlson GC, Ledent C, Alger BE (2001) Metabotropic glutamate receptors drive the endocannabinoid system in hippocampus. *J Neurosci* 21:RC188
- von Gersdorff H, Borst JGG (2002) Short-term plasticity at the calyx of held. *Nat Rev Neurosci* 3:53–64. <https://doi.org/10.1038/nrn705>
- Williams AD, Jung S, Poolos NP (2015) Protein kinase C bidirectionally modulates I_h and hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated (HCN) channel surface expression in hippocampal pyramidal neurons. *J Physiol* 593:2779–2792. <https://doi.org/10.1113/JP270453>
- Wisler JW, Xiao K, Thomsen AR, Lefkowitz RJ (2014) Recent developments in biased agonism. *Curr Opin Cell Biol* 27:18–24. <https://doi.org/10.1016/j.cob.2013.10.008>
- Wiśniewski K, Car H (2002) (S)-3,5-DHPG: a review. *CNS Drug Rev* 8:101–116
- Wu L-J, Sweet T-B, Clapham DE (2010) International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXVI. Current progress in the mammalian TRP Ion Channel family. *Pharmacol Rev* <https://doi.org/10.1124/pr.110.002725>
- Wu H, Wang C, Gregory KJ et al (2014) Structure of a class C GPCR metabotropic glutamate receptor I bound to an allosteric modulator. *Science* 344(80):58–64. <https://doi.org/10.1126/science.1249489>. [Structure](https://doi.org/10.1126/science.1249489)
- Yoshida T, Hashimoto K, Zimmer A et al (2002) The cannabinoid CB1 receptor mediates retrograde signals for depolarization-induced suppression of inhibition in cerebellar Purkinje cells. *J Neurosci* 22:1690–1697
- Zou J, Jiang J, Yang J (2017) Molecular basis for modulation of Metabotropic glutamate receptors and their drug actions by extracellular Ca^{2+} . *Int J Mol Sci* 18:672. <https://doi.org/10.3390/ijms18030672>