

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

SERINA/TREONINA QUINASES A LA SINAPSI NEUROMUSCULAR: ESPECIALITZACIÓ DE LES ISOFORMES
DE LA PROTEÏNA QUINASA C

Núria Montserrat Besalduch Canes

ISBN:978-84-692-3232-3/DL:T-939-2009

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

SERINA/TREONINA QUINASES A LA SINAPSI NEUROMUSCULAR: ESPECIALITZACIÓ DE LES ISOFORMES
DE LA PROTEÏNA QUINASA C

Núria Montserrat Besalduch Canes

ISBN:978-84-692-3232-3/DL:T-939-2009

Núria Montserrat Besalduch Canes

**SERINA/TREONINA QUINASES A LA SINAPSI NEUROMUSCULAR:
ESPECIALITZACIÓ DE LES ISOFORMES DE LA PROTEÏNA QUINASA C**

TESI DOCTORAL

dirigida per la Dra. Maria Angel Lanuza Escolano, la Dra. Neus Garcia Sancho i
el Dr. Josep M. Tomàs Ferré

Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Reus, 2009

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

SERINA/TREONINA QUINASES A LA SINAPSI NEUROMUSCULAR: ESPECIALITZACIÓ DE LES ISOFORMES
DE LA PROTEÏNA QUINASA C

Núria Montserrat Besalduch Canes

ISBN:978-84-692-3232-3/DL:T-939-2009



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
Departament de Ciències
Mèdiques Bàsiques

C/ Sant Llorenç, 21
43203 Reus
Tel. 977 759305
Fax. 977 759322

Maria Angel Lanuza Escolano, professora titular del Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques de la Universitat Rovira i Virgili.

Neus Garcia Sancho, professora titular del Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques de la Universitat Rovira i Virgili.

Josep Maria Tomàs Ferré, catedràtic d'universitat del Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques de la Universitat Rovira i Virgili.

CERTIFIQUEN:

Que el present treball titulat "Serina/treonina quinases a la sinapsi neuromuscular: Especialització de les isoformes de la proteïna quinasa C", que presenta la Núria Montserrat Besalduch Canes per l'obtenció del títol de Doctor, ha estat realitzat sota la nostra direcció al Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques d'aquesta universitat i que aconpleix els requeriments per poder optar a aquest títol.

Reus, 20 de febrer de 2009

Dra. M Angel Lanuza Escolano

Dra. Neus Garcia Sancho

Dr. Josep M. Tomàs Ferré

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

SERINA/TREONINA QUINASES A LA SINAPSI NEUROMUSCULAR: ESPECIALITZACIÓ DE LES ISOFORMES
DE LA PROTEÏNA QUINASA C

Núria Montserrat Besalduch Canes

ISBN:978-84-692-3232-3/DL:T-939-2009

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
SERINA/TREONINA QUINASES A LA SINAPSI NEUROMUSCULAR: ESPECIALITZACIÓ DE LES ISOFORMES
DE LA PROTEÏNA QUINASA C
Núria Montserrat Besalduch Canes
ISBN:978-84-692-3232-3/DL:T-939-2009

Al pare i a la mare

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

SERINA/TREONINA QUINASES A LA SINAPSI NEUROMUSCULAR: ESPECIALITZACIÓ DE LES ISOFORMES
DE LA PROTEÏNA QUINASA C

Núria Montserrat Besalduch Canes

ISBN:978-84-692-3232-3/DL:T-939-2009

Agraïixo a tots aquells que heu fet possible aquesta tesi.

En primer lloc, al Dr Josep Tomàs, per confiar en mi des del principi fins al final. Gràcies per obrir-me les portes de la unitat i donar-me l'oportunitat de treballar amb tu i amb els teus. Gràcies!

A la Dra Lanuza, Maria Àngel, què puc dir-te que no sàpigues! Has estat lo millor d'aquesta etapa. Treballar amb tu, al teu costat, m'ha fet créixer com a persona i com a "professional". He après molt al teu costat. Gràcies per tota la paciència que has tingut, per la confiança que m'has demostrat, per totes les converses, consells, per tots els bons moments i també dolents, que al teu costat s'han passat d'una altra manera.... gràcies per donar-me suport en tot allò que he fet i també pel que no he fet. Ho deixo aquí perquè no acabaria.... gràcies de tot cor!

A la Dra Garcia, Neus, gràcies per codirigir-me la tesi, per tots els consells donats dins i fora de la ciència. Gràcies per donar un toc de color al laboratori, gràcies per compartir molts moments, bons i dolents, dins i fora del lab. Un congrés sense un "nenes", no és lo mateix! Gràcies!

Al Dr Santafé, Manel, gràcies des del primer dia! Per tants cafès compartits, per tantes converses de ciència i de la vida. Gràcies per ser tant atent amb mi. Gràcies per fer-me veure que valc alguna cosa. Gràcies per tot allò que m'has ensenyat, al teu costat sempre aprenc alguna cosa. I gràcies per tot el suport i l'ajuda amb la part de l'electrofisiologia. Gràcies per tot!

A la Dra Fenoll, Rosa, gràcies per les teves paraules d'ànim en tot moment. Gràcies per compartir espai a hores intempestives. Gràcies!

A la Dra Rigau, Josepa, hem compartit poc temps, però sempre que he necessitat alguna cosa allí estaves. Gràcies!

A la Dra Morlà, Rosa, Gràcies per l'ajuda més fora del laboratori que dins, però les teves paraules sempre m'han ajudat. Gràcies!

Al Dr Ortiz, Nico, gràcies per tots els consells, per totes aquelles preguntes que m'han fet aprendre, pel consell mèdic, per sempre tenir un moment per mi quan l'he necessitat. Gràcies per donar un altre aire al lab els dijous! Gràcies per tot!

A la Dra Sabaté, Mar, què no saps? Gràcies per acollir-me de la manera que ho vas fer quan vaig ocupar la taula del teu davant. Gràcies per tot el que m'has ensenyat, per tot el que hem compartit, rialles i llàgrimes, dins i fora del laboratori.... encara que per tu vaig ser "l'última inquisició" per mi tu vas ser la salvació! Gràcies per ser com ets i acceptar-me com sóc! Gràcies amb tot lo carinyo del món!

A Marta, gràcies per compartir amb mi tot el que hem compartit, dins i fora del lab, per escoltar-me i ajudar-me quan ho he necessitat i per donar-li un toc d'alegria al lab amb la teva música. I per descomptat, gràcies per tota l'ajuda amb els animals i en la part de l'electrofisiologia. Gràcies de tot cor!

A la Dra González, Carmen, vam coincidir molt poc dins al laboratori, però gràcies per deixar-me continuar amb la teva feina feta amb els KO. Gràcies.

A la Dra Saló, Isabel, gràcies per tots els consells sobre la vida, i per l'ajuda en les pràctiques. Gràcies pels cafès compartits i per la xocolata. Ara que ja ets mare ja és més difícil quedar, però ja trobarem un dia. Un beset guapa!

A Sílvia, gràcies per voler aprendre i deixar-te ensenyar. Gràcies!

Als alumnes interns, per tenir la paciència d'escoltar-me, sobretot a aquells que vau introduir-vos a la unitat a la vegada que jo, els del curs 2004-05 (Santi, Marta, Evelyn, Itziar, Xavi, Alicia, Nani, Pilar,). Als del curs 2005-06 (Maria, Marta, Anna, Laura, Arantza, David,

Abraham, Albert, Xavi, Angel i Jordi) que va treballar amb les IHQ de PKA i PKC. Als del curs 2006-07 (Joan, Juan Antonio, Adolfo, Anna, Silvia i Esther) que va treballar amb la part del KO. Als del curs 2007-08 (Maria, Anna, Pilar, Ada i Víctor) pel vostre treball en una part que no he inclòs a aquesta tesi. Als del curs 2008-09 (Ainhara, Azucena, Lucía, Jonathan i Paula) per l'ajuda en la part final d'aquesta tesi. A tots, gràcies per l'ajuda al lab, per les rialles, per tot el que heu aportat, pels sopars, per felicitar-me quan ho he fet bé, pel vostre interès cap allò que us he ensenyat, per tot el que m'heu ensenyat, per totes les xafarderies que m'heu explicat, per totes les hores que heu estat al laboratori. Gràcies per defensar la unitat en tot moment! Gràcies a tots!!!!!!!!!!!!!!

A part de la gent de la unitat, també n'hi d'altra que forma part d'aquest treball.

A la Dra Bulló, Mònica, gràcies per tots els cafès, dinars, i el que ha fet falta que hem compartit. Gràcies per ensenyar-me tot el que m'has ensenyat sobre la ciència i la vida, al teu costat creus que un mateix no sap res, ets un crack! Gràcies per confiar en mi, per ser com ets, i per estar sempre que t'he necessitat. Gràcies Mònica!

Al Miquel, gràcies per tots els viatges a Barcelona, pels cafès inesperats, per tenir sempre una rialla per mi, per animar-me, per confiar en mi. Un besito guapo!

Al Dr Folch, Jaume, gràcies per tot el que m'has ensenyat, per totes les estones compartides, per saber que puc confiar en tu. Gràcies!

Al Dr Ortega, Artur, gràcies per dirigir-me el CAP de la manera que ho vas fer, em vas facilitar molt la feina, per confiar en mi tot i que els teus alumnes pensessin una altra cosa, per tenir sempre una paraula amable, gràcies!

A la gent de Lípids, Anna, Iolanda, Roser, gràcies per facilitar-me la feina amb els meus Westerns i també per l'ajuda amb tot el que us he demanat, gràcies.

A la gent de Fàrmaco, Marta, Esperanza, Vane, Dra Nogués, Dr Sureda, Dra Giralt, gràcies per tota l'ajuda, per la centrífuga, pel microscopi, gràcies a tots.

A la gent de Micro, als que hi son i als que han marxat, gràcies per sempre tenir un somriure, per compartir els esmorzars quan teníem la "nostra" sala, per estar sempre que us he necessitat. Gràcies a tots.

A la gent de Bioquímica, i a la gent de Fisiologia, per estar sempre que he necessitat alguna cosa. A la gent de Tòxico, pels seminaris compartits entre altres coses. Gràcies!

A la unitat de Nutrició, Dr Salas, Carles, Nancy i altres, per tenir sempre un somriure a la cara, per la paciència que heu tingut les vegades que he vingut per la vostra unitat. Gràcies.

A la gent de Preventiva, Marta, Núria, per les estones compartides, pels pitis compartits, per les rialles compartides, i sobretot a Maribel, per tota la informació dels canvis de normes de la tesi. Gràcies.

A les secretàries del departament de Ciències Mèdiques Bàsiques, Montse i Imma, per escoltar-me sempre i ajudar-me en tot allò que he necessitat. Gràcies!

A l'Amparo, Esperanza, Juan, Joanna, per la vostra ajuda amb els animals i amb tot allò que us he demanat. Gràcies per facilitar-me la feina! Gràcies als quatre!

Als conserges, per aquell bon dia a primera hora del matí, per aquella clau que he necessitat, per buscar-me una aula, gràcies per tot!

A la gent de la neteja, sí, tinc el costum d'arribar aviat a treballar i això sé que molesta quan heu de netejar, gràcies per la paciència i pel somriure de cada matí.

Als serveis científic-tècnics. Mercè, Mariana, Núria, Martí. Gràcies per tota la vostra ajuda en tot el que he necessitat i la vostra paciència. Gràcies.

Als alumnes, aquells que em vau mostrar el vostre carinyo i als que no, he après molt al vostre costat. Gràcies per fer-me les classes més fàcils del que en un principi m'imaginava. Gràcies pel vostre carinyo mostrat dins i fora de l'aula. Gràcies a tots!

D'una manera més particular vull agrair a aquella gent que ha estat amb mi abans de la meva "aventura" aquí a Reus però són testimonis dels meus inicis en el meravellós món de la ciència.

A la Dra Comalada, Mònica, per ser la meva protectora des del primer dia que vaig entrar en aquell laboratori de la UB. Gràcies per tot el que m'has ensenyat, dins i fora del lab. Les nostres vides han estat una mica semblants.

Al Dr Xaus, Jordi, el meu primer "jefe". Gràcies per tot el que m'has ensenyat, la teva manera tant especial de fer, hi ha coses que millor fer-les a ojomolar! Gràcies per la paciència, per fer-nos de guia per Granada, per tots els bons moments compartits, per tots els consells i per les coses dites tal com són! 32.000 gràcies!

Al Dr Sebastián, Carlos. Para mi siempre serás Sebas, gracias por todo! Fueron unos años duros, pero llenos de historias y de buenos momentos para no olvidar jamás. Tantos chistes malos, tantas confidencias, tantas cenas, tantas lágrimas, tantas prolis (ah! 486), pero momentos que hacen únicos aquellos años. Sin tí mi vida habría sido diferente. Gràcies per tot!

A Eva, gràcies per ser com ets, per compartir tot el que hem compartit, jefes, nervis, rialles, llàgrimes, pis, gràcies per estar!

A la Dra Solé, Concep, tu em vas enviar el mail i em vas animar a que m'ho pensés. Gràcies a tu vaig marxar a Reus. Gràcies per tot! Per ser amiga en moments difícils, Gràcies!

A Ricardo i Carles, per tots els moments compartits, i per tot el que m'heu ensenyat! Gràcies!

A tots aquells amb els qui vaig compartir els 3 anys i pico a la facu de bio i al Parc. Gràcies per tots els bons i mals moments que hem passat junts! Gràcies!

A la gent de la meva curta estada al clínic. A Marta, Raquel, Eva, Pep i Jordi. Gràcies per la vostra acollida tot i ser l'última en arribar. Gràcies pel St Jordi del 2004. Gràcies per tots els bons moments, per tot el que m'heu ensenyat i segur que em seguïu ensenyant, també fora de la ciència. Gràcies per ser com sou!

I ara, apartant-me una mica del món científic, vull agrair a aquells que han patit tots aquets anys d'una manera diferent, molts des de la distància i sense entendre massa el que estic fent i el que significa tot això.

En primer lloc a Alfons Cabrera, tu em vas ensenyar a estimar la biologia i gràcies a tu vaig decidir marxar a Girona a estudiar bio. Les teves classes, ara molt llunyanes, les recordo amb molt de carinyo, les millors amb diferència! Gràcies de tot cor!

A David, tu vas ser testimoni del meu bateig en aquest món, aquell estiu del 98 quan encara era una simple estudiant de biologia. M'has ensenyat molt, hem crescut junts, però hem escollit camins diferents... Gràcies per tots aquets anys al meu costat.

A Cristina, sempre has confiat en mi. Gràcies per tots aquests anys, des de l'estiu del 93?, són molts anys plens de milions d'històries que no oblidarem mai. Gràcies per estar sempre! Gràcies K!

A Núria, a qui sempre he tingut a pesar de la distància que ens separa. Gràcies per estimar-me tant. Gràcies!

Al iaio i Conxa, gràcies per tot el vostre carinyo encara que no entengueu que encara pugui estar “estudiant” i no “treballant”. Un besito molt fort!

A Jordi, gràcies per tot aquest temps al meu costat! Per “complicar-me” la vida. Per ensenyar-me tantes coses, per acceptar-me tal com sóc, per aquelles preguntes que sempre em descol·loquen però m’han ensenyat tant, per fer-me riure quan més ho necessitava, per escoltar-me, per compartir els bons i mals moments, per fer-me veure la vida des d’un altre punt de vista, per fer-me sentir bé, per aquesta última “etapa” al meu costat, per tot i pel que encara queda, milions de gràcies.

A Jordi, gràcies per fer de germà gran i també per deixar-me aquesta feina a mi quan ha fet falta. Jo sé que hi ets! Gràcies!

A Xavier, munguer, que hagués fet sense tu? poder no patir tant, però ja saps que m’agrada fer de germana gran tot i ser la menuda. Gràcies per ensenyar-me tot el que m’has ensenyat, per fer de germà gran, per fer de pare i també de germà menut, per tot el que hem compartit sempre. Gràcies per estimar-me tant i confiar tant en mi. Gràcies per deixar-te cuidar, ets un “pupes”, però crec que és cosa de família. Gràcies per ser tu! Gràcies Munger!

A la Mare i al Pare, gràcies per tot, això és poc, gràcies per molt més que tot! Sense vatros això no hagués estat ni un somni, i ara és una realitat. Gràcies per estar sempre al meu costat, en lo bo i en lo dolent, quan he estat bé i malament. Gràcies per tots els consells sobre la vida, gràcies per “fer-me” la persona que sóc, per respectar-me en tot el que he fet, en ajudar-me en tot allò que he fet al llarg de la meva vida, per confiar en mi, per guiar-me com ho heu fet, per ser com sou, per ajudar-me quan ho he necessitat i quan em pensava que ho podia fer sola, per donar-me tot el que m’heu donat, i perquè no, per ser els millors pares del món. Us estimo moltíssim!

No puc acabar sense donar les gràcies a les institucions que han donat el finançament necessari per a que aquest treball de recerca hagi pogut dur-se a terme. A la beca predoctoral concedida per la URV, al Fondo de Investigación sanitaria i al Ministerio de Ciencia e Innovación, així com als comitès organitzadors de congressos nacionals i internacionals que m’han concedit borses de viatges.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
SERINA/TREONINA QUINASES A LA SINAPSI NEUROMUSCULAR: ESPECIALITZACIÓ DE LES ISOFORMES
DE LA PROTEÏNA QUINASA C
Núria Montserrat Besalduch Canes
ISBN:978-84-692-3232-3/DL:T-939-2009

ÍNDEX

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

SERINA/TREONINA QUINASES A LA SINAPSI NEUROMUSCULAR: ESPECIALITZACIÓ DE LES ISOFORMES
DE LA PROTEÏNA QUINASA C

Núria Montserrat Besalduch Canes

ISBN:978-84-692-3232-3/DL:T-939-2009

Índex

	Pàgina
i – Índex de figures.....	i
ii– Índex de taules.....	iv
iii– Abreviacions.....	v
I – Introducció.....	1
1. La unió neuromuscular com a model experimental de sinapsi.....	5
2. Què és la unió neuromuscular?	5
2.1 Components de la unió neuromuscular.....	7
2.1.1 Motoneurona i terminal nerviós.....	7
2.1.2 Fibra muscular	9
2.1.3 Cèl·lula de Schwann	13
2.1.4 Làmina basal	14
3. Conducció nerviosa i neurotransmissió a la unió neuromuscular.....	15
4. Eliminació sinàptica en el desenvolupament postnatal.....	19
5. Proteïnes quinases	25
5.1 Ser/Thr quinases	26
5.2 Proteïnes Ser/Thr quinases dependents de segon missatger.....	27
5.2.1 Proteïna quinasa dependent de cAMP (PKA).....	28
5.2.1.1 Localització de la PKA.....	29
5.2.2 Proteïna quinasa dependent de calci (PKC).....	30
5.2.2.1 Estructura de la PKC.....	31
5.2.2.2 Activació de la PKC.....	33
5.2.2.3 Localització de la PKC	34
5.3 PKC i PKA a la unió neuromuscular	36
5.3.1 PKC i PKA en l'eliminació sinàptica.....	36
5.3.2 PKC i PKA en l'activitat sinàptica.....	39

	Pàgina
II – Hipòtesi i objectius.....	43
1. Hipòtesi.....	45
2. Objectius.....	45
2.1 Objectiu general.....	45
2.2 Objectius específics.....	46
III – Material i mètodes.....	47
1. Animals.....	51
2. Model d'estudi: La unió Neuromuscular.....	52
2.1 Justificació del model d'estudi.....	52
2.2 Descripció dels models musculars esquelètics estudiats.....	53
2.2.1 <i>Levator auris longus</i> (LAL).....	53
2.2.2 Diafragma.....	55
2.2.3 Músculs de les extremitats posteriors.....	56
2.2.4 Medul·la espinal.....	56
3. Metodologies utilitzades.....	57
3.1 Obtenció de músculs esquelètics de rata i ratolí.....	57
3.1.1 Dissecció del múscul LAL.....	57
3.1.2 Dissecció del múscul Diafragma.....	58
3.1.3 Dissecció dels músculs de les extremitats posteriors.....	59
3.1.4 Extracció i obtenció de la regió ventral de la medul·la espinal.....	59
3.2 Tractaments	60
3.2.1 Estimulació elèctrica.....	60
3.2.2 Tractaments per modificar l'activitat de la PKC - Incubacions.....	60
3.2.3 Tractaments per modificar l'activitat de la PKC - Injeccions subcutànies.....	61
3.3 Anticossos.....	62
3.3.1 Producció d'anticossos fosfo-específics.....	62
3.3.2 Anticossos comercials.....	64
3.3.2.1 Caracterització d'alguns dels anticossos comercials utilitzats.....	66

	Pàgina
3.4 Obtenció de proteïnes cel·lulars a partir de músculs esquelètics de rata i ratolí (LAL, Diafragma, extremitats posteriors i medulla espinal).....	69
3.4.1 Obtenció de proteïnes totals.....	69
3.4.2 Obtenció de proteïnes subcel·lulars, de citosol i de membrana.....	69
3.4.3 Obtenció de proteïna total i subcel·lular, de la part sinàptica i extrasinàptica del múscul diafragma.....	69
3.5 Quantificació de la proteïna obtinguda.....	70
3.6 Detecció de proteïnes mitjançant electroforesi SDS-PAGE i Western blot.....	71
3.6.1 Preparació de mostres.....	71
3.6.2 Electroforesi SDS-PAGE.....	71
3.6.3 Western blot.....	73
3.6.4 Immunodetecció i revelat.....	73
3.7. Slot blots.....	74
3.8 Tècnica d'immunohistoquímica de fluorescència.....	75
3.9 Seccions semifines com a tècnica d'immunofluorescència d'alta resolució per a l'anàlisi de molècules de la unió neuromuscular.....	77
3.9.1 Anàlisi de colocalització.....	84
3.10 Microscòpia làser confocal.....	85
3.11 Microscòpia electrònica.....	85
3.12 Electrofisiologia.....	88
3.12.1 Anàlisi d'electrofisiologia.....	89
3.13 Anàlisi morfològica i morfomètrica.....	90
3.13.1 Estudi del grau d'innervació polineural en ratolins KO per a la PKC θ	90
3.13.2 Estudi dels agregats de nAChR en ratolins KO per a la PKC θ	91
3.13.3 Estudi del grau de fosforilació de la subunitat δ dels nAChR en animals KO per la PKC θ	92
4. Estadística.....	92
IV – Resultats.....	93
1. Expressió i localització de diferents isoformes de la PKC i de diferents subunitats de la PKA.....	97
1.1 Expressió de diferents isoformes de la PKC (α , β I, β II, γ , ϵ , δ , θ , ζ i μ).....	97
1.2 Localització de diferents isoformes de la PKC (α , β I, β II, ϵ , δ , θ , ζ i μ).....	99

	Pàgina
1.3 Expressió de diferents subunitats de la PKA (C α , C β , RII i RI).....	110
1.4 Localització de diferents subunitats de la PKA (C α , C β , RII i RI).....	111
2. Efecte de l'activitat sinàptica sobre la localització de les isoformes clàssiques de la PKC (cPKC) a la unió neuromuscular de rata adulta.....	117
2.1 Expressió de les isoformes de cPKC en múscul esquelètic adult i la seva localització a la unió neuromuscular.....	117
2.2 Activitat de la PKC i alliberament del transmissor a la unió neuromuscular.....	118
2.3 Expressió i activitat fosforiladora de les isoformes de cPKC en múscul esquelètic de rata adulta.....	120
2.3.1 Músculs en repòs.....	120
2.3.2 Efecte de l'estimulació nerviosa amb i sense contracció muscular en la localització de les isoformes cPKC a la membrana.....	122
2.3.3 Efecte de l'estimulació nerviosa amb i sense contracció muscular en la fosforilació de les isoformes de cPKC.....	124
2.3.4 Efecte de l'estimulació nerviosa amb i sense contracció muscular en la fosforilació proteica per PKC.....	125
2.3.5 L'estimulació nerviosa i la contracció no alteren la localització de les isoformes de cPKC a la unió neuromuscular.....	128
3. Desenvolupament de l'eliminació sinàptica i maduració dels agrupaments de nAChR a la sinapsi neuromuscular de ratolins deficients en la isoforma θ de la PKC	130
3.1 Ratolins deficients en la isoforma PKC θ	130
3.2 Control del desenvolupament de les fibres musculars esquelètiques en animals deficients en la PKC θ	131
3.3 PKC θ és necessària per a l'eliminació sinàptica dependent d'activitat.....	132
3.4 Canvis morfològics en la maduració dels agrupaments de nAChR durant el període d'eliminació sinàptica postnatal al múscul LAL d'animals KO.....	133
3.5 Efecte de la PKC θ en la fosforilació de les subunitats δ i ϵ del receptor d'acetilcolina nicotínic (nAChR)	139
3.6 Efecte de la PKC θ en l'organització ultraestructural de la NMJ.....	143
3.7 Localització cel·lular de la PKC θ	145
V – Discussió.....	147
1. Expressió i localització de les isoformes de la PKC i les subunitats de la PKA.....	151
2. Efecte de l'activitat sinàptica sobre la localització de les isoformes clàssiques de la PKC (cPKC) a la unió neuromuscular de rata adulta.....	157
3. Desenvolupament de l'eliminació sinàptica i maduració dels agrupaments de nAChR a la sinapsi neuromuscular de ratolins KO en la isoforma θ de la PKC.....	161

	Pàgina
VI – Conclusions.....	165
VII – Bibliografia.....	169
Aportacions científiques.....	201

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

SERINA/TREONINA QUINASES A LA SINAPSI NEUROMUSCULAR: ESPECIALITZACIÓ DE LES ISOFORMES
DE LA PROTEÏNA QUINASA C

Núria Montserrat Besalduch Canes

ISBN:978-84-692-3232-3/DL:T-939-2009

i - Índex de figures

	Pàgina
Figura 1. Estructura de la sinapsi neuromuscular.....	6
Figura 2. Esquema de la formació de la NMJ i composició de la membrana postsinàptica.....	14
Figura 3. Estructura de les proteïnes quinases dependents de segon missatger.....	28
Figura 4. Estructura primària de les diferents isoformes de la PKC.....	32
Figura 5. Múscul <i>Levator auris longus</i> (LAL).....	54
Figura 6. Situació anatòmica del múscul LAL en una rata P8. Impregnació argèntica del múscul LAL.....	54
Figura 7. Esquema de la innervació d'un hemidiafragma.....	55
Figura 8. Imatge del múscul LAL i de l'hemidiafragma.....	58
Figura 9. Immunohistoquímica en múscul LAL (triple marcatge en múscul sencer).....	81
Figura 10. Immunohistoquímica en múscul LAL (doble marcatge en múscul sencer)..	81
Figura 11. Immunohistoquímica en múscul LAL (doble marcatge, una única secció de confocal).....	82
Figura 12. Imatge de la unió neuromuscular en un tall semifí tenyit amb blau de metilè.....	82
Figura 13. Immunohistoquímica en múscul LAL (triple marcatge en talls semifins).....	83
Figura 14. Anàlisi mitjançant Western blot de diferents isoformes de la PKC (α , β I, β II, γ , ϵ , δ , θ , ζ i μ) en extractes proteics de músculs esquelètics de rates d'edats P6 i adultes.....	98
Figura 15. Localització de la isoforma PKC α a la unió neuromuscular mitjançant la tècnica d'immunohistoquímica.....	101
Figura 16. Localització de la isoforma PKC β I a la unió neuromuscular mitjançant la tècnica d'immunohistoquímica.....	101
Figura 17. Localització de la isoforma PKC β II a la unió neuromuscular mitjançant la tècnica d'immunohistoquímica.....	103
Figura 18. Localització de la isoforma PKC ϵ a la unió neuromuscular mitjançant la tècnica d'immunohistoquímica.....	103
Figura 19. Localització de la isoforma PKC δ a la unió neuromuscular mitjançant la tècnica d'immunohistoquímica.....	104
Figura 20. Localització de la isoforma PKC θ a la unió neuromuscular mitjançant la tècnica d'immunohistoquímica.....	106
Figura 21. Localització de la isoforma PKC ζ a la unió neuromuscular mitjançant la tècnica d'immunohistoquímica.....	107
Figura 22. Localització de la isoforma PKC μ a la unió neuromuscular mitjançant la tècnica d'immunohistoquímica.....	108

	Pàgina
Figura 23. Resum de la immunolocalització de les diferents isoformes de la PKC (α , β I, β II, γ , ϵ , δ , θ , ζ i μ) a la sinapsi neuromuscular.....	109
Figura 24. Anàlisi mitjançant Western blot de diferents subunitats de la PKA ($C\alpha$, $C\beta$, RII α i RI) en extractes proteics de músculs esquelètics de rates d'edats P6 i adultes.....	110
Figura 25. Localització de la subunitat PKA $C\alpha$ a la unió neuromuscular mitjançant la tècnica d'immunohistoquímica.....	112
Figura 26. Localització de la subunitat PKA $C\beta$ a la unió neuromuscular mitjançant la tècnica d'immunohistoquímica.....	113
Figura 27. Localització de la subunitat PKA RII a la unió neuromuscular mitjançant la tècnica d'immunohistoquímica.....	114
Figura 28. Localització de la subunitat PKA RI a la unió neuromuscular mitjançant la tècnica d'immunohistoquímica.....	115
Figura 29. Resum de la immunolocalització de les diferents subunitats de la PKA ($C\alpha$, $C\beta$, RII i RI) a la sinapsi neuromuscular.....	116
Figura 30. Registres electrofisiològics.....	119
Figura 31. Expressió i fosforilació de les isoformes de cPKC en múscul esquelètic de rata adulta en repòs.....	122
Figura 32. Expressió de les isoformes cPKC en múscul esquelètic sota l'efecte de l'estimulació nerviosa amb i sense contracció muscular.....	124
Figura 33. Fosforilació de la PKC sota l'efecte de l'estimulació nerviosa amb i sense contracció muscular.....	125
Figura 34. Fosforilació dels substrats de les cPKC en múscul esquelètic.....	127
Figura 35. Localització de la isoforma β I de cPKC a la unió neuromuscular durant estimulació elèctrica amb i sense contracció muscular.....	129
Figura 36. Expressió de la PKC θ , MHC, vAChT en múscul esquelètic i medul·la espinal d'animals WT i KO mitjançant Western blot.....	131
Figura 37. Procés postnatal d'eliminació de sinapsis.....	133
Figura 38. Maduració dels agrupaments de nAChR de la unió neuromuscular d'animals WT i KO.....	135
Figura 39. Imatges de microscòpia confocal d'unions neuromusculars de músculs d'animals WT i de KO.....	137
Figura 40. Expressió de diferents proteïnes (rapsina, MuSK i utrofina) a l'aparell postsinàptic en l'edat de 6 dies.....	139
Figura 41. Selectivitat dels anticossos fosfo- δ i ϵ	141
Figura 42. Fosforilació de les subunitats δ i ϵ dels nAChR depenent de la PKC θ	142

	Pàgina
Figura 43. Ultraestructura de les unions neuromusculars dels animals KO durant el desenvolupament i en l'adult.....	144
Figura 44. Diagrama que il·lustra l'efecte tròfic positiu que la contracció muscular fa sobre l'activació de les isoformes que depenen de calci a la unió neuromuscular.....	160

ii- Índex de taules

	Pàgina
Taula 1. Classificació de les proteïnes Ser/Thr quinases.....	26
Taula 2. Material utilitzat en l'obtenció dels diferents músculs.....	59
Taula 3. Material utilitzat per a la realització dels diferents tractaments.....	62
Taula 4. Anticossos primaris.....	64
Taula 5. Anticossos secundaris.....	65
Taula 6. Material utilitzat en l'obtenció i quantificació de proteïnes.....	70
Taula 7. Material utilitzat en el Western Blot i Slot Blot.....	75
Taula 8. Material utilitzat en la immunohistoquímica.....	77
Taula 9. Percentatge de colocalització entre marcadors específics dels tipus cel·lulars de la unió neuromuscular.....	78
Taula 10. Diferència quantitativa del percentatge de colocalització dels marcadors de la NMJ per la utilització de dos mètodes.....	79
Taula 11. Material utilitzat en l'obtenció de talls semifins.....	84
Taula 12. Material utilitzat en la microscòpia electrònica.....	87
Taula 13. Material utilitzat en l'electrofisiologia.....	90

iii- ÍNDEX D'ABREVIACIONS

- aa** Aminoàcid
- Ab** Anticòs
- ACh** Acetilcolina
- AChE** Acetilcolinesterasa
- AChR** Receptors d'acetilcolina (de l'anglès *Acetylcholine receptors*)
- AKAP** Proteïna d'ancoratge a PKA, de l'anglès *A-Kinase Anchoring Protein*
- aPKC** Proteïnes quinases atípiques
- APS** Persulfat d'amoni (de l'anglès *Amonium persulfate*)
- Arg** Arginina
- ARIA** De l'anglès *AChR-inducing activity*
- ATP** Trifosfat d'adenosina (de l'anglès *Adenosin triphosphate*)
- BDNF** De l'anglès *Brain derived growth factor*
- BSA** Sèrum d'albúmina bovina (de l'anglès *Bovine serum albumin*)
- PKA-C** Subunitat catalítica de la PKA
- C1-C4** Dominis conservats de la PKC
- Ca²⁺** Ió calci
- CaC** Calfosteïna C
- CaM** Calmodulina
- cAMP** Adenosina monofosfat cíclica (de l'anglès *cyclic adenosine monophosphate*)
- Cdc-2** De l'anglès *Cell division cycle*
- CDK** De l'anglès *Cyclin Dependent Kinase*
- cGMP** Guanosina monofosfat cíclica (de l'anglès *cyclic guanosine monophosphate*)
- CK1-2** De l'anglès *Casein Kinase1-2*
- Cit** Citoplasma
- Cl⁻** Ió clor
- cm** Centímetre (10⁻²m)
- cPKC** Proteïnes quinases clàssiques o convencionals
- cRaf** Proteïna quinasa
- CS** Cèl·lula de Schwann
- Cys** Cisteïna
- DAG** Diacilglicerol

- DC** Detergent compatible
- DER** De l'anglès *Diglycidil ether polupropylene glicol*
- DGC** De l'anglès *Dystrophin-glicoprotein complex*
- DGK** DAG quinasa
- Dk** Ruc (de l'anglès *Donkey*)
- DMAE** De l'anglès *Dimethylamino ethanol*
- DMSO** De l'anglès *Dimethyl sulfoxide*
- DPX** Medi de muntatge
- DSHB** Developmental Studies Hybridoma Bank, University of Iowa, Iowa City, IA
- Dvl** De l'anglès *Dishevelled*
- E** Estímul elèctric sense contracció muscular
- E+C** Estímul elèctric amb contracció muscular
- ECL** De l'anglès *Enhancer luminiscent*
- EDL** *Extensor digitorum longus*
- EDTA** Àcid etilè diamino tetraacètic (de l'anglès *ethylenediaminetetraacetic acid*)
- EPP** Potencial de placa (de l'anglès *endplate potencial*)
- ErbB** Receptor de neuregulines, receptor tirosina quinasa
- ERK** De l'anglès *Extracellular signal-Regulated Kinase*
- ERL** De l'anglès *Vinyl cyclohexenedioxide*
- Ex** Part extrasinàptica del múscul diafragma
- FGF2** Factor de creixement dels fibroblasts 2
- g** Grams
- GAPDH** Gliceraldehid 3 fosfat dehidrogenasa
- GDNF** De l'anglès *Glial Cell line-Derived Neurotrophic factor*
- GRK** De l'anglès *G protein receptor kinase*
- Gt** Cabra (de l'anglès *Goat*)
- GTPases** Guanosina trifosfatases
- h** Hora
- HRP** Peroxidasa de rabe (de l'anglès *Horseradish Peroxidase*)
- Hz** Herz (episodi/s)
- IHQ** Immunohistoquímica
- IP₃** Trifosfat d'inositol

- JI** Jackson Immunoresearch, casa comercial
- JNK** De l'anglès *Jun Kinase*
- K⁺** Ió potassi
- kDa** Quilo Dalton
- KLH** De l'anglès *keyhole limpet hemacyanin*
- KO** De l'anglès *Knock Out*
- l** Litres
- LAL** Levator auris longus
- LRP4** Receptor de l'agrina (de l'anglès, *low-density lipoprotein receptor (LDLR)-related protein*)
- Lys** Lisina
- m** Metre
- M** Molaritat
- M1** Domini transmembrana dels receptors d'acetilcolina
- M1-5** Receptor muscarínic tipus 1-5
- M1-M6** Nivell de desenvolupament de la placa motora
- mA** Miliampers (10^{-3} A)
- mAChR** Receptor d'acetilcolina muscarínic
- MAPK** De l'anglès *Mitogen Activated Protein Kinase*
- Mb** Membrana
- MEPP** Potencial de placa en miniatura (de l'anglès *miniature endplate potencial*)
- MET** Microscopi electrònic de transmissió
- mg** Miligrams (10^{-3} g)
- Mg²⁺** Ió magnesi
- MHC** De l'anglès *Myosin Heavy Chain*
- ml** Mililitres (10^{-3} l)
- mM** Milimolar
- mm** Milímetre (10^{-3} m)
- MP** Molecular Probes, casa comercial
- MP-3** MiniProtean 3
- Ms** Ratolí
- ms** Milisegon (10^{-3} s)
- MuSK** De l'anglès *Muscle specific kinase*)

- mV** Milivolts (10^{-3} V)
- Na⁺** Ió sodi
- nAChR** Receptors d'Acetilcolina nicotínics
- N-CAM** Molècules d'adhesió de cèl·lules neuronals
- nm** Nanòmetre (10^{-9} m)
- nM** Nanomolar (10^{-9})
- NMJ** Unió neuromuscular (de l'anglès *Neuromuscular Junction*)
- nPKC** Proteïnes quinases noves
- NSA** De l'anglès *Nonenyl succinic anhydre*
- NT-3** Neurotrofina 3
- NT-4** Neurotrofina 4
- O/N** De l'anglès *Over night* (14-16 hores)
- °C** Graus centígrads
- p** Nivell de significació estadístic
- P** Dia postnatal
- PAK1** De l'anglès *p21-activated kinase*
- PAR -1** Receptor de la proteasa trombina, de l'anglès *Protease activated receptor*
- PBS** Solució salina (de l'anglès *phosphate buffer saline*)
- PIP₂** Fosfatidilinositol difosfat
- PKA** Proteïna quinasa A (de l'anglès *Protein Kinase A*)
- PKC** Proteïna quinasa C (de l'anglès *Protein kinase C*)
- PKD** Proteïna quinasa homòloga de PKC μ
- PKG** Proteïna quinasa G (proteïna quinasa depenent de cGMP)
- PMA** Forbol 12-miristat13-acetat (de l'anglès *Phorbol-12-myristate-13-acetate*)
- PP (Covance)** Producció pròpia (Covance)
- PRK1-3** De l'anglès *Protein kinase C-related kinase 1-3*
- PS** Fosfatidilserina
- PVDF** Membrana de transferència sintètica (de l'anglès *polyvinylidene fluoride*)
- PKA-R** Subunitat reguladora de la PKA
- RACK** Receptor de quinases C actives (de l'anglès *Receptor activated C Kinase*)
- Rb** Conill (de l'anglès *Rabbit*)
- ROCK1** De l'anglès *Rho-associated Kinase 1*

- RSK** De l'anglès *Ribosomal S6 Kinase*
- rpm** Revolucions per minut
- s** Segon
- SAPK** De l'anglès *Stress-activated Protein Kinase*
- SEM** Error estàndard de la mitjana
- SC** Santa Cruz, casa comercial
- SD** Desviació estàndard
- SDS** De l'anglès *sodium dodecil sulfate*
- SDS-PAGE** Tampó d'electroforèsi (de l'anglès *Sodium dodecyl sulfate-polyacrilamide gel electrophoresis*)
- Ser** Serina
- Sin** Part sinàptica del diafragma
- SLB** Tampó de càrrega per a mostres de proteïna (de l'anglès *Sample Loading Buffer*)
- Sp** Ovella (de l'anglès *Sheep*)
- SPSS** Paquet estadístic (de l'anglès *Statistical Package for the Social Sciences*)
- TBE** De l'anglès *2,2,2-tribromoethanol*, anestèsic
- TBS-t** Tampó tris (de l'anglès *Tris-buffered saline*) més Tween
- TEMED** De l'anglès *N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine*
- TGF** De l'anglès *transforming growth factor*
- Thr** Treonina
- THR** Trombina
- TL** Transduction laboratories, casa comercial
- TN** Terminal nerviós
- TRICT** Isotiocianat tetrametil de rodamina (de l'anglès *tetramethylrhodamine*)
- TSC** Cèl·lula de Schwann terminal (de l'anglès *Terminal Schwann cell*)
- Tyr** Tirosina
- V** Volts
- v/v** Volum/volum
- V1-V5** Dominis variables de la PKC
- vAChT** De l'anglès *vesicular Acetylcholine transporter*
- VDCC** Canal de calci depenent de voltatge (de l'anglès *Voltage Dependent Calcium Channel*)
- vs** *versus*

w/v	Pes/volum
WB	Western blot
WT	De l'anglès <i>Wild Type</i>
X	Augments
α-BTX	Alfa-Bungarotoxina
β'COP	RACK2
δAChR	Subunitat δ del AChR
δAChRp	Subunitat δ del AChR fosforilada
ϵAChR	Subunitat ϵ del AChR
ϵAChRp	Subunitat ϵ del AChR fosforilada
μg	Micrograms (10^{-6} g)
μl	Microlitres (10^{-6} l)
μm	Micròmetre (10^{-6} m)
μM	Micromolar (10^{-6} M)
ρAChR	Receptor d'acetilcolina fosforilat

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
SERINA/TREONINA QUINASES A LA SINAPSI NEUROMUSCULAR: ESPECIALITZACIÓ DE LES ISOFORMES
DE LA PROTEÏNA QUINASA C
Núria Montserrat Besalduch Canes
ISBN:978-84-692-3232-3/DL:T-939-2009

I - INTRODUCCIÓ

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

SERINA/TREONINA QUINASES A LA SINAPSI NEUROMUSCULAR: ESPECIALITZACIÓ DE LES ISOFORMES
DE LA PROTEÏNA QUINASA C

Núria Montserrat Besalduch Canes

ISBN:978-84-692-3232-3/DL:T-939-2009

I – Introducció

1. La unió neuromuscular com a model experimental de sinapsi

2. Què és la unió neuromuscular?

2.1 Components de la unió neuromuscular

- 2.1.1 Motoneurona i terminal nerviós
- 2.1.2 Fibra muscular
- 2.1.3 Cèl·lula de Schwann
- 2.1.4 Làmina basal

3. Conducció nerviosa i neurotransmissió a la unió neuromuscular

4. Eliminació sinàptica en el desenvolupament postnatal

5. Proteïnes quinases

5.1 Ser/Thr quinases

5.2 Proteïnes Ser/Thr quinases dependents de segon missatger

- 5.2.1 Proteïna quinasa dependent de cAMP (PKA)
 - 5.2.1.1 Localització de la PKA
- 5.2.2 Proteïna quinasa dependent de calci (PKC)
 - 5.2.2.1 Estructura de la PKC
 - 5.2.2.2 Activació de la PKC
 - 5.2.2.3 Localització de la PKC

5.3 PKC i PKA a la unió neuromuscular

- 5.3.1 PKC i PKA en l'eliminació sinàptica
- 5.3.2 PKC i PKA en l'activitat sinàptica

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

SERINA/TREONINA QUINASES A LA SINAPSI NEUROMUSCULAR: ESPECIALITZACIÓ DE LES ISOFORMES
DE LA PROTEÏNA QUINASA C

Núria Montserrat Besalduch Canes

ISBN:978-84-692-3232-3/DL:T-939-2009

1. La unió neuromuscular com a model experimental de sinapsi

La unió neuromuscular (NMJ, de l'anglès *neuromuscular junction*) és el contacte sinàptic entre una motoneurona i una cèl·lula muscular i és el tipus de sinapsi química que millor es coneix. L'esquema bàsic que descriu el funcionament de la sinapsi neuromuscular es pot generalitzar per a explicar el funcionament de totes les sinapsis químiques, encara que sempre s'ha de tenir en compte que existiran petites diferències associades a cada sinapsi particular que s'escaparan del model neuromuscular.

Què té la unió neuromuscular que la fa candidata per ser el model d'estudi d'una sinapsi química? 1) La seva mida: és una sinapsi "gran" que permet veure i estudiar els seus components per separat i a la vegada com un tot. 2) La seva accessibilitat: aquesta característica ha permès que s'hagi utilitzat des de fa molts anys i fins l'actualitat en molts estudis electrofisiològics i també neurobiològics.

No hi ha, però, una única sinapsi neuromuscular ideal com a model d'estudi sinó que s'utilitza la unió neuromuscular d'amfibis (granota), de mamífers (rata, ratolins) i, també, amb l'avanç del coneixement de la biologia molecular al llarg dels últims anys, la de *Drosophila*. La unió neuromuscular adulta dels vertebrats va servir com a model del primer estudi fet amb rigor per a la demostració de la transmissió sinàptica química (Dale i col., 1936). També va ser model per a la demostració que l'alliberament del neurotransmissor és quàntic i vesicular (Katz, 1966). El primer receptor de neurotransmissors que va ser purificat i clonat va ser el receptor nicotínic de l'acetilcolina (nAChR, de l'anglès *nicotinic Acetylcholine Receptor*), sent l'acetilcolina el neurotransmissor de la unió neuromuscular (Duclert i Changeux, 1995). La unió neuromuscular també s'ha utilitzat en estudis de recerca clínica ja que és clau en diferents malalties del sistema nerviós, com la miastenia gravis, la síndrome miastènica de *Lambert-Eaton* o la distròfia muscular de *Duchenne*.

2. Què és la unió neuromuscular?

La NMJ és la sinapsi entre una motoneurona α i una cèl·lula muscular esquelètica. És una sinapsi química, colinèrgica nicotínica, fent referència al seu neurotransmissor que és l'acetilcolina i al seu agonista que és la nicotina. El propòsit de la NMJ és generar una sinapsi química que provoqui el control nerviós sobre la contracció muscular.

Introducció

La NMJ està formada per les porcions sinàptiques de tres tipus cel·lulars: la motoneurona, la fibra muscular i la cèl·lula de Schwann (figura 1) (Courteaux, 1973; Ogata, 1988; Engel, 1994; Sanes i Lichtman, 1999). A la vegada, com en tota sinapsi química, es diferencia la part presinàptica i la part postsinàptica. La part presinàptica la compon el terminal nerviós de la motoneurona i la part postsinàptica està formada per la fibra muscular directament oposada al terminal nerviós. Les cèl·lules de Schwann terminals (anomenades també teloglials o perisinàptiques) estan estretament associades amb els components pre- i postsinàptics recobrint el terminal nerviós i tancant l'espai sinàptic amb les seves projeccions. Per altra banda, cada vegada hi ha més evidències que aquestes cèl·lules intervenen en la comunicació química i per tant se les ha de considerar com un element sinàptic més. Les porcions sinàptiques dels tres components cel·lulars estan altament especialitzades. Contenen molècules i orgànuls específics que extrasinàpticament es troben en poca concentració o fins i tot no es troben. És de menció la làmina basal sinàptica que, com s'explicarà més endavant, té una composició diferent a la que es troba fora de la sinapsi.

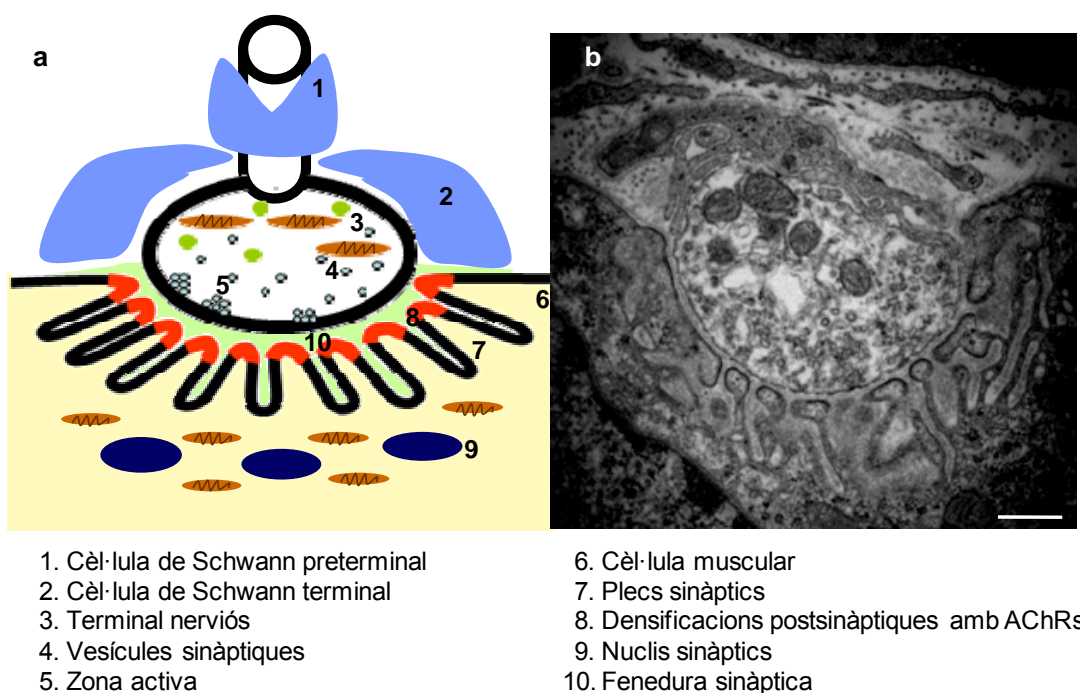


Figura 1. Estructura de la sinapsi neuromuscular. (a) Esquema de la unió neuromuscular. (b) Imatge de microscòpia electrònica de transmissió d'una NMJ. Tipus cel·lulars que la componen amb les especialitzacions de cada un d'ells. Barra d'escala = 250 nm.

2.1 Components de la unió neuromuscular

2.1.1 Motoneurona i terminal nerviós

La motoneurona condueix l'impuls nerviós des del sistema nerviós central fins als òrgans efectors (músculs i glàndules). És una cèl·lula nerviosa que consta d'un cos cel·lular o soma ubicat a la part ventral de la medul·la espinal, unes prolongacions especials denominats dendrites i un axó que surt de la medul·la espinal on es ramifica formant el terminal nerviós que contactarà amb la fibra muscular formant la sinapsi neuromuscular. Les motoneurons tenen un diàmetre de 70-100 μm .

El soma conté el nucli de la cèl·lula i la majoria dels orgànuls cel·lulars, com els cossos de Nissl que són molt abundants a prop de la base de l'axó. Conté abundants mitocondris, microtúbuls i neurofilaments. L'aparell de Golgi està situat a prop del nucli. En el citoplasma hi ha acumulacions de pigments denominats grànuls de lipofucsina dels quals no es coneix la seva funció.

Des del soma de la motoneurona irradien en totes les direccions unes prolongacions anomenades dendrites fent que la cèl·lula tingui un aspecte multipolar. La seva funció és la de rebre senyals sinàptics des d'altres neurones constituint la superfície receptora de la motoneurona. Aquestes, a mesura que es van allunyant del soma, es van fent cada vegada més primes i es divideixen, donant lloc a diferents branques formant un patró d'arborització complex, presentant un gradient pròxim-distal d'orgànuls en el seu interior.

L'axó té l'origen en una protusió del soma cel·lular i s'estén fins al terminal nerviós que és la part més distal ja en contacte amb la fibra muscular. Són funcions de l'axó transmetre a les fibres musculars l'impuls nerviós (propagació del potencial d'acció) i transportar els missatgers químics, i determinats orgànuls i molècules fins al seu extrem distal. En el seu citoplasma s'ubica el citoesquelet especialitzat (microtúbuls i neurofilaments). La longitud de l'axó varia molt, podent arribar a mesurar 125 cm (un home de 180 cm d'alçada, axó de la regió lumbosacra que innerva el múscul plantar).

Els axons motors es troben aïllats per unes cobertes lipídiques, les beines de mielina, formades per les cèl·lules de Schwann, que recobreixen l'axó en tot el seu recorregut. Aquesta coberta lipídica o mielínica no és contínua sinó que al llarg de l'axó existeixen bandes circulars sense mielina que es localitzen entre les diferents cèl·lules de Schwann. Són els anomenats nòduls de Ranvier i són els responsables de la conducció saltatòria de l'impuls nerviós.

Introducció

Els axons motors normalment innerven un sol múscul, ja que normalment no es ramifiquen durant el trajecte fins al múscul sinó que ho fan intramuscularment. Els axons es divideixen quan estan a prop del múscul que han d'innervar i poden arribar a innervar fins a un centenar de fibres musculars. Liddell i Sherrington (1925) van definir el concepte d'unitat motora com el conjunt format per una única motoneurona més tots els miòcits que estigui innervant. Tots els miòcits d'una unitat motora tenen les mateixes característiques fisiològiques i histoquímiques.

La part de l'axó que entra en contacte amb la fibra muscular a innervar és el terminal nerviós o axònic i constitueix la part més especialitzada i més distal de la motoneurona. Aquesta unió entre el terminal nerviós i la fibra muscular és l'anomenada sinapsi neuromuscular. El terminal nerviós està especialitzat en l'alliberament de la molècula neurotransmissora. Hi ha gran quantitat de vesícules sinàptiques d'aproximadament 50 nm de diàmetre que contenen el neurotransmissor que serà alliberat, l'acetilcolina (ACh), i també hi ha mitocondris que proporcionen l'energia necessària per a la síntesi i l'alliberament de l'ACh.

El terminal nerviós es troba polaritzat ja que té una distribució dels seus components adient per la funció a realitzar. En la porció del terminal nerviós que està en contacte amb la fibra muscular és on es troben les vesícules sinàptiques que contenen el neurotransmissor. Les vesícules sinàptiques es fusionen amb la membrana del terminal nerviós en uns llocs concrets per alliberar el seu contingut a l'espai extracel·lular (a l'esclètxa o fenedura sinàptica). Les zones de fusió es presenten com zones electrodenses al microscopi electrònic de transmissió i s'anomenen zones actives. S'han identificat molts components d'aquestes zones actives, alguns dels quals s'associen a canals de calci i potassi dependents de voltatge, maximitzant així l'eficàcia de l'alliberament del neurotransmissor dependent de calci (Robitaille i col., 1993; Sugiura i col., 1995; Day i col., 1997). En la porció del terminal axònic que no està en contacte amb la fibra muscular hi ha moltes menys vesícules però més mitocondris i no s'hi troben zones actives. En aquesta zona hi ha molts microtúbuls i neurofilaments i en canvi aquests són escassos en la zona de contacte amb la cèl·lula postsinàptica (Yee i col., 1988). Les molècules més ben estudiades del terminal nerviós són proteïnes de les vesícules sinàptiques (Sudhof, 1995; Colakos i Scheller, 1996): el neurotransmissor, el seu enzim sintètic (acetilcolina transferasa) i el transportador d'acetilcolina vesicular, entre altres.

2.1.2 Fibra muscular

Els músculs estriats esquelètics estan formats per fibres musculars multinucleades formades durant l'embriogènesi per la fusió de mioblasts que generen un miotub que madurarà i es convertirà en la fibra muscular. Aquestes cèl·lules tenen un diàmetre que varia de 10 a 100 μm en funció de si la musculatura ha estat sotmesa o no a exercici. Les fibres musculars observades longitudinalment sota microscopi òptic presenten una sèrie d'estriacions que són el reflex de la presència de les miofibril·les a l'interior del miòcit. Les miofibril·les són les responsables de la contracció i relaxació de les fibres musculars. Cada miofibril·la té un diàmetre d'1-2 μm i es troba separada per la miofibril·la del costat per mitocondris i pel sistema sarcoplàsmic. Les miofibril·les bàsicament es componen per actina i miosina, i és la disposició regular d'aquestes dues proteïnes la que dóna l'aparença estriada tant a la miofibril·la com a la fibra muscular. La membrana plasmàtica o sarcolemma de la fibra muscular es rodeja d'una làmina basal i de cèl·lules satèl·lit (cèl·lules amb un paper important en la regeneració muscular). El sarcolemma emet prolongacions digitiformes, anomenades túbuls T, cap a l'interior del citoplasma (també anomenat sarcoplasma). Els túbuls T estableixen contacte amb el reticle sarcoplàsmic. Els nombrosos nuclis que hi ha en una fibra muscular es localitzen a la perifèria de la cèl·lula, just per sota del sarcolemma. Els mitocondris es troben envoltant les miofibril·les que acaben ocupant el 80% del citoplasma.

El sarcolemma de la fibra muscular té unes característiques especials segons si és membrana extrasinàptica o sinàptica. La membrana extrasinàptica és la que es troba al llarg de tota la fibra muscular, exceptuant la fracció que forma part de la unió neuromuscular. Així, la membrana sinàptica o també anomenada postsinàptica, és la que es troba formant part de la unió neuromuscular i que està enfrontada, per tant, amb el component presinàptic o terminal nerviós de la sinapsi. La membrana postsinàptica està altament especialitzada per a respondre ràpidament i d'una forma efectiva a l'efecte del neurotransmissor alliberat pel terminal nerviós. Té una estructura i composició molecular diferent a la de la membrana que es troba fora de l'espai sinàptic, l'extrasinàptica. S'hi troba una elevadíssima concentració de receptors d'acetilcolina (nAChR), més de $10.000/\mu\text{m}^2$ (Salpeter i Loring, 1985). Els nAChR són receptors de tipus nicotínic que pertanyen a la superfamília de canals iònics activats per lligands, i que es componen d'heterooligòmers de cinc subunitats amb quatre dominis transmembrana cada una (Le Novère i Changeux, 1995). El nAChR té una estructura bàsica de pentàmer, compost per quatre cadenes polipeptídiques diferents (2 α , 1 β , 1 δ i 1 ϵ). L'ACh s'uneix a la subunitat α i el domini d'unió al lligand comprèn dos llocs d'unió. Aquest domini

Introducció

d'unió està exposat a la superfície extracel·lular i principalment format per la regió N-terminal de les subunitats α (Montal i Opella, 2002). Els quatre dominis transmembrana que conté cada subunitat, M1-M4, s'estructuren formant un porus, sent sobretot la seqüència M2 la responsable de la formació d'aquest. Associats a segments citoplasmàtics dels nAChR hi ha un complex aparell citoplasmàtic on la principal funció descrita fins al moment és la de mantenir l'elevada densitat de nAChR en la membrana sinàptica, ja que tot i trobar nAChR al llarg de tota la fibra muscular, en la part extrasinàptica la densitat és d'uns $10/\mu\text{m}^2$ (Salpeter i col., 1988).

Així, un dels punts fonamentals de l'estructura postsinàptica és la presència d'una alta densitat d'agrupació de nAChR [figura 2 (a)]. El funcionament correcte de la NMJ depèn de la formació, maduració i manteniment d'aquests agregats de receptors (Sanes i Lichtman, 2001). Al llarg de les últimes tres dècades s'ha produït un gran progrés en el coneixement dels diferents passos que tenen lloc en la formació de la sinapsi neuromuscular, especialment pel que fa a la formació dels agregats de nAChR a la membrana postsinàptica de la NMJ. L'agrupació dels nAChR és central en el procés de desenvolupament de la NMJ i la seva disrupció afecta adversament no només a l'organització madura del component postsinàptic sinó també a l'especialització presinàptica de la sinapsi (Sanes i Lichtman, 2001). Actualment, es coneix que el procés d'agrupació dels nAChR a la membrana postsinàptica depèn de la via de senyalització que inclou les molècules agrina, MuSK i rapsina. Durant el procés d'innervació [veure figura 2(b)], els axons motors alliberen un proteoglicà heparan sulfat anomenat agrina (Nitkin i col., 1987; Ruegg i col., 1992) que activa el receptor tirosina quinasa específic de múscul (MuSK) (Glass i col., 1996; Glass i Yancopoulos, 1997; Burden, 1998) a través de LRP4 (de l'anglès, *low-density lipoprotein receptor (LDLR)-related protein*) (Kim i col., 2008; Zhang i col., 2008). L'activació de MuSK dispara l'acoblament de molècules postsinàptiques del citoesquelet que agrupen a la membrana els nAChR a través de la molècula rapsina, una proteïna citoplasmàtica associada a la membrana (Phillips i col., 1991; Moransard i col., 2003). La rapsina s'associa amb els nAChR a la membrana postsinàptica amb una estequiometria 1:1 (Froehner, 1991) i s'ha demostrat que la presència de la rapsina és suficient per agrupar, ancorar i estabilitzar els nAChR a la membrana (Froehner i col., 1990; Phillips i col., 1991, 1993, 1997; Wang i col., 1999; Gautam i col., 1995) a més de facilitar la fosforilació del nAChR en residus de tirosina (Lee i col., 2008). MuSK sembla actuar abans que la rapsina, perquè en ratolins knockout en rapsina es produeix igualment l'agrupació dels nAChR (Apel i col., 1997). S'han descrit múltiples molècules regulades per MuSK, algunes de les quals desenvolupen coneguts

papers en la regulació del citoesquelet, com les guanosina-trifosfatases (GTPases) de la família de Rho (Weston i col., 2003); *dishevelled* (Dvl) (Luo i col., 2002); p21-activated kinase (PAK1) (Luo i col., 2002) o Dok-7 (Okada i col., 2006).

S'ha descrit que al múscul esquelètic, el complex DGC (de l'anglès *Dystrophin-glycoprotein complex*) proporciona una unió essencial entre el citoesquelet intracel·lular i la matriu extracel·lular. Aquest complex es localitza al llarg del sarcolemma del miòcit esquelètic [veure figura 2(b)], on juga un paper en el manteniment de la integritat del sarcolemma especialment sota la contracció muscular, així com també ho fa en la membrana postsinàptica de la NMJ contribuint a l'estabilització dels agregats de nAChR (Ervasti i Campbell, 1991). Són varies les molècules que formen part del complex: les subunitats α i β del distroglicà, distrofina o utrofina, subunitats de sarcoglicans, subunitats de sintrofina i subunitats de distrobrevina. El distroglicà és un element central del complex perquè estableix la unió transmembrana entre les laminines i la distrofina (Ervasti i Campbell, 1993; Ibraghimov-Beskrovnaya i col., 1992). La subunitat extracel·lular α -distroglicà interactua amb la laminina extracel·lular, mentre que la subunitat transmembrana β -distroglicà interactua amb la distrofina subsarcolèmica, la qual s'uneix a la xarxa d'actina. La α -distrobrevina (Grady i col., 2000) i la α 1-sintrofina (Adams i col., 2000) són dues proteïnes d'unió a la distrofina que són membres del complex DGC (Blake i col., 2002). Actualment es coneix que les laminines de la làmina basal que embolcalla les fibres musculars i que són organitzadors sinàptics derivats del múscul que promouen la diferenciació presinàptica mitjançant un mecanisme intercel·lular (Noakes i col., 1995; Gautam i col., 1996; Burgess i col., 1999; Patton i col., 2001; Nishimune i col., 2004; Lin i col., 2005; Misgeld i col., 2005), també promouen la maduració postsinàptica a través d'un mecanisme autocrí (Nishimune i col., 2008). Un fet a destacar és que les vies de senyalització intracel·lulars de l'agrina i la laminina coincideixen i, aquest fet podria ser important per a la formació de la unió neuromuscular (Marangi i col., 2002).

D'altra banda, s'ha estudiat la unió intracel·lular dels agregats de nAChR als filaments d'actina i s'ha suggerit que la rapsina s'uneix a través de les catenines al citoesquelet d'actina (Zhang i col., 2007). S'ha suggerit que les calpaïnes, unes proteïnes dependents de calci, podrien degradar proteïnes estructurals per al manteniment dels agregats de nAChR i que, per tant, la inhibició de l'activitat catalítica de les calpaïnes podria donar com a resultat l'estabilització dels agregats (Kim i Nelson, 2000). En aquest mateix sentit, s'ha demostrat que la rapsina inhibeix la dispersió dels nAChR mitjançant la inhibició de la calpaïna (Chen i col., 2007).

Introducció

Les neuregulines són altres molècules que indueixen l'expressió del nAChR i contribueixen a formar i/o mantenir l'elevada concentració de receptors a la NMJ (Lemke, 1996; Fischbach i Rosen, 1997; Falls, 2003a, b). La neuregulina-1 o ARIA (de l'anglès *AChR-inducing activity*), alliberada pel terminal nerviós, activa els receptors tirosina quinasa ErbB (ErbB2, ErbB3, ErbB4) (Jo i col., 1995; Moscoso i col., 1995; Zhu i col., 1995; Rimer i col., 1998; Trinidad i col., 2000) i subseqüentment activa també quinases intracel·lulars incloent Erk, JNK i Cdk5, que s'ha demostrat que es requereixen per la inducció de l'expressió dels nAChR (Si i col., 1996; Tansey i col., 1996; Altiok i col., 1997; Si i col., 1999; Fu i col., 2001).

A part d'aquesta especialitzada i complexa composició molecular, la membrana postsinàptica de la fibra muscular té una estructura molt sofisticada. Entre el component presinàptic i el postsinàptic hi ha la fenedura sinàptica, un espai d'aproximadament 50 nm. La membrana postsinàptica, encarada amb el terminal nerviós, forma una depressió on s'hi troben unes invaginacions d'aproximadament 1 µm de profunditat que se situen enfrontades amb les zones actives de la membrana presinàptica. El conjunt d'aquestes invaginacions reben el nom de plecs sinàptics. A la part apical del plec, la cresta, és on es localitzen els receptors d'acetilcolina, formant les zones denses postsinàptiques. A la base dels plecs s'hi troben els canals de sodi, molècules d'adhesió de cèl·lules neurals (N-CAM) i el receptor de la proteasa trombina (PAR-1) (Covault i Sanes, 1986; Flucher i Daniels, 1989; Lanuza i col., 2007). També s'hi troben altres molècules com l'anquirina, l'α-distrobrevina-2, la distrofina i ErbB2 i ErbB4 que colocalitzen amb els canals de sodi mentre que altres proteïnes com α-distrobrevina-1, MuSK, rapsina i utrofina colocalitzen amb els nAChR (Sealock i col., 1984; Flucher i Daniels, 1989; Wood i Slater, 1998; Trinidad i col., 2000). S'ha suggerit que aquesta organització molecular heterogènia que delimita dominis a la membrana postsinàptica pot augmentar l'eficàcia de la transmissió sinàptica (Wood i Slater, 1997; Sanes i Litchman, 1999). Sota dels plecs sinàptics s'hi troba una acumulació de mitocondris i de nuclis. Aquests nuclis, denominats nuclis sinàptics, expressen un patró de proteïnes diferent al que expressen els nuclis extrasinàptics.

2.1.3 Cèl·lula de Schwann

Les cèl·lules de Schwann són les cèl·lules glials del sistema nerviós perifèric i se situen envoltant els axons. Són cèl·lules amb un citoplasma escàs, pocs mitocondris i un aparell de Golgi petit. Aquestes cèl·lules glials poden regular determinats aspectes de les sinapsis però no està clar el paper d'aquestes en la formació de les unions. Les cèl·lules de Schwann poden envoltar l'axó formant una capa lipídica, una beina de mielina, que és una capa aïllant encara que no continua al llarg de tot el recorregut axonal. Els llocs lliures de mielina són els nòduls de Ranvier i garanteixen que la conducció del senyal elèctric sigui saltatòria.

Les cèl·lules de Schwann que formen part de la sinapsi neuromuscular són les cèl·lules de Schwann terminals o perisinàptiques (TSC, de l'anglès *Terminal Schwann Cells*) que estan estretament associades amb els elements pre- i postsinàptic de la unió neuromuscular (Auld i col., 2003). Envoltan el terminal nerviós aïllant la unió neuromuscular de l'ambient extern i proporcionant-li un medi adequat i substàncies tròfiques. Són cèl·lules que no formen mielina, contràriament al que fan les cèl·lules de Schwann no terminals, i tenen també diferent expressió gènica (Georgiou i Charlton, 1999). Són cèl·lules que desenvolupen un paper important en la reparació de sinapsis després d'una lesió ja que són elles les que guien a l'axó en regeneració (Son i Thompson, 1995). També tenen una funció important en el manteniment normal de les sinapsis, en la plasticitat sinàptica i durant el desenvolupament. Les TSC poden tenir un paper clau en la comunicació entre la part pre- i postsinàptica de la sinapsi (Castonguay i col., 2001; Auld i Robitaille, 2003). Tenen receptors muscarínics d'acetilcolina (mAChRs) que uneixen l'ACh alliberada pel terminal axònic (Robitaille i col., 1997; Georgiou i col., 1999), receptors purinèrgics (Robitaille, 1995), receptors de Substància P en amfibis (Bourque i Robitaille, 1998) i canals de calci dependents de voltatge tipus L (Robitaille i col., 1996). L'activació dels mAChRs induïx l'aparició de segons missatgers que actuen sobre els magatzems de calci intracel·lular fent augmentar el calci a l'interior de les TSCs (Jahromi i col., 1992). Aquest calci alliberat regula l'expressió de determinats gens importants en la formació de les prolongacions que fan les TSCs (Georgiou i col., 1994). Cal dir també que aquestes cèl·lules poden modificar l'arquitectura de les unions neuromusculars (Trachtenberg i Thompson, 1997) i que l'estreta associació de les TSC amb altres elements de la unió neuromuscular facilita la capacitat d'aquestes cèl·lules de detectar canvis en l'ambient de la unió (Auld i Robitaille, 2003).

Introducció

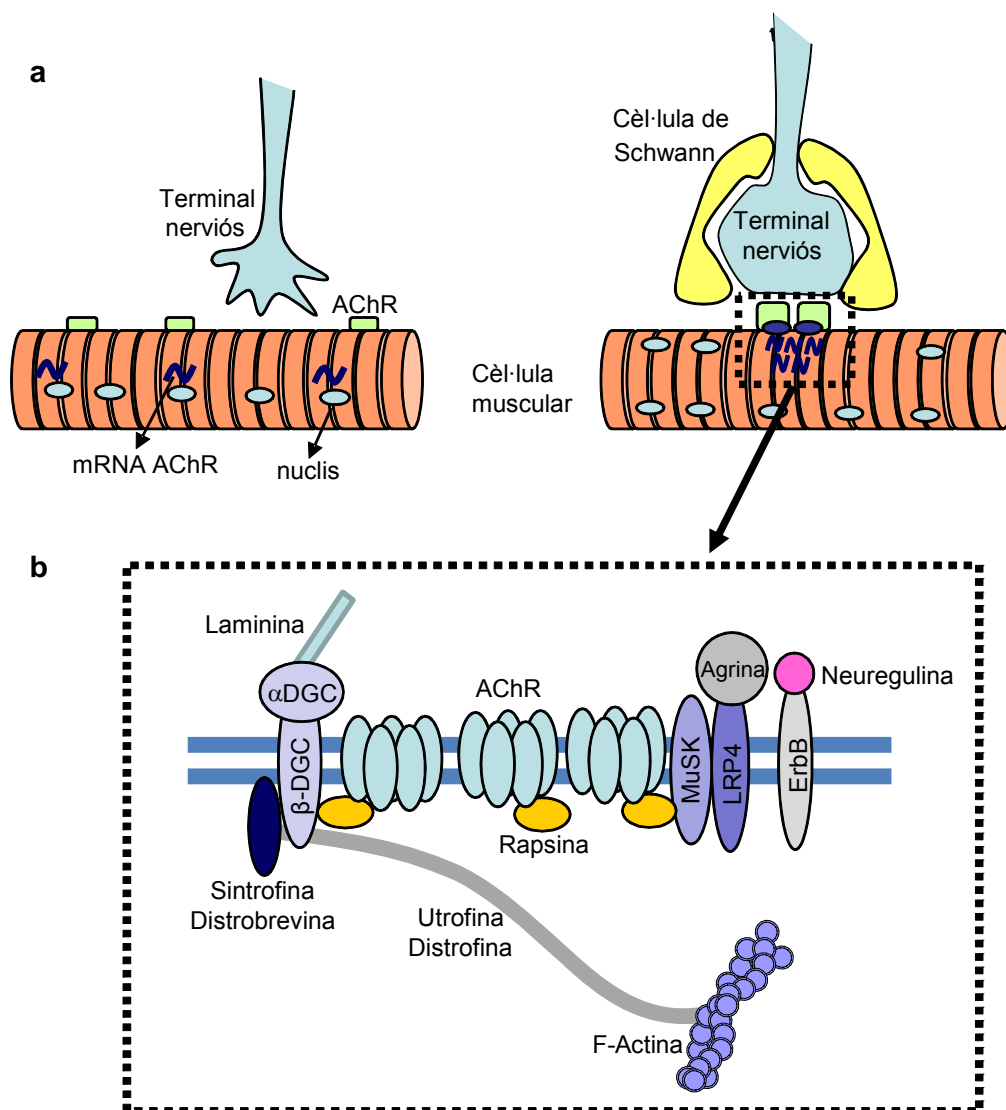


Figura 2. Esquema de la formació de la NMJ i composició de la membrana postsinàptica. (a) Esquema representatiu de la formació de la unió neuromuscular i l'especialització dels tres elements cel·lulars que la componen destacant l'agrupació inicial dels nAChR en la membrana postsinàptica i dels nuclis sinàptics. (b) Esquema de la membrana sinàptica amb les proteïnes implicades en la diferenciació postsinàptica.

2.1.4 Làmina basal

La làmina basal envolta cada fibra muscular passant, en el lloc de la sinapsi, a través de l'esclatxa o fenedura sinàptica i s'introdueix també a l'interior dels plects sinàptics. Els components majoritaris de la làmina basal sinàptica són molt semblants als de qualsevol altra làmina basal extrasinàptica (col·lagen IV, laminina, entactina i proteoglicans), però les dues làmines basals difereixen en la composició de les isoformes d'aquests components.

La diferència més rellevant és l'especificitat d'alguns elements com són l'acetilcolinesterasa (Hall, 1973), una sèrie de gliconjugats (Scott i col., 1988), el factor de creixement dels fibroblastes 2 (FGF2) (Dai i Peng, 1995) i dues molècules de senyalització, agrina (McMahan, 1990) i neuregulina (Jo i col., 1995). Aquestes molècules específiques de la làmina basal sinàptica participen tant durant el desenvolupament com en el manteniment de l'estructura sinàptica, així com també en la correcta neurotransmissió.

Les laminines són proteïnes grans amb multisubunitats de les quals almenys se n'han descrit 12, moltes de les quals en múscul (Suzuki i col., 2005). Les subunitats $\alpha 4$, $\alpha 5$ i $\beta 2$ de les laminines són sintetitzades per fibres musculars i concentrades en la làmina basal de l'esclètxa sinàptica (Sanes i col., 1990; Patton i col., 1997). Les laminines sinàptiques actuen conjuntament en les tres cèl·lules de la NMJ per organitzar i coordinar la maduració sinàptica i són promotors autocrins de la maduració postsinàptica (Nishimune i col., 2008). La laminina $\alpha 4$ ajuda específicament a que tingui lloc el precís encarament de les especialitzacions pre-postsinàptiques (Patton i col., 2001). Les laminines $\beta 2$ serveixen com a organitzadors de la maduració presinàptica, en part per la unió amb els canals de calci dependents de voltatge (de l'anglès *Voltage Dependent Calcium Channel*, VDCC) en la membrana presinàptica (Noakes i col., 1995; Son i col., 1999; Knight i col., 2003; Nishimune i col., 2004), i també afecten l'emplaçament de les cèl·lules de Schwann terminals (Patton i col., 1998).

3. Conducció nerviosa i neurotransmissió a la unió neuromuscular

Les cèl·lules nervioses generen senyals elèctrics que són la base per a que tingui lloc la transmissió d'informació en el sistema nerviós. Un primer tipus de senyal elèctric, el potencial d'acció, permet que la informació viatgi al llarg de la longitud de la cèl·lula nerviosa, mentre que un segon tipus de senyal es genera en les connexions sinàptiques entre cèl·lules nervioses o entre una neurona i una fibra muscular, en el cas de la sinapsi neuromuscular. Aquest últim tipus de senyal permet la transmissió d'informació entre la multitud de neurones en el sistema nerviós. Aquests dos tipus de mecanismes de senyalització -potencials d'acció i senyals sinàptiques- són la base de totes les capacitats de processament d'informació en el sistema nerviós.

Un potencial d'acció, originat en el soma de la motoneurona situat en la medulla espinal, es propaga cap a la regió terminal d'aquesta on posa en moviment una cadena

Introducció

d'esdeveniments que donen com a resultat un augment en l'alliberament del neurotransmissor, l'ACh. L'ACh alliberada normalment és suficient per generar un potencial de placa postsinàptic evocat o *endplate potencial* (EPP) i, en conseqüència, un potencial d'acció en la fibra muscular, i així la contracció muscular.

En un axó en repòs, hi ha una concentració intracel·lular predominant de potassi (K^+) i una d'extracel·lular de sodi (Na^+) i de clor (Cl^-) que dóna un potencial elèctric de repòs d'aproximadament uns -80 mV en els miòcits adults normals de mamífer. El K^+ té tendència a sortir, deixant l'interior cel·lular negatiu prop del potencial d'equilibri d'aquest ió. L'ió Na^+ va entrant a la cèl·lula mentre surt el K^+ , per compensar càrregues. La presència d'una bomba de Na^+/K^+ situada a la membrana, que fa sortir Na^+ i entrar K^+ fa retornar cada ió al seu lloc. Així, a l'interior de l'axó hi ha predomini de càrregues negatives i en la seva superfície externa de positives, les quals es troben separades per una membrana permeable a aquests ions.

L'impuls nerviós que es genera a l'inici de l'axó va avançant en direcció centrífuga (cap a la part final d'aquest) invertint el potencial d'acció ja que produeix canvis en la permeabilitat de la membrana, primer a favor de l'ió Na^+ que entra fins crear un predomini de càrregues positives intracel·lulars (fenomen anomenat despolarització) i després a favor del K^+ que surt fins a deixar de nou un interior negatiu (fenomen anomenat repolarització). La superfície de l'axó torna a estar en repòs però els ions no estan al seu lloc. En aquest moment, si arribés un nou impuls, aquesta àrea no estaria preparada per a conduir-lo. Aquesta situació es manté fins que les bombes de Na^+/K^+ retornen els ions al seu lloc originari, és l'anomenat període refractari. Aquest impuls despolaritzant recorre successivament una àrea rere l'altra de la membrana de l'axó fins arribar a la terminació axonal. En global es produeix un important trasbals d'ions. Es calcula que per un axó d' $1 \mu m$ d'amplada, la relació del nombre d'ions K^+ intercanviats pels de Na^+ és $1/3.000$ (Kuffer i Nicholls, 1982). Per tornar tots els ions al seu lloc hi ha un important consum d'energia per part de les bombes de Na^+/K^+ . Un nervi de conducció ràpida (100 m/s) no podria mantenir gaires impulsos seguits ja que s'esgotaria ràpidament. Per evitar-ho, hi ha les beines de mielina (beines de gran resistència elèctrica i aïllants, les quals acceleren molt la conducció del potencial d'acció podent conduir a una velocitat de 150 m/s) amb els seus nòduls de Ranvier que permeten que l'intercanvi iònic sigui reduït a aquestes petites àrees de manera que la conducció de l'impuls és saltatòria, de nòdul a nòdul (Huxley i Stampfli, 1949; Tasaki, 1959), fent-la més ràpida i "econòmica" ja que es limita molt la zona d'on s'hauran de treure ions de Na^+ a l'exterior.

L'ACh té la funció d'actuar com a intermediari químic en la transferència de l'impuls nerviós des del nervi al múscul. És un intermediari que permet amplificar el petit impuls que arriba al terminal nerviós convertint-lo en suficientment gran per ser capaç de disparar un potencial d'acció a la fibra muscular. L'ACh es sintetitza en el terminal nerviós mitjançant l'acetilació de la colina gràcies a l'enzim colinatransferasa que es localitza en el terminal axònic (Jablecki i Brimijoin, 1974). L'ACh s'allibera des de les vesícules sinàptiques, on es troba emmagatzemada, per l'arribada del potencial d'acció en les branques distals del nervi motor i per a la transmissió d'aquest a la fibra muscular. Quan l'impuls arriba al terminal, despolaritza la membrana d'aquest obrint els canals de Na^+ . La despolarització activa els VDCC que fan que hi hagi una significativa entrada de Ca^{2+} . Aquest catió Ca^{2+} gairebé no intervé en el canvi de polaritat elèctrica que es crea, però és el responsable de l'alliberament del neurotransmissor. Així, l'entrada de Ca^{2+} al terminal és essencial per l'alliberació de l'ACh (Katz i Miledi, 1965; Miledi, 1973). Si experimentalment s'elimina el Ca^{2+} de la solució o s'augmenta la concentració de Mg^{2+} (catió que competeix amb el calci per entrar en la terminació nerviosa), la neurotransmissió sinàptica es veu afectada sent quasi inexistent. Quan entra Ca^{2+} al terminal, les vesícules sinàptiques fusionen les seves membranes amb la membrana axoplàsmica, a nivell de les zones actives, deixant l'ACh lliure en l'escletxa sinàptica. Aquest procés es va confirmar a l'observar que, després d'una estimulació nerviosa el nombre de vesícules a la terminació queda reduït (Heuser i Reese, 1973; Birks, 1974) i, a més, amb tècniques de criofractura, es van visualitzar les vesícules al moment de la suposada alliberació (Heuser i col., 1974). Una vegada les vesícules han descarregat el seu contingut a la fenedura sinàptica, la membrana de les vesícules es fusiona amb l'axolemma i aquest excés de membrana s'elimina del terminal nerviós per formar noves vesícules sinàptiques. Heuser i Reese (1973) han mostrat que el reciclatge té lloc en la perifèria de la sinapsi on la membrana presinàptica és reformada amb la coberta de les vesícules mitjançant la seva endocitosi.

Després de l'alliberament, el neurotransmissor difon per tota l'escletxa sinàptica i s'uneix als seus receptors postsinàptics, els nAChRs. La unió de dues molècules d'ACh a les dues subunitats α del receptor fa que aquest s'activi i obri el canal iònic intramolecular. El flux de corrent induït pel neurotransmissor que n'ha resultat i l'obertura del canal permet el pas simultani d'ions Na^+ al seu interior i la sortida d'ions K^+ alterant així el potencial de membrana postsinàptic que resulta amb una despolarització local de la membrana de les fibres musculars (l'anomenat EPP, potencial de placa evocat). Aquesta despolarització local activa els canals de Na^+ dependents de voltatge

Introducció

postsinàptics, localitzats en el fons dels plecs secundaris (Flucher i Daniels, 1989), desencadenant un potencial d'acció que es propaga en totes les direccions de la fibra muscular i que va als sistemes de túbuls T musculars on s'inicia una seqüència d'esdeveniments intracel·lulars que finalitza amb la contracció de la fibra muscular.

Després de l'activació dels seus receptors, l'ACh se separa d'aquests i difon cap a la membrana basal on és hidrolitzada per part de l'enzim acetilcolinesterasa (AChE). L'AChE és una de les proteïnes de la làmina basal situada en la esclotxa sinàptica entre els llocs d'alliberació de l'ACh en l'axolema i els nAChR en la fibra muscular. La hidròlisi de l'ACh consisteix en desdoblar-se en colina i àcid acètic. Cap d'aquestes dues molècules pot activar el receptor i, per tant, amb aquesta hidròlisi es finalitza el procés de transmissió sinàptica en les unions neuromusculars.

La despolarització local provocada per l'activació dels receptors d'ACh per la unió dels transmissors s'anomena potencial de placa postsinàptic evocat (EPP), amb una amplitud mitja de 15-40 mV (Fatt i Katz, 1951). Aquesta amplitud depèn de varis factors com són el tipus muscular, l'espècie i l'edat. A més dels episodis d'alliberament d'ACh evocats, hi ha un alliberament espontani d'ACh en els terminals nerviosos (no necessita de l'estimulació del nervi) que dóna com a resultat un potencial de placa en miniatura o *miniature endplate-potencial* (MEPP). Aquestes petites despolaritzacions postsinàptiques d'aproximadament 0.5-1 mV i freqüència 1 Hz (1 episodi per segon) van ser descrites per primera vegada per Fatt i Katz (1952) quan estaven fent registres electrofisiològics en músculs de granota. Tant la freqüència com l'amplitud d'aquests successos depenen de diferents factors i varien entre espècies i tipus musculars, així com amb l'edat. Un MEPP individual és massa petit per disparar un potencial d'acció i el seu paper fisiològic encara està per descobrir.

En estudis electrofisiològics es va veure que l'alliberament d'una vesícula sinàptica provocava l'aparició d'un MEPP i que, comparant la mida de les amplades, els EPPs que seguien un impuls nerviós estaven formats per la suma independent de múltiples MEPPs (Fatt i Katz, 1952). Per tant, es va dir que l'alliberament del neurotransmissor es produïa en paquets separats o quantes i cadascun produïa un MEPP. Una quanta és la suma d'ACh alliberada per una vesícula i un potencial d'acció presinàptic produeix un EPP postsinàptic perquè sincronitza l'alliberament de molts quantes de transmissor (teoria quantal de la neurotransmissió; Del Castillo i Katz, 1954). En estudis posteriors es va determinar que el número de molècules que componen una quanta és d'aproximadament unes 10.000 molècules d'ACh per vesícula (Kuffler i

Yoshikami, 1975; Miledi i col., 1983). La unió neuromuscular és un mecanisme altament eficaç ja que, sota condicions normals, cada impuls nerviós dóna una contracció muscular.

Una altra dada important és el número de quantes alliberades per impuls, l'anomenat contingut quàntic. Els MEPPs són el resultat de l'alliberament d'una única vesícula d'ACh o quanta i els EPPs de 20-300 vesícules alliberades depenent de l'espècie estudiada [en diferents animals de laboratori 200-300 quantes (Hubbard i Wilson, 1973; Katz i Miledi, 1979) i en músculs humans de 28-41 quantes (Engel i col., 1990; Slater i col., 1992)].

4. Eliminació sinàptica en el desenvolupament postnatal

L'establiment de les sinapsis esdevé fonamental per la funció del sistema nerviós i és el que determina la connectivitat en un circuit neural (Sanes i Lichtman, 1999). És molt important, per tant, conèixer els mecanismes cel·lulars i moleculars que regulen la formació de les sinapsis i els mecanismes fisiològics que determinen la seva estabilització o inestabilització i posterior eliminació. Aquests mecanismes tenen també una gran importància des del punt de vista neurofisiològic i també com a possibles dianes d'agents terapèutics. La mort neuronal implica una disminució sobtada de connectivitat i és un fenomen que caracteritza moltes malalties neurals de diferent etiopatogènia com és el cas d'algun tipus de demències com la malaltia d'Alzheimer (Coleman i col., 2004; Nelson 2005). S'ha vist que hi ha també un procés de pèrdua de connexions nervioses durant l'envelliment del sistema nerviós (Masliah i col., 2006). Aquestes, però, no són les dues úniques situacions en què té lloc aquest fenomen de pèrdua de connectivitat. Un procés similar, però totalment fisiològic, té lloc durant el desenvolupament postnatal del sistema nerviós. Durant el desenvolupament, es formen sinapsis de forma excessiva i redundants que posteriorment són eliminades. Aquest procés de formació i posterior eliminació constitueix una forma de plasticitat sinàptica, d'adaptació plàstica, que pot ser interpretada com un mecanisme que elimina molts circuits d'unes connexions inicials difoses i redundants. Per entendre aquest procés és necessari conèixer quines són les característiques dels axons que els permeten competir entre ells i quines són les interaccions que causen la pèrdua d'unes connexions i el manteniment d'unes altres. Aquests punts s'intentaran explicar en aquest apartat introductori.

Introducció

Durant el desenvolupament postnatal dels vertebrats (a excepció dels peixos) es pot observar com les fibres musculars esquelètiques individuals estan innervades en una mateixa placa motora per diferents axons (Redfern, 1970; Brown i col., 1976; Ribchester i Barry, 1994). Aquesta situació s'anomena innervació polineuronal focal. Durant els primers dies de vida postnatal aquesta poliinnervació comença a decréixer fins arribar, a les poques setmanes de vida, a l'estat de monoinnervació, on les plaques motores estan innervades per un únic axó (Benoit i Changeaux, 1975, O'Brien i col., 1978). Aquesta situació de monoinnervació és la que es troba en l'adult (Redfern, 1970; Brown i col., 1976; Jansen i Fladby, 1990). És important mencionar que el procés d'eliminació de sinapsis es dona sense que hi hagi una reducció en el nombre total de neurones.

El procés d'eliminació sinàptica postnatal és gradual en dos aspectes. En el primer, dins un mateix múscul, l'eliminació sinàptica es dona d'una manera progressiva en el temps (Redfern, 1970). En el segon aspecte, dins una mateixa sinapsi neuromuscular, la transició d'innervació múltiple a monoinnervació té lloc de forma gradual perquè els axons que innerven una placa motora inicialment ocupen espais semblants, però durant el procés, aquells que es van eliminant van deixant lliure l'espai que ocupaven i l'axó que finalment es queda ocupa la totalitat de la placa postsinàptica (Balice-Gordon i Lichtman, 1993).

Molts experiments mostren com canvis en l'activitat neuromuscular fan variar la taxa d'eliminació sinàptica indicant que la reducció de sinapsis està regulada, en temps i magnitud, per l'activitat neural (Benoit i Changeaux, 1975; Thompson i col., 1979; Brown i col., 1982; Duxon, 1982; Thompson, 1983, 1985). Així, l'activitat neuromuscular juga un paper molt important en el procés d'eliminació dels contactes nerviosos redundants, accelerant-lo o reduint-lo segons si s'augmenta l'activitat o pel contrari es bloqueja. Per exemple, quan es redueix l'activitat nerviosa mitjançant toxines com la tetrodotoxina (bloca els canals de Na⁺ axonals; Thompson i col., 1979), la toxina botulínica (impedeix que les vesícules sinàptiques es fusionin amb l'axolema; Brown i col., 1982), l' α -bungarotoxina (α -BTX) (bloca els receptors de l'ACh; Duxon, 1982), o també mitjançant altres procediments quirúrgics com l'axotomia, la tenotomia, i la secció de la medulla espinal (Benoit i Changeaux, 1975; Thompson, 1985) s'alenteix l'eliminació sinàptica. En canvi, si s'augmenta l'activitat neuromuscular mitjançant l'estimulació elèctrica del nervi motor o estimulants directament la fibra muscular s'accelera la pèrdua de contactes sinàptics (Thompson, 1983; Ridge i Betz, 1984). El patró de l'activitat de la motoneurona sembla que també modula l'eliminació sinàptica (Personius i Balice-Gordon, 2002; Personius i col., 2007). Així, l'activitat neural sincrònica induïda experimentalment manté la

poliinnervació (Buffelli i col., 2002; Busetto i col., 2003) però induir experimentalment en diferents terminals nerviosos diferent activitat condueix al manteniment d'aquells més actius (Balice-Gordon i Lichtman, 1994; Buffelli i col., 2003). L'activitat de la motoneurona passa de tenir un patró temporalment correlacionat a tenir-ne un de no correlacionat durant la segona setmana del desenvolupament postnatal normal (Personius i Balice-Gordon, 2001; Buffelli i col., 2002). Per tant, tots aquests resultats suggereixen que la quantitat absoluta d'activitat neural entre les motoneurons que innerven la mateixa fibra muscular és un determinant clau en el resultat del procés d'eliminació sinàptica i que l'activitat sincrònica temporalment de les motoneurons pot mantenir la innervació múltiple, mentre que la pèrdua d'activitat correlacionada dispararia la competició sinàptica. És per tot això, que s'ha proposat que l'eliminació sinàptica sigui un procés dependent d'activitat, causat per la competició dels diferents axons innervants d'una placa motora (Redfern, 1970; Brown i col., 1976; Jansen i Fladby, 1990; Ribchester i Barry, 1994). Per tant, es pot pensar que les sinapsis o terminals més actius es mantindran i influiran en la retirada dels que ho són menys, participant en l'eliminació polineuronal. Hi ha autors, però, que suggereixen que aquesta diferència en l'activitat no és més que un factor subtil d'entre els altres que hi tenen lloc (Buffelli i col., 2003; Kasthuri i Lichtman, 2003). S'ha vist, d'altra banda, que el grau d'activitat inicial no és un factor determinant, ja que un axó de sobte pot adquirir més potència sinàptica i guanyar la competició sobre d'aquell axó que en principi era més actiu que ell (Walsh i Lichtman, 2003). Així, durant el procés d'eliminació sinàptica, hi ha diferències en la força sinàptica dels diferents terminals nerviosos que porta a la definició, en el procés de competició, d'un axó fort o gran i d'un o varis axons febles o petits (Colman i col., 1997; Santafé i col., 2001).

Durant aquest procés d'eliminació axonal hi ha un moment en què coexisteixen dos axons en la mateixa placa motora, és el que s'anomena sinapsis doblement innervades o sinapsis dobles. Aquesta situació relativament simple és un bon model per l'estudi experimental d'aquest procés. En aquestes sinapsis doblement innervades existeix un axó amb un contingut quàntic ("quantès" d'ACh alliberades) més alt, i s'anomena "EPP gran", mentre que l'altre té un contingut quàntic més baix (Colman i col., 1997; Culican i col., 1998) i és el que s'anomena "EPP petit". S'ha observat que el contingut quàntic de "l'EPP gran" en sinapsis dobles és igual al contingut quàntic que té l'EPP en unions monoinnervades, suggerint que "l'EPP gran" és l'axó que sobreviurà. Així, l'axó que sobreviu es caracteritza per tenir un increment del contingut quàntic en la secreció del neurotransmissor, mentre que en els axons que seran eliminats disminueix progressivament la seva eficàcia a l'estar associats a un menor contingut quàntic

Introducció

(Colman i col., 1997; Santafé i col., 2001). La probabilitat d'alliberament del neurotransmissor és diferent en els axons que estan competint i contribueix a augmentar la diferència en el contingut quàntic que s'observa durant la competició (Kopp i col., 2000). Aquest canvi presinàptic que precedeix la retirada dels axons competidors pot ser explicat per la modulació de la neurotransmissió ocasionada pels receptors muscarínics presinàptics. S'ha demostrat que els autoreceptors muscarínics presinàptics (mAChRs) estan implicats en la modulació de l'alliberament de neurotransmissor i, per tant, en l'eficàcia sinàptica en sinapsis colinèrgiques adultes (Caulfield, 1993; Santafé i col., 2003) i s'han descrit els mecanismes muscarínics acoblats a l'augment i reducció en l'alliberament (Ganguly i Das, 1979; Abbs i Joseph, 1981; Wessler i col., 1987; Arenson, 1989). Tant en la unió neuromuscular de granota (Slutsky i col., 1999) com de ratolí i rata (Minic i col., 2002; Santafé i col., 2003) s'ha demostrat que els subtipus M1 i M2 estan implicats en la modulació de l'alliberament d'ACh. M1 augmenta l'alliberament mentre que el M2 el disminueix (Santafé i col., 2003). En els terminals nerviosos motors de nadó, hi ha un mecanisme muscarínic dual M1-M2 que funciona a favor de l'alliberament d'ACh i aquesta potenciació de l'alliberament pot ser un factor significatiu en la competició axonal de nounats. Es coneix que els dos axons que innerven les plaques dualment innervades contenen diferents subtipus de mAChR el que fa pensar que hi ha una participació diferent en la neurotransmissió d'aquests receptors muscarínics en els dos axons que arriben a la mateixa placa motora (Santafé i col., 2004; Garcia i col., 2005). A més, ja en les dues setmanes de vida es produeix un canvi en el que els autoreceptors M2 passen a tenir una activitat inhibidora de l'alliberament tal com es troba en l'adult (Santafé i col., 2003, 2004).

S'ha observat que diferents branques axonals que provenen del mateix soma neuronal es troben en diferents estadis d'eliminació quan innerven fibres musculars veïnes (Keller-Peck i col., 2001). Això indica que el fet de guanyar o perdre dels terminals en cada unió neuromuscular no ho determina únicament el soma neuronal, sinó que hi participa el lloc de contacte en la fibra muscular, podent ser aquesta una cèl·lula intermediària en el procés. Així, en el mecanisme d'eliminació sinàptica, a part de la participació presinàptica, també hi participa el component postsinàptic de la unió neuromuscular. Per tant, un dels aspectes claus en l'estudi del procés de l'eliminació sinàptica és identificar els punts d'unió entre l'acció de la motoneurona (els mecanismes pròpiament presinàptics de desconexió axonal, retracció i eliminació) i la modificació de l'expressió i de l'activitat de molècules postsinàptiques (receptors, elements del citoesquelet, proteïnes quinases) que té lloc durant el procés d'eliminació. En aquest

sentit, recentment s'ha descrit que factors sense identificar derivats de la cèl·lula postsinàptica participen en el manteniment de la sinapsi adulta i també regulen l'eliminació de connexions durant el desenvolupament (McCann i col., 2007). D'altra banda, factors neurotròfics, com el GDNF (de l'anglès, *Glial Cell line-Derived Neurotrophic Factor*) també juguen un paper en l'eliminació sinàptica causant un increment en el número d'axons motors que innerven les fibres musculars (Nguyen i col., 1998). Durant el desenvolupament postnatal, GDNF promou la ramificació axonal i la formació de sinapsis en les unions neuromusculars (Keller-Peck i col., 2001).

La pèrdua d'axons innervants durant el procés d'eliminació sinàptica a la NMJ està acompanyada per la mobilització, desacoblament i desaparició de les especialitzacions postsinàptiques i, en particular, dels agregats de nAChR que hi estaven situats immediatament oposats (Rich i Lichtman, 1989; Balice-Gordon i Lichtman, 1993; Culican i col., 1998). Un examen detallat del curs temporal de la pèrdua dels axons innervants i la desaparició dels nAChR revela que hi ha un grau d'independència entre aquests dos processos. Així, té lloc una considerable disminució de la innervació polineuronal en un període de temps en el que hi ha poca pèrdua de nAChR postsinàptics (Lanuza i col., 2002). Per altra banda, també s'ha demostrat que hi pot haver localment pèrdua de receptors abans que es produeixi la completa retracció del terminal presinàptic corresponent (Balice-Gordon i Lichtman, 1993, 1994). El mecanisme pel qual desapareixen els nAChR del component postsinàptic sota del terminal que és eliminat no es coneix. Tanmateix, sigui quin sigui el mecanisme, ha d'existir un canvi local en els mecanismes reguladors normals de la cèl·lula per aconseguir una disminució de la densitat de molècules de nAChR en una regió de l'aparell postsinàptic mentre que es manté o s'incrementa la quantitat normal de molècules en la resta de la sinapsi. En relació amb aquest fet, sembla que han d'existir dos camins oposats que regulin la dispersió i el manteniment dels agregats de nAChR i, en definitiva, la formació i maduració de la NMJ. S'ha descrit que la mateixa activació del nAChR per l'ACh dispara un senyal que dispersa els nAChR, contrarestant l'efecte aglutinador de l'agrina, a través de la serina/treonina quinasa Cdk5 (Lin i col., 2005). Estudis recents del nostre laboratori han demostrat que un increment de l'activitat d'una altra serina/treonina quinasa, la proteïna quinasa C (PKC), dispersa els receptors en la membrana del miòcit (Lanuza i col., 2000, 2002) i augmenta la fosforilació de la subunitat delta del nAChR (Lanuza i col., 2006). Contràriament a l'acció de la PKC, la proteïna quinasa A (PKA) incrementa l'estabilitat dels receptors d'ACh en la membrana postsinàptica mitjançant un mecanisme dependent de l'activitat sinàptica (Li i col., 2001) i augmenta la fosforilació de

Introducció

la subunitat epsilon del nAChR (Lanuza i col., 2006). Aquests resultats suggereixen que un balanç entre la fosforilació del nAChR per la PKC i per la PKA podria determinar l'estabilitat o inestabilitat de la molècula de nAChR a l'agregat. D'altra banda, es coneix que l'activació intracel·lular de PKC en miotubs cultivats es pot produir en resposta a l'ACh (Eusebi i col., 1987; Ross i col., 1988; Kim i col., 2002). Per altra banda, s'ha vist que proteases endògenes dependents de calci poden estar implicades en diferents aspectes de la plasticitat sinàptica, i en particular en l'estabilitat dels agrupaments dels nAChR a la membrana postsinàptica durant el procés d'eliminació sinàptica (O'Brien i col., 1984; Van Essen i col., 1990; Chang i Balice-Gordon, 1997; Liu i col., 1994; Jia i col., 1999; Davenport i col., 2000). A la unió neuromuscular, la serina proteasa trombina és una mediadora de la reducció de sinapsis dependent d'activitat, *in vitro* i *in vivo* (Zoubine i col., 1996; Lanuza i col., 2001, 2003). La trombina modula mecanismes cel·lulars mitjançant el seu receptor situat a la membrana i acoblat a proteïna G, PAR-1 (Ishii i col., 1994; Grand i col., 1996). Aquest s'ha localitzat a la unió neuromuscular (Festoff i col., 1991; Akaaboune i col., 1998; Lanuza i col., 2003), a la cèl·lula muscular, als plecs postsinàptics i a la membrana de la cèl·lula de Schwann terminal (Lanuza i col., 2007). El procés d'eliminació sinàptica *in vivo* s'accelera en el temps si es fa un tractament amb la proteasa trombina i es bloqueja a l'administrar hirudina, un inhibidor d'aquesta (Lanuza i col., 2001). A més, aquest procés està acompanyat de canvis en l'estabilitat dels agregats de nAChR (Davenport i col., 2000; Lanuza i col., 2003) i està mediat per l'activació dels receptors de la trombina (Jia i col., 1999; Lanuza i col., 2003). Un dels elements cel·lulars que estan influenciats per la trombina és la PKC acoblada a proteïna G. Així, a la NMJ, l'activació del receptor de la trombina modula la funció i consolidació dels nAChR a través d'una PKC activada per proteïna G (Lanuza i col., 2001, 2002, 2003). Les proteïnes serina quinases, tant la PKA com la PKC, juguen un paper dependent d'activitat en la modificació de les sinapsis, de manera que l'activació de la PKC provoca una disminució de la força sinàptica, mentre que l'acció de la PKA s'oposa o reverteix l'efecte de la PKC. El paper que desenvolupen aquestes quinases a la NMJ s'explica en el següent apartat d'aquest capítol introductori.

5. Proteïnes quinases

Una proteïna quinasa és un enzim que modifica químicament altres proteïnes afegint-hi un grup fosfat, fosforilant-les. La fosforilació de proteïnes és la modificació covalent i reversible més important utilitzada per les cèl·lules per a la regulació de processos bioquímics i fisiològics com a resposta a senyals extracel·lulars (Hemmings i col., 1989). Més del 30% de totes les proteïnes poden ser modificades per l'activitat de proteïnes quinases. El genoma humà conté prop de 500 gens de proteïnes quinases que constitueixen el 2% de tots els gens eucariotes.

La fosforilació catalitzada per la família de proteïnes quinases transfereix el grup fosfat terminal (el fosfat gamma) de l'ATP (adenosina trifosfat) al grup hidroxil de diferents residus que poden ser serina (Ser), treonina (Thr) o tirosina (Tyr) que estan situats a llocs específics de la proteïna diana. Aquesta reacció de fosforilació afegeix càrregues negatives a la proteïna, alterant així la seva conformació i provocant-li un canvi funcional a causa d'un canvi en l'activitat de l'enzim, i/o en la localització cel·lular o per l'associació amb altres proteïnes (Edelman i col., 1987).

L'estat de fosforilació d'una proteïna depèn tant de l'acció de les proteïnes quinases com de les proteïnes fosfatases. Aquestes últimes defosforilen la proteïna hidrolitzant el pont fosfoèster. La regulació d'aquestes dues famílies d'enzims, quinases i fosfatases, i amb això l'estat de fosforilació de la varietat de substrats, és un mecanisme extensament utilitzat per tot tipus de cèl·lules, nervioses o no, per millorar la senyalització cel·lular (Hunter, 1995). L'activitat alterada d'una proteïna quinasa és una causa freqüent de malaltia, particularment de càncer, ja que les proteïnes quinases regulen molts aspectes del control de creixement, moviment i mort de la cèl·lula. Actualment s'estan desenvolupant drogues específiques contra proteïnes quinases per al tractament de moltes malalties i algunes són ja d'ús clínic. En el sistema nerviós, tal com en altres cèl·lules, les proteïnes quinases també regulen la diferenciació morfològica, la supervivència, la reparació i la plasticitat sinàptica (Fukunaga i Miyamoto, 1998; Sardari i col., 2003).

Les proteïnes quinases es poden dividir en dues famílies diferents: Serina-treonina quinases (Ser/Thr quinases) i tirosina quinases (Tyr quinases). La primera fosforila el substrat en un residu serina o treonina i la segona família ho fa en un residu tirosina. Ambdues famílies tenen el seu origen en el mateix gen. A continuació, es fa una descripció de la família de les proteïnes Ser/Thr quinases en relació a l'important paper que desenvolupen en la funció neural.

Introducció

5.1 Ser/Thr quinases

Les proteïnes Ser/Thr quinases tenen en comú el seu domini catalític (Johnson i col., 1996). El domini catalític de la proteïna quinasa A (PKA), proteïna quinasa dependent d'adenosina monofosfat cíclica (cAMP), fou la primera estructura tridimensional caracteritzada i la que ha servit de model per a la descripció de les altres proteïnes quinases (Knighton i col., 1991). Les proteïnes quinases es divideixen segons la seva especificitat pel substrat i pel lloc de fosforilació (aminoàcid concret dins una regió concreta). Malgrat que la majoria de les Ser/Thr quinases són proteïnes específiques pel seu substrat i també específiques del lloc a fosforilar dins d'aquest substrat, també n'existeixen que són multifuncionals.

La varietat de proteïnes Ser/Thr quinases que hi ha al sistema nerviós es poden classificar en: les proteïnes quinases dependents de segons missatgers i les proteïnes quinases que són independents d'aquests. A la taula 1 es citen alguns exemples dels dos grups de proteïnes Ser/Thr quinases que han estat descrits en el sistema nerviós. En aquesta introducció s'expliquen les proteïnes quinases dependents de segon missatger detallant-ne dues d'elles: PKA i PKC.

Taula 1. Classificació de les proteïnes Ser/Thr quinases

Proteïnes quinases
dependents de segon missatger
cAMP-dependent protein kinase (PKA)
cGMP-dependent protein kinase (PKG)
Ca ²⁺ /CaM-dependent protein kinases
Protein kinase C (PKC)

Taula 1 (continuació)

Proteïnes quinases

independents de segon missatger

MAP kinase cascade and target kinases (Raf, MEK kinases, MEKs, SEKs, ERKs, JNKs, SAPKs, RSKs)

Cyclin dependent kinases (CDKs) and CDK regulating kinases (Cdc-2, CAK, CAK kinase)

G protein-coupled receptor kinases (GRK2 (β ARK2), GRK5, and GRK6)

P21 activated kinases PAK

Kinases involved in cytoskeletal organization and development (ROCK1/Rho kinase)

Transmembrane receptor protein serine/threonine kinases (TGF β receptor protein kinases)

Casein kinases (CK1, CK2)

5.2 Proteïnes Ser/Thr quinases dependents de segon missatger

Els neurotransmissors, les citoquines, les hormones i la llum, entre altres senyals extracel·lulars, indueixen en la cèl·lula diana la formació d'un segon missatger que transmetrà el senyal extern a l'interior cel·lular. Els segons missatgers més importants són cAMP, calci, diacilglicerol (DAG) i guanosina monofosfat cíclica (cGMP). Aquests missatgers activen proteïnes quinases específiques que fosforilen proteïnes integrant i propagant subseqüentment el senyal extern.

Totes les proteïnes quinases dependents de segon missatger tenen una estructura comú (figura 3). Consten de diferents dominis funcionals que poden estar a la mateixa cadena polipeptídica o en diferents cadenes. Cada proteïna quinasa té un domini catalític, intrínscament actiu, però que es manté en un estat inactiu a causa del domini regulador. Aquest domini regulador conté una regió autoinhibidora i els llocs d'unió als segons missatgers. En cada cas, la interacció de la proteïna quinasa amb el segon missatger dissocia el lloc autoinhibidor del domini catalític desinhibint-lo. Altres regions presents en les proteïnes quinases són les responsables de la unió amb altres quinases o de la unió amb les proteïnes diana.

De totes les proteïnes Ser/Thr quinases dependents de segon missatger que hi ha, en aquest capítol introductori només es descriurà la proteïna quinasa A (PKA) i s'explicarà amb més detall la proteïna quinasa C (PKC).

Introducció

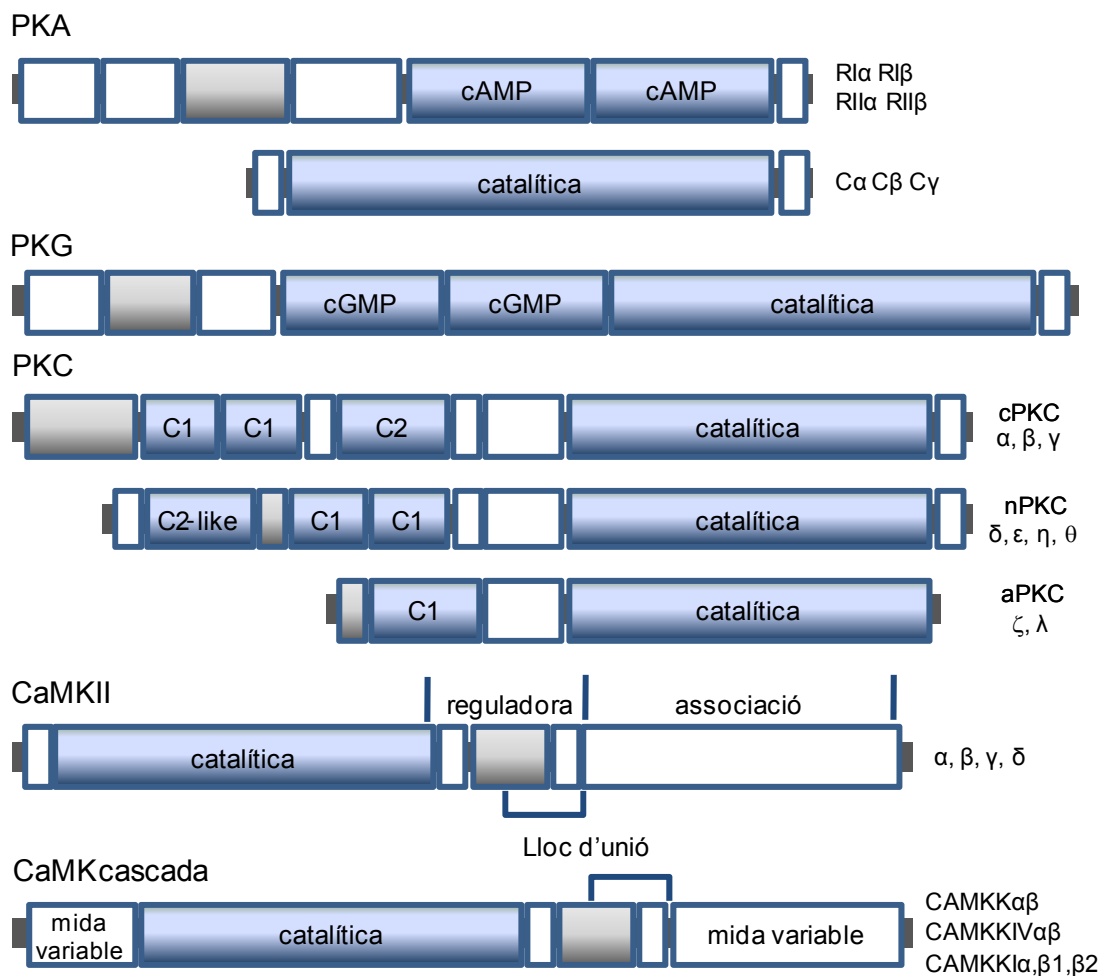


Figura 3. Estructura de les proteïnes quinases dependents de segon missatger

5.2.1 Proteïna quinasa dependent de cAMP (PKA)

Les molècules de senyalització que estimulen la síntesi de cAMP fan la seva primera acció intracel·lular activant la PKA (Edelman i col., 1987). PKA és un holoenzim, un tetràmer compost de dues subunitats catalítiques (C) i dues subunitats reguladores (R). Aquest tetràmer és inactiu. Cada subunitat R es pot unir a dues molècules de cAMP i quan això succeeix l'afinitat de R sobre C disminueix i les subunitats catalítiques es dissocien de les reguladores esdevenint així un enzim actiu. En els mamífers hi ha tres subunitats de la subunitat C, d'uns 40 kDa aproximadament, i quatre subunitats de la subunitat R, de 50-55 kDa. Les subunitats C s'anomenen C α , C β i C γ i tenen una semblant i elevada especificitat pels substrats. Les quatre subunitats R consisteixen en dues formes, α i β , i cada una d'aquestes dues formes poden ser de tipus I i II.

L'estructura comú de la subunitat R conté un domini N-terminal de dimerització que permet la dimerització entre les dues subunitats R, un lloc d'autoinhibició i dos llocs d'unió a cAMP. Els holoenzims sempre contenen dues subunitats R idèntiques que s'uneixen per ponts disulfur. Les isoformes α i β de la subunitat C s'expressen al sistema nerviós central (Cadd i McKnight, 1989). Les subunitats R difereixen en la seva regulació i propietats bioquímiques. La composició i propietats bioquímiques de les subunitats de PKA es deuen, en part, a les diferents respostes a senyals extracel·lulars concretes que activen l'adenilat ciclasa.

L'activitat de PKA s'ha descrit en moltes cèl·lules nervioses i està molt compartimentada en la cèl·lula majoritàriament degut a l'acció de les proteïnes d'ancoratge anomenades AKAPs (de l'anglès *A-Kinase Anchoring Protein*) (Rubin, 1994; Colledge i Scott, 1999; Feliciello i col., 2001). Les proteïnes AKAPs s'uneixen a la PKA a través d'una hèlix amfipàtica que interactua amb el domini de dimerització en la subunitat R de la PKA (Newell i col., 2008). Hi ha espècies de AKAPs neuronals molt conservades en ratolí (150 kDa), en boví (75 kDa) i en humans (79 kDa). Aquesta AKAP neuronal diana de PKA RII postsinàptica manté la proteïna quinasa en estreta relació amb les proteïnes del senyal de transducció, fosforilant-les, per la regulació de la transmissió sinàptica (Colledge i Scott, 1999).

5.2.1.1 Localització de la PKA

La funció que la proteïna quinasa A realitza en una cèl·lula ve determinada per la seva localització subcel·lular específica malgrat que la PKA és una proteïna ubiqüa en totes les cèl·lules dels mamífers (Kim i col., 2005). El lloc d'expressió dels gens que codifiquen per les diferents subunitats de la PKA varia. La forma α (RI α , RII α i C α) es considera ubiqüa i constitutiva, mentre que la forma β (RI β , RII β i C β) té una expressió més específica expressant-se principalment al sistema nerviós (Brandon i col., 1997). La localització de les subunitats RI i RII a la cèl·lula varia trobant-se normalment la subunitat RI a la fracció citosòlica i la subunitat RII predominantment a la fracció de membrana (Skålhegg i Taskén 1997; Hoover i col., 2001; Perkins i col., 2001), on les proteïnes AKAPs poden dirigir la seva acció a un lloc subcel·lular específic (Scott i McCartney 1994; Burton i col., 1997; Huang i col., 1997a,b; Gray i col., 1998).

Les subunitats reguladores (R) de la PKA expressades principalment al múscul esquelètic són RI α i RII α (Hoover i col., 2001; Perkins i col., 2001), encara que també es

Introducció

detecta RII β (Perkins i col., 2001). La fracció soluble conté la major part de les proteïnes RI α (Hoover i col., 2001; Perkins i col., 2001) i la proteïna RII α està distribuïda d'una manera uniforme entre les dues fraccions (Hoover i col., 2001). Per altra banda, s'ha observat que al múscul esquelètic de l'embrió es detecten nivells elevats de transcrits i de proteïna de PKA C α i de RI α uniformement distribuïts, però en canvi, en l'adult només estan presents a nivells baixos (Imaizumi-Scherrer i col., 1996). Aquest curs temporal de localització dels transcrits de PKA RI α es pot relacionar amb el paper d'aquesta molècula en l'establiment i/o manteniment de les unions neuromusculars.

S'ha demostrat l'acumulació de RI α a la NMJ de múscul esquelètic (Imaizumi-Scherrer i col., 1996) i la seva associació amb els microtúbuls (Imaizumi-Scherrer i col., 2001). Resultats d'immunohistoquímica mostren que la PKA RII α (Hoover i col., 2001; Perkins i col., 2001) i la subunitat catalítica de PKA (Hoover i col., 2001) es concentren a la part postsinàptica de la unió neuromuscular mentre que la PKA RI α colocalitza amb la sinaptofisina, la qual marca vesícules presinàptiques, i també es concentren en àrees veïnes presinàptiques (Perkins i col., 2001). PKA RII α es concentra a les proximitats de la unió neuromuscular postsinàpticament però no colocalitza amb els receptors d'acetilcolina nicotínics (nAChR) (Perkins i col., 2001). Aquest mateix patró de localització s'ha descrit per PKA RII β (Perkins i col., 2001). En aquesta tesi es pretén conèixer l'expressió de la PKA al múscul esquelètic i la localització detallada de les subunitats de la PKA a la NMJ.

5.2.2 Proteïna quinasa dependent de calci (PKC)

La fosforilació de proteïnes és un dels mecanismes més importants a través del qual les neurones integren senyals extracel·lulars. Dins d'aquest context, la PKC té un paper fonamental en regular o modular funcions neuronals tals com els fluxos de canals iònics, la dessensibilització de receptors o l'alliberament de neurotransmissor. A part d'aquestes funcions, a la PKC se la relaciona amb moltes i variades funcions com són la modulació de proteïnes estructurals de membrana, regulació de la transcripció, mediador de respostes immunes, regulació del creixement cel·lular, diferenciació i apoptosi (Brandt i col., 2003). Moltes isoformes de PKC estan implicades en el procés de regeneració muscular actuant en diferents moments i llocs i això suggereix que una isoforma individual pot realitzar diferents funcions (Moraczewsky i col., 2002). La resposta

de les isoformes de PKC a un mateix estímul podria no ser uniforme depenent molt del tipus cel·lular on es troba (Vary i col., 2005).

En funció de l'homologia de la seqüència i de la sensibilitat a activadors, s'han descrit almenys onze isoformes (codificades per 9 gens) de la PKC. Les diferents isoformes s'agrupen en tres famílies: 1) clàssiques, cPKC (α , β I, β II i γ), 2) noves, nPKC (δ , ϵ , η (L), θ) i 3) atípiques, aPKC (ζ i λ /t).

5.2.2.1 Estructura de la PKC

La proteïna quinasa C (PKC) és una família de Ser/Thr quinases que inicialment es van descriure com a dependents de calci. Existeixen almenys 11 isoformes de PKC. Totes elles estan formades per una cadena polipeptídica simple que conté una regió reguladora a la part N-terminal (20-70 kDa) i una regió catalítica amb activitat quinasa, a la part C-terminal (d'uns 45 kDa aproximadament). La variació de la regió reguladora fa distingir les diferents isoformes i, a més, la regió reguladora és la que determina la resposta als diferents activadors. La regió catalítica conserva una elevada homologia entre les diferents isoformes (Parker i col., 1986; Newton, 1995a; Nishizuka, 1995) (figura 4). La clonació als anys 80 de la primera isoforma de la PKC va revelar l'existència de 4 dominis conservats (C1-C4 tant catalítics com reguladors) (Coussens i col., 1986) i de 5 dominis variables (V1-V5). Cada domini de la regió reguladora de la PKC (C1 i C2) és un mòdul funcional d'unió a la membrana (Newton, 1995b). Nombroses anàlisis bioquímiques i mutacionals han portat a definir la funció de cada un d'aquests dominis: el domini C1 conté el motiu ric en cisteïna, duplicat en moltes isoformes, que forma el lloc d'unió pel DAG/phorbol ester, lloc d'unió a la membrana (Bell i Burns, 1991). Aquest domini està precedit per una seqüència pseudosubstrat autoinhibitòria (House i Kemp, 1987); el domini C2 conté el lloc de reconeixement per fosfolípids àcids (com la fosfatidilserina) i, en algunes isoformes (les clàssiques), el lloc d'unió a calci (Newton, 1995b). El domini C3 té el lloc d'unió a l'ATP i el domini C4 presenta el lloc de reconeixement del substrat (Taylor i Radzio-Andzelm, 1994). Les regions reguladora i catalítica estan separades per una regió pont que esdevé proteolíticament làbil quan l'enzim està unit a la membrana (Newton, 1993); el domini quinasa generat proteolíticament és constitutivament actiu (proteïna quinasa M), lliure d'inhibició pel pseudosubstrat (Inoue i col., 1977). En resum, la regió reguladora consta dels dominis C1 i C2 i de tres dominis variables (V1-V3). L'extrem N-terminal del domini C1 conté la seqüència ψ substrat (pseudosubstrat) que és la més ben coneguda de les interaccions

Introducció

intramoleculares inhibidores. La regió catalítica conté el domini d'unió a l'ATP (C3) i el d'unió al substrat (C4). L'extrem C-terminal de la proteïna conté el domini V5 que té algun lloc de fosforilació que regula l'activitat de la proteïna (Kheifets i Mochly-Rosen, 2007).

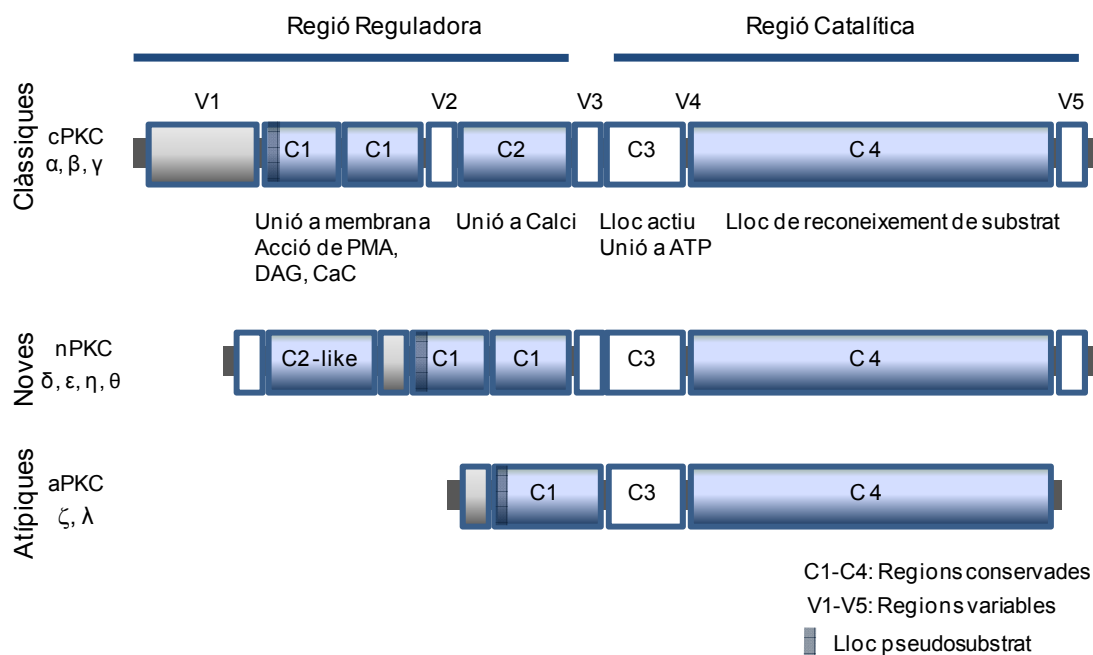


Figura 4. Estructura primària de les diferents isoformes de la PKC

Com s'ha dit anteriorment, s'han identificat 11 isoformes de la PKC que s'agrupen en tres famílies (clàssiques o convencionals, noves i atípiques) basant-se en la seva estructura (Nishizuka, 1995) i també segons les seves propietats reguladores, les quals venen donades per dominis específics en la proteïna (Mellor i Parker, 1998). Les més ben caracteritzades i primeres en descobrir-se van ser les PKCs convencionals o clàssiques: α , β I i β II i γ . Aquesta classe es diferencia de les altres en que la seva funció està regulada per calci i també per DAG o per èsters de forbol i fosfatidilserina (el domini C2 conté un lloc d'unió a calci). El següent grup ben caracteritzat són les PKCs noves; δ , ϵ , η (L), θ . Aquestes isoformes són estructuralment semblants a les PKCs convencionals o clàssiques, excepte que el domini C2, tot i mantenir la mateixa estructura, no fa la funció d'unir-se a calci. Estan regulades per DAG o èsters de forbol i fosfatidilserina i, com ja s'ha comentat, són calci independents. La isoforma PKC μ (també anomenada PKD) es va classificar inicialment com a isoforma nova però ara es

descriu com una família a part, amb característiques pròpies i allunyades de les PKCs (Ron i Kasanietz, 1999). Les últimes isoformes conegudes són les PKCs atípiques: ζ i λ_1 , són independents de calci, de DAG i d'èsters de forbol (Newton, 1997). Aquestes difereixen significativament en l'estructura respecte a les dues classes anteriors; el domini C1 conté només un motiu ric en cisteïna (no dos) i falta el domini C2. A més a més, aquestes isoformes no responen a èsters de forbol (Nishizuka, 1995).

5.2.2.2 Activació de la PKC

Les cèl·lules detecten els canvis del seu voltant a través de cascades de senyalització iniciades per receptors situats en la part externa de la seva membrana cel·lular i també per l'activació de proteïnes G associades a receptors de membrana, tant a receptors tirosina quinasa com a receptors que no ho són. La PKC transdueix una gran varietat de senyals mediat per la hidròlisi de fosfolípids ja que les isoformes de PKC s'uneixen a lípids amb una especificitat marcada per la fosfatidilserina (PS). Així, la via de transducció del senyal que activa les PKC implica l'activació de la fosfolipasa C per mediació de receptors, que trenca el fosfatidilinositol difosfat (PIP₂) produint DAG, que pot activar directament les PKC, i inositol trifosfat (IP₃). La unió de IP₃ als seus receptors provoca la sortida de calci des dels magatzems intracel·lulars, la qual cosa li permet actuar com a segon missatger activant les PKC clàssiques (Nishizuka, 1984, 1986). En particular, els neurotransmissors actuen a través de receptors associats a proteïna G activant l'intercanvi del fosfatidilinositol.

El model actual per a l'activació de les isoformes de la família clàssica de les PKCs suggereix que la unió a calci augmenta l'afinitat de la PKC per la PS a la membrana cel·lular i fa que s'uneixi a les poques molècules de DAG que es puguin trobar allí (Nishizuka, 1986; Oancea i Meyer, 1998; Nalefski i Newton, 2001; Tsuruno i Hirano, 2007). La unió dels dos dominis reguladors a la membrana fa que s'alliberi el lloc autoinhibidor del pseudosubstrat (ψ substrat) des del lloc actiu del domini catalític, produint canvis conformacionals que deixen el domini catalític accessible per a la unió del substrat i per a la fosforilació. No obstant, per a l'activació de la PKC també són necessàries la fosforilació d'aquesta i interaccions específiques proteïna-proteïna. En la família nova de la PKC, les isoformes no s'uneixen al calci però tenen molta més afinitat pel DAG que les isoformes de la classe clàssica (Nishizuka, 1986), produint així un balanç acurat de respostes a activadors semblants per les diferents isoformes.

Introducció

Les PKCs inactives es troben en la fracció soluble de les cèl·lules i es transloquen a diferents membranes cel·lulars, per un augment dels senyals intracel·lulars, on poden unir-se a molècules i fosforilar proteïnes substrat veïnes (Kraft i Anderson, 1983; Mochly-Rosen, 1995; Johnson i col., 2000). Múltiples PKCs poden estar presents a la mateixa cèl·lula i poden translocar a diferents llocs subcel·lulars, en resposta al mateix estímul, on poden ser mediadores de la mateixa funció o, fins i tot, de funcions oposades (Disatnik i col., 1994; Goodnight i col., 1995). Cada isoforma de PKC pot tenir una proteïna d'ancoratge selectiva a la qual s'uneix una vegada activada. Aquestes proteïnes d'ancoratge, anomenades receptors per quinases C actives (RACKs), ancoren isoformes específiques de PKC en un únic lloc subcel·lular (Mochly-Rosen, 1995). L'ancoratge de la isoforma amb el seu RACK fa que es localitzi la isoforma molt a prop de la proteïna substrat específica. S'han identificat dues RACKs, la RACK per PKC β II, coneguda com RACK1 (Ron i col., 1994), i la RACK per PKC ϵ coneguda com RACK2 o β 'COP (Csukai i col., 1997). L'especificitat de la interacció de PKC-RACK està mediada pels dominis C2 i V5 entre altres possibles.

El mecanisme de translocació de la PKC des del citosol a la membrana encara està en estudi. Hi ha evidències que indiquen que la translocació de la PKC depèn d'elements del citoesquelet (Schmalz i col., 1996; Dykes i col., 2003) i que el procés de translocació i acumulació de PKC a la membrana és limitat, de manera que la sobreexpressió de la PKC satura la maquinària que es requereix per a la seva translocació (Saito i col., 2003). Si la translocació de PKC implica un transport actiu a través d'elements del citoesquelet, ha d'haver-hi un nou conjunt de proteïnes i d'interaccions d'aquestes que estiguin involucrades en aquest mecanisme de translocació.

5.2.2.3 Localització de la PKC

Les diferents isoformes de la PKC es troben localitzades en una àmplia varietat de teixits i, a la vegada, en molts tipus cel·lulars. S'han descrit isoformes que tenen una localització ubíqua i isoformes que són molt més específiques d'un teixit. Per exemple, la isoforma α de la família de la PKC dependent de calci i la isoforma δ de la família de les PKCs noves s'han descrit com a dues isoformes universals o ubíquies en mamífers (Nishizuka, 1995). En canvi, la isoforma PKC θ s'ha descrit com a específica del múscul esquelètic encara que també s'ha identificat en altres teixits (Hilgenberg i Miles, 1995). La

isoforma PKC α , malgrat la seva ubiqüitat, és abundant en vasos sanguinis, en cèl·lules del teixit connectiu i també en el teixit endoneural (Nakano i col., 1992). La PKC β II es detecta a l'aorta, en hepatòcits, a la retina (Roberts i McLean, 1997) i al múscul cardíac (Perrini i col., 2004). De les isoformes de la família de les noves, la PKC δ s'ha detectat especialment en epidermis, en fibroblasts i en vasos sanguinis petits (Ekström i col., 1992); la PKC ε en vasos, també en teixit connectiu i en cèl·lules sanguínies (Nishizuka, 1995; Moraczewski i col., 2002); la PKC η en pell, al pulmó i al cor (Nishizuka, 1995); la PKC θ , com s'ha mencionat anteriorment, en múscul esquelètic, a la melsa i als testicles (Hilgenberg i Miles, 1995; Nishizuka, 1995). Entre les isoformes de la família de les PKC atípiques, la PKC ζ també està descrita com a una isoforma universal, però en particular s'expressa en vasos sanguinis (Nishizuka, 1995), en hepatòcits (Perrini i col., 2004) i en múscul (Moraczewski i col., 2002).

Al múscul esquelètic s'expressen moltes isoformes de PKC (Richter i col., 1987; Cleland i col., 1989; Hietanen i col., 1990; Nakano i col., 1992; Arakawa i col., 1993; Hilgenberg i Miles, 1995; Nishizuka, 1995; Van Ginneken i col., 2004). Entre aquestes, les isoformes ε i δ s'han trobat expressades al múscul gastrocnemi (Vary i col., 2005), les isoformes PKC α , β , θ , δ , ε , ζ i η al *extensor digitorum longus* i *soleus* (Moraczewski i col., 2002) i β I en diafragma i tríceps (Hietanen i col., 1990). La major part d'aquests estudis han demostrat que la PKC juga un paper en el transport de la glucosa mediat per la insulina i l'exercici. D'altra banda, només en uns pocs casos s'ha descrit la localització subcel·lular de la PKC dins del múscul esquelètic. Així, la isoforma α s'ha trobat a les cèl·lules satèl·lit, al sarcolemma de les cèl·lules musculars, als túbuls T i al citoplasma (Salvatori i col., 1993; Hilgenberg i Miles, 1995; Nagao i col., 1998). La detecció de la PKC a la membrana dels túbuls T indica que aquesta quinasa pot estar implicada en la contracció de la fibra muscular. La isoforma δ s'ha detectat al citoplasma de miotubs petits (Moraczewski i col., 2002) i la isoforma PKC θ al sarcolemma (Hilgenberg i Miles, 1995; Moraczewski i col., 2002) i a les fibres musculars (Lanuza i col., 2000; Perkins i col., 2001; Kim i col., 2002).

També s'expressen moltes i variades isoformes de la PKC al sistema nerviós, tant central com perifèric. Així, al cervell s'han detectat moltes isoformes de PKCs (Richter i col., 1987). Per exemple, α (Kose i col., 1988; Cleland i col., 1989; Nishizuka, 1995), β I i β II (Kose i col., 1988; Cleland i col., 1989). Les isoformes β I i β II s'han localitzat en expansions d'axons terminals, axons mielinitzats (Nakano i col., 1992; Arakawa i col., 1993), dendrites (Miki, 1995) i també als cossos neurals. La isoforma γ es troba en cèl·lules de Purkinje del còrtex cerebel·lós (Kose i col., 1988; Nishizuka, 1995). La PKC δ s'ha detectat

Introducció

al còrtex motor i a la medul·la espinal (Dave i col., 2005). Al còrtex motor també s'expressa la PKC ϵ (Nishizuka, 1995) i a la medul·la espinal les isoformes cPKCs (Kose i col., 1988; Hietanen i col., 1990; Miki, 1995; Roberts i McLean, 1997; Nagao i col., 1998). També s'ha descrit la presència d'isoformes de la PKC en nervis perifèrics. Per exemple, les isoformes cPKCs al nervi ciàtic (Cleland i col., 1989; Roberts i McLean, 1997), les isoformes β I i β II en nervis intramusculars (Hietanen i col., 1990; Nakano i col., 1992) i al teixit endoneural (Nakano i col., 1992).

D'altra banda, pel que fa a la localització de les diverses isoformes de la PKC a la unió neuromuscular, hi ha pocs treballs que s'hagin centrat en el seu estudi. PKC β , sense distingir entre β I i β II, s'ha suggerit que està present en el component presinàptic de la unió neuromuscular (Arakawa i col., 1993; Perkins i col., 2001) i també distribuïda de manera difusa en la cèl·lula muscular (Nakano i col., 1992; Perkins i col., 2001). La isoforma PKC α que s'expressa ubiquament s'ha descrit expressada en les fibres musculars *in vitro* (Lanuza i col., 2000; Kim i col., 2002) i *in vivo* (Nakano i col., 1992), en múscul esquelètic (Hilgenberg i Miles, 1995) i en estructures endoneurals (Nakano i col., 1992). Un altra isoforma de PKC de la família de les noves, independent de calci, com és la PKC θ , es troba a les fibres musculars (Hilgenberg i Miles, 1995; Lanuza i col., 2000).

En aquesta tesi es pretén conèixer l'expressió al múscul esquelètic i la localització detallada de les isoformes de la PKC a la sinapsi neuromuscular.

5.3 PKC i PKA a la unió neuromuscular

5.3.1 PKC i PKA en l'eliminació sinàptica

Les proteïnes quinases de serina -tant la PKA com la PKC- juguen un paper important en la modificació de les sinapsis en dependència de l'activitat, de forma que l'activació de la PKC provoca una disminució de la força sinàptica, mentre que l'acció de la PKA reverteix o s'oposa a l'efecte de la PKC (Li i col., 2001, 2002, 2004). En aquest sentit, estudis previs del nostre grup han demostrat que el procés d'eliminació sinàptica *in vivo* és dependent de l'acció de la PKC durant el primer terç de les 2-3 primeres setmanes de vida postnatal en què té lloc aquest fenomen (Lanuza i col., 2001). La maduració de la NMJ que té lloc durant el procés d'eliminació sinàptica implica una transformació dels agrupaments dels nAChR al component postsinàptic. Encara que la regulació de les dinàmiques d'estabilització-desestabilització dels nAChR a la

membrana durant el desenvolupament de l'aparell postsinàptic es coneixen poc, s'ha descrit que en el procés de competició sinàptica i posterior eliminació, els axons que seran eliminats disminueixen progressivament la seva eficàcia a l'associar-se un menor contingut quàntic progressiu amb una densitat de nAChR postsinàptics reduïda (Balice-Gordon i Lichtman, 1993). En canvi, la secreció de neurotransmissor per part de l'axó que sobreviu i es consolida es caracteritza per un increment continuat del contingut quàntic (Colman i col., 1997). És per això, juntament amb altres factors, que la pèrdua de nAChR sinàptics ha estat assenyalada com un factor inicial en el procés d'eliminació sinàptica a la unió neuromuscular (Balice-Gordon i Litchman, 1993, 1994; Culican i col., 1998). L'activitat de la PKC es va implicar inicialment en la redistribució dels nAChR a la NMJ en base a experiments en els que els agregats de nAChR que es formen a la membrana dels miotubs de pollastre es dispersen després de l'exposició a èsters de forbol que activen la PKC (Bursztajn i col., 1988). Estudis més recents del nostre grup en miotubs innervats de ratolí aportaren l'evidència que l'activitat de la PKC també regula la distribució dels nAChR en les NMJ de mamífers (Lanuza i col., 2000). El tractament amb èsters de forbol de miotubs de ratolí innervats per neurites de motoneurons va ocasionar una reducció en els potencials sinàptics. Aquesta disminució de l'eficàcia sinàptica va ser atribuïda a la pèrdua de nAChR dels agregats funcionals de receptors ja que anava acompanyada per una disminució de la mida del quanta individual. La dispersió dels agregats de nAChR no es va poder atribuir, però, a una reducció de l'expressió de nAChR (Lanuza i col., 2000) suggerint que una fosforilació mitjançada per la PKC podria ser la responsable de la dispersió. Per altra banda, la inhibició de l'activitat de la PKC *in vivo* va aturar la dispersió normal de nAChR que està associada a l'eliminació sinàptica, suggerint que l'activitat de la PKC regula la desaparició postnatal dels nAChR sinàptics en els músculs neonatals de rata (Lanuza i col., 2002). Recentment s'ha demostrat que un increment de l'activitat de la PKC augmenta la fosforilació de la subunitat delta del nAChR (Lanuza i col., 2006). Contràriament a l'acció de la PKC, la PKA incrementa l'estabilitat dels receptors de nAChR a la membrana postsinàptica mitjançant un mecanisme dependent de l'activitat sinàptica (Li i col., 2001). Estudis paral·lels als anteriorment citats, han demostrat que un increment de l'activitat de la PKA augmenta la fosforilació de la subunitat epsilon del nAChR (Lanuza i col., 2006). Aquests resultats suggereixen que un balanç entre la fosforilació efectuada per la PKC i per la PKA podria determinar l'estabilitat o inestabilitat de la molècula de nAChR a l'agregat. El nAChR postsinàptic de la NMJ, amb una estequiometria $\alpha_2\beta\delta\epsilon$, és una fosfoproteïna i, per tant, és diana de proteïnes quinases. S'ha descrit que diferents quinases estan activades per diferents mecanismes i tenen efectes característics en la fosforilació dels nAChR alterant el seu

Introducció

estat fisiològic (Huganir i Greengard, 1990). La tirosina quinasa implicada en el sistema agrina/MuSK/rapsina fosforila la subunitat β del receptor i juga un paper clau en l'agrupament dels receptors en els agregats sinàptics (DeChiara i col., 1996; Glass i col., 1996; Smith i col., 2001) encara que no durant l'etapa més primerenca postnatal (Friesse i col., 2007). Per altra banda, l'activació de PKC fosforila una serina específica en la subunitat δ del receptor (Nimnual i col., 1998) i, encara una tercera quinasa, la PKA, actua en les subunitats δ i γ (Miles i Huganir, 1988).

Es coneix que l'agrupament dels nAChR al component postsinàptic pot ser induït per l'agrina (Sanes i Lichtman, 1999) però també s'ha suggerit que l'activitat de la PKC compromet la funció de l'agrina ja que el tractament amb èsters de forbol accelera la disrupció dels agregats de nAChR induïts per agrina de miotubs de pollastre mentre que el mateix tractament inhibeix la formació dels agregats de nAChR induïda per agrina i la fosforilació de la tirosina en els nAChR (Wallace, 1988; Wallace i col., 1991). A més a més, s'ha mostrat que l'activitat específica de la isoforma θ de la PKC inhibeix la formació dels agregats de nAChR induïts per agrina i disgrega els preexistents, suggerint que aquesta isoforma és inhibidora de la funció de l'agrina (Miles i Wagner, 2003). Recentment, el nostre grup ha demostrat mitjançant la utilització de ratolins deficientes de la isoforma θ que aquesta isoforma és requerida per a que el procés *in vivo* d'eliminació sinàptica postnatal tingui lloc correctament (Li i col., 2004). També s'ha demostrat en aquest treball que l'eliminació de sinapsis queda alterada en cultius en els que les cèl·lules musculars no expressen la isoforma θ de la PKC. És per aquesta raó que en aquesta tesi es pretén aprofundir en el coneixement del paper que desenvolupa la PKC θ durant el procés postnatal de l'eliminació sinàptica i durant la maduració dels agrupaments de nAChR postsinàptics a la sinapsi neuromuscular.

Per altra banda, i de forma sorprenent, l'eliminació sinàptica es va suprimir també en cultius en els que únicament les neurones eren deficitàries en aquesta isoforma suggerint un paper coordinat tant pre- com postsinàptic de la isoforma θ (Li i col., 2004). Donada aquesta última troballa, es podria pensar que aquesta isoforma podria ser la responsable també *in vivo* dels canvis modulats per la PKC en l'alliberament del neurotransmissor en els terminals axònics competidors que han estat descrits pel nostre grup (Santafé i col., 2007a). En aquest treball s'ha demostrat que el bloqueig de la PKC incrementa l'alliberament de neurotransmissor en el terminal més feble. A més a més, en estudis previs de rata neonatal, es va trobar que la reducció de l'entrada de Ca^{2+} augmenta l'alliberament del neurotransmissor en els terminals competidors més febles

(Santafé i col., 2001). Tots aquests resultats semblen indicar que els canvis modulats per la PKC d'origen presinàptic implicarien una isoforma de PKC presinàptica que seria dependent de Ca^{2+} . D'altra banda, també es va demostrar que tant la reducció de Ca^{2+} (Santafé i col., 2002) com la inhibició de la PKC (Santafé i col., 2007a) van ocasionar que terminals funcionalment inactius però encara presents en la placa motora recuperessin la capacitat d'alliberament de neurotransmissor. Així doncs, un mecanisme dependent de la PKC i del Ca^{2+} podria contribuir a desconnectar determinats axons febles. L'evidència de la implicació de mAChRs presinàptics que modulen l'alliberament del neurotransmissor en el procés d'eliminació sinàptica (Santafé i col., 2004) podria permetre que els terminals competidors adquirissin diferent capacitat d'alliberar neurotransmissor en funció de l'activitat sinàptica. Així, recentment, s'ha descrit un mecanisme inhibitor de l'alliberament basat en la cascada intracel·lular mAChR-PKC-VDCC als terminals nerviosos més febles, de manera que quan aquesta cascada està completament activada, l'alliberament de l'ACh pot ser fortament reduït i inclús algunes sinapsis poden ser desconnectades (Santafé i col., 2009b).

5.3.2 PKC i PKA en l'activitat sinàptica

L'alliberament del neurotransmissor està finament regulat per receptors metabotròpics presinàptics de neurotrofines, neurotransmissors i cotransmissors. En particular, a les sinapsis colinèrgiques de varies espècies, podrien existir diversos mecanismes de modulació de l'alliberament del neurotransmissor dependent de calci, associats amb receptors d'adenosina presinàptics (Song i col., 2000), amb autoreceptors d'acetilcolina muscarínics (Caulfield, 1993; Allen, 1999; Slutsky i col., 1999; Minic i col., 2002; Santafé i col., 2003, 2004; Garcia i col., 2005) i amb receptors de neurotrofines (Bibel i Barde, 2000; Roux i Barker, 2002; Pitts i col., 2006). El conjunt d'aquests mecanismes de modulació materialitzen la capacitat adaptativa i de plasticitat de la sinapsi. Alguns receptors estimulen o inhibeixen la fosfolipasa C i, per tant la PKC, mentre que altres estimulen o inhibeixen l'adenil-ciclasa i, per tant la PKA (Caulfield, 1993; Caulfield i Birdsall, 1998; Nathanson, 2000; Pitts i col., 2006). La fosforilació proteica és el mecanisme general que acobla l'activació d'un receptor per missatgers a canvis intracel·lulars. Nombroses proteïnes quinases realitzen aquesta funció (alguns receptors són ells mateixos tirosina quinases), encara que les serina-treonina quinases, tant la PKC com la PKA, són les més ubiqües. La funció d'aquestes quinases es relaciona amb la regulació de canals iònics de lligand (Swope i col., 1999; Nelson i col., 2003, 2005) i l'exocitosi del transmissor

Introducció

(Tanaka i Nishizuka, 1994; Byrne i Kandel, 1996) sent la fosforilació proteica presinàptica duta a terme per la PKC un important mecanisme que regula l'alliberament del transmissor (West i col., 1991; Numann i col., 1994; Byrne i Kandel, 1996; Catterall, 1999). Al nostre laboratori s'ha demostrat que la fina modulació de l'alliberament del neurotransmissor realitzada pels mAChRs de tipus M1 i M2 als terminals nerviosos motors de NMJs adults (Minic i col., 2002; Santafé i col., 2003) està mediada al seu mateix temps pel calci (Santafé i col., 2003) i per l'acció de les quinases PKC i PKA (Santafé i col., 2006). No obstant, en estudis electrofisiològics realitzats en preparacions neuromusculars elèctricament inactives *ex vivo* (sense la motoneurona que dispara la contracció muscular), s'ha vist que, en aquestes condicions de repòs, la PKC no està acoblada al mecanisme d'alliberament d'ACh, perquè quan és inhibida totalment per la calfosteïna (CaC, inhibidor de la PKC) els paràmetres d'alliberament no canvien (Santafé i col., 2005, 2006). Si més no, també s'han identificat diferents circumstàncies en les que les PKCs s'acoblen a l'alliberament. Per exemple, l'augment de la concentració de calci extracel·lular potencia l'alliberament a través d'una PKC (Santafé i col., 2005, 2006) i també ho fa la inhibició del mecanisme d'alliberament d'ACh modulats pels mAChRs presinàptics (Santafé i col., 2007b, 2009b). Per tant, canvis en l'activitat de PKC que siguin dependents de calci podrien modificar directament l'alliberament normal del neurotransmissor. Quan el flux de calci augmenta, l'alliberament del transmissor podria augmentar-se directament perquè augmentaria l'activitat de la PKC. Alternativament, el flux d'entrada de calci podria ser suficient i ser l'única condició necessària per produir secreció d'ACh evocada. En aquest cas, el mecanisme d'acció de la PKC podria estar unit indirectament amb l'alliberament de transmissor via mAChRs. Altres experiments han portat a afirmar que el neurotransmissor per ell mateix contribueix directament a la fina regulació de l'alliberament del neurotransmissor i a l'eficàcia sinàptica a través d'autoreceptors muscarínics presinàptics lligats a la via intracel·lular de les serina/treonina quinases (Santafé i col., 2007b).

En condicions normals, tant l'estimulació de la PKC com de la PKA potencia l'alliberament d'ACh però només la inhibició de la PKA afecta l'alliberament (Santafé i col., 2007b). Això indica que la PKA té un paper constitutiu en promoure un component de l'alliberament normal. En aquest context d'activació sinàptica normal, la PKA està activada i contribueix de forma tònica a potenciar l'alliberament. Diferents candidats com les neurotrofines (per exemple BDNF, NT-4 i NT-3) poden estimular la PKA a través de vies de senyalització que inclouen tirosina quinases. En els mecanismes globals de les cèl·lules, l'acció de la PKA pot unir-se amb la de la PKC o bé ambdues accions poden

treballar en direccions oposades. A la NMJ, l'activació de la PKA i de la PKC tenen efectes oposats en l'estabilitat dels nAChRs i així contribueixen a l'estabilització o a l'eliminació sinàptica (Li i col., 2001). Per altra banda, en alguns circuits neurals, les quinases presinàptiques PKC i PKA poden cooperar en la modulació de les conductàncies dels canals presinàptics de calci, sodi i potassi (Byrne i Kandel, 1996). Futurs estudis a la NMJ sobre l'acoblament de la PKC i la PKA amb el calci presinàptic, VDCC, i canals de sodi i potassi podrien ajudar a determinar el paper d'aquestes quinases en el mecanisme de la neurotransmissió. Recents estudis del nostre laboratori han mostrat que en condicions normals, la PKA pot modular l'alliberament d'ACh independentment de l'activitat de PKC, mentre que la PKC depèn de l'activitat de la PKA per esdevenir acoblada i potenciar l'alliberament (Santafé i col., 2009a). Això suggereix la implicació coordinada de la PKA i PKC en les cascades intracel·lulars que modulen la transmissió neuromuscular. Per tant, és necessari considerar simultàniament la senyalització de les dues quinases. L'acció de les dues quinases es podria efectuar sobre les mateixes o sobre diferents molècules en la maquinària de l'alliberament.

Es coneix que l'activitat sinàptica depèn del flux d'entrada de calci i que les isoformes dependents de calci presinàptiques poden contribuir a la modulació de la neurotransmissió (D'Angelo i col., 1992; Santafé i col., 2005). Com ja s'ha descrit anteriorment, la fina modulació de l'alliberament del neurotransmissor per part dels mAChR de tipus M1 i M2 al terminal nerviós de NMJ adultes està mediat per les proteïnes serina quinases, PKC i PKA (Santafé i col., 2006). D'aquesta manera, s'ha demostrat que la modulació de l'alliberament del transmissor té un component que està mediat per les isoformes de PKC dependents de calci a la NMJ, però no està clar encara quines isoformes de cPKC hi estan implicades. L'activitat específica de les isoformes dependents de calci de la PKC podria proporcionar un mitjà pel qual la diana de la modulació de l'alliberament del neurotransmissor i l'activitat sinàptica estan afectats. A més, a la sinapsi neuromuscular, les PKCs estan implicades tant en l'alliberament d'ACh presinàptic dependent de calci com en la contracció de la fibra muscular postsinàptica també dependent de calci. S'ha descrit que la contracció muscular induïda per estimulació elèctrica augmenta la translocació de l'activitat total de la PKC a la membrana cel·lular (Richter i col., 1987; Cleland i col., 1989; Antipenko i col., 1999). Per aquests motius, part del treball d'aquesta tesi està dissenyat per examinar l'expressió i distribució de les isoformes dependents de calci de la PKC (α , β I, β II i γ) en múscul esquelètic i a la sinapsi neuromuscular de rata adulta sota condicions basals i després

Introducció

d'estimulació elèctrica així com la seva possible relació amb l'acoblament de la PKC en l'alliberament del neurotransmissor.

II - HIPÒTESI i OBJECTIUS

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

SERINA/TREONINA QUINASES A LA SINAPSI NEUROMUSCULAR: ESPECIALITZACIÓ DE LES ISOFORMES
DE LA PROTEÏNA QUINASA C

Núria Montserrat Besalduch Canes

ISBN:978-84-692-3232-3/DL:T-939-2009

1. Hipòtesi

Diferents isoformes i subunitats de les serina/treonina quinases PKC i PKA s'expressen i es localitzen tant a la sinapsi neuromuscular adulta com durant el desenvolupament postnatal indicant l'especialització de les isoformes de la proteïna quinasa C en funcions particulars de la sinapsi neuromuscular. L'activitat sinàptica provoca l'activació d'almenys alguna de les isoformes de la PKC dependents de calci (α , βI , βII , γ) al múscul esquelètic adult. El procés postnatal de l'eliminació sinàptica i de la maduració dels agrupaments de nAChR postsinàptics a la sinapsi neuromuscular depèn de l'acció fosforiladora de la PKC θ sobre les subunitats δ i ϵ del AChR.

2. Objectius

2.1 Objectiu general

L'objectiu general d'aquesta tesi és conèixer l'expressió i la localització de les serina/treonina quinases PKC i PKA a la sinapsi neuromuscular, així com l'especialització de les isoformes de la proteïna quinasa C (α , βI , βII , γ , θ) en funcions particulars de la sinapsi neuromuscular.

Aquest objectiu genèric es concreta en dos amplis objectius aplicables a l'especialització de dues famílies de la PKC. Aquests dos objectius corresponen a les dues parts principals d'aquesta tesi:

- (1) Es pretén aprofundir en el coneixement de l'efecte que l'activitat sinàptica, amb i sense contracció, provoca en l'activació i localització de les isoformes de la família de la PKC dependent de calci (α , βI , βII , γ) al múscul esquelètic adult així com la seva possible relació amb l'acoblament de la PKC en l'alliberament de neurotransmissor.
- (2) Es pretén aprofundir en el coneixement del paper que desenvolupa la PKC θ (isoforma de la família nova de la PKC) durant el procés postnatal de l'eliminació sinàptica i durant la maduració dels agrupaments de nAChR postsinàptics a la sinapsi neuromuscular.

2.2 Objectius específics

1. Conèixer l'expressió de diferents isoformes de la proteïna quinasa C (PKC: α , β I, β II, γ , ϵ , δ , θ , ζ i μ) i de diferents subunitats de la proteïna quinasa A (PKA: $C\alpha$, $C\beta$, $RII\alpha$ i RI) al múscul esquelètic de rata de 6 dies d'edat i adulta.
2. Conèixer la localització de diferents isoformes de la PKC (α , β I, β II, γ , ϵ , δ , θ , ζ i μ) i de diferents subunitats de la PKA ($C\alpha$, $C\beta$, $RII\alpha$ i RI) a les tres cèl·lules que formen la sinapsi neuromuscular de rata adulta.
3. Conèixer si l'activitat sinàptica provoca l'acoblament de la PKC en l'alliberament evocat de neurotransmissor al múscul esquelètic adult.
4. Estudiar l'expressió i la fosforilació de les isoformes de la PKC dependents de calci al múscul esquelètic adult, en condicions de repòs i en resposta a l'activitat sinàptica amb i sense contracció muscular.
5. Estudiar l'activitat fosforiladora de les isoformes de PKC dependents de calci al múscul esquelètic adult en resposta a l'activitat sinàptica amb i sense contracció muscular.
6. Estudiar l'efecte de l'activitat sinàptica amb i sense contracció muscular sobre la presència de les isoformes de la PKC dependents de calci a les cèl·lules de la sinapsi neuromuscular.
7. Estudiar si el procés d'eliminació sinàptica postnatal i la maduració dels agrupaments de AChRs postsinàptics de la sinapsi neuromuscular depenen de la PKC θ .
8. Conèixer si la PKC θ afecta a la fosforilació de les subunitats δ i ϵ del nAChR durant el desenvolupament postnatal de la sinapsi neuromuscular.
9. Estudiar si la PKC θ afecta a l'organització ultraestructural de la sinapsi neuromuscular durant el desenvolupament i en l'adult.

III - MATERIAL i MÈTODES

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

SERINA/TREONINA QUINASES A LA SINAPSI NEUROMUSCULAR: ESPECIALITZACIÓ DE LES ISOFORMES
DE LA PROTEÏNA QUINASA C

Núria Montserrat Besalduch Canes

ISBN:978-84-692-3232-3/DL:T-939-2009

III – Material i mètodes

1. Animals

2. Model d'estudi: La unió Neuromuscular

2.1 Justificació del model d'estudi

2.2 Descripció dels models musculars esquelètics estudiats

2.2.1 *Levator auris longus* (LAL)

2.2.2 Diafragma

2.2.3 Músculs de les extremitats posteriors

2.2.4 Medul·la espinal

3. Metodologies utilitzades

3.1 Obtenció de músculs esquelètics de rata i ratolí

3.1.1 Dissecció del múscul LAL

3.1.2 Dissecció del múscul Diafragma

3.1.3 Dissecció dels músculs de les extremitats posteriors

3.1.4 Extracció i obtenció de la regió ventral de la medul·la espinal

3.2 Tractaments

3.2.1 Estimulació elèctrica

3.2.2 Tractaments per modificar l'activitat de la PKC - Incubacions

3.2.3 Tractaments per modificar l'activitat de la PKC - Injeccions subcutànies

3.3 Anticossos

3.3.1 Producció d'anticossos fosfo-específics

3.3.2 Anticossos comercials

3.3.2.1 Caracterització d'alguns dels anticossos comercials utilitzats

3.4 Obtenció de proteïnes cel·lulars a partir de músculs esquelètics de rata i ratolí (LAL, Diafragma, extremitats posteriors i medul·la espinal)

3.4.1 *Obtenció de proteïnes totals*

3.4.2 Obtenció de proteïnes subcel·lulars, de citosol i de membrana

3.4.3 Obtenció de proteïna total i subcel·lular, de la part sinàptica i extrasinàptica del múscul diafragma

3.5 Quantificació de la proteïna obtinguda

3.6 Detecció de proteïnes mitjançant electroforesi SDS-PAGE i Western blot

3.6.1 Preparació de mostres

3.6.2 Electroforesi SDS-PAGE

3.6.3 Western blot

3.6.4 Immunodetecció i revelat

3.7. Slot blots

3.8 Tècnica d'immunohistoquímica de fluorescència

3.9 Seccions semifines com a tècnica d'immunofluorescència d'alta resolució per a l'anàlisi de molècules de la unió neuromuscular

3.9.1 Anàlisi de colocalització

3.10 Microscòpia làser confocal

3.11 Microscòpia electrònica

3.12 Electrofisiologia

3.12.1 Anàlisi d'electrofisiologia

3.13 Anàlisi morfològica i morfomètrica

3.13.1 Estudi del grau d'innervació polineural en ratolins KO per a la PKC θ

3.13.2 Estudi dels agregats de nAChR en ratolins KO per a la PKC θ

3.13.3 Estudi del grau de fosforilació de la subunitat δ dels nAChR en animals KO per a la PKC θ

4. Estadística

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

SERINA/TREONINA QUINASES A LA SINAPSI NEUROMUSCULAR: ESPECIALITZACIÓ DE LES ISOFORMES
DE LA PROTEÏNA QUINASA C

Núria Montserrat Besalduch Canes

ISBN:978-84-692-3232-3/DL:T-939-2009

1. Animals

Els animals amb els quals s'han realitzat els experiments d'aquesta tesi han estat: Ratolins C57BL/6J, soca salvatge anomenats *Wild Type* (WT) i soca *Knock Out* (KO) per a la isoforma θ de la proteïna quinasa C (PKC) d'edats entre P4 (dia postnatal 4) fins a adults (P30) i també rates adultes (P30 o amb un pes entre 80 i 100 g) de la raça *Sprague Dawley*. Els ratolins C57BL/6J de la soca salvatge i les rates *Sprague Dawley* han estat subministrats per la casa comercial Charles River de Barcelona i els ratolins KO han estat cedits pel Dr. Phillip Nelson del *Laboratory of Developmental Biology, National Institute of Child Health and Human Development, National Institutes of Health, USA*. Aquests animals KO van ser generats pel Dr. Hua Gu del *National Institute for Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health* (Bethesda, USA) i inicialment van ser desenvolupats al laboratori del Dr. Dan Littman (Molecular Pathogenesis Program, Skirball Institute of Biomolecular Medicine, New York University School of Medicine, New York, USA) (Sun i col., 2000). Els animals deficients en PKC θ van ser produïts en la soca C57Bl/J6, la mateixa que els animals salvatges. Els animals mutants van estar creuats al menys 5 vegades amb la soca salvatge C57Bl (Li i col., 2004).

Els animals s'han establert i encreuat d'una forma controlada a l'estabulari de la Facultat de Medicina i Ciències de la Salut de la Universitat Rovira i Virgili de Reus. Les condicions d'establiment i de vida dels animals han estat les que es detallen a continuació. L'establiment s'ha fet en gàbies estàndard de MAKROLON^R (27x27x14 cm³ per als ratolins i 27x64x14 cm³ per a les rates) a una temperatura ambient de 20-22°C (regulada amb termòstat electrònic) i una humitat relativa del 60-70%. Els animals s'han sotmès a cicles de 12 hores de llum-fosc (llum artificial blanca de neó). L'alimentació s'ha proporcionat *ad libitum*, a base de pinso per ratolí i rata VRF-1 de la casa comercial Charles River i aigua clorada.

Per a la realització de tots els experiments amb animals, s'ha disposat de l'autorització del Comitè Ètic d'Experimentació Animal de la Facultat de Medicina i Ciències de la Salut de la Universitat Rovira i Virgili de Reus. El projecte aprovat pel comitè és el següent: *Desestabilización y pérdida de conexiones neurales. Mecanismo molecular, dependiente de la actividad sináptica y controlado por las proteínas quinasas A y C*; Entidad Financiadora: Fondo de Investigaciones Sanitarias de la Seguridad

Social (FISSS); Proyecto PI05-0207; Duració: 2006-08; Investigador principal: Dr. Josep Tomàs. La cura i manipulació dels animals s'ha realitzat segons la llei aprovada pel Parlament de Catalunya 5/1995, del 21 de juny de 1995, de protecció dels animals utilitzats per a experimentació animal i per a d'altres finalitats científiques.

L'anestèsia de l'animal s'ha dut a terme per injecció via intraperitoneal de Tribromoetanol (TBE) al 2% (0,15 ml/ 10 g pes). L'efectivitat de l'anestèsia s'ha comprovat observant la pèrdua de reflexes de l'animal. Una vegada aquests desapareixien, s'ha procedit a manipular l'animal i a realitzar els tractaments farmacològics o el bé el seu sacrifici mitjançant l'exsanguinació fent un tall a la vena iugular.

2. Model d'estudi: La unió Neuromuscular

2.1 Justificació del model d'estudi

La sinapsi neuromuscular de vertebrats és una sinapsi nicotínica colinèrgica que va servir de model en investigacions neurobiològiques durant molts anys ja que la seva localització, la seva mida relativament gran i l'accessibilitat són trets que la fan ideal per a l'estudi d'alguns aspectes de la seva estructura. Aquest model experimental aporta altres avantatges respecte a d'altres models del sistema nerviós central com són el fàcil reconeixement de la sinapsi i la possibilitat de fàcil manipulació i aïllament del múscul innervat ja que, en adults, les fibres musculars acostumen a estar monoinnervades. A més, és un model on els principis que regulen el seu creixement i funcionalitat són extrapolables a altres sistemes amb petits canvis (Hall i Sanes, 1993; Sanes i Lichtmann, 1999). A més a més del comentat, la sinapsi neuromuscular és un model particularment adequat per a l'estudi de la formació de la sinapsi per diferents raons (Burden, 1977): 1) és geomètricament simple, 2) les sinapsis en desenvolupament i en regeneració poden ser manipulades *in vivo* d'una forma relativament fàcil, 3) es poden estudiar en cultiu, 4) les proteïnes sinàptiques, que participen en tot el procés de formació i estabilització de les sinapsis, poden ser aïllades i purificades; 5) permet l'estudi de l'expressió gènica.

2.2 Descripció dels models musculars esquelètics estudiats

2.2.1 *Levator auris longus (LAL)*

El múscul LAL, tant el de ratolí com el de rata, s'ha triat per realitzar la major part dels experiments d'aquesta tesi [figura 5 (a) i (b)]. El múscul *LAL* és el múscul més superficial de l'àrea dorsal del cap i del coll i la seva funció és el moviment de l'orella. Presenta una part cranial i una altra caudal [figura 6 (a) i (b)]. Les fibres de la regió cranial s'originen a les espines de la quarta vertebra cervical i es dirigeixen cap a la part anterior de la base del pavelló auricular, on s'insereixen. Les fibres de la regió caudal s'estenen des de la quarta i cinquena vèrtebra cervical cap a la part posterior de la base del pavelló auricular. Està format per fibres musculars de contracció ràpida (Erzen i col., 2000). Tant la regió cranial com la caudal estan innervades per la branca auricular posterior del nervi facial que segueix una trajectòria paral·lela a la de l'artèria auricular posterior. Aquesta branca del nervi facial contacta amb la regió caudal del múscul [figura 6 (a) i (b)] innervant la superfície ventral on es divideix en petites branques que es dispersaran per totes les fibres musculars. L'àrea que cobreixen aquestes branques nervioses és molt extensa però normalment existeix una zona d'innervació ben definida, que es localitza més o menys a la meitat de l'espai que separa les dues insercions de les fibres musculars. La majoria de les terminacions motores es troben per la cara de les fibres musculars que fa contacte amb la pell o també sobre el seu perfil.

El múscul va ser descrit per les seves característiques morfològiques com a model ideal, entre altres, per a la realització d'estudis amb drogues o neurotoxines (Angaut-Petit i col., 1987; Tomàs i col., 2000). Al tractar-se d'un múscul subcutani, les drogues injectades *in vivo* subcutàniament, a la zona del múscul LAL, accedeixen directament a la superfície muscular i, per tant, també a les terminacions nervioses, així el seu efecte sobre les sinapsis neuromusculars és per contacte directe. Un altre avantatge és que és un múscul molt pla, amb unes 5 ó 6 capes de cèl·lules (5.25 ± 0.78 , Lanuza i col., 2001) a la porció cranial i amb una part caudal una mica més gruixuda (Angaut-Petit, 1987; Erzen i col., 2000). Aquesta propietat facilita la possible acció dels agents injectats per la seva fàcil difusió a totes les cèl·lules musculars així com facilita la manipulació histològica *in toto* (Tomàs i col., 2000) permetent observar la innervació de tot el múscul, sense haver de fer seccions d'aquest. En la figura 5 (c), (d) i (e) es mostren imatges de confocal d'una immunohistoquímica realitzada en el múscul LAL.

Material i Mètodes

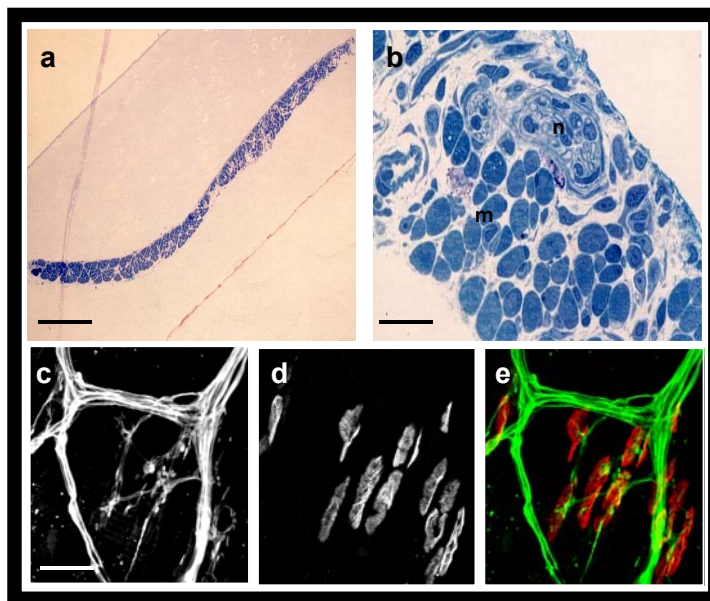


Figura 5. Múscul *Levator auris longus* (LAL). (a) i (b) Tall semifí transversal d'un múscul LAL tenyit amb blau de metilè. Destaca la presència d'un nervi (n) entremig dels miòcits (m). Barra d'escala = 150 μ m (a) i 50 μ m (b). (c), (d) i (e): Imatges d'immunofluorescència del múscul LAL obtingudes per projecció 3D de les imatges seqüencials obtingudes amb un microscopi confocal. En (c) s'han marcat els axons amb un anticòs anti-neurofilament 200. En (d) els agrupaments de nAChR van ser marcats fluorescentment amb α -bungarotoxina conjugada amb rodamina. En la imatge (e) s'observa la colocalització dels dos marcatges. Barra d'escala = 10 μ m.

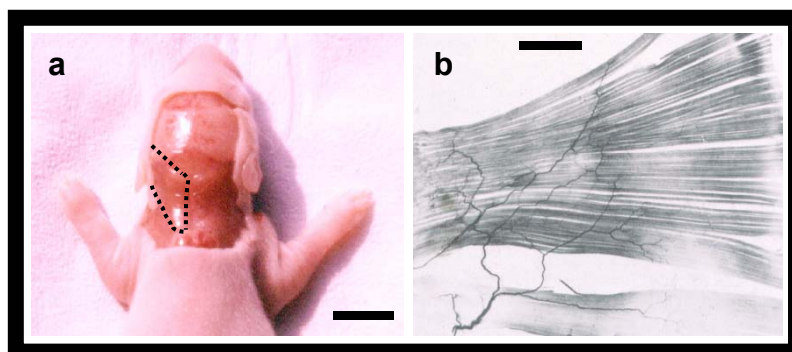


Figura 6. Situació anatòmica del múscul LAL en una rata P8. Impregnació argèntica del múscul LAL. (a) Rata de 8 dies de vida (P8) on s'ha marcat amb línies discontinües la posició que ocupa el múscul LAL. Barra d'escala = 1 cm. (b) Preparació histològica, impregnació argèntica de Gros-Bielschowsky, on s'observa el múscul LAL sencer juntament amb la seva innervació (Angaut-Petit i col., 1987) . Barra d'escala = 1.2 mm.

2.2.2 Diafragma

El múscul diafragma és un múscul prim i pla amb la zona d'innervació molt definida. Aquestes característiques fan que sigui un múscul molt utilitzat en estudis d'electrofisiologia per la fàcil localització de fibres musculars individuals i de sinapsis aïllades. D'altra banda, el patró d'innervació que presenta permet separar les àrees sinàptiques de les extrasinàptiques amb relativa facilitat. El diafragma és un múscul esquelètic que forma una paret entre el tòrax i l'abdomen i és el múscul principal que produeix els moviments respiratoris. Per la part anterior té la seva inserció en la vorera costal. Està constituït per una porció muscular perifèrica (part costal) i una d'aponeuròtica central en forma de trèvol (De Troyer i col., 1981; Pickering i Jones James, 2002). És un múscul molt actiu format per fibres mixtes, fibres tipus I i IIa (lentes i ràpides, unitats motores resistents a la fatiga, i petites), i tipus IIx6 i IIb, ràpides, i més grans que les anteriors i ràpidament fatigables (les més grans) (Sieck i Prakash, 1997; Ermilov i col., 2007). Està innervat pel nervi frènic que procedeix dels segments cervicals C3-C5 de la medulla espinal i descendeix pel tòrax fins al diafragma, on allí, al mig del diafragma, es divideix en dos per innervar els dos hemidiafragmes que el formen. La innervació de cada hemidiafragma és en forma d'arborització que s'inicia a la part central i interna i allí es divideix en tres branques, una cap a la part anterior i dos cap a la posterior i, des de cada una d'aquestes hi surten diferents branques més petites, innervant d'una forma massiva, en forma d'arbre, la part externa que és on es formen les diferents sinapsis, definint una zona d'innervació molt ben delimitada.

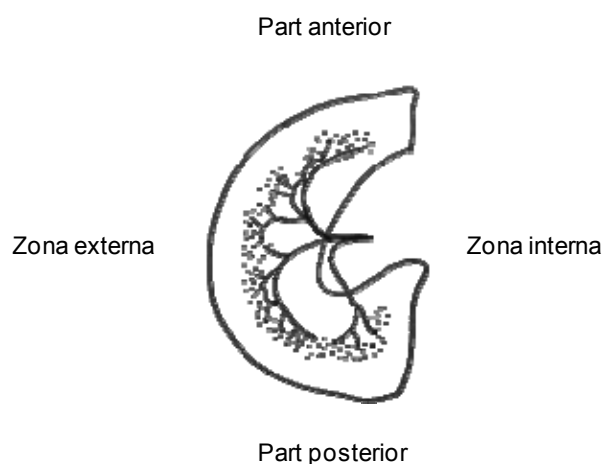


Figura 7. Esquema de la innervació d'un hemidiafragma (Adaptació de Comerford i Fitzgerald, 1986).

2.2.3 Músculs de les extremitats posteriors

En alguns experiments de Western blot s'ha utilitzat la musculatura de les extremitats posteriors, tant de rata com de ratolí. Aquest model s'ha utilitzat per a l'obtenció de proteïna que prové de múscul esquelètic. És una manera fàcil d'obtenir gran quantitat de múscul esquelètic, obtenint el conjunt de músculs, sense identificar-los ni separar-los un a un, i d'on s'aconsegueix suficient proteïna per fer els diferents estudis d'expressió proteica que s'han de realitzar (s'expliquen més endavant), utilitzant així els mínims animals possibles.

2.2.4 Medul·la espinal

Un altre model experimental utilitzat va ser la medul·la espinal. Concretament, es va utilitzar la regió ventral perquè en aquesta regió de la medul·la espinal on s'hi troben els somes de les motoneurons que innerven la musculatura esquelètica. Aquest model es va utilitzar només per realitzar diferents controls.

La medul·la espinal presenta la forma d'una tija cilíndrica de color blanquinós i un pes mig de 0.43 g en rates de 100 g de pes, 0.58 g en rates de 200 g. Els somes neuronals o matèria gris, a diferència de l'encèfal, es troba a la regió central, trobant-se la matèria blanca o fibres nervioses situades perifèricament. La medul·la espinal i la columna vertebral presenten la següent relació topogràfica: el primer segment toràcic acaba a l'última vèrtebra cervical, el primer segment lumbar comença al final de la desena vèrtebra toràcica i l'últim segment lumbar acaba al terç cranial de la primera vèrtebra lumbar. La regió sacra va des de la primera a la tercera vèrtebra lumbar, i d'aquí la regió coccígea que arriba fins a la quarta vèrtebra lumbar. La forma de la medul·la espinal és diferent en funció de la regió en que es troba. Així, la medul·la espinal cervical presenta una forma elíptica en secció transversal, les parts toràciques i lumbars presenten una secció circular i la regió coccígea és sempre quadrada. De la mateixa manera, també varia, en funció de la regió anatòmica, la quantitat i disposició de la matèria gris medul·lar. Les motoneurons que innerven els músculs esquelètics es troben localitzades a la regió ventral de la medul·la espinal, existint una distribució topogràfica relativament específica de les motoneurons dins d'un mateix segment. Aquesta distribució topogràfica està determinada en funció dels músculs individuals i

compartiments musculars que innerven (McHanwell i Biscoe, 1981; Nicolopoulos-Stournaras i Iles, 1983; Iliya i Dum, 1984; Weeks i English, 1985; Peyronnard i col., 1986; Balice-Gordon i Thompson, 1988; Ishihara i col., 1995). Prenent com exemple els segments lumbosacres de la medul·la espinal, les motoneurons que innerven els músculs de les extremitats inferiors es troben localitzades a la subregió retrodorsolateral de la regió ventral mentre que les motoneurons que innerven els músculs perineals es troben localitzades a la subregió dorsal de la regió ventral (Schroder, 1980).

3. Metodologies utilitzades

3.1 Obtenció de músculs esquelètics de rata i ratolí

3.1.1 Dissecció del múscul LAL

Una vegada l'animal s'anestesia i es sacrifica amb una injecció letal de TBE, com s'ha descrit a l'apartat d'animals (apartat 1), es col·loca de bocaterrosa sobre un suport de suro, fixat per les extremitats anteriors i les posteriors el que facilita la dissecció del múscul.

Abans d'iniciar la dissecció muscular pròpiament dita, l'animal ha de ser afaitat amb molta cura (zona dorsal del cap) en cas de que tingui pèl. En tindran aquells animals d'edat major a P10. Una vegada s'ha afaitat l'animal es retira la pell de la zona dorsal del cap fins al nas de l'animal. A continuació s'aïlla tot el paquet muscular que es troba des de la superfície fins la calota. L'abordatge del múscul es fa col·locant tot el paquet muscular extret en una placa de petri amb base de Sylgard^R i amb solució salina de Ringer normal oxigenada amb 95% O₂ i 5% de CO₂. Amb l'ajut d'agulles entomològiques, es col·loca estirat de manera que la cara interna del paquet muscular quedi dirigida cap a dalt. D'aquesta manera, el múscul LAL serà l'últim múscul que es trobarà. La dissecció del múscul es realitza sota una lupa esteroscòpica (d'un a sis augments). Es realitza l'abordatge del múscul separant i extraient cada feix muscular fins a visualitzar l'últim múscul del paquet, que és el múscul LAL. D'aquesta manera, es garanteix la conservació de les seves insercions i del seu nervi. Una vegada el múscul LAL està aïllat, es retira tot el teixit connectiu que l'envolta amb molta cura de no malmetre les fibres musculars. En alguns experiments, es retallen les fibres musculars

Material i Mètodes

pels extrems per a impedir que hi hagi contracció muscular a l'estimular el nervi elèctricament.

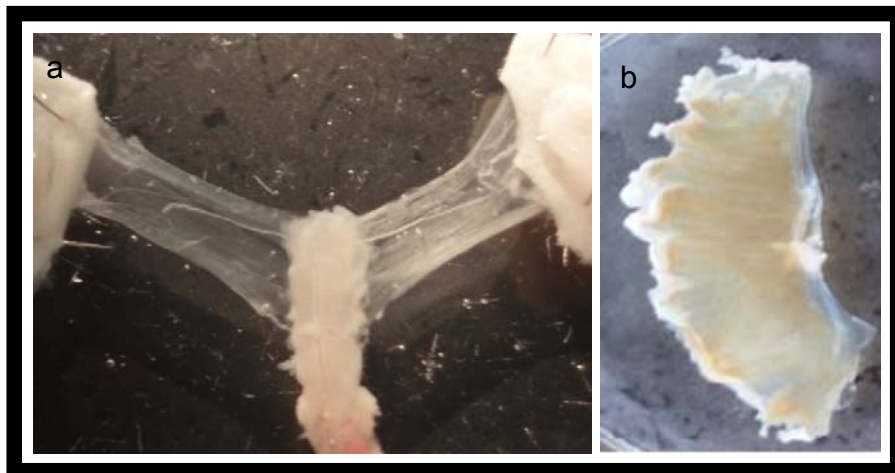


Figura 8. Imatge del múscul LAL i de l'hemidiafragma. (a) Múscul LAL. (b) Múscul hemidiafragma.

3.1.2 Dissecció del múscul Diafragma

L'animal s'anestesia de la forma descrita anteriorment. Per a l'obtenció del múscul diafragma es fa una primera extracció en bloc del tòrax i de la part superior de l'abdomen i s'introdueix en una solució de Ringer normal oxigenada amb 95% O₂ i 5% CO₂. Tot seguit, primer a ull nu i després sota la lupa, es passa a fer la dissecció de l'hemidiafragma i del nervi frènic, si s'han de fer experiments d'electrofisiologia i/o estimulació elèctrica, o es dissequen els dos hemidiafragmes sols si l'experiment a realitzar són incubacions amb drogues per a la posterior extracció proteica. S'introdueix el bloc extret sobre una placa de petri amb una base de Sylgard^R i amb Ringer oxigenat. Es col·loca de manera que quedi amb el cartílag xifoides dirigit cap a dalt i es fixa amb l'ajut d'agulles entomològiques. S'aborda el múscul per la part superior per no provocar cap lesió. Es comença traient la columna i l'estèrnum i així s'observen els òrgans que queden dins la caixa toràcica, el cor, els pulmons, el timus. Amb cura de no fer cap estirament ni del múscul ni del nervi, es separen tots els òrgans i també les costelles fins a aïllar el diafragma i el nervi que l'innerva. Una vegada es té el múscul aïllat, depenent de l'experiment a realitzar, es retallen les fibres musculars fins que no hi hagi contracció quan s'estimuli el múscul. Durant tota la dissecció s'ha de mantenir el múscul amb vida,

així que es va canviant periòdicament (cada 15 minuts) el Ringer de la placa on s'està treballant per Ringer oxigenat.

3.1.3 Dissecció dels músculs de les extremitats posteriors

Es sacrifica l'animal de la forma habitual, amb TBE i exsanguinació. Es separen les extremitats posteriors, amb l'ajut de pinces i tisores. Es treu la pell i es procedeix a dissecar els músculs. No es diferencia entre els diferents músculs que componen l'extremitat, sinó que es fa una extracció conjunta, de tots els músculs esquelètics de l'extremitat. A mesura que es dissequen, es fiquen en un tub eppendorf amb PBS en fred i es guarden a -80°C per a la seva posterior utilització.

3.1.4 Extracció i obtenció de la regió ventral de la medul·la espinal

Després de l'anestèsia de l'animal es procedeix a l'exanguinació d'aquest i es fixa sobre una superfície de suro. Es realitza una incisió en la regió dorsal de l'animal per poder accedir a la columna vertebral. Una vegada tenim la columna exposada es procedeix a l'extracció d'aquesta. Sempre amb molta precisió per tal de no lesionar la medul·la espinal es procedeix a tallar l'os de la columna, per tal d'extreure la medul·la de la caixa òssia on es troba localitzada. Una vegada aïllada la medul·la espinal es procedeix a la separació de la regió ventral i la dorsal, descartant aquesta última regió i seleccionant la regió ventral, ja que és en aquesta regió on es troben localitzades les neurones motores.

Taula 2. Material utilitzat en l'obtenció dels diferents músculs

Material utilitzat en l'obtenció dels diferents músculs
TBE; Tribromoetanol (Sigma) al 2% w/v (anestèsic)
PBS (<i>Phosphate Buffered Saline</i>); 2.7 mM KCl, 1.5 mM KH_2PO_4 , 140 mM NaCl, 8.1 mM Na_2HPO_4 a pH 7.4
Ringer; 137 mM NaCl, 5mM KCl, 2mM CaCl_2 , 1mM MgSO_4 , 12mM NaHCO_3 , 1 mM Na_2HPO_4 i 11mM de Glucosa pH 7.3
Plaques de petri de vidre amb Sylgard ^R (polímer sintètic comercial)
Material de dissecció i lupa

3.2 Tractaments

3.2.1 Estimulació elèctrica

Per a la realització del tractament d'estimulació elèctrica del múscul esquelètic s'han utilitzat els músculs LAL i hemidiafragma. Una vegada s'ha realitzat la dissecció del nervi i del múscul es fica el múscul en una camareta de registre, amb Ringer oxigenat que es va renovant cada 15 minuts durant els 30 minuts que dura el tractament. Una vegada col·locat el nervi entre els elèctrodes es mira el llinar d'estimulació amb el qual el múscul es contrau. Aquest número multiplicat per 3 és el que s'utilitza com la intensitat per fer l'estímul del múscul durant 30 minuts a 1 Hz. Els músculs control es processen de la mateixa manera però no s'aplica l'estímul elèctric. A l'inici i al final dels 30 minuts del tractament es confirma que el múscul es manté viu comprovant que es contrau al tocar feblement el nervi. Un grup de músculs es processa de la mateixa manera però s'evita la contracció tallant les fibres musculars bastant al límit de la zona d'innervació. Abans d'iniciar el temps d'estimulació es fan rentats de Ringer durant 1 hora amb la finalitat de netejar allò que el múscul ha secretat al ser tallat.

3.2.2 Tractaments per modificar l'activitat de la PKC - Incubacions

Per a la realització d'aquests tractaments del múscul *ex vivo* s'han utilitzat els músculs LAL i hemidiafragma. Una vegada dissecats el nervi i el múscul s'immobilitzen en una camareta de registre i s'incuben en una solució de Ringer oxigenat amb el compost utilitzat en cada tractament: PMA 10 nM (activador de la proteïna quinasa C), Calfosteïna C (CaC) 10 μ M (inhibidor de la proteïna quinasa C) i calci 5 mM. Les incubacions es realitzen de 30 minuts i a l'inici i al final d'aquests es confirma que el múscul es manté viu comprovant que es contrau al tocar feblement el nervi. La concentració final de DMSO (solvent) en el control i en les preparacions dels diferents tractaments realitzats era 0.1% (V/V). En experiments control, aquesta concentració de DMSO s'ha comprovat que no afecta a cap dels paràmetres estudiats.

3.2.3 Tractaments per modificar l'activitat de la PKC - Injeccions subcutànies

Per a la realització dels tractaments amb els músculs *in toto* s'ha utilitzat el múscul LAL per les seves característiques anatòmiques ja descrites anteriorment. Els tractaments es realitzen mitjançant una injecció subcutània de calfosteïna C (CaC) 200 nM sobre la superfície del múscul LAL. La dosi i el protocol de subministrament van ser descrits i utilitzats anteriorment (Lanuza i col., 2001, 2002).

Una vegada l'animal està anestesiàt es procedeix a la separació del teixit connectiu subdèrmic injectant subcutàniament aire a l'àrea anatòmica on es localitza el múscul LAL, de 25 a 100 µl d'aire depenent de l'edat de l'animal. D'aquesta manera, es crea una butllofa d'aire ben delimitada sobre la superfície externa del LAL. A continuació es procedeix a la injecció del compost administrat en solució salina (PBS). El volum injectat depèn de l'edat de l'animal (25-100 µl). Els animals reben una injecció diària des del dia P4 (dia postnatal 4) i els músculs s'estudien els dies P6 i P8.

Es realitzen controls per assegurar que les solucions injectades recobreixen completament la superfície del múscul LAL i que romanen en el lloc com a mínim dues hores abans de ser absorbides pel sistema vascular. S'injecta el marcador vital blau de metilè, seguint el procediment anterior. Passades 2 hores es fa la dissecció dels músculs LAL tractats amb blau de metilè i es fa el muntatge sobre un portaobjectes amb glicerol, podent observar que el marcador vital és present i està distribuït per tota la superfície del múscul.

Degut a que la injecció en si mateixa pot produir reaccions inflamatòries o d'altres reaccions tòxiques, es tenyeixen amb blau de toluidina al 0.5% músculs control i músculs tractats, i no s'observa cap signe histopatològic de lesió muscular o regeneració. També es realitzen preparacions histològiques permanents, talls semifins d'1 µm de gruix (tres músculs per cada edat i per condició experimental). No s'observa cap signe de patologia muscular (hemorràgia, necrosi o signes de regeneració) en aquestes preparacions. L'àrea i el diàmetre de les fibres musculars quantificades en treballs experimentals previs es van analitzar fent servir un morfòmetre MOP-Videoplan Kontron 2000 connectat a una càmera de vídeo en color. No es van detectar diferències entre les fibres control i les tractades (Lanuza i col., 2001) el que assegura que la CaC injectada no produeix cap reacció tòxica.

Taula 3. Material utilitzat per a la realització dels diferents tractaments

Material utilitzat per a la realització dels diferents tractaments
Ringer; 137 mM NaCl, 5mM KCl, 2mM CaCl ₂ , 1mM MgSO ₄ , 12mM NaHCO ₃ , 1 mM Na ₂ HPO ₄ i 11mM de Glucosa pH 7.3
PBS (<i>Phosphate Buffered Saline</i>); 2.7 mM KCl, 1.5 mM KH ₂ PO ₄ , 140 mM NaCl, 8.1 mM Na ₂ HPO ₄ a pH 7.4
Camareta de registre
Sistema de bombolleig per oxigenar el Ringer
Sistema d'estimulació elèctrica
PMA (activador de la proteïna quinasa C) 10 nM
CaC (inhibidor de la proteïna quinasa C) 200 nM /10 μM
Calci 5 mM
2,2,2-Tribromoethanol (Sigma) al 2% w/v
Blau de metilè
Portaobjectes (Thermo scientific Menzel-Gläser)
Cobreobjectes (Hirschmann Laborgerate)
Glicerol (Panreac)
Lupa i Microscopi òptic
Blau de Toluïdina 0.1%
Tot el material necessari per obtenir talls semifins (veure microcòpia electrònica)
MOP-Videoplan Kontron 2000 – càmera de vídeo en color

3.3 Anticossos

3.3.1 Producció d'anticossos fosfo-específics

Es van generar anticossos contra el lloc específic de fosforilació per part de la PKA i de la PKC. Es van utilitzar fosfopolipèptids sintètics per millorar la possibilitat de producció d'anticossos contra els epítops fosforilats vs els no fosforilats. Donat que les seqüències a prop del lloc de fosforilació en serina són bastant homòlogues en les diferents espècies, es van escollir seqüències d'aminoàcids amb una alta homologia amb les seqüències diana de fosforilació per PKA i PKC en Torpedo i pollastre (Huganir i col., 1984; Safran i col., 1986, 1987, 1990; Souroujon i col., 1986; Nimnual i col., 1998). La subunitat δ dels nAChR és fosforilada per la PKC i la subunitat ε ho és per la PKA. Les

seqüències dels pèptids sintètics contra les quals reaccionen els diferents anticossos són les següents:

- δAChR (subunitat delta del receptor d'acetilcolina),
 - el pèptid no fosforilat; ³⁷⁶TAKAEEYFSLKSRSDLMFEKQSERC
 - el pèptid fosforilat; ³⁷⁶TAKAEEYFSLKS(PO₃)RS(PO₃) DLMFEKQSERC
- εAChR (subunitat epsilon del receptor d'acetilcolina),
 - el pèptid no fosforilat; ³⁶⁴RTASPARRASSVGILLRAEELC
 - el pèptid fosforilat; ³⁶⁴RTASPARRAS(PO₃) SVGILLRAEELC

Una vegada sintetitzats els pèptids, es realitza el protocol corresponent per a la producció d'anticossos contra aquests pèptids en conills (Covance, Princeton (NJ) USA), (http://www.covance.com/abservices/sample_protocols.php). Els fosfopèptids sintètics produïts, de 22-25 aminoàcids, són suficientment llargs per obtenir una bona resposta immunològica, però, a l'hora, suficientment curts per focalitzar la resposta immune en els residus fosforilats. Es va unir cada fosfopèptid a una proteïna transportadora (KLH, de l'anglès *keyhole limpet hemacyanin*) i es van immunitzar dos conills amb el fosfopèptid de la subunitat delta dels nAChR i dos conills amb el fosfopèptid de la subunitat epsilon dels nAChR per preparar l'antisèrum policlonal.

Una vegada es van obtenir els sèrums dels animals, els diferents anticossos específics es van purificar mitjançant columnes d'afinitat. Es van generar dues columnes: (1) La columna d'afinitat negativa, amb boles d'agarosa lligades amb el pèptid no fosforilat, per a que s'uneixin específicament a ell els anticossos anti-pèptid no fosforilat. (2) La columna d'afinitat positiva, amb el pèptid fosforilat unit a les boles d'agarosa per a que s'uneixin els anticossos anti-pèptids fosforilats. Els anticossos no fosforilats es van aïllar per cromatografia d'afinitat utilitzant la columna d'afinitat negativa. Els anticossos que no reconeixien el grup fosfat eren retinguts a la columna 1, mentre que els anticossos per als quals el fosfat és una part essencial de l'epítop van fluir a través d'aquesta columna. Amb la utilització d'una placa d'ELISA on s'ha unit el pèptid no fosforilat, es van testar les mostres següents: Sèrum, material no fosforilat unit a la columna 1 i material no fosforilat no unit a la columna 1, per tal de determinar quant de material no fosforilat no s'ha unit a aquesta columna. Els resultats van mostrar que menys del 1% d'anticossos no fosforilats eren presents en el material no unit a la columna d'afinitat negativa.

El material no unit a la columna d'afinitat del pèptid no fosforilat (columna 1) es va fer passar per la columna d'afinitat positiva (columna 2) i el material unit va ser eluït obtenint-se els anticossos fosfoespecífics. Cal destacar que els anticossos específics per les seqüències no fosforilades van ser sotmesos només a un pas de purificació (unió a la columna del pèptid no fosforilat) i, en canvi, per a l'obtenció dels anticossos fosfoespecífics es van realitzar tant passos de purificació positius com negatius [no units a la columna del pèptid no fosforilat (columna 1) i unió a la columna del pèptid fosforilat (columna 2)].

3.3.2 Anticossos comercials

A continuació es detallen els anticossos comercials que s'han utilitzat, a la taula 4 els anticossos primaris i a la taula 5 els secundaris.

Taula 4. Anticossos primaris

Anticòs	Espècie	Casa Comercial	Dilució	Tècnica
PKC α	Rb	SC	1/100	IHQ/WB
PKC α	Ms	TL	1/100	IHQ/WB
PKC β I	Rb	SC / TL	1/100	IHQ/WB
PKC β II	Rb	SC / TL	1/100	IHQ/WB
PKC γ	Rb	SC / TL	1/100	IHQ/WB
PKC γ	Ms	TL	1/100	IHQ/WB
PKC ϵ	Rb	SC / TL	1/100	IHQ/WB
PKC δ	Rb	SC / TL	1/100	IHQ/WB
PKC μ	Rb	SC / TL	1/100	IHQ/WB
PKC θ	Rb	SC	1/100	IHQ/WB
PKC θ	Ms	TL	1/100	IHQ/WB
PKC ζ	Rb	SC / TL	1/100	IHQ/WB
PKA RII α	Rb	SC / TL	1/100	IHQ/WB
PKA RI	Rb	SC / TL	1/100	IHQ/WB
PKA C α	Rb	SC / TL	1/100	IHQ/WB
PKA C β	Rb	SC / TL	1/100	IHQ/WB
Syntaxina	Ms	Sigma	1/1,000	IHQ
Neurofilament 200	Ms	Sigma	1/1,000	IHQ

Taula 4 (continuació)

Anticòs	Espècie	Casa Comercial	Dilució	Tècnica
S100	Ms	Abcam	1/1,000	IHQ
MHC	Ms	DSHB	1/1,000	WB
VACht	Gt	Chemicon	1/100	WB
β Actina	Gt	SC	1/2,000	WB
GAPDH	Gt	SC	1/100	WB
Serp PKC substrat	Rb	Cell Signalling	1/1,000	WB
Serp	Ms	Qiagen	1/1,000	WB
Rapsyn	Ms	Acris	1/500	WB
Rapsyn	Gt	SC	1/100	IHQ
MuSK	Rb	Acris	1/500	WB
MuSK	Gt	SC	1/100	IHQ
Utrophin	Rb	SC	1/100	IHQ
AChR δ	Gt	SC	1/100	WB
AChR $\delta\rho$ (N4129)	Rb	Pp (Covance)	1/100	IHQ/WB
AChR δ (HL4129)	Rb	Pp (Covance)	1/100	IHQ/WB
AChR $\epsilon\rho$ (N4136)	Rb	Pp (Covance)	1/100	IHQ/WB
ρ PKC(pan)	Rb	Cell Signalling	1/1,000	WB
ρ PKC α Ser 657	Rb	Upstate	1/1,000	WB

Rb- Conill; Ms- Ratolí; Gt- cabra; Dk- ruc; Sp- ovella

IHQ- Immunohistoquímica; WB- Western blot

SC- Santa Cruz; TL- Transduction laboratories; DSHB- Developmental Studies Hybridoma Bank, University of Iowa, Iowa City, IA; PP (Covance)- Producció pròpia (Covance).

Taula 5. Anticossos secundaris

Espècie	Diana	Conjugat	Casa Comercial	Dilució	Tècnica
Dk	Rb	Alexa fluor 488	MP	1/300	IHQ
Dk	Rb	Alexa fluor 488	MP	1/300	IHQ
Dk	Ms	Alexa fluor 488	MP	1/300	IHQ
Dk	Gt	Alexa fluor 488	MP	1/300	IHQ
Dk	Rb	TRICT	JI	1/300	IHQ
Dk	Ms	TRICT	JI	1/300	IHQ
Dk	Rb	Alexa fluor 647	MP	1/300	IHQ
Dk	Ms	Alexa fluor 647	MP	1/300	IHQ
*	α -BTX	TRICT	JI	1/300	IHQ
*	α -BTX	Alexa fluor 647	MP	1/300	IHQ
Dk	Rb	HRP	JI	1/5,000	WB
Sp	Ms	HRP	Amersham	1/25,000	WB
Dk	Ms	HRP	JI	1/5,000	WB
Rb	Gt	HRP	MP	1/2,500	WB

Rb- rabbit; Ms- mouse; Gt- goat; Dk- donkey; Sp- sheep

IHQ- Immunohistoquímica; WB- Western blot

MP- Molecular Probes; JI- Jackson ImmunoResearch

HRP- Horseradish Peroxidase ; TRICT- tetramethylrhodamine

* - la α -BTX s'utilitza temporalment en la tècnica d'IHQ com un anticòs secundari però no ho és.

3.3.2.1 Caracterització d'alguns dels anticossos comercials utilitzats

S'han testat diferents anticossos contra les isoformes clàssiques de la PKC:

- Anticòs policlonal de conill contra PKC α (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA); anticòs realitzat contra un pèptid sintètic (aa 651-672) que correspon a la seqüència del qual es localitza a la part C-terminal de la PKC α d'origen humà.

- Anticòs monoclonal contra PKC α (Transduction Laboratories, BD, Lexington, KY, USA); anticòs realitzat contra un pèptid sintètic (aa 270-427) que correspon a la seqüència de la PKC α d'origen humà.

- Anticòs policlonal de conill contra PKC β I (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA); anticòs purificat per afinitat realitzat contra un pèptid sintètic (aa 656-671) que correspon a la seqüència del qual es localitza a la part C-terminal de la PKC β I d'origen humà.

- Anticòs policlonal de conill contra PKC β II (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA); anticòs purificat per afinitat realitzat contra un pèptid sintètic (aa 657-673) que correspon a la seqüència del qual es localitza a la part C-terminal de la PKC β II d'origen humà.

- Anticòs policlonal de conill contra PKC γ (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA); anticòs purificat per afinitat realitzat contra un pèptid localitzat en la part C-terminal de la PKC γ d'origen humà. Anticòs monoclonal contra PKC γ (Transduction Laboratories, BD, Lexington, KY, USA); anticòs realitzat contra un pèptid sintètic (aa 676-689) que correspon a la seqüència de la PKC γ d'origen humà.

La caracterització de diferents anticossos contra cPKCs ha estat testada per Western blot i Slot blot. Els anticossos utilitzats contra les isoformes β I, β II i γ només reconeixen la proteïna corresponent i no fan una reacció creuada entre les isoformes detectades. Per altra banda, els anticossos contra la isoforma α també reconeixen les isoformes β I i β II.

Anticossos contra les subunitats de la PKA:

- Anticòs policlonal de conill contra PKA RII α (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA); anticòs purificat per afinitat realitzat contra un pèptid la seqüència del qual es localitza a la part C-terminal de la PKA RII α d'origen murí.

- Anticòs policlonal de conill contra PKA RI (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA); anticòs purificat per afinitat realitzat contra un pèptid la seqüència del qual es localitza a la part C-terminal de la PKA RI d'origen humà.

- Anticòs policlonal de conill contra PKA C α (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA); anticòs purificat per afinitat realitzat contra un pèptid la seqüència del qual es localitza a la part C-terminal de la PKA C α d'origen humà.

- Anticòs policlonal de conill contra PKA C β (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA); anticòs purificat per afinitat realitzat contra un pèptid la seqüència del qual es localitza a la part C-terminal de la PKA C β d'origen humà.

Els anticossos comercials existents per a la detecció de les subunitats catalítiques no són completament específics per la subunitat específica per cada un d'ells sinó que també en reconeixen d'altres. L'anticòs contra la subunitat C α també reconeix la C β , i el C β reconeix la subunitat C α . Així, cada anticòs reconeix les dues subunitats catalítiques però amb més especificitat per la subunitat α o β , respectivament. Pel que fa als anticossos per a les subunitats reguladores, no diferencien entre α i β però no hi ha creuament entre les subunitats reguladores de tipus I i II.

Altres anticossos com:

- Anticòs de conill contra substrats de cPKC fosforilats (*anti-phospho-cPKC substrate* de Cell Signaling Technology, Beverly, MA) que detecta nivells endògens de moltes proteïnes cel·lulars només quan són fosforilades en residus serina envoltats per Arg o Lys en les posicions -2 i +2 i un residu hidrofòbic en la posició +1. Aquest anticòs no reacciona amb residus serina no fosforilats, ni amb un residu treonina fosforilat en el mateix motiu, o amb residus de serina fosforilats en altres motius. Anticòs que reconeix la seqüència d'aminoàcids: H-Lys-Arg-Pro-phosphoSer-Gln-Arg-His-Gly-Ser-Lys-Tyr-NH₂.

- Anticòs Phospho-PKC (pan) (β II Ser660) (de Cell Signaling Technology, Beverly, MA) detecta nivells endògens de les isoformes PKC α , β I, β II, δ , ϵ , η i θ només quan es fosforila el residu carboxi terminal homòleg a la serina 660 de PKC β II, aquest no detecta PKC fosforilades en altres llocs. Anticòs realitzat contra el pèptid sintètic DQNEFAGSYTNPC.

- Anticòs de conill anti-phospho-PKC α (Ser657) de Upstate (Lake Placid, NY), aquest detecta PKC α de ratolí, rata i humana fosforilats en la Ser 657. Anticòs realitzat contra un pèptid sintètic (aa 654-663) que correspon a la seqüència del qual es localitza a la PKC α .

- Anticòs policlonal de cabra contra GAPDH d'Imgenex (San Diego, CA); realitzat contra un pèptid sintètic amb una seqüència d'aminoàcids HQVVSSDFNSDT de la part C-terminal de la seqüència de la proteïna d'acord amb NP_002037.

També s'han utilitzat anticossos per detectar les diferents parts de la NMJ:

Per detectar el terminal nerviós s'utilitzen conjuntament l'anticòs contra Sintaxina de conill o de ratolí i l'anticòs contra Neurofilament 200 de conill o de ratolí (Sigma, St Louis, MO), i per detectar la cèl·lula de Schwann l'anticòs contra S-100 de conill (Dako, Carpinteria, CA) o de ratolí (Acris Antibodies GmbH Herford, Germany).

Anticossos secundaris de ruc conjugats amb Alexa Fluor 488 i Alexa Fluor 647 es van obtenir de Molecular Probes (Eugene, OR). Els receptors d'acetilcolina postsinàptics (nAChR) van ser detectats amb α -bungarotoxina conjugada amb TRICT de Molecular Probes (Eugene, OR). Anticossos secundaris contra cabra (Molecular Probes), conill (Jackson Immunoresearch) i ratolí (Amersham i Jackson Immunoresearch) conjugats amb peroxidasa de rabe (HRP).

Com a control, s'elimina l'anticòs primari tant de la immunohistoquímica com del Western blot. Els músculs control no van mostrar marca positiva ni es va revelar cap banda en cap de les dues tècniques. En protocols de doble marcatge, eliminant un o altre anticòs primari s'elimina la marca per complet i no hi ha creuament amb altres anticossos. La preabsorció dels anticossos primaris amb un pèptid bloquejant específic (Santa Cruz i Transduction Laboratories, BD) fa que no hi hagi marca de l'anticòs corresponent a la immunohistoquímica ni bandes del pes molecular esperat als Westerns.

3.4 Obtenció de proteïnes cel·lulars a partir de músculs esquelètics de rata i ratolí (LAL, Diafragma, extremitats posteriors i medul·la espinal)

3.4.1 Obtenció de proteïnes totals

L'obtenció de proteïnes totals del teixit muscular es fa a partir de músculs dissecats, com s'ha explicat en l'apartat 3.1. Els músculs s'homogeneïtzen mitjançant un homogeneïtzador "automàtic" o amb un de manual de vidre, en un tampó d'homogeneïtzació amb una relació d'1 g de teixit per 5 ml de tampó (20% w/v). Una vegada s'obté l'homogenat, es centrifuga a 6.000 g, 10 minuts a 4°C, per separar els components de la matriu extracel·lular i les restes cel·lulars no homogeneïtzades de la resta. Es descarta el precipitat resultant i el sobrenedant, que és el que conté les proteïnes totals d'interès, es guarda a -80°C per una futura utilització.

3.4.2 Obtenció de proteïnes subcel·lulars, de citosol i de membrana

Per a l'obtenció d'aquestes fraccions de proteïna es parteix dels extractes proteics totals com s'ha descrit anteriorment. L'extracte de proteïna total es centrifuga 1 hora a 95.000 g a 4°C amb la utilització d'una ultracentrífuga. El sobrenedant resultant conté les proteïnes solubles, les del citosol i el pèl·let conté les proteïnes de membrana. Per a l'obtenció d'aquestes últimes s'afegeix de 100 a 400 µl del tampó d'homogenització més tritó al 1% (volum que depèn del pèl·let que n'ha resultat), s'incuba 1 hora en gel abans de resuspendre-les. Es guarden també a -80°C.

3.4.3 Obtenció de proteïna total i subcel·lular, de la part sinàptica i extrasinàptica del múscul diafragma

El procés d'obtenció de proteïna total i subcel·lular és idèntic al que s'acaba d'explicar en els dos apartats anteriors (3.4.1 i 3.4.2), encara que en aquest cas no es parteix de tot el múscul diafragma, sinó que abans es fa una separació de la zona sinàptica (zona d'innervació que queda molt ben delimitada) i de la zona extrasinàptica (zona lliure de teixit nerviós). La separació es fa sota una lupa i s'ha comprovat que totes les sinapsis i recorreguts nerviosos queden dins de la zona anomenada sinàptica.

Per realitzar aquest control, es fa una tinció del múscul amb α -bungarotoxina (α -BTX) marcada amb rodamina (queden marcats els receptors d'acetilcolina postsinàptics) i posteriorment es fa la separació de la zona sinàptica de la zona extrasinàptica i després es munta la mostra i s'observa sota un microscopi de fluorescència. Una vegada estan les dues parts separades es processa de la mateixa manera que s'ha explicat anteriorment.

3.5 Quantificació de la proteïna obtinguda

Per valorar la quantitat de proteïna obtinguda s'ha utilitzat el mètode *DC Protein Assay* de BioRad. *DC (detergent compatible) Protein Assay* consta d'un assaig colorimètric per a la determinació de la quantitat de proteïna en mostres que s'han solubilitzat utilitzant detergents. La reacció que té lloc és semblant a la que té lloc al mètode de Lowry (Lowry i col., 1951), però amb alguna modificació. Es segueixen les instruccions del mètode, s'afegeix un volum concret de les mostres a quantificar i, a més a més, s'afegeixen diferents reactius, també amb la quantitat exacta segons marca el protocol i, per últim, es llegeix l'absorbància a 750 nm. Juntament amb la preparació de les mostres a quantificar es prepara un recta patró amb una solució d'albúmina sèrica bovina (BSA). Tant les mostres com la recta patró es preparen per duplicat.

Taula 6. Material utilitzat en l'obtenció i quantificació de proteïnes

Material utilitzat en l'obtenció i quantificació de proteïnes
PBS (<i>Phosphate Buffered Saline</i>); 2.7 mM KCl, 1.5 mM KH_2PO_4 , 140 mM NaCl, 8.1 mM Na_2HPO_4 a pH 7.4
Tampó d'homogeneïtzació; 10 mM TrisHCl pH 7.5, 2 mM EDTA, 150 mM NaCl + Cocktail inhibidors de proteases (+1% tritó X100 o NP40)
Homogeneïtzador automàtic high-speed homogenizer; overhead stirrer, VWR International, Clarksburg, MD. Homogeneïtzador manual de vidre (Afora)
Centrífuga i ultracentrífuga
BSA; Albúmina sèrica bovina
Material de dissecció i lupa
Espectrofotòmetre

3.6 Detecció de proteïnes mitjançant electroforesi SDS-PAGE i Western blot

Les tècniques de detecció de proteïna es basen en la utilització d'anticossos específics per detectar i analitzar quantitativa o qualitativament la presència de certes proteïnes. La utilització combinada de l'electroforesi en gel de poliacrilamida SDS i la tècnica del Western blot permet detectar quantitativament la presència d'una proteïna o, inclús, l'estat de modificació post-transcripcional d'algunes proteïnes (estat de fosforilació, etc). El procés general consisteix en una separació en gel de diferents proteïnes d'una mostra heterogènia pel seu pes molecular. Les proteïnes separades es transfereixen a una membrana de PVDF o de nitrocel·lulosa on són immobilitzades i poden ser utilitzades per immunoblot amb anticossos específics. Mentre la separació de proteïnes per SDS-PAGE pot ser utilitzada per altres supòsits, en aquesta tesi ha estat utilitzat únicament per al Western blot i la posterior immunodetecció.

3.6.1 Preparació de mostres

L'electroforesi SDS-PAGE és una de les tècniques més utilitzades per a la separació de proteïnes segons el seu pes molecular (Laemmli, 1970). Les mostres de proteïna s'han de barrejar amb l'anomenat tampó de càrrega SLB (de l'anglès *Sample Laemmli Buffer*), el qual conté SDS, un detergent que confereix càrrega negativa a la proteïna proporcionalment al seu pes molecular. El SLB es prepara 5X (concentració stock) i es dilueix amb la mostra a una concentració final d'1X.

3.6.2 Electroforesi SDS-PAGE

La base de l'electroforesi de SDS-PAGE és que es poden separar les mostres que prèviament s'han preparat amb l'aplicació d'un camp elèctric en el gel. El gel està compost per una barreja d'acrilamida/bisacrilamida que forma com una xarxa. Amb presència de SDS, aquest interacciona amb les mostres de proteïna preparades anteriorment i, per les seves propietats, fa que la separació de les mostres en el gel sotmeses al camp elèctric sigui només dependent del seu pes molecular. El gel de poliacrilamida consta, en realitat, de dos gels diferents, amb un % de poliacrilamida i un pH diferent, són el gel separador i el gel apilador.

El gel apilador, el de baix % de poliacrilamida i baix pH, serveix per apilar les proteïnes abans de que entrin al gel separador. Les proteïnes corren ràpidament per aquest gel ja que conté un 5% de poliacrilamida.

El gel separador és el gel en el que les proteïnes es separaran segons el seu pes molecular. El % de poliacrilamida és variable depenent del pes molecular de les proteïnes que es vulguin separar i més tard detectar. Per a proteïnes de baix pes molecular (10-50 kDa) és millor utilitzar gels amb elevat % de poliacrilamida (12%) i per proteïnes d'elevat pes molecular (100-250 kDa) s'utilitzen gels d'un 7.5% de poliacrilamida. En els gels realitzats en aquesta tesi, s'ha utilitzat un % intermig, d'un 8% en tots els casos, que permet separar el rang dels pesos de les proteïnes del nostre interès. En tots els gels realitzats s'ha utilitzat un estàndard de pes molecular per controlar la separació de les proteïnes durant l'electroforesi.

En totes les electroforesis realitzades, s'ha utilitzat el sistema d'electroforesi Mini-Protean 3 (MP-3) de BioRad que és de fàcil manipulació i permet treballar amb volums de mostra relativament baixos (10-50 µl). S'ha utilitzat una barreja de poliacrilamida comercial (Pronadisa) juntament amb altres tampons i en presència d'APS (persulfat d'amoni) i TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine), com es descriu més endavant, que fa que la barreja polimeritzi i gelifiqui.

Així, una vegada s'han preparat les mostres que es volen analitzar, es preparen les gels amb el sistema MP-3, al % de poliacrilamida desitjat, es col·loca tot a la cubeta d'electroforesi, s'apliquen les mostres al gel amb la presència del marcador de pes molecular en un dels pous del gel, s'afegeix el tampó d'electroforesi (SDS-PAGE 1X), s'aplica el camp elèctric fixant el voltatge entre 90-100V i es deixa córrer fins que el front de càrrega arriba al final del gel. El temps que triga a córrer el gel dependrà del voltatge aplicat i del % de poliacrilamida del gel (1 hora i mitja aproximadament en un gel al 8% d'acrilamida i a un voltatge de 90 mV).

3.6.3 Western Blot

La tècnica del Western blot permet transferir les proteïnes separades en el gel a un suport més manipulable, com és una membrana de PVDF o de nitrocel·lulosa, que permetrà la posterior detecció de les proteïnes separades.

Així, en primer lloc es transfereixen les proteïnes del gel a la membrana. Per a la transferència es necessita del sistema de transferència, també en aquest cas MP-3. Es col·loca el gel, on hi ha les proteïnes separades, en un suport de plàstic porós anomenat "sandwich" de transferència. El "sandwich" té una part negra que indica el pol negatiu i una part transparent que indica el positiu. Per a la transferència cal que tot el material que s'utilitzi estigui degudament hidratat amb el tampó de transferència que es farà servir. Una vegada tot hidratat, a sobre de la part negra del "sandwich" es col·loca per ordre i amb molt de compte de que no es formin bombolles, una esponja (tipus espontex), un paper absorbent, el gel, la membrana degudament activada, un altre paper wattmann i una altra esponja, es tanca el "sandwich" i es col·loca al suport de transferència i a la cubeta de l'electroforesi seguint les polaritats. S'afegeix el tampó de transferència i també un bloc de gel per a refrigerar el sistema. Una vegada muntada la transferència, s'aplica un camp elèctric a un amperatge fix de 250 mA durant 1 hora.

Una vegada ha passat aquest temps, es desmunta el "sandwich" i s'obté la membrana a la qual s'han transferit les proteïnes. Ja està preparada per poder fer la immunodetecció.

3.6.4 Immunodetecció i revelat

Una vegada obtinguda la membrana on hi són les proteïnes separades, es fa la immunodetecció de la/es proteïna/es d'interès mitjançant anticossos primaris específics i anticossos secundaris contra els primaris. L'anticòs secundari ha d'estar conjugat amb peroxidasa de rabe (HRP) que després servirà per a la detecció de les proteïnes.

Abans d'incubar els anticossos es fa un bloqueig de la membrana per evitar unions inespecífiques de l'anticòs. Es fa durant 1 hora a temperatura ambient, com a mínim, amb tampó de bloqueig, TBS-T_{0.1} i 5% de llet desnatada en pols o sèrum d'albúmina bovina (BSA) (segons les indicacions de cada casa comercial per cada

anticòs). L'anticòs primari s'incuba a una dilució concreta amb el tampó de bloqueig, tota la nit a 4°C. Després es fan tres rentats de 5-7 minuts cada un amb TBS-T_{0,1} i es realitza la incubació amb l'anticòs secundari. La incubació és d'una hora i mitja a temperatura ambient a una dilució concreta amb el mateix tampó de bloqueig. Es repeteixen 3 rentats de 5-7 minuts i a continuació es fa el revelat de la proteïna. Per posar de manifest la proteïna desitjada s'utilitza ECL d'Amersham (ECL Advance Western Blotting Detection Kit) que és un mètode de detecció quimioluminiscent, és una barreja de Luminol i un potenciador del senyal, que reaccionen amb l'enzim que porta conjugat l'anticòs secundari, la peroxidasa de rabe. La reacció d'oxidació que té lloc dona com a resultat un substrat oxidat més l'emissió de llum. És aquesta llum la que es detecta amb el film de radiografia que després és revelat. També s'ha utilitzat un altre mètode de revelat de les membranes (VersaDoc de BioRad).

3.7 Slot blots

És una tècnica que s'ha utilitzat per a testar l'especificitat dels anticossos fosfoespecífics (anti-AChR δ fosforilat i no, i anti-AChR ε fosforilat).

Es col·loca una membrana de nitrocel·lulosa o PVDF, degudament activada, entre les dues peces de plàstic que componen l'aparell (PR 648 Slot Blot Manifold). A cada pou es fica la mostra, en aquest cas els pèptids específics (1-0.015 µg, quantitat a testar) i, amb l'ajut d'una bomba de buit, queden units a la membrana que s'ha situat per sota. De la mateixa manera que al Western blot, es bloqueja la membrana abans de realitzar la immunodetecció, amb tampó de bloqueig durant un mínim de 1 hora a temperatura ambient. Després del bloqueig, s'incuba amb l'anticòs primari, anticòs a testar, tota la nit a 4°C. Es realitzen tres rentats de 5-7 minuts amb TBS-T_{0,1} i s'incuba amb l'anticòs secundari durant una hora i mitja a temperatura ambient. Es realitzen de nou tres rentats amb TBS-T_{0,1} i es passa a fer el revelat de la mateixa manera que s'ha explicat en l'apartat anterior.

Taula 7. Material utilitzat en el Western Blot i Slot Blot

Material utilitzat en el Western blot i Slot blot
Aparell per fer el Slot Blot (PR 648 Slot Blot Manifold, GE Healthcare)
Aparell per fer el buit
Equip d'electroforesi, Mini Protean 3 (MP-3) de BIORAD
Font d'alimentació; Powerpac Mini power supply de BIORAD
Tampó de càrrega (SLB5X); 12.5% β -Mercaptoetanol, Tris 150 mM pH 6.8, 5% SDS i Indicador de Blau de Bromofenol
Marcador de pes molecular; Full-Range Rainbow Molecular Weight Markers, Amersham. MagicMark XP Western Protein Standard, Invitrogen
Gel Poliacrilamida; Acrilamida/Bisacrilamida (8.5%/5%), Tris HCl (1.5 M pH 8.8 i 0.5 M pH 6.8), SDS, β - mercaptoetanol i TEMED
Tampó d'electroforesi (SDS-PAGE); 25 mM Tris, 250 mM glicina, 0.1% SDS
Tampó de transferència; 25 mM Tris base, 192mM glicina, Metanol 20% (v/v) pH 8.3
Suport per fer la transferència, paper wattmann, esponja tipus espontex, bloc de gel (BioRad)
Membrana de PVDF (polyvinylidene fluoride) o de nitrocel·lulosa
TBS-T _{0.1} (<i>Tris buffered saline</i>); 10 mM Tris Cl, 150 mM NaCl pH7.5 + 0.01% Tween 20
Tampó de Bloqueig; 5% BSA/llet descremada en TBS-t
Ab 1aris; Anticòs diluït amb el tampó de bloqueig (mirar taula 4, apartat 3.3.2)
Ab 2aris; Anticòs diluït amb el tampó de bloqueig (mirar taula 5 apartat 3.3.2)
ECL Advance Western Blotting Detection Kit (Amersham)
Equip de detecció de quimioluminiscència VERSADOC (BioRad)
Films autoradiogràfics (Amersham) i aparell de revelat

3.8 Tècnica d'immunohistoquímica de fluorescència

Les immunohistoquímiques realitzades es porten a terme utilitzant músculs LAL. Una vegada es fa la dissecció del múscul aquest es fixa mitjançant agulles entomològiques a una placa de petri que conté el polímer sintètic Sylgard^R. Es realitza la fixació del múscul a estudiar amb paraformaldehid al 4% amb tampó fosfat (PBS) durant 30 minuts a temperatura ambient. Una vegada fixat, es fan rentats amb PBS (3 x 5 minuts) i s'incuba amb glicina 0.1 M amb PBS durant 30 minuts per aturar l'acció del fixador utilitzat i bloquejar els grups aldehid que hagin pogut quedar lliures. Després de la fixació del múscul i mentre es fan els rentats i la incubació amb glicina, es realitza la dissecció fina del múscul sota la lupa, com s'ha descrit anteriorment. Una vegada està el

múscul fixat, aïllat i lliure de teixit connectiu, es realitza el protocol d'immunohistoquímica. En primer lloc es fa un bloqueig i una permeabilització de la mostra amb albúmina sèrica bovina 4% (BSA) i 0.5-1% Tritó X-100 en PBS (depenent de l'anticòs utilitzat). Aquest primer pas, normalment, es fa durant tota la nit a 4°C o durant unes 4 hores a temperatura ambient. Un cop permeabilitzat i bloquejat el múscul a marcar, es realitza el marcatge amb l'anticòs primari o amb una barreja d'aquests (depenent si es fa un marcatge simple o múltiple). La incubació de l'anticòs primari es fa durant tota la nit a 4°C a una dilució concreta i amb el mateix tampó de bloqueig i permeabilització que s'ha utilitzat en el primer pas. Una vegada passat aquest temps, es fan rentats amb PBS (3 x 7 minuts) per eliminar l'anticòs que no s'ha unit i, a continuació, es fa la incubació amb l'anticòs secundari o una barreja d'aquests, segons el marcatge a realitzar. Els anticossos secundaris estan conjugats a un fluorocrom específic. La incubació es fa durant 4 hores a temperatura ambient i a la foscor. La α -bungarotoxina (α -BTX, toxina que s'uneix irreversiblement als receptors d'acetilcolina, nAChR) s'afegeix a la barreja dels anticossos secundaris. Una vegada s'ha fet la incubació amb els anticossos, es realitzen tres rentats de 7 minuts amb PBS per eliminar aquells que no s'hagin unit, i les mostres es munten amb Mowiol i amb p-phenylenediamine per a prolongar la marca fluorescent.

Es té molta cura en el fet que no tinguin lloc reaccions creuades no apropiades entre els anticossos secundaris i primaris. Es realitzen diversos controls per detectar la possible marca fluorescent no específica. En un dels controls es fa la incubació de la mostra en absència d'anticòs primari i presència de secundari. En un altre control s'incuba un anticòs primari produït en una espècie diferent a l'espècie que reconeix l'anticòs secundari.

Alguns músculs van ser sotmesos a un tractament amb col·lagenasa (Bekoff i Betz, 1977) per tal d'eliminar el component presinàptic (terminal nerviós i cèl·lules de Schwann) de la unió neuromuscular i d'aquesta manera obtenir cèl·lules musculars aïllades. Així, després de l'extracció i la dissecció del múscul es procedeix a incubar el múscul amb una solució al 0.3% de col·lagenasa amb PBS oxigenat durant 20-30 minuts a 37°C, renovant la solució cada 15 minuts. Una vegada transcorregut aquest temps, es realitzen 3 rentats de 5 minuts amb PBS i amb una pipeta Pasteur, es separen les fibres musculars, obtenint així les cèl·lules musculars aïllades.

Taula 8. Material utilitzat en la immunohistoquímica

Material utilitzat en la immunohistoquímica
PBS (<i>Phosphate Buffered Saline</i>); 2.7 mM KCl, 1.5 mM KH ₂ PO ₄ , 140 mM NaCl, 8.1 mM Na ₂ HPO ₄ pH 7.4
Col·lagenasa tipus I al 0.3% (Sigma)
Paraformaldehyd al 4%
Glicina 0.1M
Tampó de Bloqueig; 4% BSA + 0.5-1% Tritó
Ab 1aris; Anticòs diluït amb el tampó de bloqueig (veure taula 4, apartat 3.3.2)
Ab 2aris; Anticòs diluït amb el tampó de bloqueig (veure taula 5, apartat 3.3.2)
Portaobjectes (Thermo scientific Menzel-Gläser)
Cobreobjectes (Hirschmann Laborgenate)
Medi de muntatge; MOWIOL Mowiol 4-88 (Calbiochem) + P-Phenylenediamine (Sigma)

3.9 Seccions semifines com a tècnica d'immunofluorescència d'alta resolució per a l'anàlisi de molècules de la unió neuromuscular

L'obtenció de seccions transversals semifines de múscul LAL inclòs en resina és un mètode simple i sensible que permet analitzar la distribució específica cel·lular i subcel·lular de les molècules de la unió neuromuscular. Aquesta tècnica neix de la necessitat de millorar la resolució de les imatges obtingudes per immunomarcatge fluorescent de la forma comentada a l'apartat anterior (3.8). En aquesta tècnica s'utilitza el múscul LAL que per les seves característiques (comentades a l'apartat 2.2.1) permet treballar amb el múscul sencer permetent veure la innervació del múscul al complert.

Quan es realitza la tècnica d'immunohistoquímica de la manera convencional i es marquen els tres elements de la unió neuromuscular amb marcadors específics com són S-100 per a la cèl·lula de Schwann, syntaxina per al terminal nerviós i α -BTX per als receptors d'acetilcolina (nAChR), es detecten molts punts de coincidència entre els marcadors (figures 9 i 10). La Taula 9 mostra l'anàlisi quantitativa del grau de coincidència o colocalització entre els marcadors específics dels tres elements de la unió neuromuscular observant-se un percentatge de colocalització elevat en tots els casos (veure apartat 3.9.1). Així doncs, la tècnica d'immunofluorescència habitualment

utilitzada dona com a resultat una elevada colocalització entre els tres elements cel·lulars quan en realitat aquests estan separats entre ells, encara que per molt poca distància (50-100 nm).

Taula 9. Percentatge de colocalització entre marcadors específics dels tipus cel·lulars de la unió neuromuscular

	Múscul sencer (n)
AChR sobre Syntaxina	48.39 ± 14.27 (66)
AChR sobre S100	43.77 ± 24.67 (63)
Syntaxina sobre S100	45.54 ± 12.40 (62)

Mitjana del percentatge de les mesures de l'àrea de coincidència entre dos marcadors fluorescents. (n) Nombre d'unions neuromusculars observades en cada situació. Els valors s'expressen com a mitjana del percentatge ± SD.

Una manera de millorar la resolució de les imatges és obtenint talls transversals semifins. L'observació de talls transversals semifins d'unions neuromusculars dona una resolució suficient per a poder identificar independentment els tres elements cel·lulars que formen la unió neuromuscular. Així, unint la tècnica d'immunohistoquímica i el processament de mostres per a l'obtenció de talls semifins, es va desenvolupar una tècnica que podia resoldre el problema mostrat anteriorment de colocalitzacions i coincidències entre els elements de la unió neuromuscular (Garcia i col., 2005; Lanuza i col., 2007). Per dur a terme aquest mètode, inicialment es realitza la tècnica d'immunohistoquímica, de la manera habitual, amb el múscul LAL sencer. Una vegada realitzada la immunohistoquímica, es seleccionen les zones del múscul riques en unions neuromusculars, amb l'observació dels receptors d'acetilcolina marcats amb α -BTX-TRICT, mitjançant un microscopi de fluorescència. Es tallen fragments de múscul d'uns 3 mm². Una vegada seleccionats els fragments de múscul s'inicia el procés per a l'obtenció de blocs de resina-Spurr i la posterior obtenció dels talls semifins. En primer lloc, els fragments de múscul es deshidraten utilitzant una bateria d'alcohols creixent: 10 minuts en alcohol 30%, 10 minuts en alcohol 50%, 10 minuts en alcohol 70%, 10 minuts en alcohol 96%, 3 x 10 minuts alcohol 100%, 3 x 15 minuts acetona (que també s'utilitza en la preinclusió). Una vegada realitzada la deshidratació es fa la preinclusió dels fragments en acetona-resina Spurr. 1.5-2 hores amb 3:1 (acetona:resina) a temperatura

ambient en agitació i amb els vials que contenen la mostra tapats. Un segon pas de 1.5-2 hores de 1:1, en les mateixes condicions. Un tercer pas amb 1:3 d'1 hora a temperatura ambient i després una incubació durant tota la nit a 4°C, també en agitació i amb els vials tapats. Una vegada realitzada la preinclusió, on s'ha anat introduint la resina dins dels fragments del múscul a poc a poc, es realitza la inclusió dels fragments en resina Spurr pura. Es fan 3 banys de resina Spurr pura de 1.5-2 hores cada bany, a temperatura ambient, en agitació i amb els vials destapats per a que s'evapori l'acetona que hi pugui quedar. Un cop acabada la inclusió de la mostra, el fragment de múscul s'orienta transversalment en el motlle de silicona per fer els blocs. Per a que la resina solidifiqui es col·loquen els blocs en una estufa a 60°C durant 48 hores. Una vegada es tenen els blocs solidificats amb el fragments de múscul al seu interior orientats transversalment es poden piramidar els blocs i realitzar els talls semifins (d'un gruix de 0.5-0.7 µm, amb el micròtom Reichert Ultracut E microtome, Leica Microsystems, Bannockburn, IL). Els talls semifins resultants es col·loquen en un portaobjectes i s'observen mitjançant el microscopi confocal (TE 2000-E, Nikon). El que s'obté és una imatge transversal de la unió neuromuscular on es poden identificar els tres elements cel·lulars que la formen amb escassos o nuls punts de coincidència entre ells (taula 10).

Taula 10. Diferència quantitativa del percentatge de colocalització dels marcadors de la NMJ per la utilització de dos mètodes

	Semifins (n)	Múscul sencer (n)
AChR sobre Sintaxina	15.64 ± 10.57 (45)	48.39 ± 14.27 * (66)
AChR sobre S100	4.69 ± 3.31 (47)	43.77 ± 24.67 * (63)
Sintaxina sobre S100	18.63 ± 8.50 (42)	45.54 ± 12.40 * (62)

Mitjana del percentatge de les mesures de l'àrea de solapament entre dos marcadors fluorescents. (n) Nombre d'unions neuromusculars observades en cada situació. Els valors s'expressen com a mitjana del percentatge ± SD *p<0.01. La taula mostra el percentatge de colocalització de marcadors i l'anàlisi comparatiu entre la colocalització de mostres de seccions semifines (semifins) i de mostres de múscul sencer. L'anàlisi de colocalització dels marcadors seleccionats mostra una disminució significativa quan es realitzen seccions semifines, proporcionant una evidència en l'increment de la resolució de la metodologia proposada.

Així, amb aquesta nova tècnica el que s'ha fet ha estat desenvolupar un nou mètode d'elevada sensibilitat per a la localització de proteïnes a la unió neuromuscular que aporta diferents avantatges en front a altres mètodes que també es podrien haver utilitzat. Alguns d'aquests mètodes i les avantatges es descriuen a continuació.

- Talls transversals del múscul fixat i/o inclòs per congelació (Tokuyasu, 1973, 1980; Lafarga i col., 1997). El principal avantatge davant d'aquesta tècnica, a part de que els talls realitzats seran més fins (talls semifins d'un gruix de 0.5-0.7 μm), és el fet de que amb la tècnica d'immunofluorescència en talls semifins es localitza la zona d'interès abans de fer els talls. Aquest fet facilita molt la feina ja que la zona d'interès representa menys de l'1% del total del múscul. Així, localitzar la zona d'interès abans de tallar estalvia de fer molts talls i analitzar moltes seccions que no contindran unions neuromusculars.

- Immunohistoquímica sobre talls semifins (Binder i col., 1991; Kabuto i col., 1995; Schlamp i Williams, 1996; Haraguchi i Yokota, 2002). Davant d'aquesta tècnica, el principal avantatge és el fet de garantir l'antigenicitat de les molècules ja que el fet d'haver d'extreure la resina d'un tall, abans de tenyir-lo, fa que s'hagin d'utilitzar solvents agressius que fan perdre l'antigenicitat de moltes molècules, ja que no aguanten el procés d'extracció. La immunohistoquímica prèvia a la inclusió, que es realitza en la tècnica d'immunofluorescència en talls semifins fa que el procés d'inclusió no afecti a l'antigenicitat (el múscul ja està marcat) i com no es realitza un procés d'extracció de resina, encara es minimitza més el fet de poder perdre la molècula d'interès. Un altre avantatge, respecte a aquesta tècnica i, també respecte a la tècnica d'immunohistoquímica sobre talls realitzats per congelació, vista abans, és el fet de que la presència d'antígens estarà augmentada al treballar amb el múscul sencer i no ser un tall, on la presència d'antígens es veu limitada.

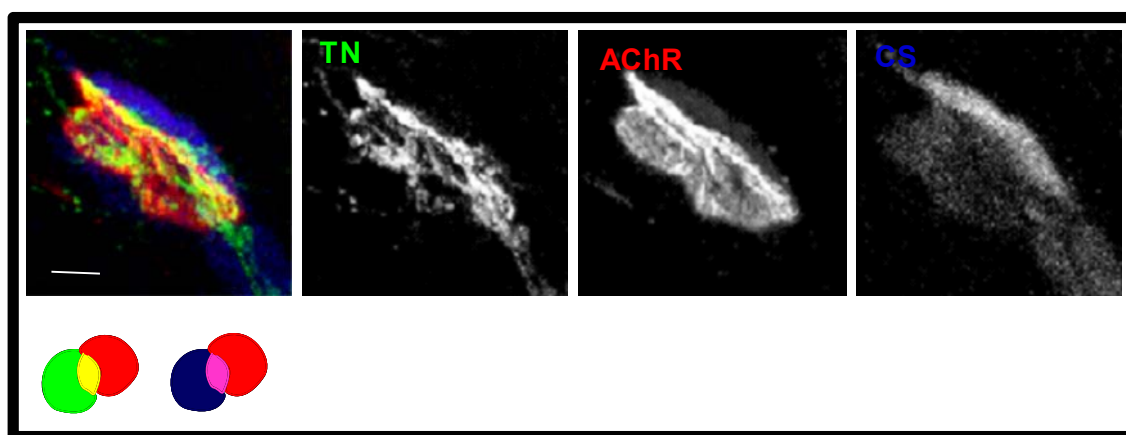


Figura 9. Immunohistoquímica en múscul LAL (triple marcatge en múscul sencer). S'observa una unió neuromuscular de ratolí de 6 dies d'edat on s'han marcat els tres elements cel·lulars que la formen: en verd el terminal nerviós (TN), en vermell els receptors d'acetilcolina (AChR) i en blau la cèl·lula de Schwann (CS). En la imatge de color es pot observar la superposició dels tres elements (els punts grocs i els de color rosa-fucsia) que representen zones de colocalització entre els diferents elements de la unió neuromuscular. Els punts grocs (verd i vermell) són la coincidència entre el terminal nerviós i els receptors. Els punts rosa-fucsia (blau i vermell) són la coincidència entre la cèl·lula de Schwann i els receptors. Barra de escala = 10 μ m.

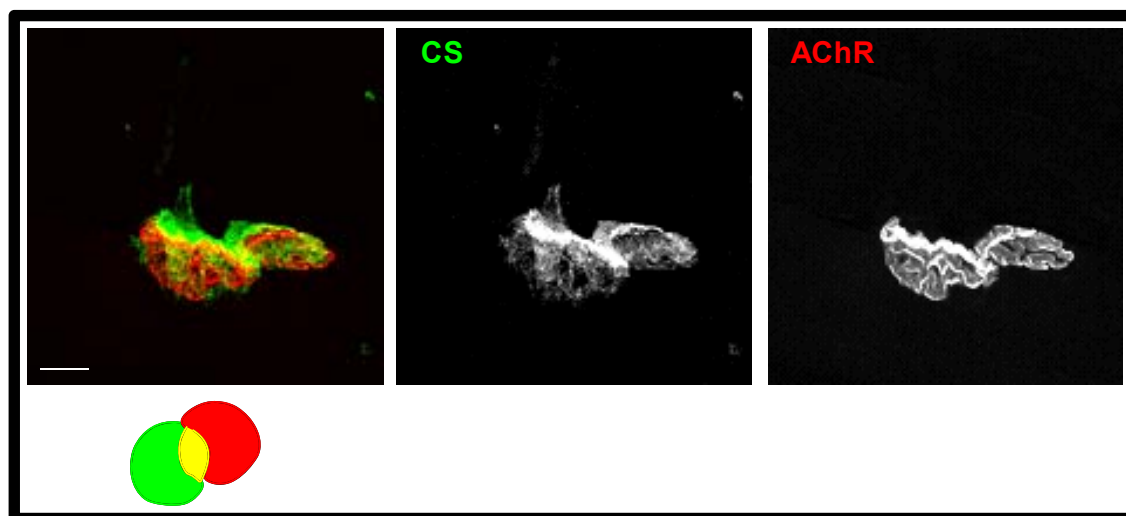


Figura 10. Immunohistoquímica en múscul LAL (doble marcatge en múscul sencer). Es pot observar una unió neuromuscular on només s'han marcat en vermell els receptors d'acetilcolina (AChR) i en verd la cèl·lula de Schwann (CS) i es pot veure en la imatge de superposició dels dos elements com també hi ha punts de coincidència (punts grocs). Barra de escala = 10 μ m.

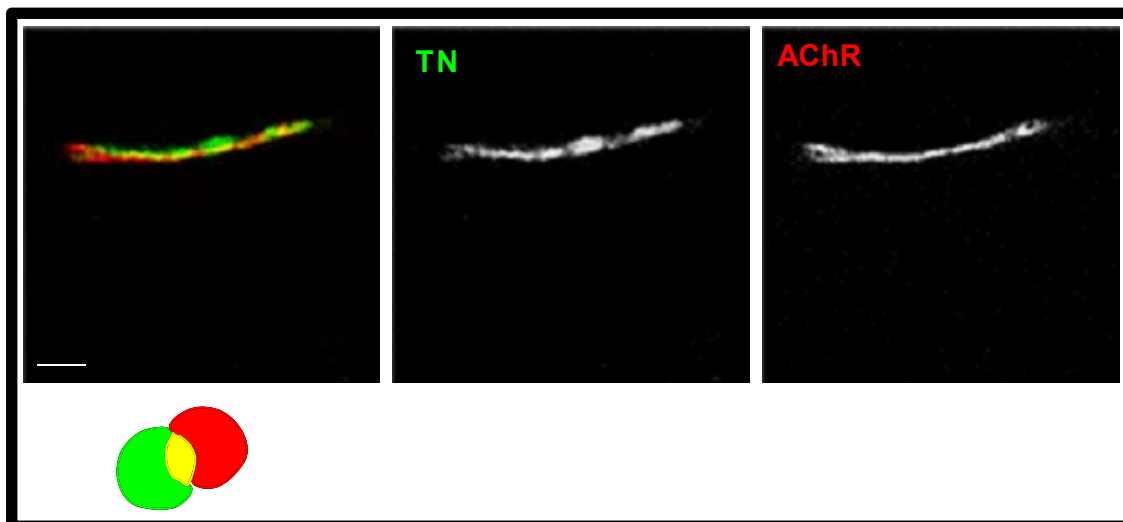


Figura 11. Immunohistoquímica en múscul LAL (doble marcatge, una única secció de confocal). Es mostra una imatge més simplificada d'una unió neuromuscular amb un doble marcatge en una única secció òptica obtinguda per microscòpia confocal on s'han marcat en vermell els receptors d'acetilcolina (AChR) i en verd el terminal nerviós (TN). També s'observen punts de coincidència en la superposició de les imatges (punts grocs). Barra de escala = 10 µm.

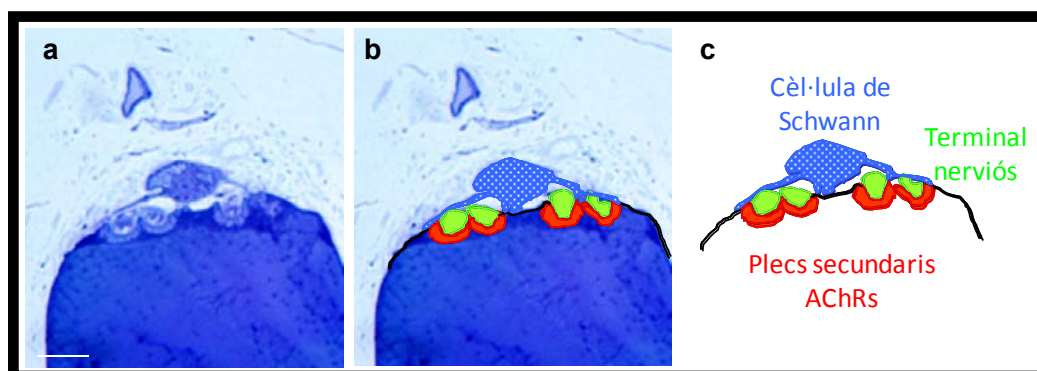


Figura 12. Imatge de la unió neuromuscular en un tall semifí tenyit amb blau de metilè. (a) Imatge d'un tall semifí tenyit en blau de metilè, en el que es poden observar de forma independent els tres elements de la sinapsi. (b) la mateixa imatge que en (a) on s'han resseguit en diferents colors els tres elements cel·lulars (vermell –receptors d'acetilcolina, verd- terminal nerviós i en blau puntejat – cèl·lula de Schwann). (c) Esquema dels tres elements cel·lulars de la unió neuromuscular representats en la imatge (b). Barra de escala = 10 µm.

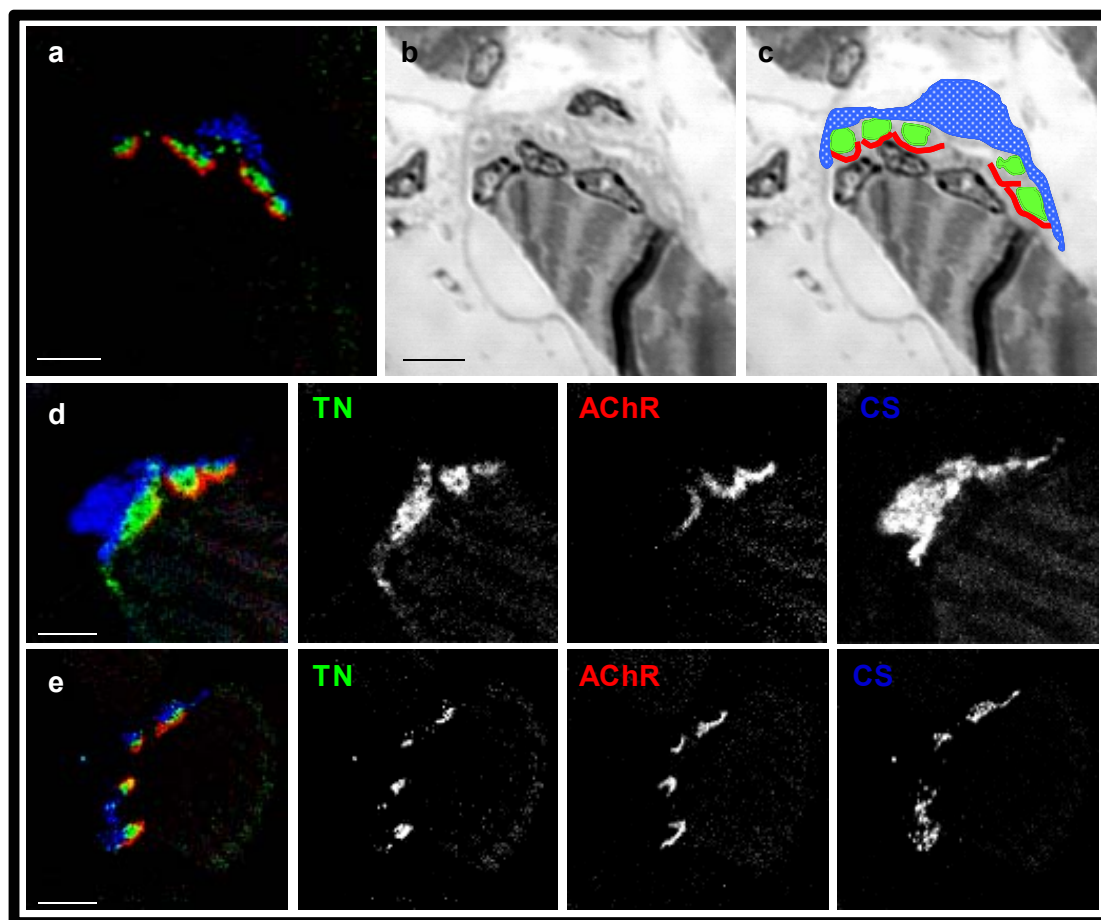


Figura 13. Immunohistoquímica en múscul LAL (triple marcatge en talls semifins). (a) Immunohistoquímica d'una unió neuromuscular on s'han marcat els seus tres elements cel·lulars: en vermell els receptors d'acetilcolina, en verd el terminal nerviós (TN) i en blau la cèl·lula de Schwann (CS). (b) Imatge d'un tall semifí de la mateixa sèrie que el tall (a) però vist amb llum blanca. (c) El mateix tall (b) però on s'han destacat els tres elements cel·lulars de la unió neuromuscular. (d) i (e) Altres exemples d'immunohistoquímica en múscul LAL (triple marcatge en talls semifins) igual que en (a). Cal destacar que els punts de coincidència en la imatge de la superposició dels tres elements són escassos o nuls. Barra de escala = 10 μ m.

Taula 11. Material utilitzat en l'obtenció de talls semifins

Material utilitzat en l'obtenció de talls semifins
Material utilitzat per a la realització de la tècnica d'immunohistoquímica
Vials de vidre (Afora)
Alcohol; 30%, 50%, 70%, 90%, 96% i 100%
Acetona 100% ultrapura
Resina-Spurr (ERL; vinyl cyclohexenedioxide, DER; diglycidil ether polupropylene glicol, NSA; nonenyl succinic anhidre, DMAE; dimethylamino ethanol)
Motlles de silicona per fer els blocs (Aname)
Lupa
Estufa a 60°C
Micròtom Reichert Ultracut E microtom de Leica Microsystems; Bannockburn, IL
Portaobjectes (Thermo scientific Menzel-Gläser)
Placa calefactora
Microscòpi confocal (NIKON TE 2000E)

3.9.1 Anàlisi de colocalització

A més a més de l'anàlisi de colocalització visual de les imatges de dobles o triples marcatges (AChR, sintaxina i S100), com s'ha mostrat en les taules 9 i 10, s'han fet mesures del tant per cent de l'àrea que colocalitza entre dos marcadors fluorescents utilitzant el programa d'anàlisi d'imatge *Metamorph Imaging System* sèrie 6.1 (Universal Imaging Corporation-Molecular Devices). Es defineix una regió en dues dimensions (2D) d'intensitat relativa de fluorescència de dos canals i es mesura i es conta el número de punts coincidents. Un punt de colocalització queda representat per píxels amb elevada intensitat presents en ambdós canals. S'ha realitzat una anàlisi morfomètrica en mostres de seccions semifines i de mostres de múscul sencer marcades fluorescentment. Es van quantificar diferents mostres de músculs marcats amb combinacions dels diferents anticossos. Es van quantificar diferents unions neuromusculars de dos o tres animals per cada triple marcatge de les dues tècniques realitzades. Les diferències entre grups van ser valorades via el t-test o U-test (Mann-Whitney), amb el Kolmogorov-Smirnov test per comparar mitjanes. El criteri de significació estadística es va fixar en $p < 0.05$.

3.10 Microscòpia làser confocal

Per a visualitzar els músculs, nervis i unions neuromusculars tenyits fluorescentment s'ha utilitzat un microscopi làser scanning confocal NIKON (TE 2000-E). Les imatges es capten amb un objectiu de 63X o 100X d'1.4 d'obertura numèrica oil, (UPlan-Apochromatic objective). Els fluorocroms Alexa fluor 488 (verd), TRICT (vermell) i Alexa fluor 647 (blau) s'exciten seqüencialment amb les línies de 488 nm, 568 nm i 633 nm amb làsers d'argó-kriptó-He-Ne. Es té en conte la força dels làsers per evitar qualsevol senyal de contaminació d'un canal en un altre. Les seccions X i Y es recullen en la direcció Z d'una mostra utilitzant un "Z-stage" (platina mòbil) d'elevada resolució. Les projeccions de màxima intensitat de les successives seccions X,Y es transformen en projeccions 3D utilitzant un software específic del microscopi làser confocal.

3.11 Microscòpia electrònica

S'ha utilitzat el microscopi electrònic de transmissió JEOL 1011 per a l'estudi de músculs LAL de ratolins C57BL6 Wild Type (WT), que són els controls, i *Knock Out* (KO) per a PKC θ (descrits anteriorment). Es realitza un estudi morfològic per veure les diferències existents a les unions neuromusculars en els dos tipus d'animals. S'estudien animals en diferents edats del desenvolupament (P3, P6 i P13) i en adult (P30).

En primer lloc, es punxa als animals vius una injecció subcutània, sobre la zona del múscul LAL, d' α -Bungarotoxina marcada amb el fluorocrom de color vermell rodamina, TRICT (α -BTX-TRICT). Es deixa actuar 30 minuts. L' α -BTX s'uneix als receptors d'acetilcolina i com aquesta està marcada amb TRICT els nAChR són visibles sota el microscopi de fluorescència, cosa que és molt útil per a la realització dels següents passos. Passats els minuts d'incubació amb α -BTX-TRICT i amb l'animal anestesiats es disseca el múscul LAL. A continuació es realitza la fixació del múscul sencer per immersió amb el fixador glutaraldehid al 2% en tampó fosfat 0.1M durant 2 hores a 4°C. Una vegada fixat el múscul es realitzen rentats amb tampó fosfat 0.1 M (2 x 15 minuts més un altre canvi d'1 hora). A l'hora que es realitzen els rentats es fa la selecció de la zona d'interès del múscul, que és una zona rica en unions neuromusculars. Aquestes àrees s'identifiquen observant la localització dels nAChR marcats anteriorment amb α -BTX-TRICT mitjançant el microscopi de fluorescència

Nikon Eclipse TE2000-U. Una vegada seleccionats els fragments de múscul rics en unions neuromusculars ($\sim 3 \text{ mm}^2$), es procedeix amb el protocol convencional de processament de mostres per a microscòpia electrònica.

Els fragments resultants es tornen a fixar amb tetraòxid d'osmi al 2% (en tampó fosfat 0.1 M) durant 2 hores a 4°C i protegits del llum. Posteriorment es realitzen 2 rentats de 15 minuts amb tampó fosfat 0,1 M. Es procedeix a continuació a realitzar la deshidratació de la mostra amb concentracions creixents d'alcohol: 10 minuts en alcohol 30%, 10 minuts amb alcohol de 50%, una incubació O/N amb acetat d'uranil 70% a 4°C. Al dia següent, es continua amb la sèrie creixent d'alcohol: 10 minuts amb alcohol de 90%, 10 minuts amb alcohol de 96%, 3 x 10 minuts amb alcohol pur, i a continuació 3 banys de 15 minuts amb acetona (perquè la preinclusió es farà en resina Spurr i acetona). Una vegada obtinguts els fragments de múscul deshidratats i amb acetona es fa la preinclusió, 2 banys d'1.5-2 hores amb concentració creixent de resina (acetona:resina 3:1 i 1:1) i un últim bany d'acetona:resina 1:3, 1 hora a temperatura ambient i tota la nit a 4°C, en agitació i amb el vial on es realitzen els banys tapat. Per últim, es fa la inclusió dels fragments amb resina Spurr pura, 3 banys amb resina Spurr de 1.5-2 hores (depenent de la mostra) a temperatura ambient, en agitació i amb el vial destapat per a que s'evapori l'acetona que hi pugui quedar. Una vegada les mostres estan incloses amb la resina, aquestes es col·loquen en orientació transversal en els motlles de silicona que s'utilitzen per fer els blocs de resina i es col·loquen a l'estufa a 60°C durant 48 hores per a que s'endureixi la resina. Es realitzen seccions semifines de 0.5-0.7 μm de gruix amb un micròtom Reichert Ultracut E microtome (Leica Microsystems, Bannockburn, IL). Es tenyeixen amb blau de metilè i es munten amb DPX. S'examinen tots els talls semifins sota un microscopi òptic convencional per seleccionar la zona que contingui unions neuromusculars i/o nervis. Una vegada delimitada l'àrea d'interès de les seccions semifines es fan seccions ultrafines. Les seccions ultrafines (de 60 nm de gruix) realitzades amb un micròtom Reichert Ultracut E microtome (Leica Microsystems, Bannockburn, IL) es munten sobre reixetes de coure i són contrastades amb acetat d'uranil i citrat de plom per a l'observació sota un microscopi electrònic de transmissió (Zeiss 10 CA). Les imatges són obtingudes digitalment.

Taula 12. Material utilitzat en la microscòpia electrònica

Material utilitzat en la microscòpia electrònica
α -BTX-TRICT en PBS
Glutaraldehyd 2% en tampó fosfat 0.2 M
Tampó fosfat 0.2 M ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O} + \text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ Merck) pH 7.4
Tetraòxid d'osmi
Vials de vidre (Afora)
Alcohol Uranil 70%
Alcohols, 30%, 50%, 70%, 90%, 96% i 100%
Acetona 100% ultrapura
Resina-Spurr (ERL- vinyl cyclohexenedioxide, DER- diglycidil ether polupropylene glicol, NSA- nonenyl succinic anhydre, DMAE- dimethylamino ethanol)
Motlles de silicona per fer els blocs (ANAME)
Estufa a 60°C
Agitador
Lupa
Micròtom i Ultramicròtom Reichert Ultracut E microtom de Leica Microsystems; Bannockburn, IL
Portaobjectes (Thermo scientific Menzel-Gläser)
Cobreobjectes (Hirschmann Laborgenate)
Blau de metilè
Placa calefactora
Medi de muntatge- DPX
Microcopi òptic
Acetat d'uranil + citrat de plom
Reixetes de Coure
Microscopi electrònic Zeiss 10 CA

3.12 Electrofisiologia

El múscul Diafragma s'extreu de l'animal i es dissequen els dos hemidiafragmes per separat amb el seu nervi. La dissecció es realitza sota una lupa i utilitzant càpsules de Petri amb Sylgard^R que contenen la solució de Ringer normal oxigenada (95% O₂/5% CO₂) per tal de mantenir el múscul viu i en les condicions ideals pel posterior tractament i anàlisi. L'hemidiafragma dissecat es transfereix a una camareta de registre d'un volum d'1.5 ml. Tots els experiments es porten a terme a una temperatura ambient controlada de 22-25°C i un grau d'humitat constant del 50%. La temperatura del bany durant els experiments està monitoritzada a 23.4°C ± 1.7 per un termòmetre digital (Digital Thermometer TMP 812, Leticia, Barcelona). Per al registre intracel·lular dels potencials de placa (EPP) s'utilitzen microelèctrodes de vidre convencionals que contenen KCl 3M (resistència: 20-40 M Ω). Els elèctrodes de registre es connecten a un amplificador (Tecktronics, AMS02, Tektronix, Inc., Beaverton, OR, US) i s'utilitza com a referència un elèctrode Ag-AgCl distant connectat amb la solució del bany a través d'un pont d'agar (agar 3.5% en NaCl 137 mM). Els registres es digitalitzen (DIGIDATA 1322A interface, Axon Instruments Inc, CA, USA) i s'analitzen amb el software Axoscope 9.0 (Axon Instruments Inc, CA, USA) que també s'utilitza per l'adquisició de les dades. Es tria la concentració més elevada del compost a utilitzar, sense que causi un canvi en l'amplitud dels MEPPS ja que en els experiments a realitzar interessa descartar els efectes postsinàptics de les drogues. Així, que en primer lloc, es determina la línia base de concentració de les drogues utilitzades. S'analitza la relació dosi-resposta de totes les drogues utilitzades en els potencials de placa en miniatura (MEPPS) de músculs adults. En estudis previs (Santafé i col., 2003, 2005, 2006), i utilitzant tècniques de registre intracel·lular convencional, es van realitzar experiments controls per demostrar que l'amplitud dels MEPPS i els potencials de la membrana postsinàptica no estan afectats pels per les drogues utilitzades, i per tant, aquestes actuen únicament a la part presinàptica de la sinapsi neuromuscular i no afecten així a la part postsinàptica.

Durant el registre dels EPPs s'evita la contracció muscular tallant els músculs en cada banda de la branca principal del nervi intramuscular (Hubbard i Wilson, 1973). Després de ser tallat i abans de començar l'experiment, el múscul es renta durant 1 hora amb 100 ml de Ringer normal, ja que les fibres musculars tallades alliberen components en el medi que poden alterar les seves característiques fisiològiques. A partir del primer rentat d'1 hora, el Ringer en la camareta de registre es renova completament (3 ml)

després de cada registre cel·lular. A més, les preparacions de múscul tallat esdevenen parcialment despolaritzades per la inactivació dels canals de sodi dependents de voltatge. Les contraccions musculars són quasi eliminades però la transmissió sinàptica no es veu afectada.

En tots els casos, després d'introduir l'elèctrode a la fibra muscular, el nervi està contínuament estimulat, s'utilitzen dos elèctrodes de platí units a un generador unit a una unitat aïlladora d'estímuls (70 estímuls a 0.5 Hz). Es graven els 50 últims EPPs sempre i quan el potencial de membrana sigui major de -45 mV i que el valor d'aquest no variï més de 5 mV durant el període de registre. La mitjana de l'amplada (mV) per fibra es calcula i es corregeix pel mètode de la sumació no lineal (en músculs en els que s'ha fet "cut" els EPPs acostumen a fer més de 4 mV (McLachlan i Martin, 1981) assumint el potencial de membrana de -80 mV).

S'estudien un mínim de 15 fibres per múscul i normalment un mínim de 5 músculs per cada tipus d'experiment. En els experiments de fibra única (experiments on s'estudia l'efecte de la droga en els EPPs en una mateixa fibra a la que no s'ha retirat l'elèctrode durant el temps d'incubació), la/les droga/gues s'afegeixen a la solució del bany i es registren els EPPs com es descriu prèviament cada 15 minuts durant 1 hora.

3.12.1 Anàlisi d'electrofisiologia

Els valors s'expressen com a mitjana \pm S.E.M. El percentatge del canvi era definit com: $[(\text{Amplitud del EPP en salí} - \text{Amplitud durant l'exposició a la droga o al tractament}) / \text{Amplitud del EPP en salí}] \times 100$. Utilitzem l'anàlisi de variança d'una via (ANOVA) per avaluar les diferències entre grups i el test de Bonferroni per les comparacions múltiples. Quan les diferències són evaluades només entre dos grups, s'utilitza *two-tailed Welch's t-test* (per valors no aparellats no assumint variàncies iguals). Les diferències es consideren significatives amb una $p < 0.05$.

Taula 13. Material utilitzat en l'electrofisiologia

Material utilitzat en l'electrofisiologia
2,2,2-Tribromoethanol (Sigma) al 2% w/v
Material de dissecció
Ringer; 137 mM NaCl, 5mM KCl, 2mM CaCl ₂ , 1mM MgSO ₄ , 12mM NaHCO ₃ , 1 mM Na ₂ HPO ₄ i 11mM de Glucosa pH 7.3
Sistema de bombolleig per oxigenar el Ringer
Camareta de registre
Sistema d'estimulació elèctrica
Calci 5 mM
CaC (inhibidor de la proteïna quinasa C) 10 µM
KCl 3M
Elèctrodes de platí
Estimulador (Cibertec Stimulator CS-20)
Elèctrode de registre, capil·lar de vidre de Borosilicat convencionals (GC150F-10 Harvard Apparatus Ltd)
Elèctrode de referència Ag-AgCl
Pont Agar (Agar 3.5% en 137 mM NaCl)
Amplificador (tecktromix, AM502 Differential Amp)
Software Axoscope 9.0 (Axon Instruments Inc.)

3.13 Anàlisi morfològica i morfomètrica

3.13.1 Estudi del grau d'innervació polineural en ratolins KO per a la PKC θ

Es realitza una anàlisi morfològica del grau d'innervació polineural en ratolins KO per a la PKC θ . Un cop realitzada la tècnica d'immunohistoquímica del múscul LAL de ratolins WT (*Wild Type*) i KO (*Knock Out*) es conta el número de plaques motores monoinnervades i poliinnervades en diferents edats de desenvolupament.

3.13.2 Estudi dels agregats de nAChR en ratolins KO per la PKC θ

Es realitza una anàlisi morfològica dels agregats de nAChR en animals control i també en animals KO per la PKC θ . En concret s'estudia el grau de maduresa dels agregats de nAChR *in vivo* durant el període postnatal en el que s'esdevé el fenomen de l'eliminació sinàptica. Amb aquesta finalitat i seguint criteris iniciats per altres investigadors (Steinbach, 1981; Slater, 1982a, b; Bewik i col., 1996) es defineixen 6 estadis:

- M1: els agregats corresponents a una placa de forma oval i uniforme en densitat de nAChR. S'observa una porositat uniformement distribuïda dins de la placa.
- M2: la placa s'ha anat elongant i comencen a aparèixer zones no tan homogènies en la densitat de nAChR. L'augment de densitat de nAChR apareix localitzat en línies estretes dins la placa.
- M3: placa oval en la que apareixen zones sense receptors, "forats". Zones lliures de receptors que no estan innervades.
- M4: la placa s'ha transformat, segueix un patró de branques, amb zones d'alta i baixa densitat de receptors. Els "forats" estan delimitats per línies riques amb nAChR.
- M5: patró de branques millor definit amb regions amb alta, baixa i nul·la densitat de nAChR. Les regions amb alta densitat, estan en contacte amb branques terminals d'axons, mentre que hi ha regions no innervades.
- M6: patró discontinu de nAChR, que segueixen un patró de branques fragmentades.

Es va fer també, una anàlisi morfomètrica de les plaques motores postsinàptiques marcades amb α -BTX-TRICT. Es van visualitzar amb un microscopi Nikon (TE2000 U) i les imatges es van captar amb una càmera Nikon digital (Digital Camera DXM 1200F). Aquestes imatges van ser analitzades amb el programa d'anàlisi d'imatge Metamorph Imaging System (Universal Imaging Corporation, Downington, PA). L'àrea i el perímetre es mesuren en animals control, tractats i animals KO.

3.13.3 Estudi del grau de fosforilació de la subunitat δ dels nAChR en animals KO per la PKC θ

Per conèixer si la PKC θ està implicada en la fosforilació de les subunitats δ i ϵ dels nAChR, es fa una anàlisi quantitativa de la fosforilació d'aquestes subunitats tant en animals controls com en animals KO per la isoforma θ de la PKC. Es realitza una immunohistoquímica sobre múscul LAL per detectar específicament la subunitat δ i ϵ dels nAChR fosforilada. Es realitzen fotos del resultat de la tècnica d'immunohistoquímica i s'analitzen. Es delimita la placa on hi ha marca fluorescent i amb el programa d'anàlisi d'imatge Metamorph (Universal Imaging Corporation, Downington, PA) es quantifiquen varis paràmetres com són l'àrea ocupada per la totalitat dels nAChR en l'agrupament de receptors, l'àrea ocupada pels nAChR fosforilats en la subunitat δ ó ϵ , la intensitat de fluorescència de α -BTX i per últim la intensitat de fluorescència de δ -phospho-AChR i ϵ -phospho-AChR.

4. Estadística

Les dades obtingudes en els diferents experiments es processen mitjançant el paquet estadístic SPSS (Statistical Package for the Social Sciences). Es realitza un primer tractament descriptiu, calculant els principals índexs estadístics que permeten descriure la distribució d'una variable: la mitjana, la desviació estàndard i el nombre de casos. Les dades passen un test de normalitat (test de Kolmogorov-Smirnov). Es testen les diferències estadístiques entre grups fent servir el t-test o el U-test de Mann-Whitney en el cas de les variables quantitatives. Per comparar percentatges, es fa servir el test de la Chi quadrat. El criteri de significació es fixa en $p < 0.05$. Les dades es presenten en tot el treball com la mitjana \pm desviació estàndard (SD). Per cada dia i sèrie estudiada s'analitzen un mínim de 85 sinapsis per múscul i un mínim de 6 músculs.

IV - RESULTATS

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

SERINA/TREONINA QUINASES A LA SINAPSI NEUROMUSCULAR: ESPECIALITZACIÓ DE LES ISOFORMES
DE LA PROTEÏNA QUINASA C

Núria Montserrat Besalduch Canes

ISBN:978-84-692-3232-3/DL:T-939-2009

IV – Resultats

1. Expressió i localització de diferents isoformes de la PKC i de diferents subunitats de la PKA

- 1.1 Expressió de diferents isoformes de la PKC (α , β I, β II, γ , ϵ , δ , θ , ζ i μ)
- 1.2 Localització de diferents isoformes de la PKC (α , β I, β II, ϵ , δ , θ , ζ i μ)
- 1.3 Expressió de diferents subunitats de la PKA (C α , C β , RII i RI)
- 1.4 Localització de diferents subunitats de la PKA (C α , C β , RII i RI)

2. Efecte de l'activitat sinàptica sobre la localització de les isoformes clàssiques de la PKC (cPKC) a la unió neuromuscular de rata adulta

- 2.1. Expressió de les isoformes de cPKC en múscul esquelètic adult i la seva localització a la unió neuromuscular
- 2.2. Activitat de la PKC i alliberament del transmissor a la unió neuromuscular
- 2.3 Expressió i activitat fosforiladora de les isoformes de cPKC en múscul esquelètic de rata adulta
 - 2.3.1 Músculs en repòs
 - 2.3.2 Efecte de l'estimulació nerviosa amb i sense contracció muscular en la localització de les isoformes cPKC a la membrana
 - 2.3.3 Efecte de l'estimulació nerviosa amb i sense contracció muscular en la fosforilació de les isoformes de cPKC
 - 2.3.4 Efecte de l'estimulació nerviosa amb i sense contracció muscular en la fosforilació proteica per PKC
 - 2.3.5 L'estimulació nerviosa i la contracció no alteren la localització de les isoformes de cPKC a la unió neuromuscular

3. Desenvolupament de l'eliminació sinàptica i maduració dels agrupaments de nAChR a la sinapsi neuromuscular de ratolins deficientes en la isoforma θ de la PKC

- 3.1 Ratolins deficientes en la isoforma PKC θ
- 3.2 Control del desenvolupament de les fibres musculars esquelètiques en animals deficientes en la PKC θ
- 3.3 PKC θ és necessària per a l'eliminació sinàptica dependent d'activitat
- 3.4 Canvis morfològics en la maduració dels agrupaments de nAChR durant el període d'eliminació sinàptica postnatal al múscul LAL d'animals KO
- 3.5 Efecte de la PKC θ en la fosforilació de les subunitats δ i ϵ del receptor d'acetilcolina nicotínic (nAChR)
- 3.6 Efecte de la PKC θ en l'organització ultraestructural de la NMJ
- 3.7 Localització cel·lular de la PKC θ

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

SERINA/TREONINA QUINASES A LA SINAPSI NEUROMUSCULAR: ESPECIALITZACIÓ DE LES ISOFORMES
DE LA PROTEÏNA QUINASA C

Núria Montserrat Besalduch Canes

ISBN:978-84-692-3232-3/DL:T-939-2009

1. Expressió i localització de diferents isoformes de la PKC i de diferents subunitats de la PKA

S'ha descrit que al múscul esquelètic s'expressen varies isoformes de la PKC entre les que es troben isoformes de la família clàssica (α , β I i β II), nova (ϵ , δ i θ) i de l'atípica (ζ) (Richter i col., 1987; Cleland i col., 1989; Hietanen i col., 1990; Nakano i col., 1992; Arakawa i col., 1993; Hilgenberg i Miles, 1995; Nishizuka, 1995; Van Ginneken i col., 2004). També s'ha trobat que s'expressen varies subunitats de la PKA ($C\alpha$, $R1\alpha$, $R11\alpha$, $R11\beta$) (Hoover i col., 2001; Perkins i col., 2001). Tanmateix, no existeixen estudis comparatius de l'expressió d'aquestes i altres isoformes de la PKC, ni d'aquestes subunitats de la PKA, durant el desenvolupament postnatal i en l'adult. A més, pocs són els estudis que hagin determinat la localització precisa d'aquestes isoformes i subunitats al múscul esquelètic i, encara són més escassos els treballs on s'hagi estudiat la presència d'aquestes quinases a la sinapsi neuromuscular. Les ubicacions descrites fins al moment són poc concretes. En el present estudi, un cop demostrada la presència de les isoformes i de les subunitats al múscul esquelètic mitjançant tècniques de Western blot, es van realitzar experiments utilitzant tècniques d'immunohistoquímica (IHQ) per identificar en quin o quins dels tres tipus cel·lulars de la unió neuromuscular es localitzen (cèl·lula muscular, cèl·lula de Schwann i terminal nerviós).

1.1 Expressió de diferents isoformes de la PKC (α , β I, β II, γ , ϵ , δ , θ , ζ i μ)

Es van realitzar diferents Western blots amb proteïna total de mostres procedents de múscul de les extremitats de rates de dues edats, P6 i adult, per tal de determinar la presència de diferents isoformes de la PKC en múscul esquelètic (α , β I, β II, ϵ , δ , θ , ζ i μ). Es van utilitzar anticossos específics per a les diferents isoformes i es va obtenir un patró de bandes esperat d'acord al seu pes molecular teòric (figura 14). La tècnica del Western blot va demostrar la presència de PKC α , β I, β II, ϵ , δ , θ , ζ i μ en quantitat suficient mentre que la isoforma γ va ser gairebé indetectable (figura 14). Es va detectar la isoforma PKC α amb un pes molecular de 76.7 kDa; la isoforma PKC β I, amb un pes molecular de 76.6 kDa; la isoforma PKC β II, amb un pes molecular de 76.8 kDa; la isoforma PKC ϵ , amb un pes molecular de 94 kDa; la isoforma PKC δ , amb un pes molecular de 75 kDa; la isoforma PKC θ , amb un pes molecular de 80.1 kDa; la isoforma

Resultats

PKC ζ , amb un pes molecular de 80 kDa i la isoforma PKC μ , amb un pes molecular de 100 kDa.

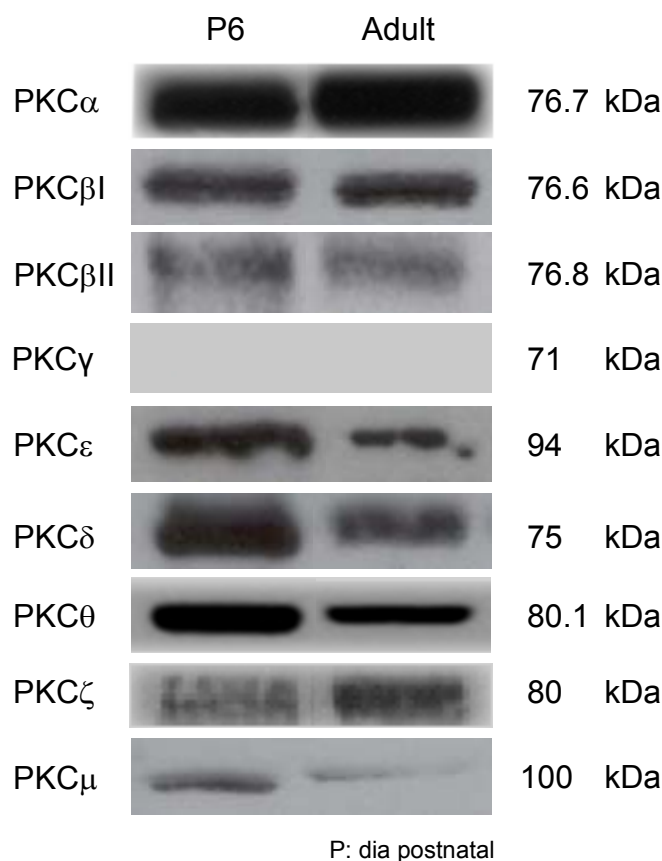


Figura 14. Anàlisi mitjançant Western blot de diferents isoformes de la PKC (α , β I, β II, γ , ϵ , δ , θ , ζ i μ) en extractes proteics de músculs esquelètics de rates d'edats P6 i adultes. La quantitat de proteïna és de 15 μ g per mostra. Els pesos moleculars esperats són els que s'indiquen.

Es pot observar que l'expressió de les diferents isoformes de la PKC (figura 14) no és igual en les dues edats estudiades (P6 i adult). S'observa que l'expressió de PKC α augmenta en l'adult respecte a P6 (ratio adult/P6: 1.42 ± 0.03 ; 42.23% de variació). Per altra banda, l'expressió de la isoforma PKC β I és molt semblant entre P6 i adult, sense que hi hagi pràcticament variació en l'expressió (0.97 ± 0.07 ; 2.11% menys en l'adult). En el cas de la isoforma β II, l'expressió en les dues edats estudiades varia i ho fa disminuint en l'adult (0.79 ± 0.13 ; 20.15% de reducció en l'adult respecte a P6). La isoforma γ va ser en tots els casos pràcticament indetectable. L'expressió de les

isoformes PKC ϵ , δ i θ , de la família de les PKCs noves, és semblant. En les tres isoformes, l'expressió cau en l'adult (0.45 ± 0.02 ; 54.80%, 0.75 ± 0.02 ; 24.24% i 0.63 ± 0.01 ; 36.55%, respectivament). Pel que fa a la isoforma ζ , de la família de les PKCs atípiques, hi ha un augment en l'adult respecte a P6 (1.85 ± 0.16 ; 85.62%), al contrari que en les isoformes de la família de les PKCs noves. Per últim, la isoforma μ de la PKC també té una diferent expressió durant les dues edats estudiades, hi ha una disminució en l'adult respecte a P6 (0.16 ± 0.08 ; 83.90%).

Es va verificar l'especificitat d'aquests anticossos amb la tècnica del Western blot i del Slot Blot. Els anticossos de la família clàssica contra βI , βII i γ van detectar la proteïna corresponent i no es van detectar reaccions creuades entre les isoformes. En canvi, els anticossos contra la isoforma α , a més de detectar la proteïna corresponent, també reconeixien βI ($12.51\% \pm 0.81$) i βII ($20.9\% \pm 0.43$). Pel que fa als anticossos utilitzats contra les isoformes de la família de les PKCs noves i de les atípiques eren específics per a la isoforma corresponent.

1.2 Localització de diferents isoformes de la PKC (α , βI , βII , ϵ , δ , θ , ζ i μ)

Conèixer la localització específica subcel·lular de les isoformes de la PKC als elements pre-, post i perisinàptics és crucial per determinar la funció d'aquestes proteïnes. Per analitzar la distribució cel·lular de les isoformes a la NMJ es van realitzar tècniques d'immunohistoquímica utilitzant el múscul LAL com a model experimental. Es va realitzar la tècnica d'immunohistoquímica (IHQ) sobre el múscul LAL sencer i en els casos que va ser necessari es va ampliar l'estudi obtenint seccions semifines de músculs sencers tenyits amb un triple marcatge. Aquesta tècnica proporciona un mètode simple i molt sensible per a l'anàlisi de les molècules a la sinapsi neuromuscular. Per a la realització de la tècnica d'immunohistoquímica es van utilitzar els mateixos anticossos específics de les isoformes de la PKC utilitzats en la tècnica de Western blot, en combinació amb altres anticossos que són marcadors específics dels diferents tipus cel·lulars de la unió neuromuscular. Aquests últims són la syntaxina i el neurofilament com a marcadors del terminal nerviós i el S-100 com a marcador de la cèl·lula de Schwann. També es va utilitzar la α -BTX com a marcador dels receptors d'acetilcolina

(nAChR) postsinàptics. El marcatge obtingut va ser diferent per cada anticòs utilitzat i es detalla a continuació per a cada isoforma.

La figura 15 (a) mostra la colocalització de la PKC α (en verd) amb els nAChR tenyits amb α -BTX (en vermell) i es pot observar que la PKC α està present a la unió neuromuscular. A la figura 15 (b) i (c) es mostra una immunohistoquímica de talls semifins on s'ha combinat la PKC α (en verd) amb els nAChR (en vermell) i amb sintaxina/neurofilament (Sin/NF) (b) o amb S-100 (c) (tots dos marcadors en blau). Quan PKC α es va marcar juntament amb α -BTX i sintaxina/neurofilament [figura 15 (b)], es va detectar una marca granulada fina per a PKC α colocalitzada fortament amb la de sintaxina/neurofilament en la posició corresponent al terminal nerviós presinàptic (sobre els plecs postsinàptics positius per als nAChR) [fletxa en la imatge de colocalització, en (b)]. El senyal es va veure també fora del terminal nerviós marcant intensament la cèl·lula muscular postsinàptica i el que podria correspondre als cossos de la cèl·lula de Schwann. L'immunomarcatge amb una marca granular densa a la regió ocupada per la cèl·lula de Schwann que cobreix el terminal nerviós estava desplaçat principalment cap a la regió de la cèl·lula glial allunyada de les terminacions nervioses presinàptiques [figura 15 (c)]. Aquests resultats indiquen que PKC α és una molècula situada a la unió neuromuscular i que està expressada als tres elements d'aquesta. A més, es va observar un marcatge intens a les àrees extrasinàptiques de les cèl·lules musculars.

En la figura 16 (a) s'observa la marca fluorescent específica per a la PKC β I (verd) amb α -BTX (vermell, que marca els receptors postsinàptics). Es pot observar que la marca en verd està present a la unió neuromuscular, però d'una forma molt més concentrada que en el cas de la PKC α [figura 15 (a)] suggerint que la marca de PKC β I pot estar al terminal nerviós. A la figura 16 (b) es mostra una immunohistoquímica de talls semifins on s'ha combinat la detecció de la PKC β I (en verd) amb els nAChR (en vermell) i S-100 (en blau). S'observa que en el cas de la isoforma β I, només es va trobar senyal positiu en una única localització de la unió neuromuscular. La marca de PKC β I es va mostrar agrupada en diferents petites àrees localitzades sobre la línia postsinàptica dels nAChRs i rodejades per la cèl·lula de Schwann [figura 16 (b)]. Aquesta marca es correspon amb els diferents botons del terminal nerviós perquè colocalitza amb la de sintaxina/neurofilament [imatge petita en (b)] indicant que aquesta isoforma s'expressa exclusivament al terminal nerviós de la unió neuromuscular.

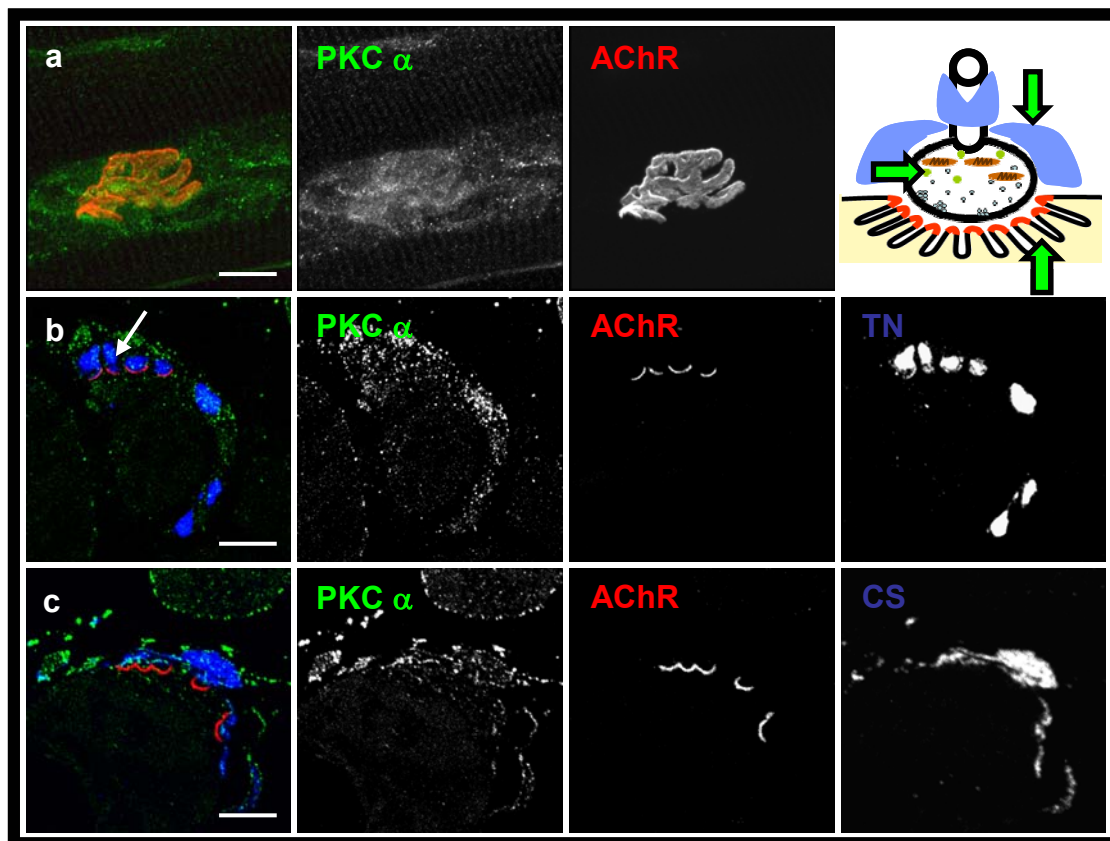


Figura 15. Localització de la isoforma PKC α a la unió neuromuscular mitjançant la tècnica d'IHQ. (a) IHQ on s'ha marcat en verd la PKC α i en vermell els nAChR. (b i c) Immunohitoquímica de seccions semifines on s'ha marcat en verd la PKC α , en vermell els nAChR i en blau el terminal nerviós (TN) (b) o la cèl·lula de Schwann (CS) (c). La imatge de color mostra la colocalització entre les diferents proteïnes immunodetectades. Al dibuix s'indica amb fletxes la localització de la isoforma a la NMJ. Barra d'escala = 10 μ m.

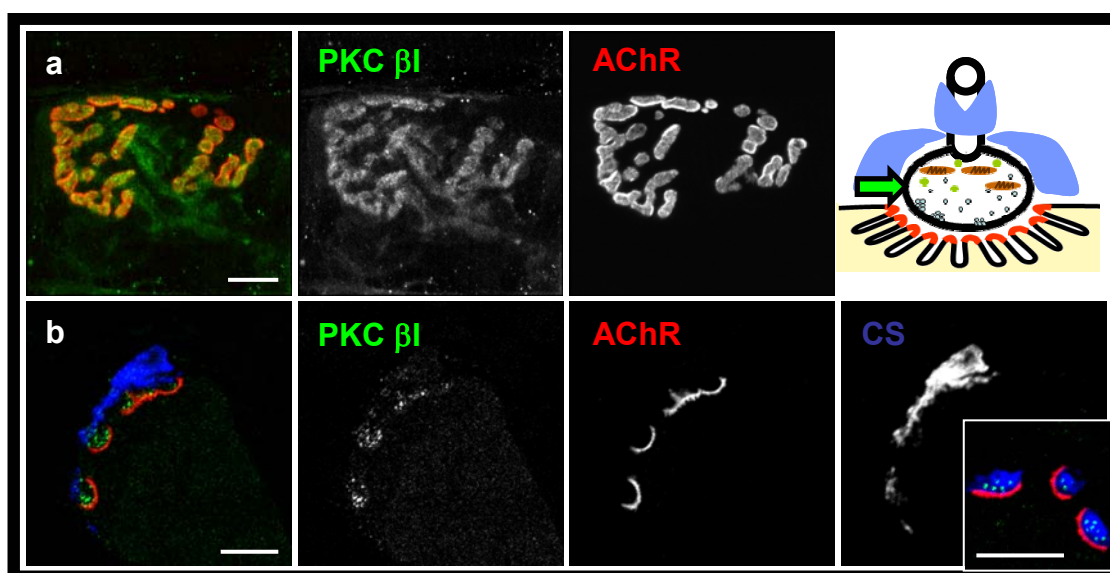


Figura 16. Localització de la isoforma PKC β 1 a la unió neuromuscular mitjançant la tècnica d'IHQ. (a) IHQ on s'ha marcat en verd la PKC β 1 i en vermell els nAChR. (b) Immunohitoquímica de seccions semifines on s'ha marcat en verd la PKC β 1, en vermell els nAChR i en blau la

cèl·lula de Schwann (CS). La imatge petita en (b) mostra en verd la PKC β I, en vermell els nAChR i en blau el terminal nerviós. La imatge de color mostra la colocalització entre les diferents proteïnes immunodetectades. Al dibuix s'indica amb fletxes la localització de la isoforma a la NMJ. Barra d'escala = 10 μ m.

La figura 17 (a) mostra la combinació de la PKC β II (en verd) amb α -BTX (en vermell) i es pot observar que la marca en verd està present a la unió neuromuscular, però aquesta és difusa i no es pot diferenciar amb exactitud en quin element de la unió neuromuscular està situada. En la figura 17 (b) es mostra una immunohistoquímica de seccions semifines on s'ha combinat la PKC β II (en verd) amb els nAChR (en vermell) i la syntaxina/neurofilament (en blau, marcador del terminal nerviós). La marca de PKC β II va mostrar una distribució que coincideix amb una de concentrada al component postsinàptic de la unió neuromuscular i per sobre del marcador per al terminal nerviós [Sin/NF; figura 17 (b)] que colocalitza amb el marcador per a la cèl·lula de Schwann [S100, la imatge petita a la figura 17 (b)]. L'espai ocupat pels botons dels terminals axònics, marcats amb anticossos contra syntaxina i neurofilament, van ser negatius per a PKC β II [figura 17 (b)]. La presència de la PKC β II a la part postsinàptica de la unió neuromuscular es va concentrar principalment per sota de la regió dels plecs postsinàptics, on es localitzen els nAChR, ocupant tota la regió postsinàptica. A més, les regions amb marca postsinàptica més intensa per β II estava localitzada immediatament per sota del plec primari, possiblement al fons dels plecs secundaris. És interessant remarcar que no hi va haver colocalització amb les regions amb senyal per a α -BTX (localització del plec primari), la qual cosa suggereix una localització específica i diferent per la PKC β II. Les imatges van mostrar també una evidència clara de marcatge al sarcolemma extrasinàptic.

En la figura 18 (a) s'observa el múscul LAL *in toto* amb la immunodetecció de la isoforma PKC ϵ a la sinapsi neuromuscular en una localització que podria correspondre al component presinàptic. A la figura 18 (b) s'observen seccions semifines on s'ha identificat, igual que en (a), en verd la isoforma PKC ϵ , en vermell els nAChR marcats amb α -BTX conjugada amb TRICT i, en blau la cèl·lula de Schwann detectada amb S-100. Al terminal nerviós s'observa una marca clara, que queda delimitat per sota pels nAChR i per sobre per la cèl·lula de Schwann. Així, els resultats mostren que la isoforma ϵ de la PKC només es localitza al terminal nerviós de la unió neuromuscular.

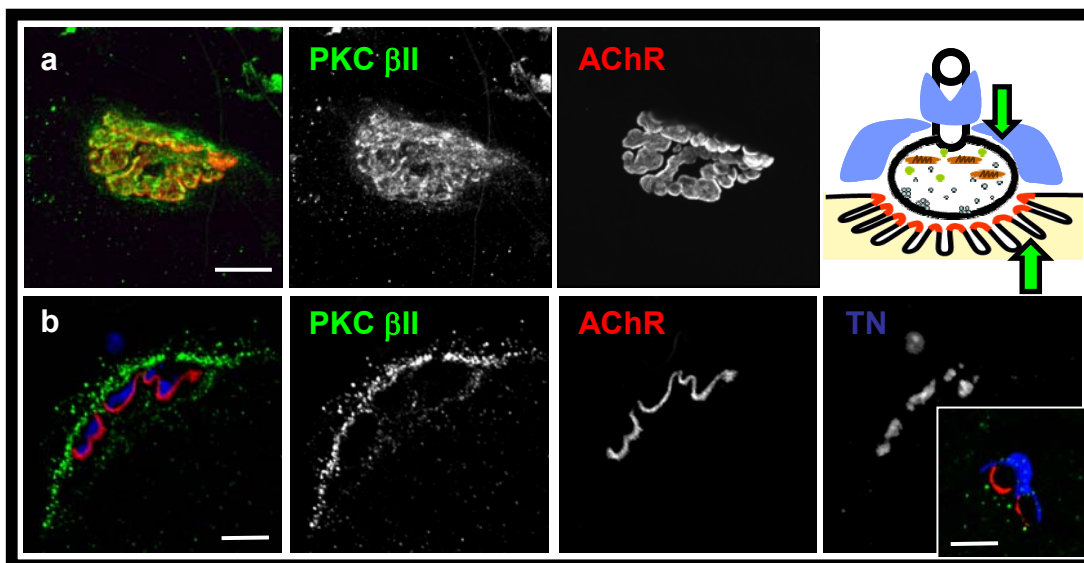


Figura 17. Localització de la isoforma PKC β II a la unió neuromuscular mitjançant la tècnica d'IHQ. (a) IHQ on s'ha marcat en verd la PKC β II i en vermell els nAChR. (b) Immunohitoquímica de seccions semifines on s'ha marcat en verd la PKC β II, en vermell els nAChR i en blau el terminal nerviós (TN). La imatge petita en (b) mostra en verd la PKC β II, en vermell els nAChR i en blau la cèl·lula de Schwann. La imatge de color mostra la colocalització entre les diferents proteïnes immunodetectades. Al dibuix s'indica amb fletxes la localització de la isoforma a la NMJ. Barra d'escala = 10 μ m.

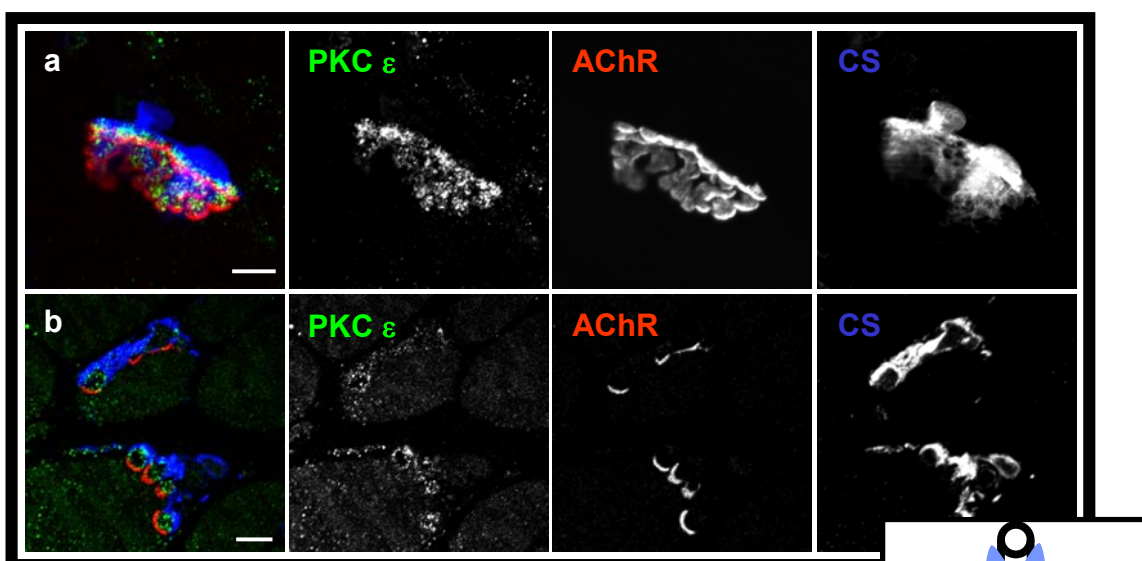


Figura 18. Localització de la isoforma PKC ϵ a la unió neuromuscular mitjançant la tècnica d'IHQ. (a) IHQ on s'ha realitzat un triple marcatge, en verd la PKC ϵ , en vermell els nAChR i en blau la cèl·lula de Schwann (CS). (b) El mateix immunomarcatge en seccions semifines. La imatge de color mostra la colocalització entre les diferents proteïnes immunodetectades. Al dibuix s'indica amb fletxes la localització de la isoforma a la NMJ. Barra d'escala = 10 μ m.

A la figura 19 (a) es mostra un triple immunomarcatge on en verd s'observa la marca de la isoforma δ de la PKC, en vermell els nAChR i en blau la cèl·lula de Schwann. En aquest cas s'observa la unió neuromuscular lateralment i es poden veure els diferents elements cel·lulars que hi formen part. La marca en verd (a) es detecta a la cèl·lula muscular, tant a la part sinàptica com a l'extrasinàptica, a la zona presinàptica (terminal nerviós o cèl·lula de Schwann) i també s'observa que colocalitza amb els nAChR o està immediatament sota d'ells. La imatge en (b) correspon a un miòcit dennervat en visió lateral. La PKC δ (en verd) es veu clarament localitzada sota dels nAChR (en vermell). En aquesta imatge es veu la presència de la cèl·lula de Schwann en blau, però en canvi, no hi ha marca de PKC δ colocalitzant amb ella. Es confirma així que PKC δ es troba a la unió neuromuscular, al terminal nerviós i a la cèl·lula muscular amb concentració a l'àrea postsinàptica.

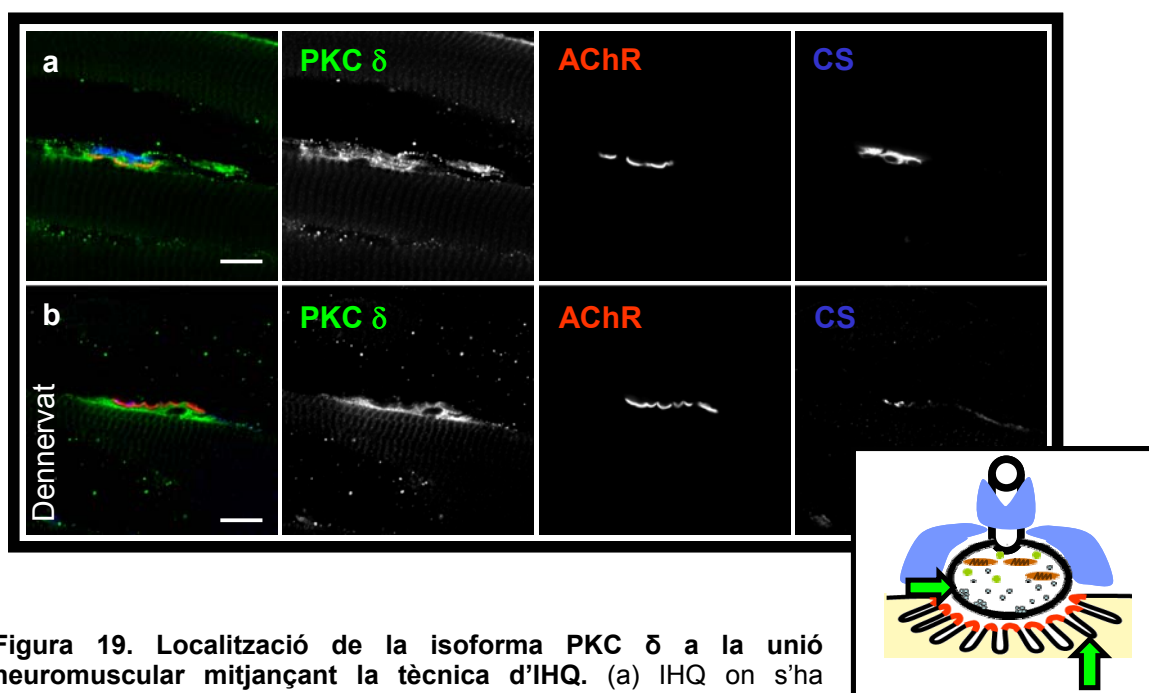


Figura 19. Localització de la isoforma PKC δ a la unió neuromuscular mitjançant la tècnica d'IHQ. (a) IHQ on s'ha realitzat un triple marcatge, en verd la isoforma PKC δ , en vermell els nAChR i la cèl·lula de Schwann (CS) en blau. (b) Imatge semblant a (a) però d'un miòcit dennervat. La imatge de color mostra la colocalització entre les diferents proteïnes immunodetectades. Al dibuix s'indica amb fletxes la localització de la isoforma a la NMJ. Barra d'escala = 10 μ m.

A la figura 20 es mostra la localització de la isoforma θ a la NMJ. Ja que estudis previs havien demostrat una acció clarament postsinàptica d'aquesta isoforma durant el desenvolupament postnatal, es va voler demostrar que tenia una ubicació a la fibra muscular en músculs d'animals P6. Per tal d'eliminar els terminals axonals i les cèl·lules de Schwann de la sinapsi, els músculs LALs es van tractar amb col·lagenasa (Lanuza i col., 2003). A la figura 20 (a) es mostra que després d'aquest tractament (descriu en l'apartat 3.8 de material i mètodes), l'expressió de PKC θ es detecta a la unió neuromuscular indicant així la localització postsinàptica d'aquesta isoforma. Com a control de que la fibra muscular està intacta, es pot veure que la subunitat δ dels nAChR es manté a la fibra muscular després del tractament [figura 20(b)]. Pel contrari, la syntaxina (el marcador del terminal nerviós) i S-100 (el marcador de la cèl·lula de Schwann) no estan presents a la unió neuromuscular després del tractament amb col·lagenasa [figura 20 (c)]. En la figura 20 (d) es mostra un múscul control no tractat amb col·lagenasa on sí es pot observar el terminal nerviós. Quan s'observen fibres musculars intactes, sense ser tractades amb col·lagenasa, PKC θ es localitza també a la unió neuromuscular però, en alguns casos, és possible veure axons que estan expressant la PKC θ [figura 20 (e) fletxa] indicant també la localització presinàptica d'aquesta isoforma. Així, amb aquests resultats es pot afirmar que la isoforma θ de la PKC es localitza a la cèl·lula muscular i també al terminal nerviós de la sinapsi neuromuscular.

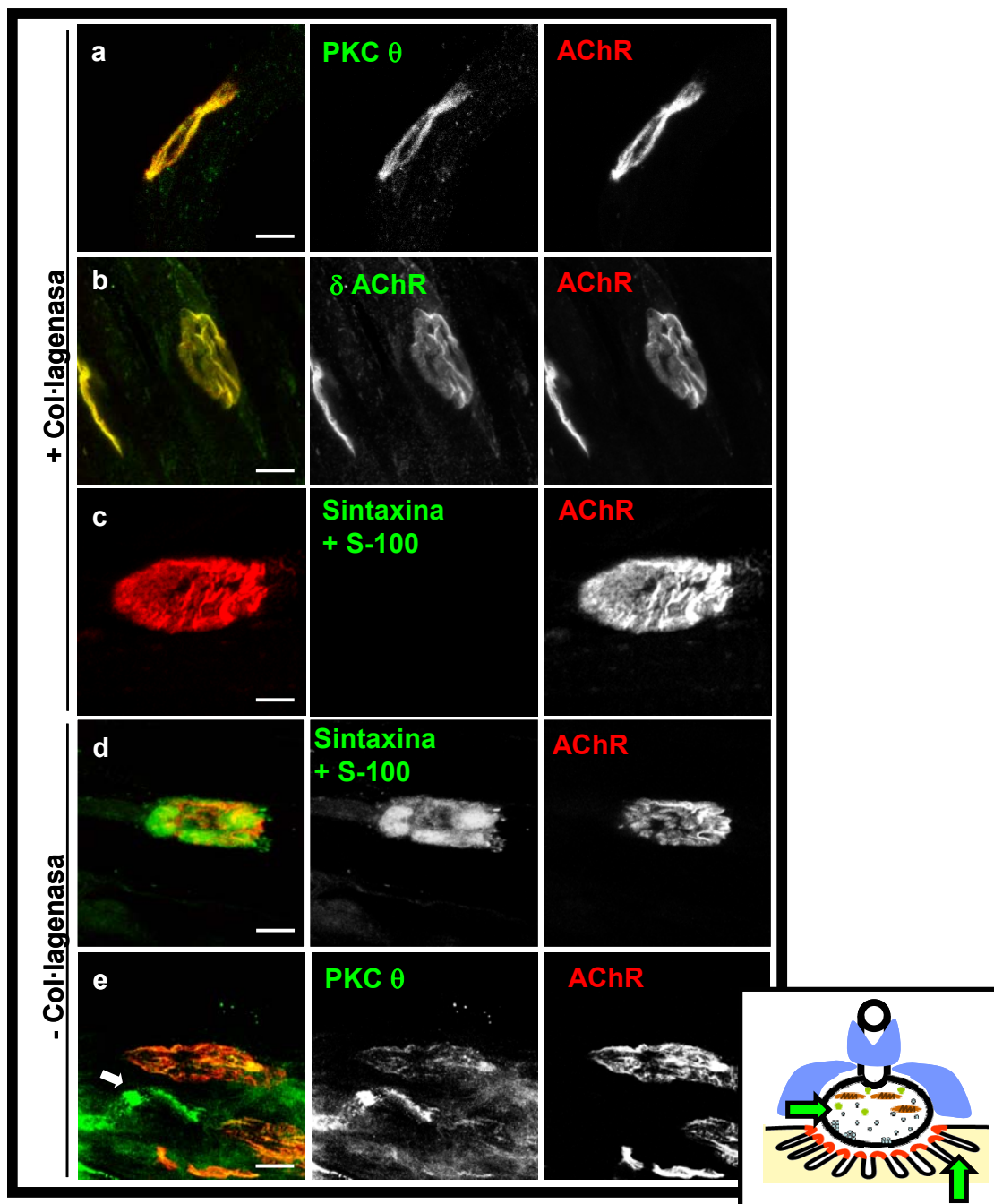


Figura 20. Localització de la isoforma PKC θ a la unió neuromuscular mitjançant la tècnica d'IHQ. (a) Immunoreactivitat de la PKC θ en fibres aïllades de múscul LAL després del tractament amb col·lagenasa d'animals de 6 dies d'edat. (b-c) Immunomarcatge de δ nAChR, sintaxina i S-100 utilitzat per demostrar que el tractament amb col·lagenasa i la separació mecànica elimina els terminals nerviosos i la cèl·lula de Schwann mentre es mantenen les molècules postsinàptiques. (d) Es mostra la marca positiva per a sintaxina i S-100 abans del tractament amb col·lagenasa. (e) La immunoreactivitat de PKC θ al múscul LAL d'animals de 6 dies. La imatge de color mostra la colocalització entre les diferents proteïnes immunodetectades. Al dibuix s'indica amb fletxes la localització de la isoforma a la NMJ. Barra d'escala = 10 μ m.

La figura 21 (a) mostra un triple immunomarcatge on en verd s'observa la isoforma ζ de la PKC, en vermell els nAChR i en blau el terminal nerviós. S'observa una marca de la isoforma de la PKC ζ àmplia i difosa per tota la fibra muscular encara que també clarament localitzada a la unió neuromuscular. En (b) s'observa una immunohistoquímica d'una secció longitudinal semifina. S'observa la marca per a PKC ζ als tres elements de la unió neuromuscular. La marca a la cèl·lula muscular se segueix observant com una tinció fina i difosa. La imatge de la secció transversal semifina (c) on queda marcat ara en blau la cèl·lula de Schwann, s'observa que aquest senyal colocalitza amb la marca de la isoforma ζ de la PKC. La marca que s'observa a la cèl·lula muscular segueix sent fina. Amb aquests resultats es pot afirmar que la PKC ζ es localitza a la cèl·lula de Schwann, al terminal nerviós i a tota la fibra muscular.

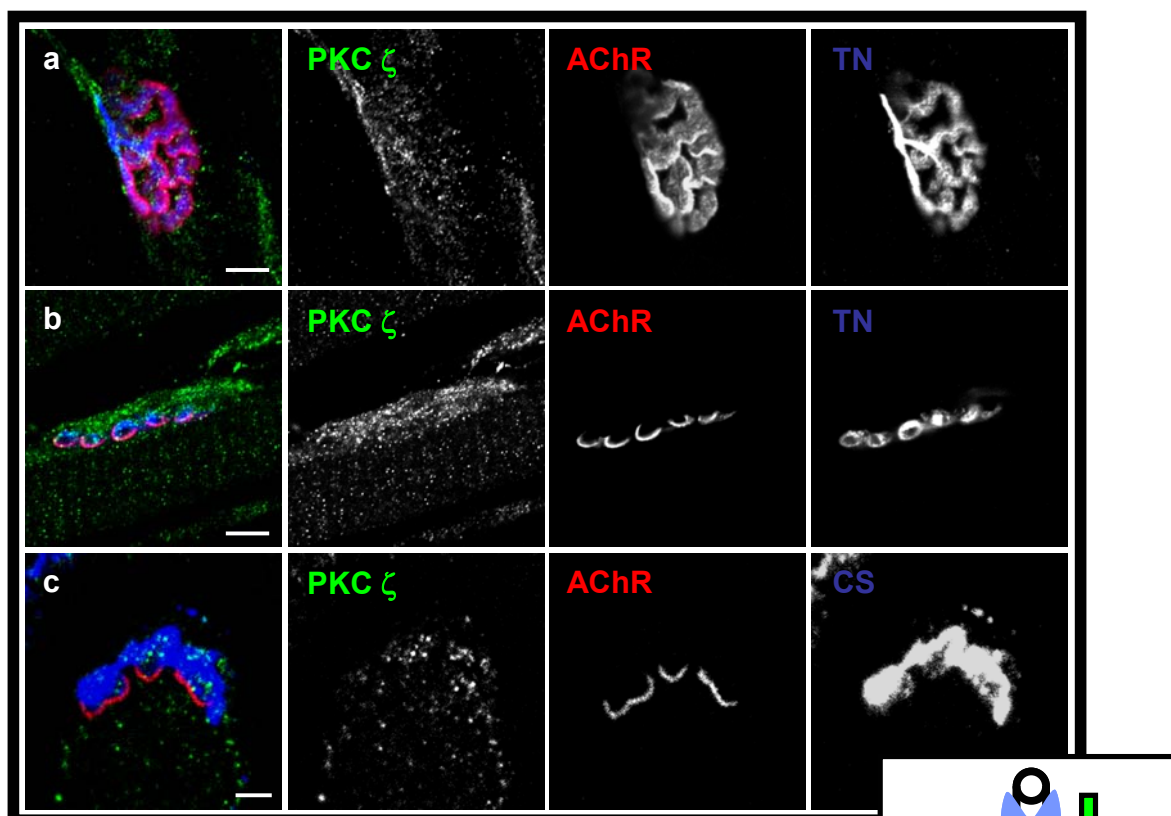


Figura 21. Localització de la isoforma PKC ζ a la unió neuromuscular mitjançant la tècnica d'IHQ. (a) IHQ on s'ha realitzat un triple marcatge, en verd la isoforma PKC ζ , en vermell els nAChR i en blau el terminal nerviós (TN). (b-c) IHQ en seccions semifines (b) el mateix triple marcatge realitzar en (a). (c) Triple marcatge on s'observa en verd la isoforma ζ de la PKC, en vermell els nAChR i en blau la cèl·lula de Schwann (CS). La imatge de color mostra la colocalització entre les diferents proteïnes immunodetectades. Al dibuix s'indica amb fletxes la localització de la isoforma a la NMJ. Barra d'escala = 10 μ m.

La figura 22 (a) i (b) mostra un triple immunomarcatge on en verd s'observa la isoforma μ de la PKC, en vermell els nAChR i en blau la cèl·lula de Schwann. S'observa un marcatge clar de la isoforma μ de la PKC a la unió neuromuscular, localitzada a la cèl·lula muscular i possiblement al terminal nerviós. En canvi, no s'observa similitud entre la marca de la isoforma amb la de la cèl·lula de Schwann. En (b) s'observa una imatge lateral d'un miòcit on s'ha realitzat un triple marcatge on la isoforma μ de la PKC es detecta en verd a l'àrea sinàptica de la cèl·lula muscular. No hi ha colocalització de PKC μ amb la cèl·lula de Schwann i molt possiblement tampoc amb el terminal nerviós. Amb aquests resultats es pot afirmar que la isoforma de la PKC es localitza a l'àrea sinàptica de la fibra muscular.

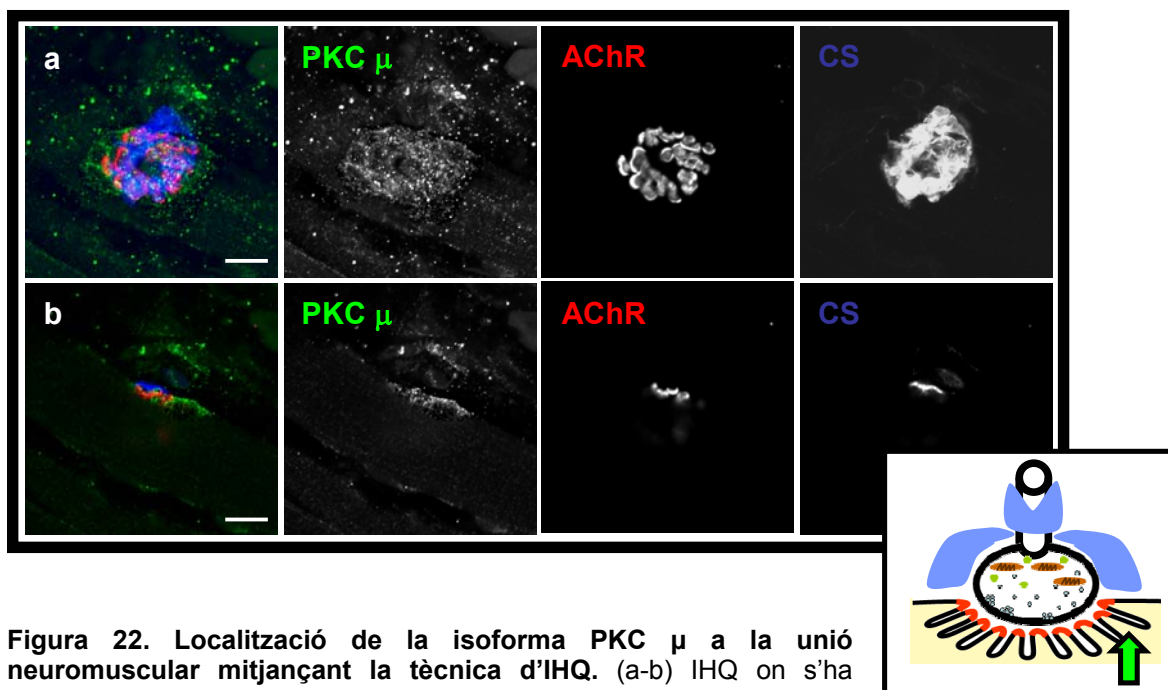


Figura 22. Localització de la isoforma PKC μ a la unió neuromuscular mitjançant la tècnica d'IHQ. (a-b) IHQ on s'ha realitzat un triple marcatge, en verd la isoforma PKC μ , en vermell els nAChR i en blau la cèl·lula de Schwann (CS). La imatge de color mostra la colocalització entre les diferents proteïnes immunodetectades. Al dibuix s'indica amb fletxes la localització de la isoforma a la NMJ. Barra d'escala = 10 μ m.

La figura 23 mostra un dibuix simplificat de la sinapsi neuromuscular resumint la immunolocalització de les isoformes de la PKC, α , β I, β II, ξ , δ , ξ i μ a la unió neuromuscular.

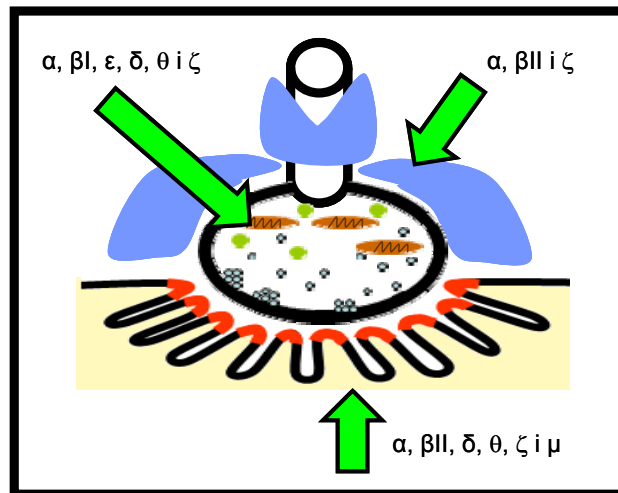


Figura 23. Resum de la immunolocalització de les diferents isoformes de la PKC (α , β I, β II, ϵ , δ , ζ i μ) a la sinapsi neuromuscular. Al terminal nerviós es localitzen les isoformes α , β I, ϵ , δ , θ i ζ . A la cèl·lula de Schwann les isoformes α , β II i ζ . I a la cèl·lula muscular es localitzen les isoformes α , β II, δ , θ , ζ i μ .

Resultats

1.3 Expressió de diferents subunitats de la PKA (C α , C β , RII i RI)

Es van realitzar diferents Westerns blots a partir de mostres de proteïna total procedents de múscul de les extremitats de rates a l'edat de P6 i a l'adult, per tal de determinar la presència de subunitats de la PKA al múscul esquelètic. Es van utilitzar anticossos específics per a les diferents subunitats i es va obtenir un patró de bandes esperat pel seu pes molecular teòric (figura 24). Es va detectar la subunitat PKA C α , amb un pes molecular de 40 kDa; la subunitat PKA C β , amb un pes molecular de 53 kDa; la subunitat PKA RII α , amb un pes molecular de 50 kDa i la subunitat PKA RI β , amb un pes molecular de 51 kDa. Els anticossos comercials existents per a la detecció de les subunitats catalítiques no són completament específics per a la subunitat específica per cada un d'ells, sinó que també en reconeixen d'altres, encara que, tot i amb això s'han detectat diferències entre els diferents anticossos tant d'expressió (mitjançant Western blot) com de localització (mitjançant tècniques d'immunohistoquímica que després es mostrarà). Així, l'anticòs contra la subunitat C α també reconeix la C β , i el C β reconeix la subunitat C α . D'aquesta manera, cada anticòs reconeix les dues subunitats catalítiques però amb més especificitat per la subunitat α o β , respectivament. El resultat de Western blot mostren una diferent expressió d'una i altra subunitat al múscul esquelètic a les diferents edats, però el patró d'expressió és el mateix mostrant una disminució a l'adult respecte a P6. Pel que fa als anticossos per a les subunitats reguladores, no diferencien entre α i β però no hi ha creuament entre les subunitats reguladores de tipus I i II.

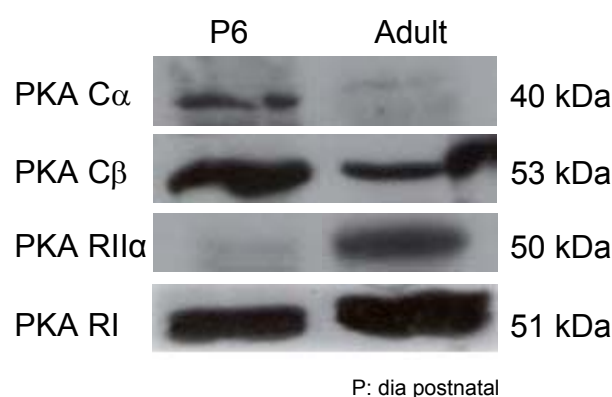


Figura 24. Anàlisi mitjançant Western blot de diferents subunitats de la PKA (C α , C β , RII α i RI) en extractes proteics de músculs esquelètics de rates d'edats P6 i adultes. La quantitat de proteïna és de 15 μ g per mostra. Els pesos moleculars esperats són els que s'indiquen.

Es pot observar que l'expressió de les diferents subunitats de la PKA no és igual a les dues edats estudiades (P6 i adult). L'expressió de la PKA C α a l'adult disminueix molt respecte a l'expressió en P6 (ratio adult/P6: 0.217 ± 0.01 ; 78.20% més en P6 que a l'adult). L'expressió de la subunitat C β a l'adult també disminueix respecte a P6 (0.39 ± 0.02 ; 60.29%). En el cas de la subunitat RII α , quasi no s'expressa en P6, en canvi, a l'adult l'augment respecte a P6 és més que considerable (8.37 ± 1.32 ; 737.80%). Per últim, la subunitat RI, igual com la subunitat RII α té una expressió menor en P6 que a l'adult, però aquí només s'observa un dèbil augment (1.36 ± 0.01 ; 36.27%).

1.4 Localització de diferents subunitats de la PKA (C α , C β , RII i RI)

Conèixer la localització específica subcel·lular de les subunitats de la PKA en els elements pre-, post i perisinàptics és crucial per determinar la/les funció/ons d'aquestes proteïnes. Per tal d'analitzar la distribució cel·lular de les subunitats a la NMJ es van realitzar tècniques d'immunohistoquímica utilitzant el múscul LAL com a model experimental. Es va realitzar la tècnica d'immunohistoquímica sobre el múscul LAL sencer i en els casos que va ser necessari es va ampliar l'estudi obtenint seccions semifines de músculs sencers tenyits amb un múltiple marcatge. Aquesta tècnica proporciona un mètode simple i sensible per a l'anàlisi de les molècules a la sinapsi neuromuscular. Per a la realització de la tècnica d'immunohistoquímica es van utilitzar els mateixos anticossos específics de les subunitats de la PKA utilitzats en la tècnica de Western blot en combinació amb altres que són marcadors específics dels diferents tipus cel·lulars de la unió neuromuscular. Aquests últims són la syntaxina i el neurofilament com a marcadors del terminal nerviós i el S-100 com a marcador de la cèl·lula de Schwann. També es va utilitzar la α -BTX com a marcador dels receptors d'acetilcolina (nAChR) postsinàptics. La marca obtinguda va ser diferent per cada anticòs utilitzat i es detalla a continuació per a cada subunitat.

A la figura 25 (a) s'observa una visió pràcticament lateral d'una NMJ on s'ha realitzat un doble marcatge: en verd la subunitat PKA C α i en vermell els nAChR postsinàptics. S'observa que la marca de la subunitat de PKA és més extensa que l'àrea que delimiten els nAChR i està per sobre dels receptors, indicant una localització presinàptica de PKA C α (terminal nerviós i/o cèl·lula de Schwann). No s'observa senyal positiu per sota dels nAChR, a la fibra muscular. En (b) i (c) s'ha realitzat un triple

Resultats

marcatge per observar si hi ha colocalització de PKA $C\alpha$ amb els altres dos elements cel·lulars de la unió neuromuscular. A la figura 25 (b) s'observa en blau el terminal nerviós i es veu una clara colocalització amb la marca verda de la subunitat de la PKA $C\alpha$, encara que aquesta també es localitza de forma més extensa i més tènue que la marca axonal, suggerint una expressió de la PKA $C\alpha$ tant al terminal nerviós com a la cèl·lula de Schwann. A la figura 25 (c) s'observa en blau la cèl·lula de Schwann i a la imatge de colocalització es veu com també hi ha colocalització amb la marca verda, encara que predomina un senyal que correspon al terminal nerviós. Així, amb aquests resultats es pot afirmar que la subunitat PKA $C\alpha$ es localitza a la unió neuromuscular i en concret al terminal nerviós i a la cèl·lula de Schwann.

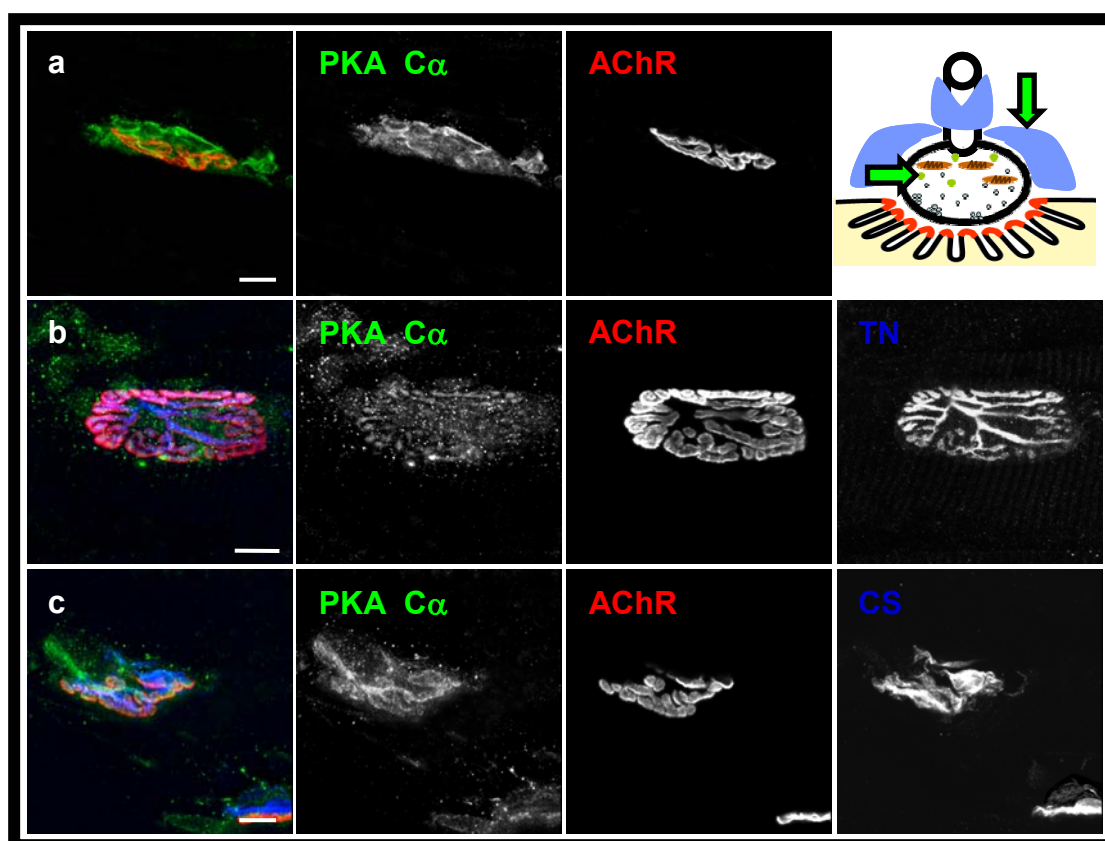


Figura 25. Localització de la subunitat PKA $C\alpha$ a la unió neuromuscular mitjançant la tècnica d'IHQ. (a) IHQ on s'ha realitzat un doble marcatge on en verd s'observa la marca de la subunitat PKA $C\alpha$ i en vermell els nAChR. (b) IHQ on s'ha realitzat un triple marcatge: en verd s'ha marcat la subunitat PKA $C\alpha$, en vermell els nAChR i en blau el terminal nerviós (TN). (c) Triple marcatge on s'ha marcat en verd la subunitat PKA $C\alpha$, en vermell els nAChR i en blau la cèl·lula de Schwann (CS). La imatge de color mostra la colocalització entre les diferents proteïnes immunodetectades. Al dibuix s'indica amb fletxes la localització de la isoforma a la NMJ. Barra d'escala = 10 μ m.

A la figura 26 s'observa en (a) un doble marcatge on en verd s'observa la subunitat PKA C β i en vermell els nAChR postsinàptics. La marca de la subunitat de PKA està ocupant una àrea àmplia de la NMJ suggerint que la subunitat C β està localitzada als tres elements cel·lulars de la unió neuromuscular. És remarcable la presència d'una marca que té la forma del terminal nerviós [veure fletxa la figura 26 (a)]. En (b) s'observa una imatge d'IHQ en seccions semifines on s'ha realitzat un triple marcatge. A la imatge que es mostra a la secció transversal de la unió neuromuscular es pot veure que la marca de la subunitat de la PKA C β es troba als tres elements de la unió. Amb aquests resultats es pot afirmar que la subunitat PKA C β es localitza als tres elements de la sinapsi neuromuscular.

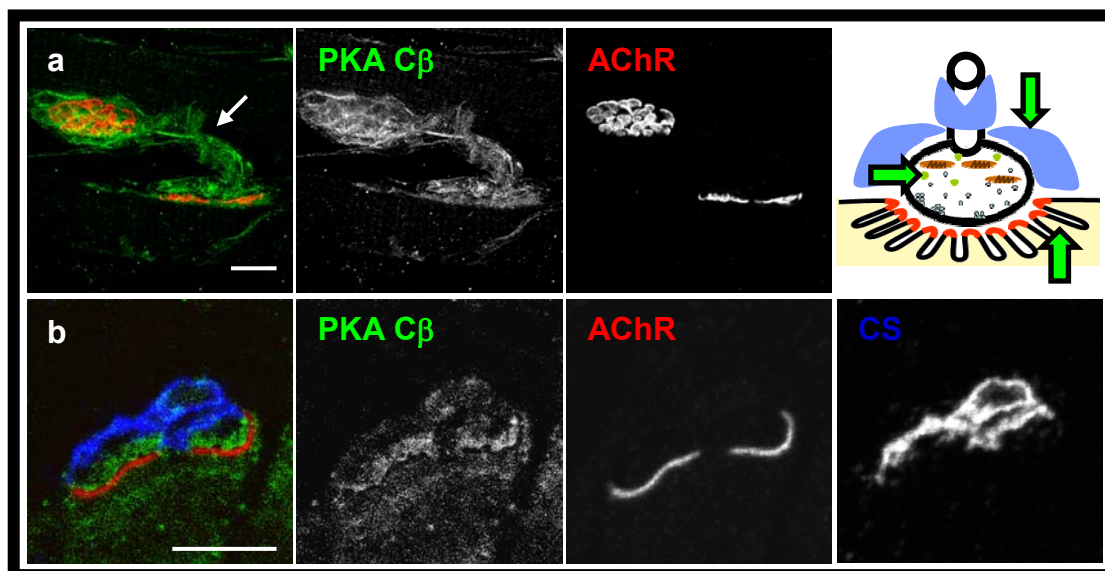


Figura 26. Localització de la subunitat PKA C β a la unió neuromuscular mitjançant la tècnica d'IHQ. (a) IHQ on s'ha realitzat un doble marcatge on en verd s'observa la marca de la subunitat PKA C β i en vermell els nAChR. (b) IHQ en seccions semifines on s'ha realitzat un triple marcatge: en verd s'ha marcat la subunitat PKA C β , en vermell els nAChR i en blau la cèl·lula de Schwann (CS). La imatge de color mostra la colocalització entre les diferents proteïnes immunodetectades. Al dibuix s'indica amb fletxes la localització de la isoforma a la NMJ. Barra d'escala = 10 μ m.

A la figura 27 (a) es pot observar que la subunitat PKA RII es localitza a la membrana del miòcit postsinàptic sense gaire coincidència amb els nAChR. És interessant observar que no existeix colocalització entre el terminal nerviós en blau i la subunitat de la PKA en verd. El triple marcatge realitzat en seccions semifines (b-c) on específicament es marca la cèl·lula de Schwann i els nAChR, mostra que no existeix

colocalització entre PKA RII i la cèl·lula de Schwann. És de ressaltar que la subunitat RII està localitzada en una àrea propera als nAChR però fora de l'àrea ocupada pels nAChR i propera a la membrana. En la figura 27 (c) s'observa una imatge d'una secció transversal d'un miòcit que no conté cap unió neuromuscular i se segueix detectant senyal en verd corresponent a la subunitat de la PKA en àrees de membrana cel·lular. Amb aquests resultats es pot afirmar que la subunitat RII de la PKA es localitza a la unió neuromuscular, únicament a la cèl·lula muscular en àrees adjacents als nAChR.

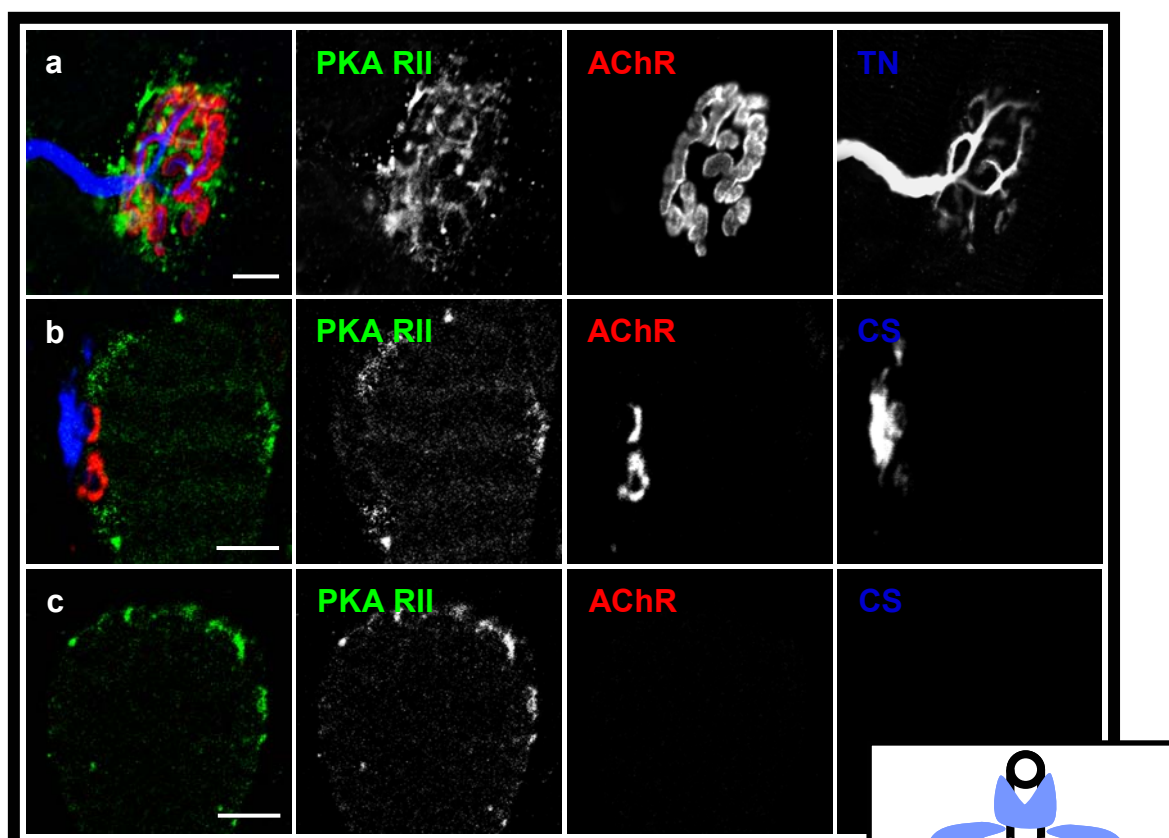


Figura 27. Localització de la subunitat PKA RII a la unió neuromuscular mitjançant la tècnica d'IHQ. (a) IHQ on s'ha realitzat un triple marcatge on en verd s'observa la marca de la subunitat PKA RII, en vermell els nAChR i en blau el terminal nerviós (TN). (b-c) IHQ en seccions semifines on s'ha realitzat un triple marcatge: en verd s'ha marcat la subunitat PKA RII, en vermell els nAChR i en blau la cèl·lula de Schwann (CS). La imatge de color mostra la colocalització entre les diferents proteïnes immunodetectades. Al dibuix s'indica amb fletxes la localització de la isoforma a la NMJ. Barra d'escala = 10 µm.

A la figura 28 s'ha realitzat un triple marcatge on en verd s'observa la subunitat de la PKA RI, en vermell els nAChR postsinàptics i en blau, el terminal nerviós (a) o la cèl·lula de Schwann (b). En (a) s'observa que la marca en verd només es localitza per sota els receptors i no hi ha colocalització amb el terminal nerviós. En (b), una imatge lateral de dues plaques motores, s'observa que el senyal en verd es troba únicament per sota del vermell dels nAChR postsinàptics i no colocalitza amb la senyal blava de la cèl·lula de Schwann. Amb aquests resultats es pot afirmar que la subunitat de la PKA RI està localitzada únicament a la cèl·lula muscular de la unió neuromuscular per sota de la ubicació dels nAChR.

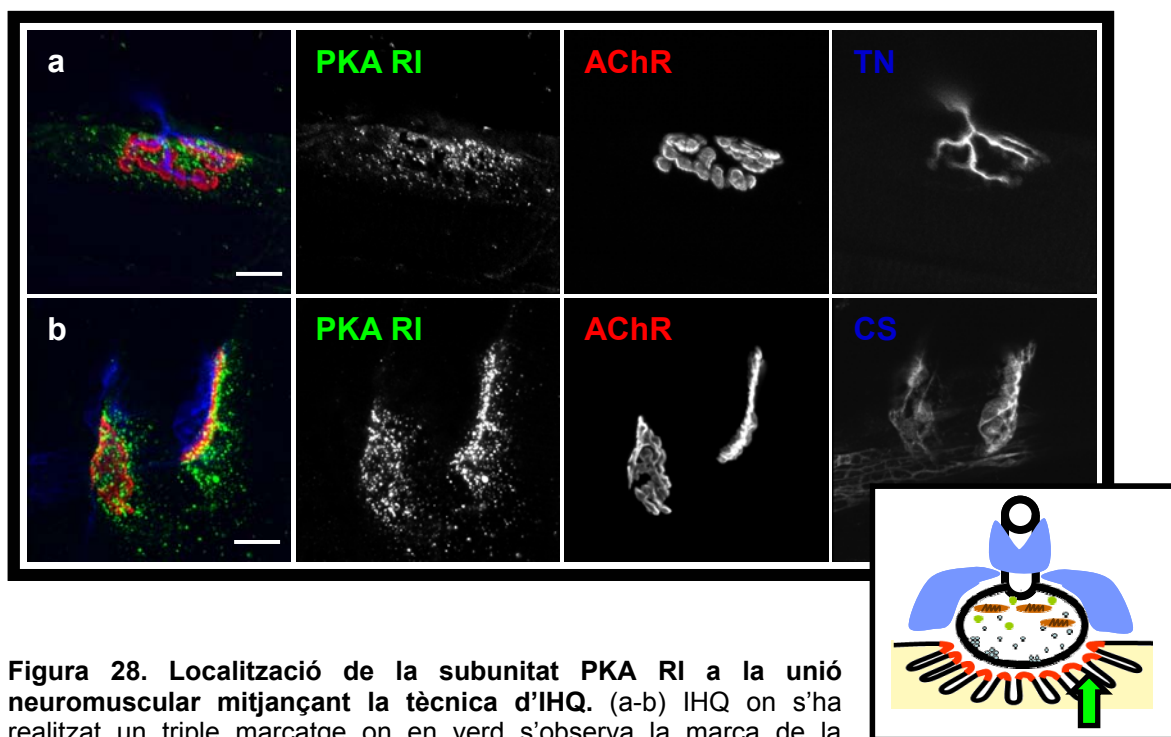


Figura 28. Localització de la subunitat PKA RI a la unió neuromuscular mitjançant la tècnica d'IHQ. (a-b) IHQ on s'ha realitzat un triple marcatge on en verd s'observa la marca de la subunitat PKA RI, en vermell els nAChR i en blau el terminal nerviós (TN) en (a) i la cèl·lula de Schwann (CS) en (b). La imatge de color mostra la colocalització entre les diferents proteïnes immunodetectades. Al dibuix s'indica amb fletxes la localització de la isoforma a la NMJ. Barra d'escala = 10 μ m.

Resultats

La figura 29 resumeix la immunolocalització de les subunitats de PKA $C\alpha$, $C\beta$, RII i RI a la unió neuromuscular.

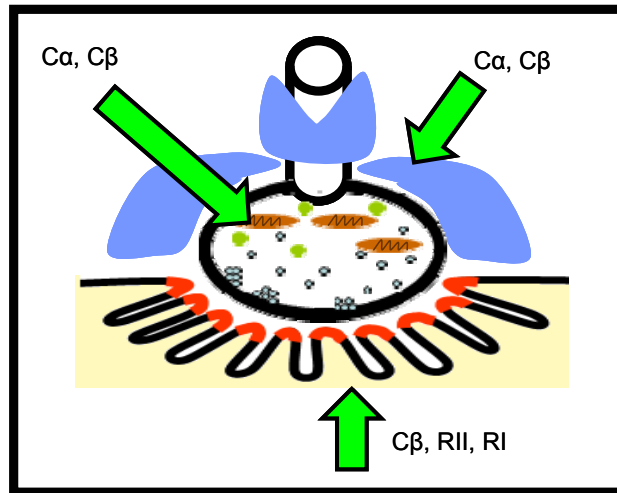


Figura 29. Resum de la immunolocalització de les diferents subunitats de la PKA ($C\alpha$, $C\beta$, RII i RI) a la sinapsi neuromuscular. Al terminal nerviós es localitzen, igual que a la cèl·lula de Schwann les subunitats catalítiques de la PKA, $C\alpha$ i $C\beta$. A la cèl·lula muscular es localitzen les subunitats reguladores, RII i RI i també la subunitat $C\beta$.

2. Efecte de l'activitat sinàptica sobre la localització de les isoformes clàssiques de la PKC (cPKC) a la unió neuromuscular de rata adulta

L'activitat sinàptica en les neurones és essencial per al desenvolupament i funcionament normal dels sistema nerviós. Totes les sinapsis químiques tenen en comú un mecanisme d'acció bàsic que és l'alliberament del neurotransmissor disparat per l'influx de calci durant el potencial d'acció presinàptic (Zucker, 1996). Entre els mecanismes que modulen l'alliberament del neurotransmissor provocant canvis en l'eficàcia sinàptica destaca l'acció presinàptica de la PKC i de la PKA (Santafé i col., 2005, 2006, 2009b) que, en el sistema neuromuscular *in vitro*, s'ha descrit que és dependent de l'estimulació elèctrica (Jia i col., 1999; Lanuza i col., 2000; Li i col., 2001). En el present treball es pretén conèixer l'efecte que l'activitat sinàptica, amb i sense contracció, provoca en l'activació i localització de les isoformes de la família de la PKC dependent de calci (α , β I, β II, γ) al múscul esquelètic adult així com la seva possible relació amb l'acoblament de la PKC en l'alliberament de neurotransmissor.

2.1 Expressió de les isoformes de cPKC en el múscul esquelètic adult i la seva localització a la unió neuromuscular

Com s'ha descrit en el capítol anterior de resultats (apartat 1.1), per tal de determinar la presència d'isoformes de cPKC en el múscul esquelètic, abans d'analitzar la seva localització i els possibles canvis funcionals, es va realitzar un Western blot mitjançant anticossos contra isoformes de cPKC (α , β I, β II i γ) en mostres d'extractes proteics provinents de múscul esquelètic. El Western blot va demostrar la presència d'aquestes quatre isoformes encara que la isoforma γ quasi va ser indetectable (figura 14 en l'apartat 1.1 de la secció de resultats). Les isoformes PKC α , β I i β II es van detectar en quantitat suficient. Un cop demostrada la presència de les isoformes clàssiques al múscul esquelètic, es van realitzar experiments utilitzant tècniques d'immunohistoquímica per identificar en quin o quins dels tres tipus cel·lulars que formen la unió neuromuscular es troben (cèl·lula muscular, cèl·lula de Schwann i terminal nerviós). En resum, s'han detectat les isoformes PKC α i β I al terminal nerviós de la unió neuromuscular mentre que PKC α i β II es van detectar a la cèl·lula postsinàptica i a la cèl·lula de Schwann (veure figura 15, 16 i 17 en l'apartat 1.2 de resultats). Per tant, la PKC β I és la isoforma que exclusivament es detecta al terminal nerviós de la NMJ. Les

isoformes α , β I i β II de PKC no només s'observen a l'àrea sinàptica, sinó que a la regió extrasinàptica de les fibres musculars també es pot observar una marca dèbil i difusa. A més, PKC α es detecta molt intensament a la paret dels vasos i en cèl·lules del teixit connectiu (resultats que no es mostren).

2.2 Activitat de la PKC i alliberament del transmissor a la unió neuromuscular

En estudis previs del nostre laboratori on es van estudiar preparacions d'unió neuromuscular de mamífer en repòs, es va veure que la PKC no estava acoblada al mecanisme d'alliberament de neurotransmissor evocat, perquè la seva inhibició no afectava a l'alliberament d'ACh (Santafé i col., 2005). A la figura 30 (a) i (b) (per un curs temporal), es pot veure que la inhibició total de la PKC per part de la calfosteïna C (CaC, 10 μ M) no provoca un canvi en l'alliberament d'ACh. L'increment de calci extern (5 mM), en canvi, augmenta la mida de l'EPP (un 100%, figura 30). Aquest efecte pot estar produït, en part, per la implicació de la PKC a la neurotransmissió, ja que el bloqueig de la quinasa amb CaC en presència d'una elevada concentració de calci va provocar la reducció de l'alliberament evocat [figura 30 (b)]. Aquests resultats suggereixen que en la modulació de l'alliberament de l'ACh evocat hi podrien estar implicades almenys les PKC dependents de calci, en condicions en les que la PKC estigui activa.

No obstant, encara que la PKC no estigui acoblada a l'alliberament d'ACh en condicions de repòs (preparacions neuromusculars *ex vivo* elèctricament inactives), quan les fibres que innerven la unió neuromuscular es van estimular elèctricament a baixa freqüència (una hora amb estimulació elèctrica contínua a 1 Hz introduint una activitat fisiològica moderada), la PKC va esdevenir acoblada en l'alliberament del neurotransmissor. Aquest acoblament es va manifestar per una petita, però significant, disminució de l'alliberament després de la inhibició de la quinasa amb CaC [figura 30 (b); imatge inferior en la figura 30 (c)]. Per altra banda, l'estimulació elèctrica de les fibres nervioses a baixa freqüència no va canviar per ella mateixa l'amplitud dels EPPs [figura 30 (a)] indicant la implicació de la PKC en el manteniment de l'activitat sinàptica contínua.

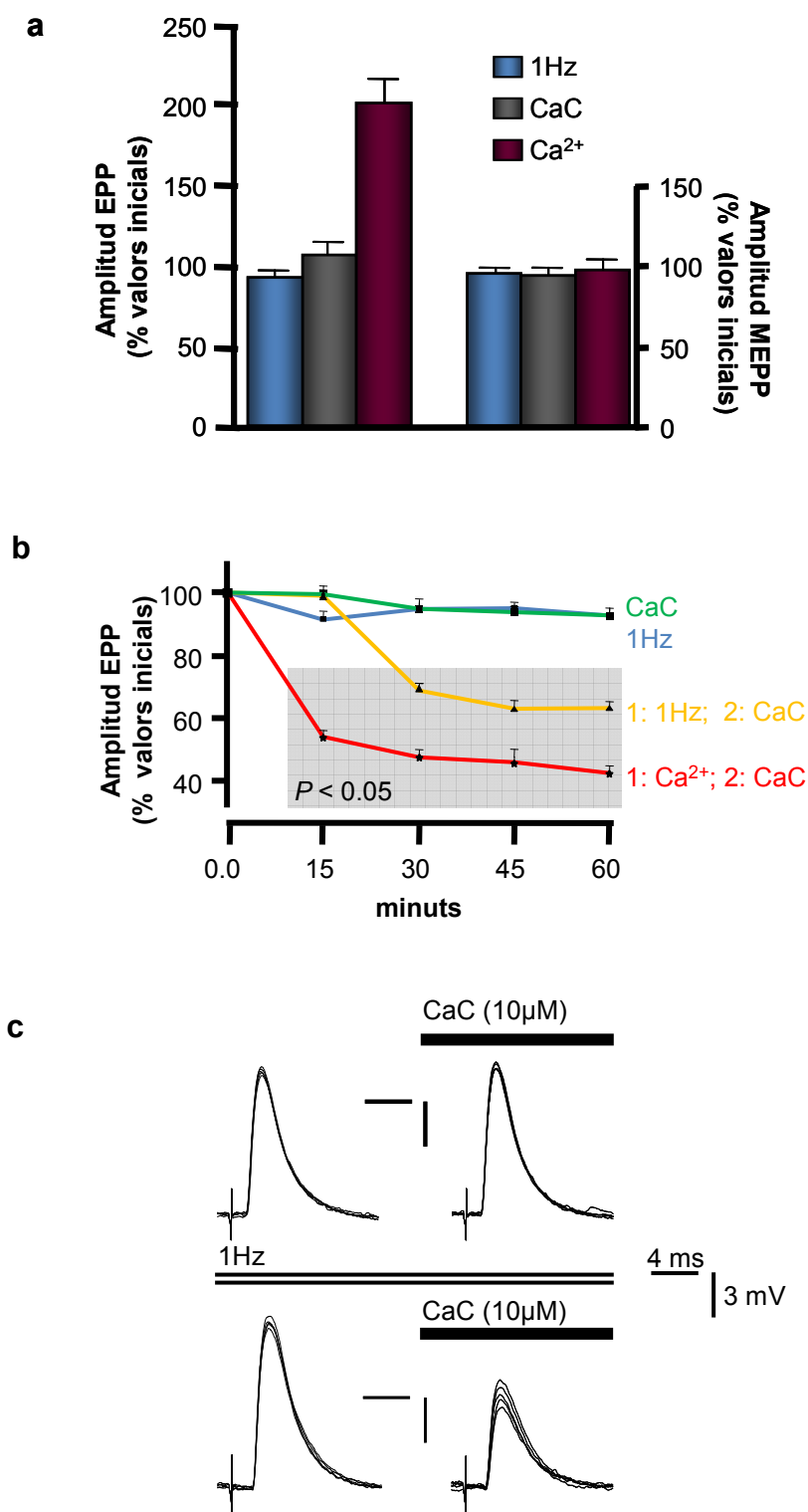


Figura 30. Registres electrofisiològics. (a) Preparacions neuromusculars *ex vivo* elèctricament inactives en condicions de repòs. La inhibició total de la PKC per calfosteïna C (CaC 10 μ M, 1 hora) no provoca un canvi en l'alliberament d'ACh (ambdós EPPs i MEPPs). També, una hora

d'estimulació elèctrica contínua a 1Hz, indueix una moderada activitat fisiològica, sense canviar la mida dels potencials sinàptics. A més, l'augment de calci exogen (5 mM) augmenta la mida dels EPPs (100%) sense un canvi en l'amplitud dels MEPPs. (b) Curs temporal de l'efecte de la CaC sobre l'amplitud dels EPPs quan el múscul va ser incubat sol (només amb CaC), en presència de calci extern (1: Ca^{2+} ; 2: CaC) i quan prèviament es va aplicar una estimulació contínua a 1Hz (1 hora) (1: 1Hz; 2: CaC). Els valors estan expressats en percentatge (mitjana \pm S.E.M) de l'amplitud inicial. N=10-15 fibres úniques per cada experiment. Punts dins l'àrea gris: $p < 0.05$ respecte als valors inicials (0.0 minuts). (c) Exemples de l'efecte de la CaC en els potencials sinàptics amb i sense estimulació elèctrica. Els EPPs van ser gravats a l'inici i als 60 minuts de l'aplicació de la CaC. A dalt: només CaC. A sota: CaC amb estimulació contínua a 1Hz. S'observa que els canvis produïts només es poden veure al de sota: la mida dels EPPs disminueix i la variança dels EPPs augmenta. Els artefactes s'han eliminat per veure-ho amb més claredat. Barres d'escala, horitzontal: 4 ms, vertical: 3 mV.

2.3 Expressió i activitat fosforiladora de les isoformes de cPKC en el múscul esquelètic de rata adulta

2.3.1 Músculs en repòs

En primer lloc, es va investigar com les isoformes de cPKC (α , βI , βII i γ) estan distribuïdes a les zones sinàptiques i extrasinàptiques del múscul esquelètic. En molts músculs, la zona sinàptica concentra quasi totes les unions neuromusculars prop de la regió central de les cèl·lules musculars facilitant una acurada separació d'aquestes àrees. La distribució de les sinapsis en el múscul diafragma es coneix bé i es van portar a terme experiments control en aquest múscul per assegurar que totes les unions neuromusculars es localitzaven a la part sinàptica i no hi havia unions a la part extrasinàptica quan aquestes àrees se separaven [veure apartat 3.4.3 de material i mètodes; figura 31 (a)].

Donat que es coneix que l'activació de la PKC per diacilglicerol (DAG) i calci provoca una translocació de la proteïna des del citoplasma a la membrana plasmàtica (Kraft i Anderson 1983; Nishizuka 1992, 1995), s'ha estudiat la distribució d'aquestes isoformes a les fraccions de membrana i de citoplasma de la mostra com a marcadors de l'activitat de PKC. Per avaluar la separació de la fracció de membrana i de citoplasma, s'ha utilitzat un anticòs contra Gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenasa (GAPDH), una proteïna específica de la fracció de citoplasma. En tots els casos, la immunoreacció de GAPDH es va observar només a la fracció del citoplasma i no a la de membrana [figura 31 (b)].

L'anàlisi quantitatiu per Western blot, realitzat en músculs en repòs, va indicar que les isoformes de cPKC α , β I i β II s'expressaven en ambdues àrees del múscul esquelètic de rata, a l'àrea sinàptica i a l'extrasinàptica, però no es van detectar diferències d'expressió entre aquestes àrees (ratio sinàptic/extrasinàptic: PKC α 1.05 ± 0.07 , β I 0.94 ± 0.11 , i β II 1.05 ± 0.12). Malgrat que els resultats d'immunohistoquímica han mostrat un enriquiment de les isoformes de cPKC en les estructures sinàptiques, els Westerns blots realitzats en músculs en repòs no presenten aquest enriquiment, possiblement degut al petit volum que representa la unió neuromuscular quan es compara amb la cèl·lula muscular extrasinàptica. Més endavant s'examinaran les diferències entre les zones sinàptiques i extrasinàptiques observades en les diferents situacions experimentals.

Per altra banda, sota condicions basals, totes aquestes proteïnes van ser més abundants a la fracció de membrana que en la de citoplasma [figura 31 (c): Ratio membrana sinàptica/citoplasma: PKC α 2.8 ± 1.0 , β I 2.71 ± 1.11 , i β II 2.6 ± 0.7]. Aquest resultat clarament indica que les isoformes de cPKC estan habitualment a la fracció de membrana suggerint que l'enzim està majoritàriament en estat actiu.

La fosforilació de la PKC és un requisit per a la seva activitat catalítica (Bornancin i Parker, 1997; Dutil i col., 1998). Per determinar la fosforilació de les isoformes de cPKC situades a la membrana i que per tant són actives, es va realitzar un Western blot amb un anticòs anti-phospho PKC (pan) [figura 31 (d)] que detecta les formes fosforilades de PKC α , β I, i β II entre altres isoformes. Sota condicions de repòs del múscul, s'ha detectat un nivell elevat de PKCs fosforilades a la membrana sinàptica i extrasinàptica i bandes molt més tènues a la fracció del citoplasma. Això confirma que la localització de l'enzim a la fracció de membrana està associada a l'estat actiu de la PKC. Els mateixos resultats es van trobar quan es va utilitzar l'anticòs anti-phospho-PKC α (Ser657) per identificar la fosforilació específica de PKC α [figura 31 (d)]. Això indica que les isoformes de cPKC estan actives habitualment també en condicions de repòs del múscul per al manteniment de processos cel·lulars. Els nivells detectats de proteïna de la isoforma γ de PKC van ser molt baixos en tots els músculs i, per tant, aquesta isoforma no va ser quantificada.

Resultats

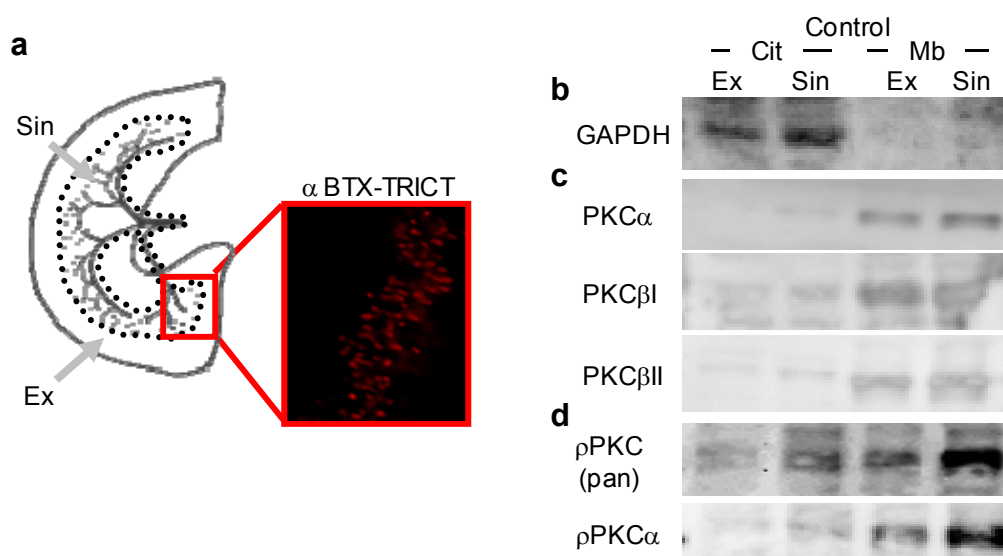


Figura 31. Expressió i fosforilació de les isoformes de cPKC en múscul esquelètic de rata adulta en repòs. (a) El dibuix del múscul diafragma mostra l'àrea d'innervació del múscul. Les línies discontinües indiquen el lloc pel qual s'han separat les àrees sinàptica (Sin) i extrasinàptica (Ex). La imatge fluorescent mostra les unions musculars detectades mitjançant α -BTX conjugada amb TRITC. Les unions neuromusculars es localitzen a la zona anomenada sinàptica i no n'hi ha a la zona extrasinàptica. (b) Western blot de Gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenasa (GAPDH), una proteïna específica de la fracció citoplasmàtica amb un pes molecular de 37 kDa. La immunoreactivitat de GAPDH s'observa només a la fracció del citoplasma (Cit) i no a la fracció de membrana (Mb) de les mostres analitzades. (c) Expressió de les isoformes de cPKC α , β I i β II a la fracció de membrana i de citoplasma de les àrees sinàptica i extrasinàptica del múscul diafragma. (d) Expressió de la cPKC fosforilada a la membrana i a la fracció citoplasmàtica muscular sinàptica i extrasinàptica. Es van utilitzar els anticossos anti-phospho-PKC (pan) (β II Ser660) (pes molecular 75-95 kDa) i anti-phospho-PKC α (β II Ser657) (pes molecular de 77 kDa).

2.3.2 Efecte de l'estimulació nerviosa amb i sense contracció muscular en la localització de les isoformes cPKC a la membrana

Quan el nervi és estimulat durant 30 minuts a baixa freqüència (1Hz) s'ha demostrat que una o més molècules de la família de les PKCs esdevenen acoblades en l'alliberament de neurotransmissor per al manteniment de l'activitat sinàptica contínua. És per aquesta raó que s'ha volgut estudiar si la quantitat d'alguna de les isoformes de cPKC varia la seva presència a la membrana després de l'estimulació elèctrica (amb o sense contracció). Un canvi de localització podria indicar la seva implicació en la modulació de l'alliberament d'ACh a la unió neuromuscular en aquestes condicions. Així, s'han realitzat estudis quantitius d'expressió de cPKCs i s'ha analitzat com estan

distribuïdes les isoformes de cPKC (α , β i β II) a les zones sinàptica i extrasinàptica i també s'ha estudiat la distribució d'aquestes isoformes a les fraccions de membrana i de citoplasma.

L'estimulació elèctrica de les fibres nervioses al múscul esquelètic (1Hz durant 30 minuts) i la resultant contracció muscular va causar un increment significatiu en la quantitat de les isoformes α , β i β II a la membrana sinàptica [figura 32 (a) i (b)]. Aquesta estimulació elèctrica a baixa freqüència va tenir un efecte més significatiu en la isoforma α (47% d'augment; $p < 0.05$) que en la β (31% d'augment; $p < 0.05$) encara que una part de l'augment de la isoforma α podria ser degut a la reactivitat creuada amb β (vist anteriorment). Es va detectar un petit canvi però significatiu en la isoforma β II (16% d'augment; $p < 0.05$). La unió d' α , β i β II a la membrana no va estar acompanyada d'un canvi significatiu d'aquestes molècules al citoplasma (ratio respecte al control: PKC α 1.19 ± 0.3 , β 1.14 ± 0.3 , i β II 1.05 ± 0.1 ; $p > 0.05$). A més, PKC β i β II no estaven augmentades a la fracció de membrana extrasinàptica després de 30 minuts d'estimulació elèctrica amb contracció. Aquest, però, no va ser el cas per a la isoforma α que estava incrementada a la membrana extrasinàptica (ratio respecte al control: PKC α 1.43 ± 0.3 , $p < 0.05$; β 1.21 ± 0.3 , i β II 1.14 ± 0.2 , $p > 0.05$).

Per tal de separar l'efecte de l'estimulació presinàptica i de la transmissió sinàptica en si mateixa de l'efecte de la contracció de la cèl·lula muscular, es van realitzar experiments en els que es va inhibir la contracció tallant les fibres musculars (descriu a l'apartat 3.2.1 de material i mètodes). En aquestes condicions, l'estimulació sinàptica va causar una disminució significativa de la quantitat de les tres isoformes (α , β i β II) a la membrana sinàptica [figura 32 (a) i (b); α 31% de canvi, β 16% i β II 7%, $p < 0.05$ en els tres casos]. La quantitat d'aquestes isoformes a la fracció de citoplasma no va variar significativament (ratio respecte al control: PKC α 1.09 ± 0.4 , β 1.17 ± 0.5 , i β II 0.96 ± 0.1 ; $p > 0.05$). La isoforma α de la PKC va augmentar a la membrana extrasinàptica (ratio respecte al control: PKC α 1.28 ± 0.1 , $p < 0.05$) mentre que PKC β i β II no ho van fer (β 1.12 ± 0.2 , i β II 0.97 ± 0.1 ; $p > 0.05$ en ambdós casos). Aquests resultats indiquen que la contracció muscular indueix un canvi que reverteix l'efecte de l'estimulació nerviosa per ella mateixa en la localització de les isoformes de cPKC a la membrana sinàptica, sent la translocació a membrana indicador de la seva activitat catalítica.

Resultats

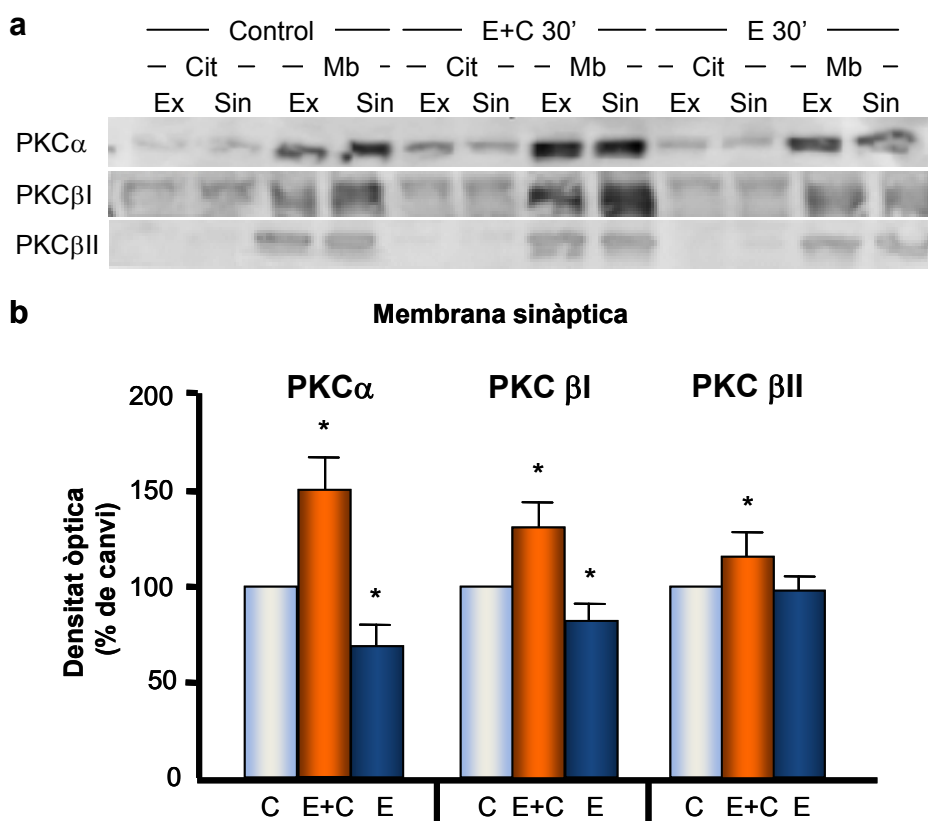


Figura 32. Expressió de les isoformes cPKC en múscul esquelètic sota l'efecte de l'estimulació nerviosa amb i sense contracció muscular. Western blot on s'analitzen els nivells d'immunoreactivitat de les isoformes de PKC α , β I, β II en músculs diafragma control i experimentals. El múscul se separa en la part sinàptica (Sin) i en la part extrasinàptica (Ex) i s'analitzen les proteïnes a la fracció citoplasmàtica (Cit) i a la de membrana (Mb). (a) Western blot de les isoformes de cPKC, α , β I i β II, en múscul en condicions basals (Control) i després d'estimulació elèctrica (1Hz, 30 minuts) amb contracció muscular (E+C) i sense (E). (b) Anàlisi quantitativa dels nivells d'immunoreactivitat per Western blot de les isoformes de cPKC a la membrana sinàptica. Les dades provenen de mesures densitomètriques de tres experiments separats i estan representades respecte a la fracció control. Les condicions experimentals provoquen un canvi significatiu ($p < 0.05$) respecte als valors control com es destaca amb un asterisc. Les dades mostrades són el valor de la mitjana \pm S.D.

2.3.3 Efecte de l'estimulació nerviosa amb i sense contracció muscular en la fosforilació de les isoformes de cPKC

La fosforilació de la PKC és un requisit per a la seva activitat catalítica (Bornancin i Parker, 1997; Dutil i col., 1998). Per tant, per determinar si l'estimulació elèctrica i l'estimulació elèctrica amb contracció muscular activen la PKC per inducció de la fosforilació de les PKCs en múscul esquelètic es van processar mostres per Western

blot amb un anticòs anti-phospho-PKC (pan) (figura 33). Es va detectar que al múscul en condicions de repòs les isoformes fosforilades estaven majoritàriament ja localitzades a la fracció de membrana, localització associada a un estat actiu de la PKC. Amb l'estimulació elèctrica i contracció muscular es va detectar un increment en el nivell de fosforilació de la PKC a la membrana sinàptica respecte al control (ratio 1.35 ± 0.24) i, en canvi, l'estimulació elèctrica per ella mateixa va ocasionar una disminució d'aquesta fosforilació a la mateixa localització (0.36 ± 0.08). Aquests resultats confirmen que és possible detectar canvis en les formes actives dels enzims en resposta a l'estimulació elèctrica amb i sense contracció. Amb la utilització d'un anticòs anti-phospho-PKC α (Ser 657) es va identificar la fosforilació específica de PKC α , trobant els mateixos resultats que amb l'anticòs anterior després de les condicions d'estimulació amb i sense contracció (figura 33) encara que l'efecte més gran amb l'estimulació és l'augment de la quantitat de la PKC α en la regió extrasinàptica (2.4 ± 0.34).

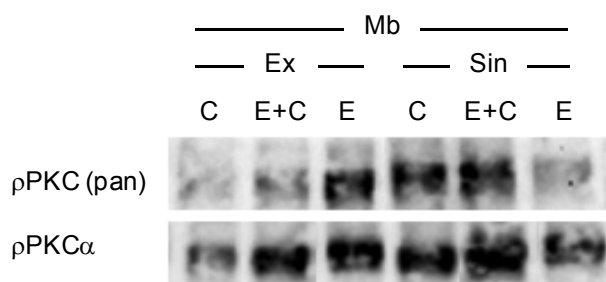


Figura 33. Fosforilació de la PKC sota l'efecte de l'estimulació nerviosa amb i sense contracció muscular. Expressió de la fosforilació de PKC a la membrana muscular sinàptica (Sin) i extrasinàptica (Ex) en condicions bassals (C) i amb estimulació elèctrica amb i sense contracció muscular (E+C i E). Les condicions d'estimulació i contracció es descriuen a l'apartat 3.2.1 de material i mètodes. Es van analitzar extractes de proteïna (15 μ g/carril) de la fracció de membrana. Es van utilitzar els anticòs anti-phospho-PKC (pan) (β II Ser660) (pes molecular de 75-95 kDa) i anti-phospho-PKC α (β II Ser 657) (pes molecular de 77 kDa).

2.3.4 Efecte de l'estimulació nerviosa amb i sense contracció muscular en la fosforilació proteica per PKC

Per tal de determinar si l'estimulació (activitat sinàptica per ella mateixa) i l'estimulació elèctrica amb contracció indueixen l'activitat fosforiladora de les cPKCs en proteïnes de múscul esquelètic, es van separar extractes de proteïna mitjançant un Western blot i es van analitzar amb un anticòs anti-phospho-cPKC-substrate, que reconeix específicament proteïnes fosforilades en la seqüència de consens de cPKC.

Quan s'activen, les isoformes de cPKC fosforilen substrats que contenen la seqüència consens serina o treonina, amb arginina o lisina en les posicions -3, -2 i +2, i aminoàcids hidrofòbics en posició +1 (Pearson i Kemp, 1991; Nishikawa i col., 1997; Obata i col., 2000). L'anticòs que s'ha utilitzat reconeix aquest motiu només quan està fosforilat al residu serina envoltat per Arg i Lys a la posició -2 i +2 i un residu hidrofòbic a la posició +1.

Es van analitzar zones sinàptiques i extrasinàptiques i les fraccions de citoplasma i de membrana per a la detecció de la fosforilació dels substrats de cPKC i la seva distribució subcel·lular. En condicions basals es van detectar bandes immunoreactives amb aquest anticòs [figura 34 (a)]: es mostra, a mode d'exemple, només tres bandes immunoreactives (110 kDa a membrana, 50 kDa a citoplasma i 43 kDa a membrana i citoplasma). L'estimulació elèctrica acompanyada de contracció muscular (30 minuts) va induir un augment de la fosforilació d'aquestes i altres proteïnes per part de les cPKCs al lloc consens de cPKC. Per exemple, a la zona sinàptica va haver un augment de la proteïna de membrana de 110 kDa (1.20 ± 0.1) i de la citoplasmàtica de 50 kDa (1.39 ± 0.23) indicant que l'augment de les isoformes de cPKC a la membrana sinàptica en aquestes condicions experimentals coincideix amb l'acció fosforiladora de les quinases. A més, les mateixes proteïnes van ser fosforilades després de tractar el múscul amb PMA (10 nM, 30 minuts) [figura 34 (b)], un èster de forbol que activa les isoformes de la PKC del grup de les clàssiques i també de les noves, indicant que aquest anticòs detecta substrats de PKC més que substrats d'altres quinases no relacionades. A la zona extrasinàptica van augmentar la seva fosforilació diferents proteïnes després de l'estimulació i contracció (per exemple, 110 kDa 1.77 ± 0.24 i 43 kDa a la membrana 1.26 ± 0.03 ; 50 kDa 1.93 ± 0.12 al citoplasma).

Quan l'estimulació elèctrica del nervi amb un elèctrode de succió no estava acompanyada de la contracció muscular es va trobar una disminució en la fosforilació de diferents proteïnes a la fracció de membrana sinàptica (per exemple 110 kDa 0.92 ± 0.09 i 43 kDa 0.65 ± 0.03) [figura 34 (a)]. Aquesta reducció en la fosforilació dels substrats coincideix amb la disminució de les PKC α , β I i β II a la membrana sinàptica en les mateixes condicions. Per altra banda, l'augment de PKC α detectat a la membrana extrasinàptica en aquestes condicions va estar acompanyat per l'augment de fosforilació de diferents proteïnes a la mateixa fracció de membrana (per exemple 110 kDa 2.62 ± 0.07 i 43 kDa 1.48 ± 0.25) i a la fracció de citoplasma també de la zona extrasinàptica

(per exemple 50 kDa 1.26 ± 0.1 i 43 kDa 1.1 ± 0.05) [figura 34 (a)]. Aquests resultats confirmen que l'augment o la disminució en el nivell de les isoformes de PKC a la membrana extrasinàptica i sinàptica després de condicions particulars d'estimulació i contracció coincideixen amb l'augment o disminució respectivament de la fosforilació dels substrats per part de les cPKC al múscul esquelètic el qual suggereix, al mateix temps, una activitat catalítica de cPKC en aquestes condicions.

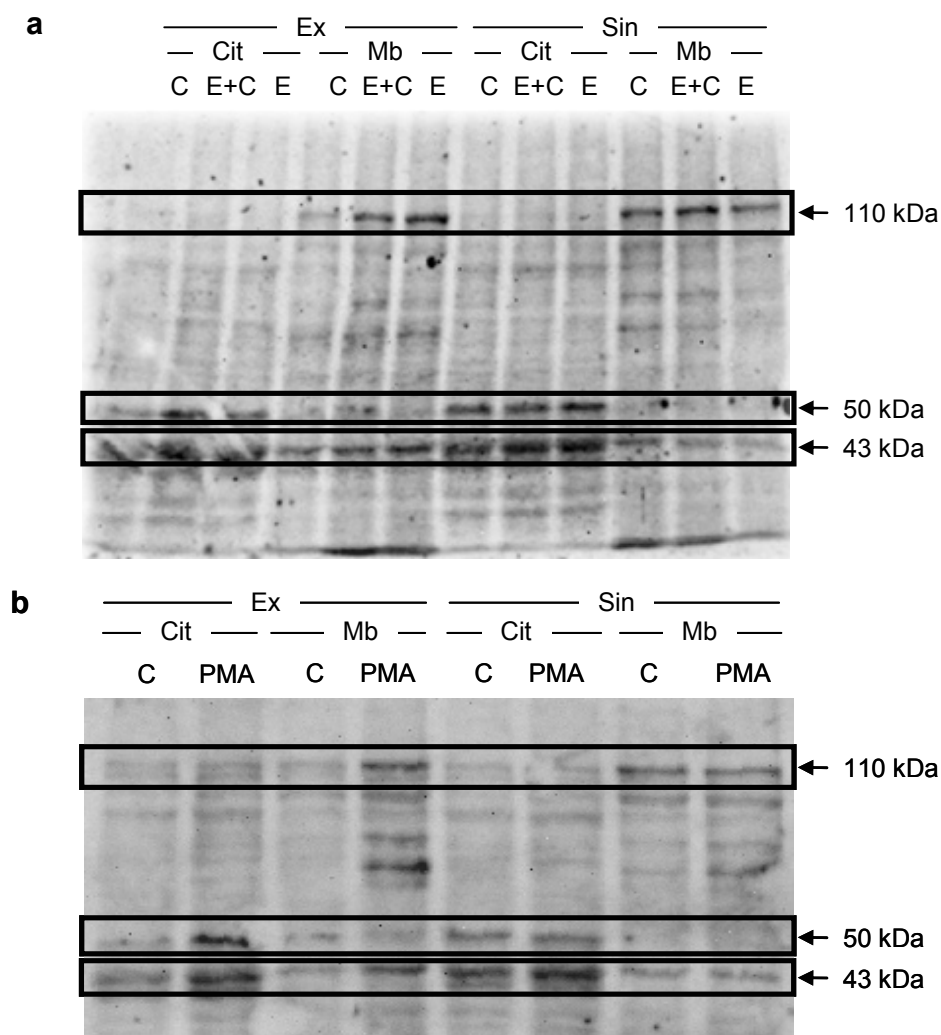


Figura 34. Fosforilació dels substrats de les cPKC en múscul esquelètic. La fosforilació dels substrats per part de les cPKC es va observar mitjançant un Western blot amb l'anticòs phospho-(ser) PKC substrate. (a) Fosforilació dels substrats de cPKC a la membrana (Mb) i citoplasma (Cit) de múscul de la zona sinàptica (Sin) i extrasinàptica (Ex) en condicions basals (C) i amb estimulació elèctrica amb i sense contracció muscular (E+C i E). Les fletxes indiquen les bandes que mostren canvis en el nivell de fosforilació després de les condicions experimentals. Les condicions d'estimulació i contracció es descriuen a l'apartat 3.2.1 de material i mètodes. (b) Fosforilació dels substrats per part de cPKC a la membrana i citoplasma de múscul de la zona sinàptica i extrasinàptica en condicions basals i després del tractament amb PMA (10nM).

2.3.5 L'estimulació nerviosa i la contracció no alteren la localització de les isoformes de cPKC a la unió neuromuscular

En apartats anteriors s'ha descrit que cada una de les isoformes de PKC (α , β I i β II) tenen una localització cel·lular específica a la sinapsi neuromuscular de rata adulta. En particular, β I està present exclusivament al terminal nerviós i podria ser una de les isoformes de les PKC dependents de calci que estiguin acoblades en l'alliberament de neurotransmissor quan s'estimula el múscul a baixa freqüència. Per això, és interessant conèixer si l'estimulació elèctrica i la contracció muscular, que augmenta l'expressió de la isoforma de β I a la membrana sinàptica, provoca algun canvi en el patró normal de localització d'aquesta isoforma en les tres cèl·lules que formen part de la unió neuromuscular. Per determinar la localització de la isoforma β I a la unió neuromuscular després de l'estimulació elèctrica amb o sense contracció, es van obtenir seccions semifines de músculs tenyits per un múltiple marcatge (que s'ha descrit en l'apartat 3.2.1 de material i mètodes). Les imatges de la figura 35 mostren que la PKC β I es va trobar exclusivament localitzada als botons del terminal nerviós en les dues condicions estudiades. S'observa que PKC β I no colocalitza amb la marca de S-100 i no està situada a la cèl·lula muscular, però en canvi colocalitza amb el marcador del terminal nerviós com es mostra a la imatge petita en (c). Per tant, l'augment de la isoforma β I a la membrana sinàptica després de l'estimulació amb contracció muscular, que es va detectar mitjançant la tècnica de Western blot, no estava ocasionat per una nova inducció d'expressió d'aquesta isoforma en un altre element de la unió neuromuscular. Tampoc l'estimulació sense contracció varia la localització d'aquesta isoforma.

Pel que fa la isoforma PKC β II, no es va detectar al terminal nerviós de la unió neuromuscular ni sota condicions basals ni després de l'estimulació elèctrica amb o sense contracció (resultats que no es mostren). De la mateixa manera, PKC α no canvia la seva localització. Aquests resultats determinen que les isoformes de cPKC que esdevenen acoblades a l'alliberament d'ACh després de l'estimulació elèctrica a baixa freqüència podrien ser β I i/o α .

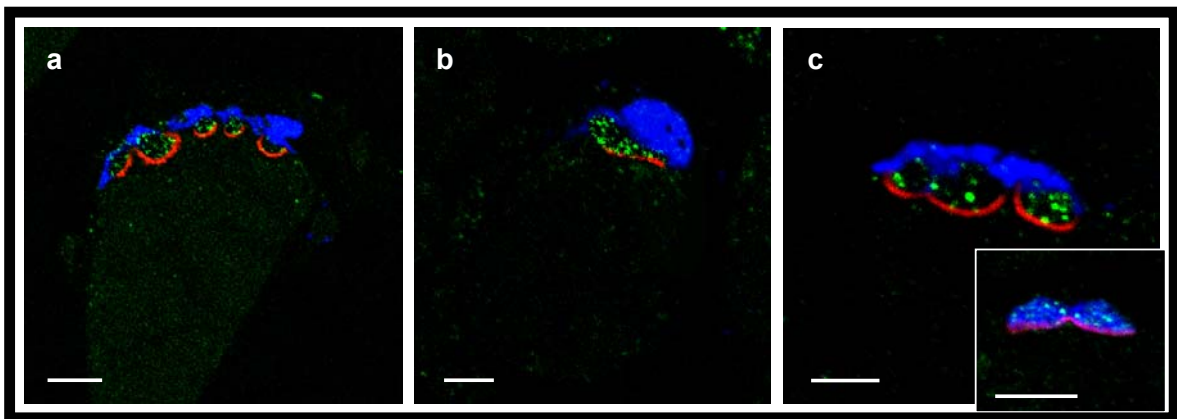


Figura 35. Localització de la isoforma β I de cPKC a la unió neuromuscular després de l'estimulació nerviosa amb i sense contracció muscular. Seccions semifines de músculs marcats immunofluorescentment: (a) músculs control, (b) músculs amb estimulació elèctrica amb contracció muscular i (c) estimulació elèctrica sense contracció muscular. Les imatges mostren PKC β I en verd, els nAChR en vermell i en blau el S-100 en (a), (b) i (c) i en la imatge petita en (c) el terminal nerviós. Barra d'escala = 10 μ m.

3. Desenvolupament de l'eliminació sinàptica i maduració dels agrupaments de nAChR a la sinapsi neuromuscular de ratolins deficients en la isoforma θ de la PKC

La PKC té un paper crític en la modificació de les sinapsis neuromusculars que es produeix durant el desenvolupament postnatal mitjançant un mecanisme competitiu i dependent de l'activitat sinàptica. Aquest procés implica la pèrdua de tots els terminals nerviosos, excepte un, que innerven un mateix component postsinàptic i una paral·lela reorganització estructural dels nAChR que es troben a la membrana sinàptica del miòcit. En el present treball es pretén conèixer el paper que desenvolupa la PKC θ (isoforma de la família nova de la PKC) durant el procés postnatal de l'eliminació sinàptica i durant la maduració dels agrupaments de nAChR postsinàptics a la sinapsi neuromuscular. Aquesta isoforma ha estat descrita com una de les isoformes de la PKC que s'expressa de forma específica al múscul esquelètic (Hilgenberg i Miles, 1995; Hilgenberg i col., 1996) i que més s'expressa durant el període postnatal en el que l'eliminació de sinapsis té lloc (veure apartat 1 de Resultats). Per aquestes raons, serà de gran valor examinar si els mecanismes del desenvolupament postnatal dependents de la PKC s'expressen en animals deficients (KO) en aquesta isoforma particular.

3.1 Ratolins deficients en la isoforma PKC θ

Per tal d'estudiar el paper que desenvolupa la isoforma PKC θ de la família de les noves durant el procés d'eliminació sinàptica i de la maduració dels agrupaments de nAChR a la sinapsi neuromuscular s'ha treballat amb ratolins deficients en aquesta isoforma. L'anàlisi per Western blot de múscul esquelètic i de medul·la espinal confirma que la soca de ratolí utilitzada no expressa la isoforma PKC θ . La figura 36 (a) mostra l'expressió de la isoforma PKC θ en múscul i en medul·la espinal dels ratolins WT i l'absència de l'expressió d'aquesta isoforma als teixits d'animals mutants. Es va analitzar l'expressió de PKC θ en músculs d'animals heterozigots, i tal com s'esperava, es va trobar un nivell d'expressió de PKC θ intermedi entre el WT i el KO (González C., Tesi Doctoral).

3.2 Control del desenvolupament de les fibres musculars esquelètiques en animals deficientes en la PKC θ

Es va mesurar per Western blot l'expressió de la cadena pesada de la miosina (MHC, de l'anglès *Myosin Heavy Chain*) com a marcador per al control del desenvolupament del múscul esquelètic i no es van trobar diferències entre animals WT i KO de P6 [figura 36 (b)]. A més, tampoc es van trobar diferències en l'expressió del transportador d'acetilcolina vesicular (vAChT, de l'anglès *vesicular acetylcholine transporter*), marcador de motoneurons, entre cèl·lules de medul·la espinal d'animals WT i KO [veure figura 36 (b)].

Quan es va analitzar el diàmetre cel·lular de les fibres musculars, tampoc es van trobar diferències entre animals WT i KO (per exemple, a P5, $7.74 \mu\text{m} \pm 1.18$ per a KO i $7.93 \mu\text{m} \pm 0.32$ per WT, 3 músculs, 120 fibres cada un). A més, no hi va haver diferència significativa en el pes (en g) entre animals WT i KO en cap punt del desenvolupament dels animals (per exemple, a P6, 4.03 ± 0.8 per KO i 4.10 ± 0.6 per WT). Les unions neuromusculars van ser morfològicament indiferenciables excepte en la velocitat de maduració que sí era diferent (veure més endavant). D'aquesta manera, el desenvolupament general del sistema de la unió neuromuscular no sembla presentar diferències entre els animals WT i els KO.

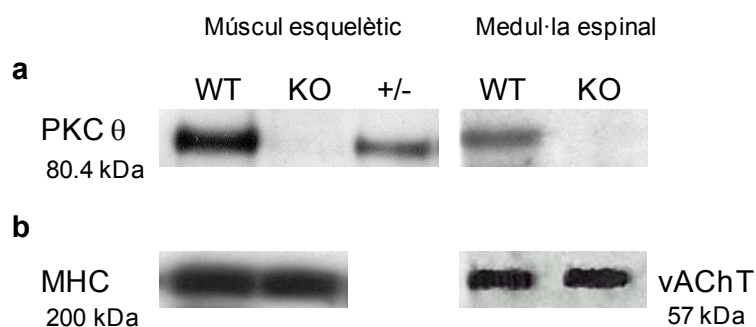


Figura 36. Expressió de la PKC θ , MHC, vAChT en múscul esquelètic i medul·la espinal d'animals WT i KO mitjançant Western blot. (a) PKC θ no existeix en animals PKC θ $-/-$ (KO), on aquesta isoforma sí s'expressa en animals WT i s'obté un valor entremig en músculs d'animals heterozigots (+/-). Els Western blots de teixit muscular i de medul·la espinal es van realitzar amb un anticòs monoclonal contra PKC θ . (b) A la part esquerra, Western blot de teixit muscular amb l'anticòs monoclonal contra la cadena pesada de la miosina (MHC) en animals WT i KO. A la part dreta, Western blot de medul·la espinal amb un anticòs contra vAChT en animals WT i KO. Es van analitzar 10 μg de proteïna total tant per a múscul esquelètic com per a medul·la espinal d'animals WT i KO.

3.3 PKC θ és necessària per a l'eliminació sinàptica dependent d'activitat

En estudis previs del nostre grup s'havia observat que el procés d'eliminació sinàptica *in vivo* està molt influenciat per processos que bloquegen o augmenten l'activitat de la proteïna quinasa C (PKC) (Lanuza i col., 2001). Més recentment, es va trobar que el ratolí deficient en la isoforma PKC θ mostra un retràs inicial en l'eliminació sinàptica tot i que, finalment, les unions neuromusculars esdevenen monoïnnervades (Li i col., 2004). En el present estudi es va aprofundir en l'anàlisi de l'eliminació sinàptica dels animals deficients en la isoforma PKC θ i es va trobar que aquest retràs significatiu es mantenia des de P4 a P12. En P4 (veure figura 37), el procés d'eliminació sinàptica havia començat en animals WT (percentatge d'innervació polineural: 87.36 ± 2.78) però no en animals KO. En P6, quan la pèrdua de sinapsis havia començat als músculs d'animals deficients per a la PKC θ , hi havia una diferència significativa en el percentatge de la innervació polineural (65.36 ± 2.26 en músculs d'animals WT vs 86.26 ± 2.79 en músculs KO; $p < 0.001$). Aquesta diferència es mantenia en P8 (50.20 ± 3.25 en el múscul WT vs 79.90 ± 1.88 en músculs KO; $p < 0.001$) i en P12 (26.73 ± 4.35 en músculs d'animals WT vs 38.21 ± 3.34 en músculs KO; $p < 0.01$). En P14, en canvi, el percentatge de poliïnnervació no era diferent entre els dos tipus d'animals (96% de les unions neuromusculars esdevenien monoïnnervades en ambdós tipus d'animals). D'acord amb aquest resultat, prèviament es va demostrar que el número promig d'axons innervant una sinapsi neuromuscular cau des de tres a prop d'un en els primers 14 dies postnatsals (Lanuza i col., 2001; Li i col., 2004) i el temps en el qual té lloc el punt mig de pèrdua (dos axons per sinapsi) es retarda des de 5.5 dies en animals WT a 9.0 en animals KO (Li i col., 2004).

Per tal de conèixer si la PKC θ és la isoforma de la família de les PKC rellevant, implicada en el procés de pèrdua axonal, es van tractar músculs LAL amb calfosteïna C (CaC, 200 nM), un inhibidor selectiu de totes les isoformes de la PKC. Els animals WT i KO van rebre una injecció subcutània diàriament sobre el múscul LAL des del dia postnatal 4, i els músculs es van estudiar el dia 6 i el 8. Es van realitzar experiments paral·lels injectant PBS (tampó salí) de la mateixa manera que la CaC i es va comprovar que el procés d'injecció per ell mateix no té efecte en les morfologies del terminal nerviós motor i dels agrupaments de nAChR (resultats que no es mostren). La CaC injectada en els animals WT va retardar l'eliminació sinàptica (veure també Lanuza i col.,

2001), però, en canvi, no es van trobar canvis addicionals en els animals KO amb el tractament de CaC pel que fa als valors de poliinervació trobats ja en aquests animals sense tractar (figura 37). L'anàlisi de diferents paràmetres morfològics i fisiològics va indicar que no hi havia evidències de reaccions tòxiques produïdes per l'administració de CaC que poguessin alterar la maduració del múscul/nervi (veure també Lanuza i col., 2001). Tots aquests resultats suggereixen que la PKC θ podria ser una isoforma necessària que actua en el procés d'eliminació sinàptica.

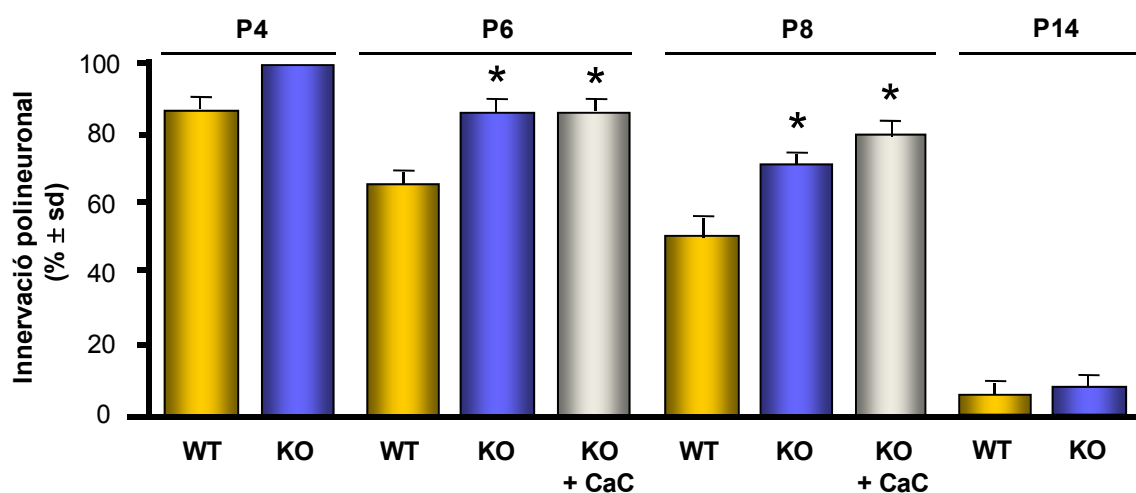


Figura 37. Procés postnatal d'eliminació de sinapsis. L'eliminació sinàptica en animals WT i en KO (PKC θ -/-) *in vivo*, mesurat com a percentatge d'innervació polineuronal de les fibres musculars en funció dels dies postnats (P4-P14). Músculs LALs d'animals WT i KO van ser tractats amb Calfosteïna C (CaC). L'animal va rebre una injecció subcutània diària sobre el múscul LAL des del dia postnatal 4, i els músculs van ser estudiats al dia 6 i 8. * $p < 0.001$ respecte a l'animal WT no tractat de la mateixa edat.

3.4 Canvis morfològics en la maduració dels agrupaments de nAChR durant el període d'eliminació sinàptica postnatal al múscul LAL d'animals KO

Es coneix que la pèrdua postnatal de sinapsis al múscul esquelètic va acompanyada de la desaparició de nAChR dels agrupaments moleculars de receptors inicialment formats i d'una redistribució final d'aquests receptors per a l'organització de l'aparell postsinàptic madur quan la sinapsi neuromuscular esdevé monoinnervada (Balice-Gordon i Lichtman, 1993; Lanuza i col., 2002). A més, durant el desenvolupament, la maduració dels agrupaments de nAChR *in vivo* pot estar molt influenciada per processos que bloquegen o augmenten l'activitat de la PKC (Lanuza i col., 2002). Per a

determinar la maduració dels agrupaments de nAChR a la unió neuromuscular d'animals WT i KO *in vivo* durant el període d'eliminació polineuronal, el procés de maduració de la distribució dels nAChR a la unió neuromuscular es va dividir en 4 passos (M1 a M4; Lanuza i col., 2002; veure també Steinbach, 1981; Slater, 1982a, b; Bewick i col., 1996). A mesura que el procés normal de maduració va tenint lloc (veure exemples en la figura 38), es produeixen canvis en la distribució dels nAChR de manera que la placa oval uniforme de nAChR que s'observa al naixement (M1) es transforma en una placa oval elongada amb unes poques línies amb major densitat dels receptors (M2) que més tard es transformarà en agrupaments que contenen petites àrees de molt baixa densitat de nAChR que apareixen com a forats (M3). Aquesta morfologia porta finalment a un increment de l'estructuració de la marca fluorescent en plecs primaris independents (M4). La figura 38 (a) mostra la maduració dels agrupaments de nAChR sinàptics en ratolins WT i KO *in vivo* en funció de l'edat postnatal (P3 i P7) (González, C., Tesi Doctoral). S'observa que el percentatge de cada estat de maduració considerat va ser significativament diferent entre les unions neuromusculars de WT i KO en les dues edats estudiades. El percentatge de plaques motores mostrant els majors senyals de redistribució dels nAChR, maduració i organització dels agrupaments (M3 i M4) és menor en l'animal KO (i inclús en animals P3 KO no hi ha agrupaments M4) mentre que augmenten els tipus M1 i M2. Tot i això, el percentatge de M1 en animals P3 KO és més baix que en animals WT suggerint una acció diferent de la PKC θ que depèn del nivell de maduració dels agrupaments de nAChR. L'anàlisi morfomètrica de l'àrea de l'agrupament va indicar una diferència significativa entre els animals WT i els KO (àrea KO/àrea WT = 0.815, $p = 0.002$). Així, aquesta dada indica que PKC θ podria jugar un paper en el desenvolupament de les unions neuromusculars i principalment podria ser afectant l'estabilitat dels agrupaments de receptors.

Es va examinar l'efecte d'altres isoformes de la PKC en el procés de la redistribució dels nAChR realitzant tractaments a animals WT i KO amb PBS i CaC. Es va analitzar el percentatge dels agrupaments amb àrees sense receptors (M3 i M4) els quals representen un pas important en la maduració dels agrupaments. El tractament amb CaC en l'animal WT va retardar la maduració de l'agrupació de nAChR (com l'eliminació axonal que prèviament s'ha descrit) (veure també Lanuza i col., 2002) però no es van trobar diferències entre el tractament amb PBS i CaC en els animals KO en els dies estudiats [figura 38 (b)]. Aquests valors en els animals KO no van ser diferents dels

trobats en els animals WT tractats amb CaC. Això indica el paper central de la PKC θ durant el període inicial en l'organització dels agrupaments de nAChR. Un altre fet que demostra el paper de la PKC θ en estadis inicials del desenvolupament és que s'ha vist que en animals KO d'un mes d'edat, molts dels agrupaments de nAChR són de l'estat M4, estat normal de maduració ($98.47\% \pm 2.54$ al múscul d'animals WT vs $96.25\% \pm 1.07$ en músculs KO; $p > 0.05$). Així, com també prèviament s'ha vist per a l'eliminació axonal, la maduració dels agrupaments està retardada durant el desenvolupament però finalment té lloc igualment en animals KO, indicant que aquesta isoforma no és crítica per a la maduració final de la unió neuromuscular però sí per al desenvolupament inicial.

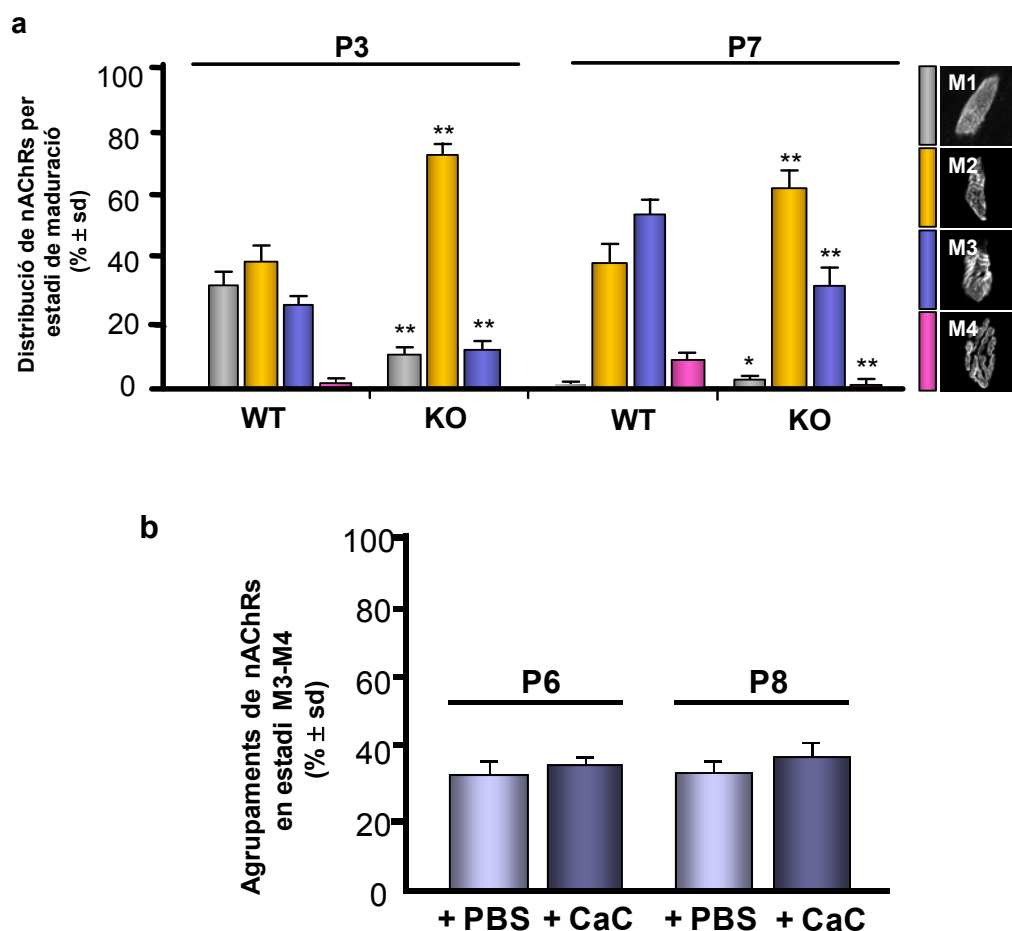


Figura 38. Maduració dels agrupaments de nAChR de la unió neuromuscular d'animals WT i KO. (a) El procés de maduració dels agrupaments de nAChR *in vivo* es divideix en 4 estadis (M1 a M4) d'acord amb el criteri morfològic: les plaques ovals amb distribució uniforme dels nAChR (M1) es transformen en una placa oval elongada amb unes poques línies amb major densitat de receptors (M2) que més tard es transformarà en agrupaments que contenen petites àrees de molt baixa densitat de nAChR que apareixen com a forats (M3), i aquesta morfologia porta finalment a un increment en l'estructuració de la marca fluorescent en plecs primaris

independents (M4). La distribució de la maduració dels nAChR es va quantificar, i es pot observar com el percentatge de cada estadi de maduració era significativament diferent entre les sinapsis neuromusculars de WT i KO en les dues edats estudiades (P3 i P7). El percentatge de les plaques mostrant els signes majors de l'organització dels agrupaments de nAChR (M3 i M4) era menor en animals KO. A més, el percentatge de M1 en animals P3 KO és menor que en els animals WT suggerint una diferent acció de la PKC θ que depèn del nivell de maduració dels agrupaments de nAChR. (b) La maduració dels agrupaments de nAChR en animals KO tractats amb PBS i CaC, mesurats com el percentatge de plaques mostrant àrees lliures de nAChR a la placa, tipus M3 i M4, en funció dels dies postnatsals (P6 i P8). En (a) i (b), dades calculades com la mitjana \pm sd. * $p < 0.01$, ** $p < 0.0005$ respecte a l'animal WT de la mateixa edat.

A la figura 39 s'han seleccionat exemples típics d'unions neuromusculars poliinnervades i monoinnervades de músculs procedents d'animals WT i de KO on es mostra el diferent nivell de maduració dels components pre- i postsinàptics. Les unions neuromusculars dels animals KO de diferents edats de desenvolupament (P4 i P8) mostren una maduresa menor comparada amb les unions neuromusculars d'animals WT que afecta tant al terminal nerviós (per exemple, número d'*inputs* axonals en P4) com als receptors postsinàptics (per exemple maduració dels nAChR en P4 i P8). Tanmateix, en ambdós tipus d'animals (WT i KO) es van observar signes de creixement del terminal nerviós (*sprouts* axonals no oposats a nAChR; fletxa a la figura 39 (a), P4). Malgrat tot, quan en els dos tipus d'animals, WT i KO, les sinapsis estaven monoinnervades, l'estructura del terminal nerviós i la morfologia de l'agrupament de nAChR era diferent, sent més madures les sinapsis dels animals WT. Així, a les sinapsis monoinnervades (en P8) mostrades en la figura 39 (a), la morfologia de l'agrupament en els WT correspon a l'estat M3 mentre que en el KO correspon a M2. També el terminal nerviós és més madur a la sinapsi d'animals WT. Aquesta diferència en el nivell de maduració de les sinapsis durant el desenvolupament postnatal no es va trobar a les sinapsis d'adult [figura 39 (b)].

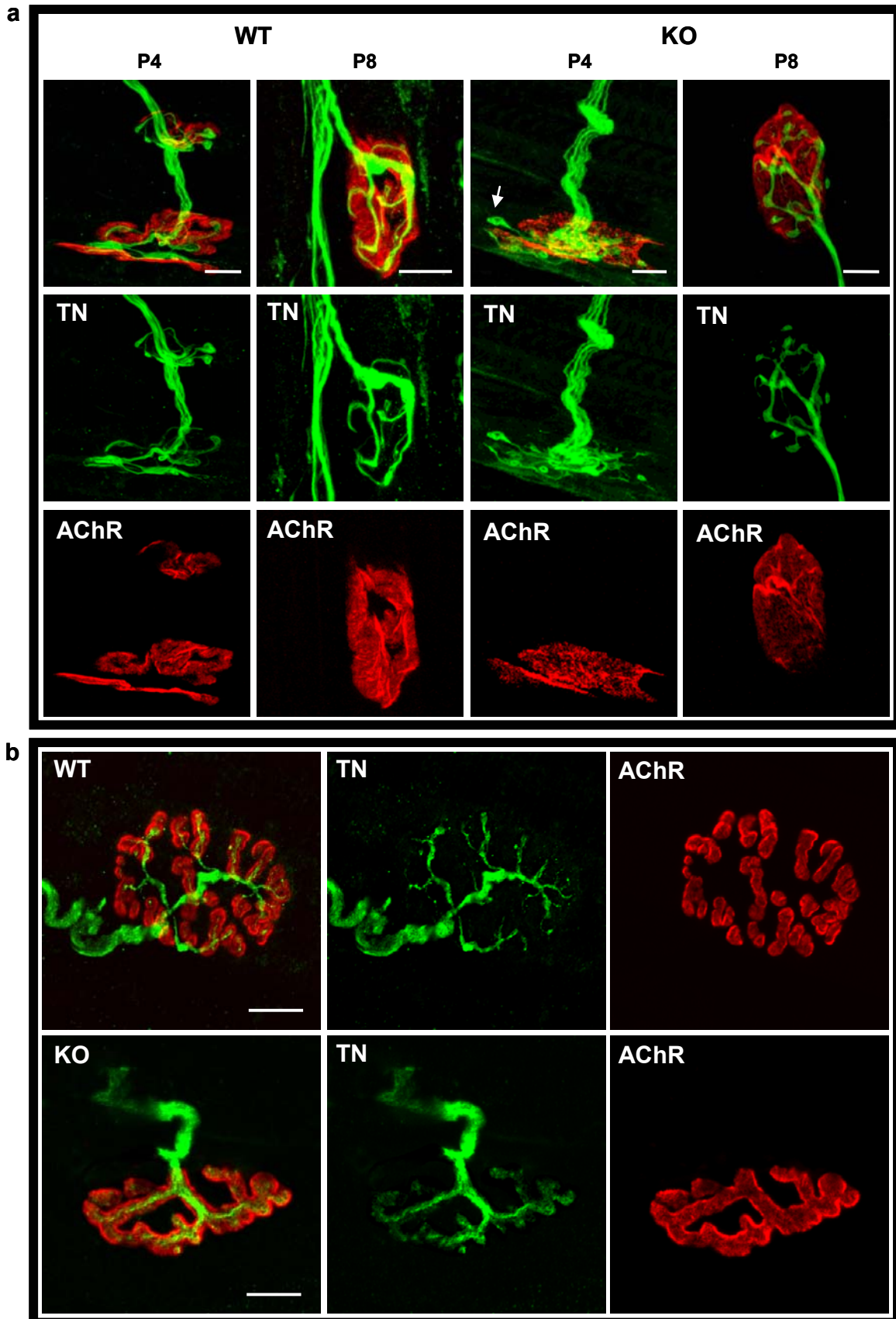


Figura 39. Imatges de microscòpia confocal d'unions neuromusculars de músculs d'animals WT i de KO. Microfotografies realitzades amb el microscopi confocal d'unions neuromusculars neonatals de WT i KO *in vivo* a P4 (unions neuromusculars multiinnervades) i a P8 (unions neuromusculars monoinnervades) en (a) i d'adults en (b) marcant els nAChR (en vermell; α -BTX) i el terminal nerviós (en verd; TN). Barra d'escala = 10 μ m.

L'agrupament dels nAChR a la sinapsi neuromuscular requereix de l'expressió de la proteïna quinasa específica de múscul (MuSK, de l'anglès *Muscle Specific Kinase*) i de la molècula de la rapsina que apareix unida al nAChR associada al complex d'utrofina a través del complex β -dístroglicà. Es va voler determinar si la falta de la PKC θ afecta a l'expressió d'aquestes molècules relacionades amb la formació de l'aparell postsinàptic i, si aquest fet, per ell mateix, podria causar els canvis que es detecten en la morfologia dels agrupaments de nAChR. Es van comparar directament els patrons morfològics de MuSK, rapsina i utrofina amb la utilització de la tècnica d'immunohistoquímica durant el desenvolupament postnatal del múscul i no es va veure cap diferència entre la seva expressió i l'expressió dels nAChR. Per exemple, a P6, es pot veure una perfecta colocalització entre MuSK, rapsina, utrofina i nAChR, indicant que aquestes proteïnes s'agrupen i estan en contacte una amb l'altra (figura 40). Així, l'acumulació d'aquestes molècules postsinàptiques a les sinapsis no depèn de l'activitat de la PKC θ . A més, aquests resultats aparentment indiquen que els canvis en la morfologia dels agrupaments de nAChR es poden atribuir a un efecte directe de la PKC θ sobre els nAChR una vegada aquests estan ben agrupats, i el retard de la maduració d'aquests agrupaments segueix els passos del desenvolupament postsinàptic normal. No obstant, encara que la PKC θ no afecti a l'expressió i a l'acció d'agrupament del MuSK, de la rapsina i de la utrofina, podria ser que una mala interacció posterior entre els nAChR i aquestes proteïnes postsinàptiques afecti a la maduració de l'agrupament.

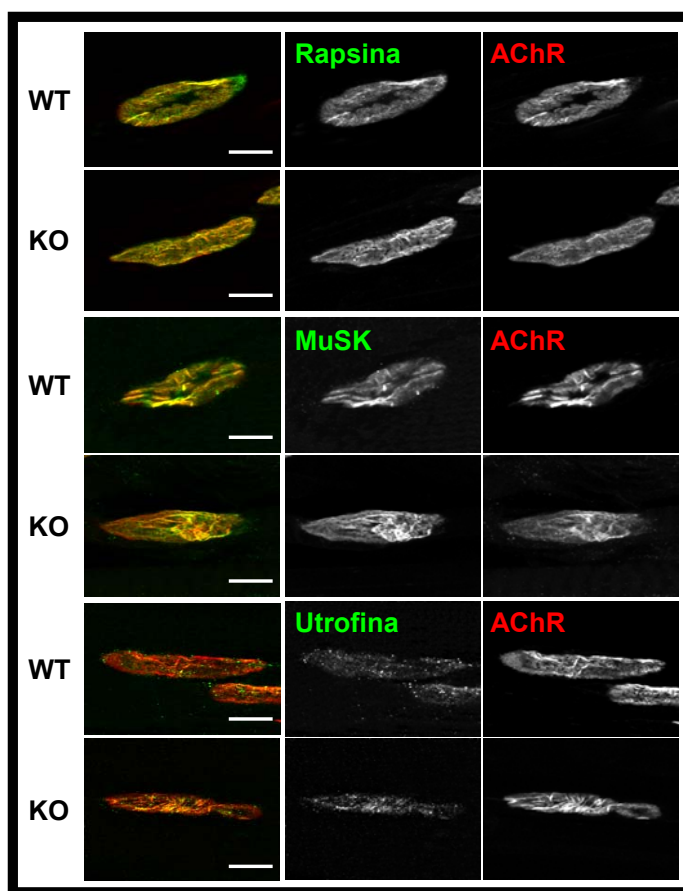


Figura 40. Expressió de diferents proteïnes (rapsina, MuSK i utrofina) a l'aparell postsinàptic a l'edat de 6 dies. Immunohistoquímica de MuSK, rapsina i utrofina en animals WT i KO (en verd, segona columna). La tercera columna mostra els agrupaments de nAChR nicotínic marcats amb α -BTX conjugada amb TRICT. La primera columna mostra la colocalització entre l'anticòs específic i els nAChR. Cada proteïna està concentrada a la sinapsi en animals WT i KO. Barra d'escala = 10 μ m.

3.5 Efecte de la PKC θ en la fosforilació de les subunitats δ i ϵ del receptor d'acetilcolina nicotínic (nAChR)

En estudis previs, tant del nostre grup com d'altres autors, es va descriure que la dispersió dels agrupaments de nAChR que depèn de la PKC no podia ser explicada per una reducció de l'expressió dels nAChR (Ross i col., 1988; Lanuza i col., 2000), suggerint que la fosforilació per part de la PKC era la responsable de la dispersió. Recentment, s'ha demostrat que manipulacions que afecten l'estabilitat dels receptors també produeixen canvis en la fosforilació de la subunitat δ dels nAChR (Lanuza i col., 2006). En aquest treball, analitzant la fosforilació de la subunitat δ dels agrupaments de nAChR

d'animals P6 WT i KO, es va examinar si la fosforilació que depèn de PKC θ afecta als llocs de fosforilació de serina de la subunitat δ del nAChR. Es van obtenir anticossos específics contra la seqüència d'aminoàcids entre els residus 387-410 de la subunitat δ de nAChR de ratolí, la qual conté llocs de fosforilació per PKC en Ser³⁹⁸ i Ser⁴⁰⁰ (veure apartat 3.3.1 de material i mètodes i Lanuza i col., 2006). A la figura 41 es pot observar que els anticossos que reconeixen la subunitat δ fosforilada del nAChR reaccionen amb el fosfo-pèptid corresponent però també reaccionen amb la forma del pèptid no fosforilada, encara que amb més baixa intensitat (ratio fosfo-/ no fosfo- = 1.8 ± 0.4). Aquest anticòs reacciona específicament amb 5 μ g de proteïna [figura 42 (a)] i marca intensament els agrupaments de nAChR i el doble immunomarcatge mostra una bona colocalització amb la subunitat δ del nAChR i amb la marca de α -BTX. Tant els músculs esquelètics d'animals WT com els dels animals deficients per a la PKC θ mostren una activitat fosforiladora de la PKC en la subunitat δ dels nAChR tot i que en el WT era substancialment més elevada que en el KO [figura 42 (c) a dalt], indicant que la isoforma θ de la PKC juga un paper important en aquest lloc de fosforilació en particular. És de destacar que aquesta variació en el nivell de fosforilació es produeix sense un canvi aparent en la subunitat δ del nAChR en l'animal KO [figura 42 (b) a baix]. La figura 42 (e) mostra una anàlisi quantitativa de la intensitat de fluorescència als músculs d'animals P6. Els nAChR totals (marca de α -BTX) no va canviar significativament en l'animal KO però la intensitat de la fluorescència de l'anticòs fosfoespecífic (marca de p-AChR δ) es va veure disminuïda significativament als músculs d'aquests ratolins deficients, malgrat la falta de la completa especificitat de l'anticòs per la subunitat fosforilada que abans s'ha mencionat. La densitat (intensitat/àrea) de la subunitat δ fosforilada o la ratio entre la fluorescència de la subunitat δ fosforilada i la α -BTX són significativament més elevats en els animals WT que en els KO. Aquests resultats indiquen que l'activitat de PKC θ es requereix per obtenir una fosforilació normal de la subunitat δ del nAChR.

S'ha demostrat prèviament que l'activació de la PKC i de la PKA tenen efectes oposats en l'estabilitat dels nAChR a la membrana del miotub i que manipulacions d'aquestes dues quinases que alteren l'estabilitat del receptor també produeixen canvis en la fosforilació del receptor (Li i col., 2001; Lanuza i col., 2006). Això podria suggerir que un equilibri entre la fosforilació per part de la PKC (en la subunitat δ) i la fosforilació per part de la PKA (en la subunitat ϵ) podria determinar l'estabilitat o inestabilitat de la molècula del nAChR a l'agrupament. Per tal de conèixer si hi ha algun canvi en la

fosforilació del nAChR dependent de la PKA associat a la fosforilació de la subunitat δ del nAChR dependent de la PKC a l'animal KO postnatal, es va utilitzar un anticòs específic per detectar la forma fosforilada de la subunitat ϵ del nAChR. Aquest anticòs ha estat seleccionat per afinitat reaccionant amb una seqüència d'aminoàcids de la subunitat ϵ del nAChR que inclou la diana de fosforilació de la PKA (veure apartat 3.3.1 de material i mètodes i Lanuza i col., 2006). Aquest anticòs té una especificitat excel·lent per la forma fosforilada de la subunitat ϵ , no reacciona amb la forma no fosforilada de la subunitat ϵ (figura 41 i Lanuza i col., 2006) i reacciona específicament amb 5 μ g de proteïna, figura 42 (b). La figura 42 (d) mostra que aquest anticòs fosfoespecífic marca intensament agrupaments de nAChR d'animals P6 WT i el doble immunomarcatge mostra una bona colocalització amb la subunitat ϵ del AChR i amb la marca de α -BTX. En músculs d'animals P6 KO s'ha trobat una disminució significativa en la intensitat de la fluorescència de l'anticòs fosfoespecífic (marca de ρ -AChR ϵ) que no està acompanyada d'un canvi en la marca de la α -BTX [figura 41 (d) a dalt i figura 41 (e)]. Així, existeix una disminució significativa en la marca d'anticòs fosfoespecífic relatiu al conjunt total de receptors en els agregats (ratio) i en l'àrea dels agrupaments (densitat). Aquests resultats indiquen que l'activació de la PKC θ és necessària per a que la PKA fosforilli, amb normalitat, la subunitat ϵ del nAChR. Això suggereix que la disminució de la fosforilació de la subunitat δ retarda la mobilitat del receptor a la membrana per situar-se a la localització definitiva on es podria establitzar per la fosforilació en la subunitat ϵ .

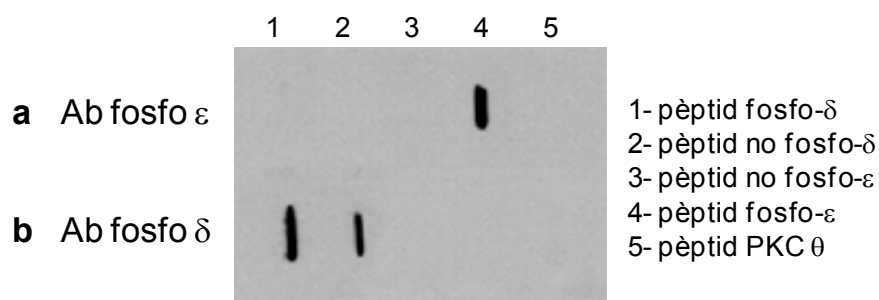


Figura 41. Selectivitat dels anticossos fosfo- δ i ϵ . Anàlisi mitjançant un Slot blot utilitzant anticossos policlonals fosfo-específics contra el lloc de fosforilació de PKA en la subunitat ϵ (a) i de PKC en la subunitat δ dels nAChR (b). (a) L'anticòs fosfo- ϵ reacciona específicament amb el corresponent pèptid fosforilat no mostrant reactivitat amb el pèptid no fosforilat corresponent. (b) L'anticòs fosfo- δ reacciona amb el pèptid fosforilat corresponent, però també reacciona (però amb menys intensitat) amb el pèptid corresponent no fosforilat. Els anticossos van reaccionar amb un rang d'1-0.125 μ g de pèptid (es mostra amb 0.125 μ g de pèptid). Es van utilitzar diferents pèptids (en la imatge PKC θ) per certificar l'especificitat dels anticossos analitzats, i en cap cas es va observar reconeixement d'aquest per part de cap anticòs.

Resultats

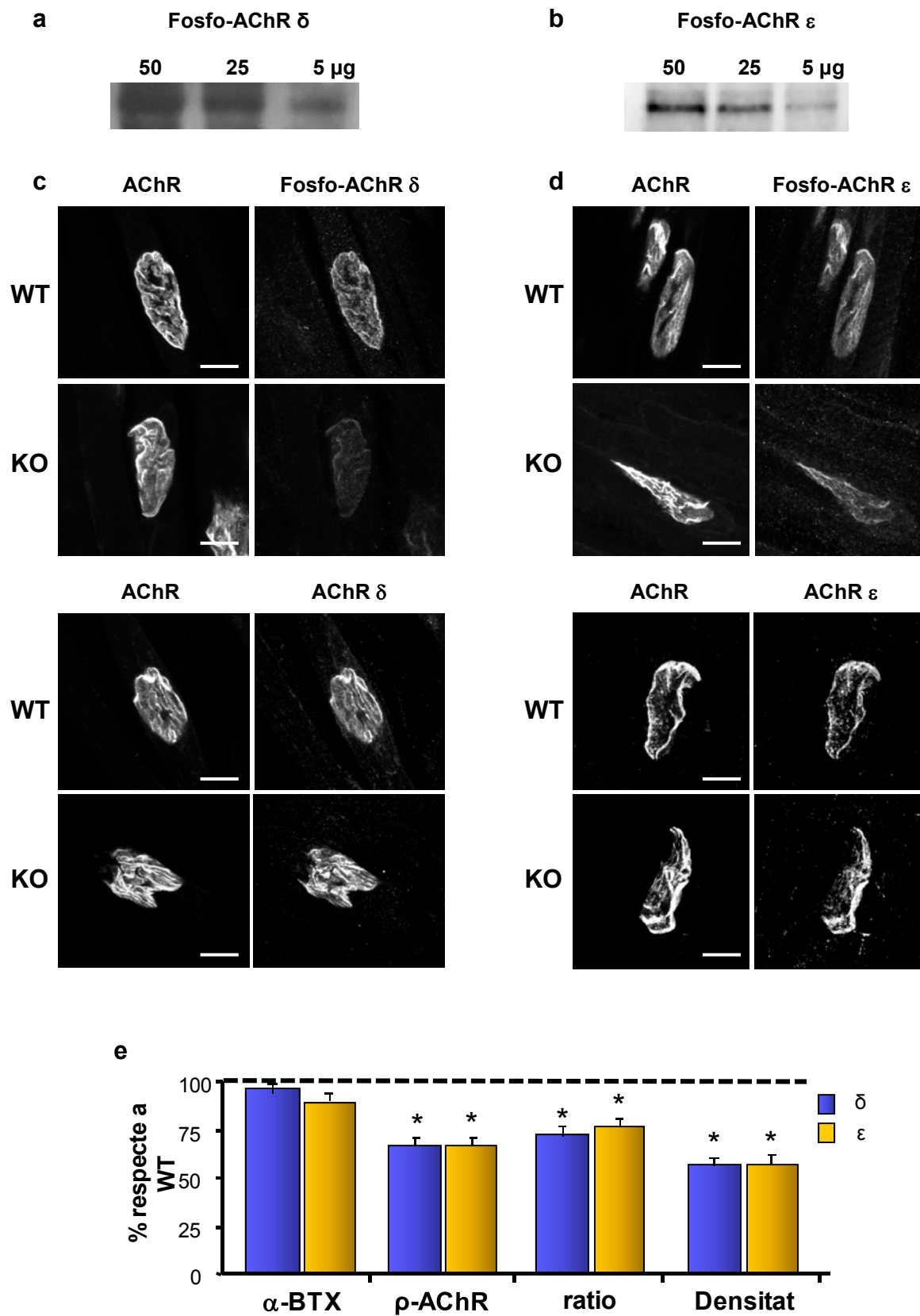


Figura 42. Fosforilació de les subunitats δ i ϵ dels nAChR dependent de la PKC θ . (a-b) Anàlisi mitjançant Western blot utilitzant anticossos policlonals fosfo-específics realitzats contra un petit pèptid que conté la diana per la PKC de la subunitat δ del nAChR (a) i per la PKA de la subunitat ϵ (b). Aquests anticossos reaccionen específicament amb 5 μ g de proteïna. (c-d) Immunohistoquímica de la fosforilació de la subunitat δ (c) i ϵ (d) dels nAChR en animals WT i KO. Les subunitats δ (c) i ϵ (d) dels nAChR es van marcar amb anticossos comercials. Els nAChR totals es van marcar amb α -BTX conjugada amb TRICT. Barra d'escala = 10 μ m. (e) Anàlisi quantitatiu de la intensitat de fluorescència de les subunitats δ i ϵ en animals WT i KO. La densitat (intensitat/àrea) de les subunitats δ i ϵ fosforilades o la ratio entre la fluorescència de la subunitat δ o ϵ fosforilada i α -BTX és significativament major en animals WT que en KO. * $p < 0.001$ respecte al WT. Els resultats es mostren com el % respecte al WT \pm sd).

3.6 Efecte de la PKC θ en l'organització ultraestructural de la NMJ

Per tal de determinar si la reducció de la fosforilació de les subunitats δ i ϵ dels nAChR (que està acompanyada alhora d'un retard en la maduració de la morfologia dels agrupaments de nAChR) pot afectar a la ultraestructura de la sinapsi neuromuscular, es van observar sinapsis de diferents edats durant el desenvolupament postnatal amb el microscopi electrònic de transmissió (figura 43). Es coneix que en cada una de les edats considerades, les sinapsis individuals poden tenir estats de desenvolupament diferent. Tant en músculs d'animals WT com KO, les sinapsis neuromusculars amb un nivell de maduració comparable mostren una estructura semblant. En una anàlisi qualitativa s'ha vist que en animals KO l'aparença ultraestructural i la disposició de les tres cèl·lules que configuren la unió neuromuscular (nervi, múscul i glia) no mostren cap anormalitat en P3, P6 i P13. La coexistència de diferents botons de terminals nerviosos sobre una membrana postsinàptica poc definida, amb una baixa electrondensitat, sense plecs a P3 [figura 43 (a)] canvia a un estat intermedi, en P6, on els axons estan separats [a l'exemple de (b)]. Aquesta situació és seguida [P13 en (c)] per una formació més avançada dels plecs postsinàptics i una segregació i eliminació d'alguns terminals nerviosos. Alguns terminals nerviosos (marcats amb un #) estan englobats per prolongacions de la cèl·lula de Schwann on s'observa que també contenen residus de membrana. A la figura 43 (d) es pot observar que les sinapsis neuromusculars d'adult entre WT i KO també presenten un nivell de maduració comparable mostrant una estructura semblant.

Resultats

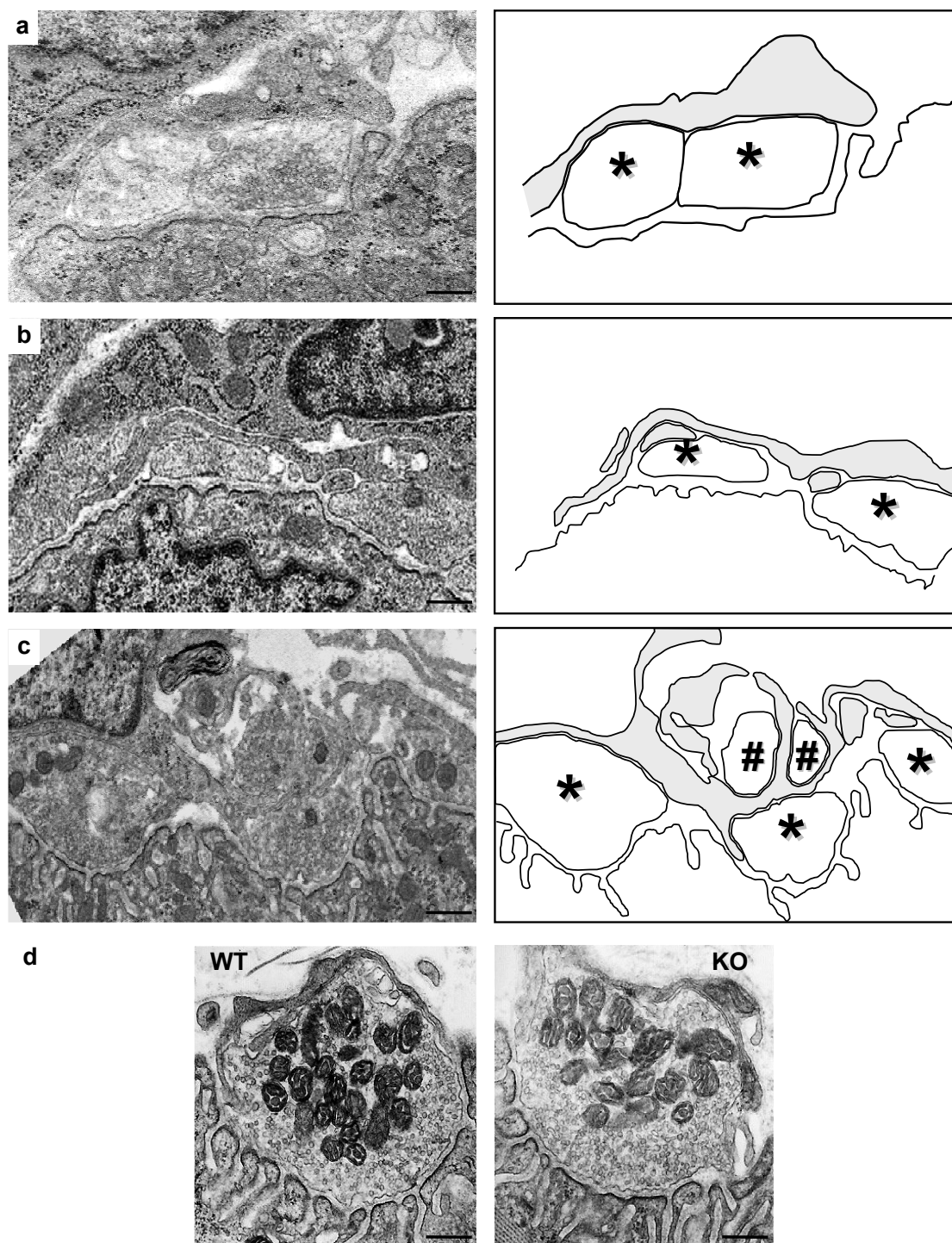


Figura 43. Ultraestructura de les unions neuromusculars dels animals KO durant el desenvolupament i en l'adult. Unions neuromusculars amb un nivell de maduració comparable mostren la mateixa estructura en músculs WT i en KO a P3, P6 i P13. (a) Unió neuromuscular d'animal KO de P3; la sinapsi mostra la coexistència de diferents botons de terminals nerviosos (marcat amb un asterisc (*) al dibuix a la dreta de la imatge) pobrament definits, baixa densitat, la membrana postsinàptica sense plecs. (b) Es mostra un estat intermedi de la separació dels axons a P6. (c) Unions neuromusculars de músculs P13 de KO que mostra una avançada formació dels plecs i la segregació del terminal nerviós i eliminació. Els terminals nerviosos

marcats amb # al dibuix que l'acompanya està englobat per prolongacions de la cèl·lula de Schwann i també conté restes de membrana. En (a-c), la columna de la dreta són dibuixos on els tres elements cel·lulars de la unió neuromuscular (terminal axònic, cèl·lula de Schwann i membrana densificada postsinàptica) han estat delimitats. (d) Sinapsi neuromuscular d'adult en animals WT i KO. Barra d'escala = 200 nm.

3.7 Localització cel·lular de la PKC θ

S'ha suggerit que amb la compartimentació cel·lular de les isoformes de la PKC s'aconsegueix selectivitat pels substrats. Determinar una localització postsinàptica de la PKC θ podria, per tant, ser bastant indicatiu de la fosforilació directa de la subunitat δ del nAChR per part d'aquesta isoforma. La localització de la isoforma θ a la sinapsi neuromuscular s'ha descrit a l'apartat 1.2 de la part de resultats (figura 22). L'expressió de la PKC θ es detecta a la unió neuromuscular en desenvolupament (P6) després del tractament amb col·lagenasa, indicant així la localització postsinàptica d'aquesta isoforma. Quan s'observen fibres musculars intactes, sense ser tractades amb col·lagenasa, la PKC θ es localitza també a la unió neuromuscular però, en alguns casos, és possible veure axons que l'estan expressant, indicant també la localització presinàptica d'aquesta isoforma.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

SERINA/TREONINA QUINASES A LA SINAPSI NEUROMUSCULAR: ESPECIALITZACIÓ DE LES ISOFORMES
DE LA PROTEÏNA QUINASA C

Núria Montserrat Besalduch Canes

ISBN:978-84-692-3232-3/DL:T-939-2009

V - DISCUSSIÓ

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

SERINA/TREONINA QUINASES A LA SINAPSI NEUROMUSCULAR: ESPECIALITZACIÓ DE LES ISOFORMES
DE LA PROTEÏNA QUINASA C

Núria Montserrat Besalduch Canes

ISBN:978-84-692-3232-3/DL:T-939-2009

V – Discussió

- 1. Expressió i localització de diferents isoformes de la PKC i de diferents subunitats de la PKA**
- 2. Efecte de l'activitat sinàptica sobre la localització de les isoformes clàssiques de la PKC (cPKC) a la unió neuromuscular de rata adulta**
- 3. Desenvolupament de l'eliminació sinàptica i maduració dels agrupaments de nAChR a la sinapsi neuromuscular de ratolins KO en la isoforma θ de la PKC**

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

SERINA/TREONINA QUINASES A LA SINAPSI NEUROMUSCULAR: ESPECIALITZACIÓ DE LES ISOFORMES
DE LA PROTEÏNA QUINASA C

Núria Montserrat Besalduch Canes

ISBN:978-84-692-3232-3/DL:T-939-2009

1. Expressió i localització de les isoformes de la PKC i de les subunitats de la PKA

Les serina/treonina quinases PKC i PKA són proteïnes que s'expressen àmpliament a l'organisme i que fan funcions diverses. La família de PKC està composta per diferents isoformes que han estat identificades segons les seves propietats moleculars i bioquímiques (Nishizuka 1992). Les isoformes es diferencien en el seu domini regulador i la seva dependència pel calci, com també en la seva distribució en els teixits tot i que moltes d'elles s'expressen al cervell i al múscul esquelètic. La PKA és una quinasa ubiqüa composta per dues subunitats catalítiques (C) i dues reguladores (R). És important conèixer tant l'expressió com el lloc on es localitzen les diferents isoformes de la PKC i les subunitats de la PKA per tal de poder conèixer i poder associar-les amb funcions concretes a la cèl·lula i a la unió neuromuscular.

Expressió i localització de les isoformes de la PKC (α , βI , βII , γ , ϵ , δ , θ , ζ i μ)

Com s'ha mostrat en l'apartat 1.1 de la secció de resultats, al múscul esquelètic s'han identificat diferents isoformes de la PKC (α , βI , βII , ϵ , δ , θ , ζ i μ) que tenen una diferent expressió depenent de l'edat. Els resultats mostren que hi ha isoformes, com les de la família de les clàssiques, que s'expressen de forma abundant tant en P6 com en l'adult, encara que la PKC α augmenta a l'adult i, en canvi, βI no varia i βII disminueix. Això indica que entre aquestes isoformes de la mateixa família hi ha un comportament diferent durant el desenvolupament i suggereix que cada una podria tenir un paper diferent amb diferents funcions durant aquest període (discussió que s'amplia més endavant). Pel que fa a les isoformes de la PKC de la família de les noves (ϵ , δ i θ) tenen una major expressió en P6 que en l'adult, suggerint que la funció principal d'aquesta família d'isoformes tindrà lloc durant el desenvolupament, com s'explicarà més endavant en el cas de la PKC θ . La PKC ζ té una major expressió en l'adult, al contrari que la isoforma μ que destaca durant el desenvolupament.

Com s'ha comentat prèviament, les diferents isoformes de la PKC es troben localitzades en una àmplia varietat de teixits i, a la vegada, en molts tipus cel·lulars. S'han descrit isoformes que tenen una localització ubiqüa i isoformes que són molt més específiques d'un teixit. Hi ha molts treballs en els que es descriu que el múscul

esquelètic expressa moltes isoformes de PKC (Brandt i col., 2003; Moraczewski i col., 2002; Cantó i col., 2004; Perrini i col., 2004; Rose i col., 2004; Van Ginneken i col., 2004; Vary i col., 2005). Aquestes inclouen les isoformes ϵ i δ en el múscul *gastrocnemius* (Vary i col., 2005), PKC θ , δ , ϵ , α , ζ i β i η al *extensor digitorum longus* i al *soleus* (Moraczewski i col., 2002). Molts d'aquests estudis han demostrat que la PKC desenvolupa un paper en el transport de glucosa mediat per la insulina i l'exercici. També s'ha descrit que, una quantitat significativa de la PKC està expressada a la membrana dels túbuls T (Salvatori i col., 1993) indicant que possiblement aquestes PKCs extrasinàptiques intervenen en el metabolisme i en la contracció de la fibra muscular. Les PKCs també s'expressen a les motoneurons de la medulla espinal (Hietanen i col., 1990; Miki, 1995; Roberts i col., 1997; Nagao i col., 1998; Dave i col., 2005). Tot i això, són pocs els treballs que han immunolocalitzat aquestes isoformes a la unió neuromuscular. Els nostres resultats d'immunolocalització de les diferents isoformes de la PKC en múscul esquelètic d'adult mostren, igual que en l'expressió, una diferent localització d'aquestes isoformes a la unió neuromuscular. Així s'ha trobat que les isoformes δ i ϵ , de la família de les noves, es localitzen a la unió neuromuscular adulta, tant al terminal nerviós (δ i ϵ) com al component postsinàptic (δ). La isoforma atípica ζ es localitza als tres elements de la sinapsi, a la part postsinàptica, a la cèl·lula de Schwann i al terminal nerviós. I l'última isoforma analitzada, la isoforma μ , només s'ha localitzat a la part postsinàptica, a la fibra muscular sinàptica. Pel que fa a la localització de les isoformes de la família de les clàssiques (cPKC), a continuació es discuteix més extensament, igual que es farà més endavant amb la isoforma θ de la família de les noves.

Els resultats d'immunoblots d'aquest estudi mostren que tres de les quatre isoformes de cPKC (α , β I i β II) estan presents al múscul esquelètic. També es mostra que la quantitat d'isoformes de cPKC a la zona sinàptica del múscul és semblant a la de les regions distals extrasinàptiques (ambdues zones han estat normalitzades amb la quantitat d'actina). Això indica que totes les isoformes de cPKC estan presents en tota la fibra muscular, encara que la immunohistoquímica d'elevada resolució mostri una distribució i concentració selectiva de β I i β II als petits volums de la unió neuromuscular.

S'ha trobat també que el múscul diafragma té la major proporció de les isoformes de cPKC a la membrana sinàptica. Això coincideix amb les evidències d'altres autors que mostren que al múscul esquelètic, la proporció més elevada de l'activitat total de

l'enzim està associada amb la fracció de membrana (Richter i col., 1987; Cleland i col., 1989), indicant l'alt potencial en l'estat d'activació d'aquestes quinases en condicions basals. És ben conegut que la translocació de les PKCs implica un moviment de les quinases des de la fracció citoplasmàtica a la de membrana, provocant canvis conformationals de l'enzim i, per tant, de la seva activitat (Kraft i Anderson, 1983). D'altra banda, s'ha demostrat que en condicions de repòs del múscul, la localització de l'enzim a la fracció de membrana està associada amb la fosforilació de la PKC, que és l'estat actiu de l'enzim.

Com diferents isoformes de PKC poden tenir funcions diferents a les neurones i als músculs, s'ha estudiat la distribució de les diferents isoformes de PKC que depenen de calci als tres elements de la unió neuromuscular. El present estudi demostra que tres de les isoformes de PKC que depenen de calci s'expressen a la unió neuromuscular d'adult amb una distribució selectiva en tipus cel·lulars específics. Al terminal nerviós s'han detectat les isoformes α i β I de la PKC mentre que a la cèl·lula muscular i a la cèl·lula de Schwann es van detectar PKC α i β II, sent indetectable la PKC γ en aquests tipus cel·lulars. Així, PKC β I és la isoforma de cPKC que es troba exclusivament al terminal nerviós de la unió neuromuscular, suggerint que podria tenir una funció específica en l'alliberament del transmissor. També PKC α podria estar implicada en aquesta funció ja que es troba també al terminal nerviós, encara que podria tenir més d'una funció al localitzar-se als tres tipus cel·lulars de la NMJ. Altres autors han mostrat que la PKC α s'expressa ubiquament (Nakano i col., 1992). No es pot descartar, però, que part de la marca detectada com a PKC α , en realitat correspongui a β I o β II donada la parcial especificitat de l'anticòs utilitzat. Per altra banda, PKC α i β II es van detectar a la cèl·lula muscular postsinàptica i a la cèl·lula de Schwann. Altres estudis també suggereixen que hi ha immunoreactivitat per PKC α i β II a les cèl·lules de Schwann del nervi ciàtic (Ekström i col., 1992; Roberts i McLean, 1997). Per altra banda, les isoformes de PKC β (sense distingir entre el tipus I i II) han estat marcades al component presinàptic (Nakano i col., 1992; Arakawa i col., 1993; Perkins i col., 2001) i a la cèl·lula postsinàptica (Nakano i col., 1992; Perkins i col., 2001). La PKC γ ha estat principalment descrita només al sistema nerviós central (CNS) i a la medul·la espinal (Nishizuka Y, 1995). En el present estudi s'ha trobat que PKC γ és quasi bé absent a la unió neuromuscular i al múscul extrasinàptic.

Per altra banda, l'expressió de la isoforma de PKC independent de calci, PKC θ , ha estat detectada al múscul esquelètic (Hilgerberg i Miles, 1995; Lanuza i col., 2000; Kim i col., 2002) i existeixen evidències directes i indirectes que han mostrat una acció postsinàptica de la PKC θ *in vivo* i *in vitro* (Li i col., 2001; Lanuza i col., 2002; Li i col., 2004; veure més endavant). A més, està descrit que aquesta isoforma s'expressa en miotubs aneurals (Lanuza i col., 2000). En el present treball, s'ha determinat que durant el desenvolupament postnatal la isoforma θ de la PKC es localitza al component postsinàptic de la NMJ però també s'expressa als axons intramusculars i als terminals nerviosos de la NMJ. Aquest fet no sorprèn perquè s'ha descrit que la PKC θ juga un paper al terminal nerviós de la NMJ *in vitro* (Li i col., 2004). En concret, en preparacions de co-cultius cel·lulars en les que les cèl·lules musculars expressen la PKC θ però, en canvi, les motoneurons són deficitàries en aquesta quinasa no es produeix el mecanisme de competició axonal que porta a l'eliminació de sinapsis. Per tant, la presència de la PKC θ al component postsinàptic durant els primers dies de desenvolupament postnatal indica que aquesta isoforma podria estar implicada en els mecanismes postsinàptics que tenen lloc durant el procés postnatal d'eliminació sinàptica.

Expressió i localització de les subunitats de la PKA (C α , C β , RII i RI)

Mitjançant la tècnica de Western blot s'ha analitzat l'expressió de diferents subunitats de la PKA al múscul esquelètic de rata en dues edats diferents (P6 i adult) i s'han trobat les subunitats C α , C β , RII α i RI. Es va observar que l'expressió d'aquestes subunitats varia en les dues edats estudiades. Les subunitats C α i C β de la PKA disminueixen en l'adult respecte a P6, i això fa pensar que aquestes subunitats tenen un paper més destacat durant el desenvolupament i no tant en l'adult on la seva expressió és baixa. L'expressió de les subunitats reguladores, RII α i RI, és contrària a la de les subunitats catalítiques, en quant a que en l'adult s'expressen més que en P6, cosa que fa suposar que, tot i que la PKA és un tetràmer format per dues subunitats catalítiques i dues reguladores, aquestes tenen diferent expressió depenent de l'edat. Aquesta manca de concordança entre l'expressió de les subunitats catalítiques i reguladores fa pensar en una regulació diferent per les diferents subunitats en els dos períodes estudiats. Aquesta diferència en l'expressió entre unes i altres subunitats de la PKA podria

manifestar-se en la diferència que hi ha en la funció de la PKA durant el desenvolupament i en l'adult. La subunitat C γ no s'ha detectat al múscul esquelètic i, per tant, tampoc a la unió neuromuscular. Fins al moment, aquesta subunitat només s'ha trobat expressada en els testicles humans (Beebe i col., 1990; Foss i col., 1992; Zimmermann i col., 1999). S'ha descrit que la forma α (C α , RI α i RII α) es considera ubiqua i constitutiva, mentre que la forma β (C β , RI β i RII β) té una expressió més específica expressant-se principalment al sistema nerviós (Brandon i col., 1997) tot i que la proteïna quinasa A és una proteïna ubiqua en totes les cèl·lules dels mamífers (Kim i col., 2005).

Com ja s'ha comentat anteriorment, els anticossos que s'han utilitzat per a la detecció de les subunitats catalítiques de la PKA no són completament específics per a la subunitat específica teòrica, sinó que també en reconeixen d'altres. Tot i aquesta inespecificitat, s'han detectat diferències entre els diferents anticossos, tant d'expressió (mitjançant Western blot) com de localització (mitjançant tècniques d'IHQ). Els resultats de Western blot mostren que les subunitats C α i C β tenen una menor expressió en l'adult respecte a P6. Pel que fa als anticossos per a les subunitats reguladores, tampoc són del tot específics ja que no diferencien entre les formes α i β però en canvi no hi ha creuament entre les subunitats reguladores de tipus I i II.

Una vegada coneguda l'expressió de les subunitats de la PKA al múscul esquelètic, conèixer la localització d'aquestes a la unió neuromuscular facilitarà en un futur relacionar-les amb la funció que realitzen. Al igual que s'ha comentat anteriorment referent a la PKC, pel que fa a l'estudi de la localització de les subunitats de la PKA al múscul esquelètic i en particular a la NMJ són pocs els estudis realitzats fins al moment. En aquest treball, i mitjançant la tècnica d'IHQ, es mostra la localització a la unió neuromuscular, mitjançant la tècnica d'immunohistoquímica, de les diferents subunitats de la PKA. S'ha trobat la presència de la PKA C α al terminal nerviós i a la cèl·lula de Schwann, de la subunitat C β als tres elements de la unió neuromuscular i de les subunitats reguladores RI i RII a la cèl·lula muscular postsinàptica. Altres autors havien descrit la localització de les subunitats només a la cèl·lula postsinàptica i no als altres elements de la unió neuromuscular. Així s'havia descrit que la PKA RII α (Hoover i col., 2001; Perkins i col., 2001) i la subunitat catalítica de PKA (Hoover i col., 2001) es concentren a la part postsinàptica de la unió neuromuscular. El present estudi mostra la PKA RII concentrada postsinàpticament sense colocalitzar amb els receptors d'acetilcolina

nicotínics, i també localitzada a la membrana fora de la unió neuromuscular. La PKA RI es localitza a la part postsinàptica de la NMJ. Aquest mateix patró de localització s'ha descrit per PKA RII β (Perkins i col., 2001).

2. Efecte de l'activitat sinàptica sobre la localització de les isoformes clàssiques de la PKC (cPKC) a la unió neuromuscular de rata adulta

Les proteïnes quinases C són una família d'enzims essencial per a la transducció de senyals en molts tipus cel·lulars, incloent neurones i múscul esquelètic. A la sinapsi neuromuscular, les PKCs estan implicades tant en l'alliberament d'ACh presinàptic dependent de calci com en la contracció de la fibra muscular postsinàptica també dependent de calci. El present estudi descriu la localització cel·lular de les isoformes de la PKC dependents de calci associades amb l'activitat sinàptica a la unió neuromuscular. Prèviament, al nostre laboratori, es va demostrar que, a la sinapsi neuromuscular, almenys una isoforma de PKC que depèn de calci facilita l'alliberament d'ACh modulats pels mAChRs presinàptics (Santafé i col., 2006). Donada la mida i la diversitat en la família de les PKCs, una qüestió important és saber quin/s membre/s de la família de la PKC estan implicats en el funcionament de la unió neuromuscular. Per determinar l'expressió i distribució de les isoformes de la PKC al múscul esquelètic i a la unió neuromuscular, de rata adulta, en condicions de repòs i després d'estimulació elèctrica, l'estudi s'ha centrat en les PKCs "clàssiques o convencionals" (cPKCs: α , β I, β II i γ) que estan regulades per calci i diacilglicerol (DAG).

Aquest estudi descriu: (1) els efectes del bloqueig de PKC en l'amplitud dels EPPs, amb i sense estimulació; (2) l'expressió de les isoformes de cPKC en resposta a condicions d'estimulació; (3) els efectes de l'estimulació sobre la fosforilació de cPKC i la fosforilació dels seus substrats. Els principals resultats demostren que un augment en l'activitat sinàptica evocada elèctricament està associat amb un augment en l'activació de cPKC i de la fosforilació. Aquest augment en els nivells de les isoformes α , β I i β II a les membranes de la unió neuromuscular té lloc quan la contracció muscular segueix a l'estimulació, indicant que la contracció muscular és essencial per mantenir aquest increment.

En aquest treball, però també en estudis electrofisiològics previs realitzats en preparacions neuromusculars elèctricament inactives *ex vivo* (sense la motoneurona que dispara la contracció muscular), s'ha vist que, en aquestes condicions de repòs, la PKC no està acoblada al mecanisme d'alliberament d'ACh, perquè quan és inhibida totalment per la CaC els paràmetres d'alliberament no canvien (figura 30; Santafé i col., 2005). No obstant, en aquest estudi s'ha trobat que la PKC també s'acobla a

l'alliberament (esdevé inhibible per CaC) quan s'imposa una moderada activitat en la unió neuromuscular per estimulació elèctrica contínua (1 Hz, en cèl·lules musculars sense contracció). És interessant senyalar que, aquesta nova activitat de la PKC, inhibible per CaC, no resulta per ella mateixa en una potenciació o depressió de l'alliberament, suggerint que la PKC podria realitzar una funció de manteniment d'algun aspecte de la maquinària d'alliberament. És molt interessant examinar si l'activitat de PKC α , β I i β II (γ no es detecta) canvia després de l'estimulació, perquè això podria indicar que l'activitat específica de les isoformes dependents de calci de la PKC podria proporcionar un mitjà pel qual la diana de la modulació de l'alliberament del neurotransmissor i l'activitat sinàptica estan afectades. Altres estudis han descrit que la contracció muscular induïda per estimulació elèctrica augmenta la translocació de l'activitat total de la PKC a la membrana cel·lular (Richter i col., 1987; Cleland i col., 1989; Antipenko i col., 1999). En aquest estudi es mostra que l'augment de l'activitat sinàptica acompanyat de la contracció muscular proporciona un augment del nivell de les isoformes α , β I i β II a la fracció de membrana de la zona sinàptica sense un canvi d'aquestes molècules al citoplasma. La isoforma α augmenta també a la membrana extrasinàptica. Aquests canvis estan acompanyats d'un augment en la fosforilació de les pròpies cPKC i en la fosforilació de moltes proteïnes que són substrat de cPKC. El conjunt d'aquests resultats indica en aquestes condicions experimentals que l'augment de les isoformes de cPKC a la membrana sinàptica, va acompanyat d'un increment en l'acció fosforiladora d'aquestes quinases. Quan no té lloc la contracció muscular, l'estimulació sinàptica causa una disminució significativa de les tres isoformes en la membrana sinàptica (i, alhora, una disminució en la fosforilació de proteïnes) sense que es produeixi cap canvi significatiu a la fracció citoplasmàtica, alhora que es produeix un augment de la isoforma α a la membrana extrasinàptica. Així, quan les sinapsis són estimulades, les isoformes α , β I i β II augmenten o disminueixen la seva quantitat a la membrana sinàptica depenent de la presència o absència, respectivament, de la contracció de les cèl·lules musculars. En canvi, a la zona extrasinàptica, la isoforma α sempre augmenta amb l'activitat sinàptica independentment de l'activitat contràctil. Això suggereix que PKC α es pot activar, almenys parcialment, a la membrana extrasinàptica per un mecanisme lligat a una conducció passiva dels EPPs.

Els resultats d'immunohistoquímica han mostrat que les isoformes α i β I es localitzen al terminal nerviós, mentre que al component postsinàptic ho fan α i β II.

L'augment de les isoformes presinàptiques (α i β I) provocat per l'activitat sinàptica seguida de la contracció de la cèl·lula muscular, pot requerir la participació d'una resposta positiva neurotròfica des del component postsinàptic com a resultat de l'activitat contràctil postsinàptica. L'augment de les isoformes α i β II (al component postsinàptic) pot estar directament induït per la contracció de la cèl·lula muscular. A la figura 44 es mostra una representació dels efectes tròfics positius que la contracció muscular té en l'activació de les isoformes dependents de calci a la sinapsi neuromuscular. Quan l'activitat sinàptica no va acompanyada de l'activitat contràctil (sent l'activitat contràctil el resultat final i la màxima eficàcia de la neurotransmissió normal a la unió neuromuscular), els mecanismes de manteniment i d'activació de les cPKCs no s'activen i les isoformes poden inclús, disminuir tal i com mostren els resultats. En aquestes condicions, també podria contribuir a la disminució de la PKC en la membrana una resposta negativa en el component d'estimulació presinàptic que actuaria a través de l'alliberament d'ACh via mAChRs i que no es veuria compensada per l'hipotètic suport neurotròfic depenent de la contracció.

En resum, aquest estudi demostra una distribució selectiva de les isoformes de cPKC als tipus cel·lulars específics de la unió neuromuscular, sent PKC α i PKC β I localitzades als terminals presinàptics, mentre que PKC α i PKC β II estan associades amb la membrana postsinàptica. Aquesta distribució indica que les isoformes β I i/o α de la PKC podrien ser els enzims implicats directament en la modulació de l'alliberament d'ACh. Els resultats destaquen que l'augment en l'activitat sinàptica evocada elèctricament està associat amb un increment en l'activació i la fosforilació de les cPKC i que la contracció de la cèl·lula muscular és una condició necessària per al manteniment o augment de les isoformes de cPKC a les membranes sinàptiques.

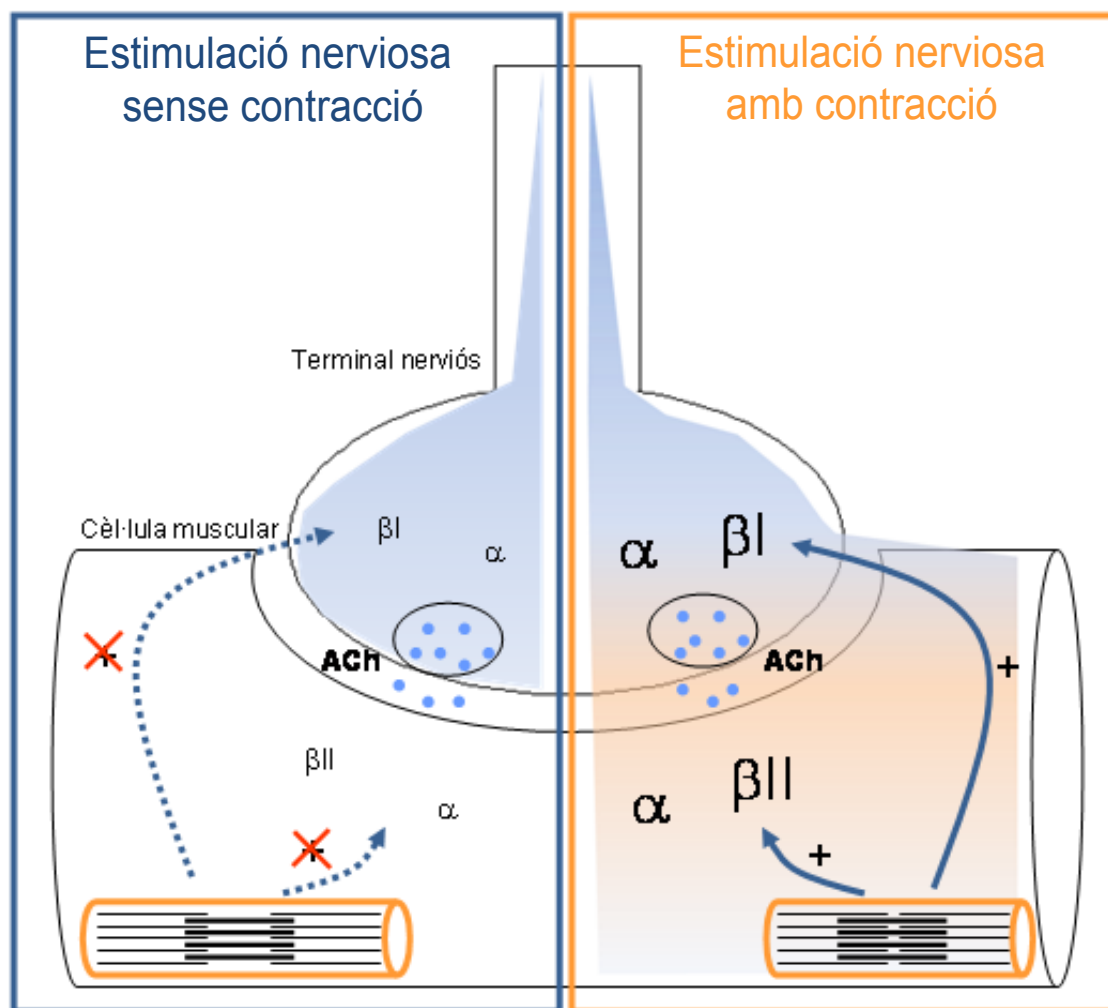


Figura 44. Diagrama que il·lustra l'efecte tròfic positiu que la contracció muscular fa sobre l'activació de les isoformes que depenen de calci a la unió neuromuscular. La PKC α i la PKC β I es localitzen al terminal presinàptic, mentre que la PKC α i la PKC β II estan associades amb la membrana postsinàptica. Part dreta: L'activitat sinàptica està associada amb un augment en els nivells de les isoformes α , β I i β II de la PKC a la membrana de la sinapsi neuromuscular quan la contracció muscular segueix a l'estímul. La contracció muscular és essencial per mantenir aquest augment. L'augment de les isoformes presinàptiques (β I i α) a la zona sinàptica dependent de la contracció de la cèl·lula muscular pot requerir de la implicació d'un efecte neurotròfic positiu des del component postsinàptic com a resultat de l'activitat contràctil postsinàptica. L'augment de les isoformes α i β II (en la part postsinàptica) podria estar directament induït a la cèl·lula muscular quan es contrau. Part esquerra: Quan l'activitat sinàptica no va acompanyada de l'activitat contràctil, el mecanisme de manteniment i activació de les PKCs no s'engega i les isoformes poden inclús disminuir, tal i com es mostra en el diagrama.

3. Desenvolupament de l'eliminació sinàptica i maduració dels agrupaments de nAChR a la sinapsi neuromuscular de ratolins KO en la isoforma θ de la PKC

El procés d'eliminació de sinapsis dependent de l'activitat sinàptica té lloc a la NMJ d'una forma molt intensa en el període postnatal (Brown i col., 1976; Thompson, 1985). En aquest procés d'eliminació de connexions contribueixen tant alteracions en l'estabilitat dels receptors postsinàptics com de les estructures presinàptiques sent múltiples les molècules implicades, encara que els mecanismes responsables encara no es coneixen amb exactitud (Sanes and Lichtman, 1999). S'ha descrit que la PKC té un paper essencial en el procés de la modificació de les sinapsis neuromusculars postnatal tant a nivell presinàptic com postsinàptic (Lanuza i col., 2001, 2002). De les diferents isoformes de la PKC, la isoforma PKC θ s'expressa de forma específica al múscul esquelètic i la seva expressió és regulada per control neural (Hilgenberg i Miles, 1995; Hilgenberg i col., 1996). Aquestes característiques la fan una bona candidata per estar implicada en els processos del desenvolupament postnatal. Estudis recents del nostre grup han mostrat que l'eliminació sinàptica requereix l'acció de la PKC θ (Li i col., 2004). Per aquestes raons, és molt interessant conèixer si els mecanismes postnatsals de modificació de connexions sinàptiques que depenen de la PKC s'expressen en animals deficients (KO) en la isoforma θ .

Tal i com s'havia realitzat prèviament (Li i col., 2004), s'han fet diversos controls que indiquen que l'estat general del desenvolupament sembla no ser diferent entre els animals WT i els KO per a PKC θ . S'ha estudiat l'expressió de MHC (marcador del desenvolupament de múscul esquelètic) i l'expressió a la medulla espinal del vAChT (marcador de motoneurons). A més, no es van detectar diferències significatives en la mida de les fibres musculars, ni es va trobar cap diferència constant en el pes corporal en cap punt del desenvolupament dels animals. Per altra banda, excepte en la diferència en la velocitat de maduració de les sinapsis, les unions neuromusculars eren morfològicament iguals.

En aquest treball s'ha demostrat que l'expressió funcional normal de la PKC θ té un paper fonamental durant les primeres etapes de la maduració de la NMJ. L'eliminació sinàptica postnatal i la maduració dels agrupaments de nAChR postsinàptics es veuen retardades en els animals deficients en la PKC θ durant la primera setmana de vida

postnatal però, en canvi, en els animals KO de 14 dies d'edat, el percentatge d'innervació polineuronal no és diferent entre els animals WT i els KO. Això concorda amb resultats previs del nostre laboratori en els que es va mostrar que el procés d'eliminació sinàptica postnatal està molt influenciat per tractaments farmacològics que bloquegen o augmenten l'activitat de la PKC (Lanuza i col., 2001, 2002). Es va identificar un període dependent de la PKC entre P4 i P8, durant el període d'eliminació sinàptica, i un de PKC independent des del dia 8 fins l'edat adulta. L'aplicació tòpica repetida de calfosteïna C (CaC), un inhibidor de la PKC, sobre la part externa del múscul LAL evita totalment l'eliminació sinàptica entre P4 i P8, però només ho fa parcialment entre les edats de P8 i P12 (Lanuza i col., 2001). En aquest context, la sobreexpressió de la PKC θ accelera la maduració sinàptica postnatal (Miles i Wagner, 2003).

El retard en el procés d'eliminació de terminals nerviosos en els animals KO està acompanyat per un retard en la maduració dels agrupaments de nAChR. En els animals WT, les plaques uniformes de nAChR es van transformant de manera que en l'interior de l'agrupament dels nAChR van apareixent àrees lliures de receptors (forats) que són indicatives del desplaçament de molècules de nAChR a la membrana. En els animals KO, són més nombrosos els agrupaments de nAChR que mantenen la seva estructura sense forats que en els WT indicant el retard en la maduració. Aquests resultats concorden amb els trobats anteriorment en els que el bloqueig de la PKC per part de la CaC produeix un bloqueig quasi total en el global de la maduració sinàptica entre el dia P4 i el P8 en animals WT (Lanuza i col., 2002). És interessant el fet de que el tractament dels músculs d'animals KO amb CaC no fa variar els valors de poliinnervació ni de maduració dels agrupaments de nAChR en els animals KO suggerint que la PKC θ podria ser la isoforma de PKC necessària que actua en aquests processos en el període considerat (P4-P8). No es pot descartar, però, que altres isoformes de la PKC conflueixin en el mateix procés.

Anteriorment, es va descriure que l'acció de la PKC provoca la dispersió dels agrupaments de nAChR en cultius de miòcits encara que aquesta dispersió no va poder ser explicada per una reducció de l'expressió dels nAChR (Ross i col., 1988; Lanuza i col., 2000), suggerint que la fosforilació dels nAChR mediada per la PKC era responsable de la dispersió. L'activació de la PKC, per altra banda, fosforila serines específiques en la subunitat δ del receptor (Huganir i col., 1984; Safran i col., 1990; Nimnual i col., 1998). Aquesta reacció de fosforilació altera l'estat fisiològic dels receptors, augmentant la

velocitat a la qual es desensibilitzen (Huganir i Greengard, 1990). Aquests i altres resultats ens fan plantejar que l'augment de fosforilació dels residus de serina dels nAChR en el domini citoplasmàtic de la subunitat δ podria provocar un desprendiment dels nAChR des del seu ancoratge amb les proteïnes estructurals de la membrana postsinàptica que ocasionaria la mobilitat lateral dels AChRs a l'agrupament de nAChR afavorint l'aparició d'espais lliures de nAChRs (forats: estadis M3 i M4). Treballs recents del nostre grup han mostrat que tractaments farmacològics que activen o inhibeixen la PKC provocant una dispersió o estabilització dels agrupaments de nAChR (Lanuza i col., 2000) augmenten o disminueixen la fosforilació de la subunitat δ del nAChR en cultius de miòcits (Lanuza i col., 2006). En aquest mateix sentit, l'activació de la PKA que provoca una major estabilitat dels agrupaments de nAChR (Li i col., 2001) augmenta la fosforilació de la subunitat ϵ del nAChR en cultius de miòcits (Lanuza i col., 2006). Es coneix que la fisiologia del nAChR està afectada per una fosforilació específica en la subunitat ϵ mediada per la PKA (Nishizaki i Sumikawa, 1994). Per altra banda, la desestabilització dels nAChR, produïda per l'activació de PKC, pot ser bloquejada o revertida per l'activitat de la PKA (Li i col., 2001). En el present estudi, es mostra que en músculs d'animals KO per a la isoforma θ hi ha una deficient fosforilació de les subunitats δ i ϵ del nAChR durant el desenvolupament postnatal suggerint que la PKC θ podria contribuir a la fosforilació de la subunitat δ i que, a més, influiria en l'acció fosforiladora de la PKA sobre la subunitat ϵ del nAChR. Així, la fosforilació adequada del nAChR en les subunitats δ i ϵ contribuiria a la correcta maduració de l'agrupament de nAChR a la NMJ, que pot influir a la vegada en la pèrdua axonal que té lloc en aquest període del desenvolupament postnatal. Aquest fet posa de manifest l'acció coordinada de les serina-treonina quinases PKC i PKA durant el procés postnatal d'eliminació sinàptica. És, però, probable que altres mecanismes a part de la fosforilació del nAChR puguin estar involucrats en la maduració dels agrupaments de nAChR i, al seu través, en l'eliminació selectiva de sinapsis. Existeixen un gran nombre de proteïnes citoplasmàtiques subsinàptiques que s'han identificat com a part de la maquinària d'estabilització de l'aparell postsinàptic (Sanes i Lichtman, 1999, 2001; Kummer i col., 2006). L'associació directa o indirecta dels nAChR amb aquesta estructura citoplasmàtica pot ser crítica per al manteniment de la sinapsi i pot ser dependent d'una varietat de reaccions de fosforilació. Els resultats presents mostren que molècules clau de l'aparell postsinàptic com MuSK, rapsina i utrofina es localitzen juntament amb els nAChR sense mostrar diferència entre els músculs KO i WT i indicant que aquestes proteïnes s'agrupen i estan en contacte una amb l'altra. Així,

Discussió

l'acumulació d'aquestes molècules postsinàptiques a les sinapsis no depèn de l'activitat de la PKC θ .

Els resultats d'IHQ han mostrat que la isoforma θ es localitza al component postsinàptic durant el desenvolupament postnatal. Aquesta localització concorda amb les evidències mostrades de l'acció postsinàptica de la PKC θ . Per altra banda, la manca de la isoforma θ de la PKC no sembla afectar a la formació ultraestructural de la NMJ tal i com ho indiquen les imatges obtingudes per microscòpia electrònica.

En resum, aquest estudi demostra que la PKC θ és crítica en les etapes inicials del procés d'eliminació sinàptica postnatal incloent la maduració inicial dels agrupaments de nAChR postsinàptics de la sinapsi neuromuscular. La falta d'aquesta isoforma θ de la PKC no afecta ni a l'expressió de les molècules relacionades amb l'agrupament dels nAChR (MuSK, rapsina i utrofina) ni a l'acumulació d'aquestes a la unió neuromuscular, indicant que el retràs en la maduració dels agrupaments de nAChR a la membrana postsinàptica és un efecte directe de la PKC θ sobre els nAChR una vegada aquests han estat agrupats. L'efecte directe de la PKC θ podria ser la fosforilació de la subunitat δ del nAChR durant el desenvolupament postnatal ja que la PKC θ és necessària per a la fosforilació correcta de les subunitats δ i ϵ del nAChR. La fosforilació adequada en aquestes subunitats sembla contribuir a la correcta maduració de l'agrupament de nAChR a la sinapsi neuromuscular.

VI - CONCLUSIONS

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

SERINA/TREONINA QUINASES A LA SINAPSI NEUROMUSCULAR: ESPECIALITZACIÓ DE LES ISOFORMES
DE LA PROTEÏNA QUINASA C

Núria Montserrat Besalduch Canes

ISBN:978-84-692-3232-3/DL:T-939-2009

1. Les isoformes de la PKC α , β I, β II, ϵ , δ , θ , ζ i μ s'expressen en quantitat suficient al múscul esquelètic mentre que la isoforma γ és gairebé indetectable. Les isoformes de la PKC α , β I, ϵ , δ , θ , ζ i μ presenten una expressió diferent en el sisè dia postnatal (P6) que en l'adult: les isoformes α i ζ s'expressen més en l'adult que en P6; les isoformes β I, ϵ , δ , θ i μ , al contrari, més en P6 que en l'adult; i la isoforma β II no presenta canvis d'expressió entre P6 i adult.

2. Les isoformes de la PKC α , β I, β II, ϵ , δ , θ , ζ i μ es localitzen de forma específica als tres elements cel·lulars de la sinapsi neuromuscular:

A la cèl·lula muscular postsinàptica es localitzen les isoformes α , β II, δ , θ , ζ i μ .

Al terminal nerviós es localitzen les isoformes α , β I, ϵ , δ , θ i ζ .

A la cèl·lula de Schwann es localitzen les isoformes α , β II i ζ .

3. Les subunitats de la PKA $C\alpha$, $C\beta$, RII i RI s'expressen en quantitat suficient al múscul esquelètic mostrant una diferent expressió en el sisè dia postnatal (P6) que en l'adult. Les isoformes catalítiques $C\alpha$ i $C\beta$ s'expressen més en P6 que en l'adult. Pel contrari, les isoformes reguladores RII i RI s'expressen més en l'adult que en P6.

4. Les subunitats de la PKA $C\alpha$, $C\beta$, RII i RI es localitzen específicament als tres elements de la sinapsi neuromuscular:

A la cèl·lula muscular postsinàptica es localitzen les subunitats $C\beta$, RII i RI.

Tant al terminal nerviós com a la cèl·lula de Schwann es localitzen les subunitats $C\alpha$ i $C\beta$.

5. L'activitat sinàptica evocada elèctricament al múscul esquelètic adult provoca l'acoblament d'una o més isoformes de la PKC en l'alliberament del neurotransmissor, encara que en aquestes condicions no varia l'amplitud del potencial de placa evocat indicant la implicació de la PKC en el manteniment de l'activitat sinàptica contínua. Almenys una isoforma de la PKC dependent de calci podria estar implicada en la modulació de l'alliberament evocat del neurotransmissor.

6. Al múscul esquelètic adult en condicions de repòs, les isoformes dependents de calci α , β I i β II s'expressen majoritàriament a la membrana, tant de l'àrea sinàptica com de l'extrasinàptica, amb un nivell elevat de fosforilació, indicant així l'estat actiu de l'enzim en aquesta ubicació.

Conclusions

7. L'activitat sinàptica evocada elèctricament de les fibres nervioses al múscul esquelètic adult i la subseqüent contracció muscular provoca un increment de les isoformes α , βI i βII i de la seva fosforilació a la membrana sinàptica així com de la seva activitat fosforiladora. La contracció muscular és essencial per mantenir aquests increments.

8. La presència de les isoformes de PKC (α , βI i βII) a les cèl·lules específiques de la unió neuromuscular no s'altera amb l'activitat sinàptica evocada elèctricament amb o sense contracció muscular. En particular, la isoforma βI present exclusivament al terminal nerviós, podria ser una de les isoformes de les PKC dependents de calci que esdevé acoblada a l'alliberament del neurotransmissor en resposta a l'activitat sinàptica.

9. La PKC θ és necessària en les etapes inicials del procés d'eliminació sinàptica postnatal.

10. La isoforma θ de la PKC no és crítica per a la maduració final dels agrupaments de nAChR postsinàptics de la sinapsi neuromuscular però sí per al seu desenvolupament inicial.

11. La falta de la PKC θ no afecta ni a l'expressió de les molècules relacionades amb l'agrupament dels nAChR (MuSK, rapsina i utrofina) ni a l'acumulació d'aquestes a la unió neuromuscular, indicant que el retràs en la maduració dels agrupaments de nAChR a la membrana postsinàptica és un efecte directe de la PKC θ sobre els nAChR una vegada aquests han estat agrupats.

12. La PKC θ és necessària per a que les subunitats δ i ϵ del nAChR es fosforilin amb normalitat durant el desenvolupament postnatal. La fosforilació adequada del nAChR a les subunitats δ i ϵ contribueix a la correcta maduració de l'agrupament de nAChR a la sinapsi neuromuscular.

13. La falta de PKC θ no afecta a l'organització ultraestructural de la unió neuromuscular ni durant el desenvolupament postnatal ni en l'adult.

VII - BIBLIOGRAFIA

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

SERINA/TREONINA QUINASES A LA SINAPSI NEUROMUSCULAR: ESPECIALITZACIÓ DE LES ISOFORMES
DE LA PROTEÏNA QUINASA C

Núria Montserrat Besalduch Canes

ISBN:978-84-692-3232-3/DL:T-939-2009

Abbs, E.T. and Joseph, D.N. (1981). The effects of atropine and oxotremorine on acetylcholine release in rat phrenic nerve-diaphragm preparations. *Br J Pharmacol.* Jun;73(2):481-3.

Adams, M.E., Kramarcy, N., Krall, S.P., Rossi, S.G., Rotundo, R.L., Sealock, R., Froehner, S.C. (2000). Absence of alpha-syntrophin leads to structurally aberrant neuromuscular synapses deficient in utrophin. *J Cell Biol.* 150(6):1385-98.

Akaaboune, M., Hantaï, D., Smirnova, I., Lachkar, S., Kapsimali, M., Verdière-Sahuqué, M., Festoff, B.W. (1998). Developmental regulation of the serpin, protease nexin I, localization during activity-dependent polyneuronal synapse elimination in mouse skeletal muscle. *J Comp Neurol.* 397(4):572-9.

Allen, T.G. (1999). The role of N-, Q- and R-type Ca²⁺ channels in feedback inhibition of ACh release from rat basal forebrain neurones. *J Physiol.* 515:93-107.

Altiok, N., Altiok, S., Changeux, J.P. (1997). Heregulin-stimulated acetylcholine receptor gene expression in muscle: requirement for MAP kinase and evidence for a parallel inhibitory pathway independent of electrical activity. *EMBO J.* 16(4):717-25.

Angaut-Petit, D., Molgo, J., Connold, A.L., Faille, L. (1987). The levator auris longus muscle of the mouse: a convenient preparation for studies of short- and long-term presynaptic effects of drugs or toxins. *Neurosci. Letters.* 82:83-88.

Antipenko, A., Frías, J.A., Parra, J., Cadefau, J.A., Cussó, R. (1999). Effect of chronic electrostimulation of rabbit skeletal muscle on calmodulin level and protein kinase activity. *Int J Biochem Cell Biol.* 2:303-10.

Apel, E.D., Glass, D.J., Moscoso, L.M., Yancopoulos, G.D., Sanes, J.R. (1997). Rapsyn is required for MuSK signaling and recruits synaptic components to a MuSK-containing scaffold. *Neuron.* 18(4):623-35.

Arakawa, M., Mizoguchi, A., Masutani, M., Kawakita, N., Ide, C. (1993). Ultrastructural localization of protein kinase C beta-subspecies in the axon terminal of rat neuromuscular junction. *Neurosci Res.* 16(2):125-30.

Arenson, M.S. (1989). Muscarinic inhibition of quantal transmitter release from the magnesium-paralysed frog sartorius muscle. *Neuroscience.* 30(3):827-36.

Auld, D.S., Colomar, A., Bélair, E.L., Castonguay, A., Pinard, A., Rousse, I., Thomas, S., Robitaille, R. (2003). Modulation of neurotransmission by reciprocal synapse-glia interactions at the neuromuscular junction. *J Neurocytol.* 32(5-8):1003-15. Review.

Auld, D.S. and Robitaille, R. (2003). Perisynaptic Schwann cells at the neuromuscular junction: nerve- and activity-dependent contributions to synaptic efficacy, plasticity, and reinnervation. *Neuroscientist*. 9(2):144-57. Review.

Balice-Gordon, R.J. and Thompson, W.J. (1988). The organization and development of compartmentalized innervation in rat extensor digitorum longus muscle. *J. Physiol*. 398:211-31.

Balice-Gordon, R.J. and Lichtman, J.W. (1993). In vivo observations of pre- and postsynaptic changes during the transition from multiple to single innervation at developing neuromuscular junctions. *J Neurosci*. 13(2):834-55.

Balice-Gordon, R.J. and Lichtman, J.W. (1994). Long-term synapse loss induced by focal blockade of postsynaptic receptors. *Nature*. 372(6506):519-24.

Beebe, S.J., Oyen, O., Sandberg, M., Frøysa, A., Hansson, V., Jahnsen, T. (1990). Molecular cloning of a tissue-specific protein kinase (C gamma) from human testis--representing a third isoform for the catalytic subunit of cAMP dependent protein kinase. *Mol Endocrinol*. 4(3):465-75.

Bekoff, A. and Betz, W. (1977). Properties of isolated adult rat muscle fibres maintained in tissue culture. *J Physiol*. 271 (2):537-47.

Bell, R.M. and Burns, D.J. (1991). Lipid activation of protein kinase C. *J Biol Chem*. 266(8):4661-4. Review.

Benoit, P. and Changeux, J.P. (1975). Consequences of tenotomy on the evolution of multiinnervation in developing rat soleus muscle. *Brain Res*. 99(2):354-8.

Bewick, G.S., Youngm C., Slater, C.R. (1996). Spatial relationships of utrophin, dystrophin, beta-dystroglycan and beta-spectrin to acetylcholine receptor clusters during postnatal maturation of the rat neuromuscular junction. *J Neurocytol*. 25(7):367-79.

Bibel, M. and Barde, Y.A. (2000). Neurotrophins: key regulators of cell fate and cell shape in the vertebrate nervous system. *Genes Dev*. 14(23):2919-37. Review.

Binder, M., Schanz, M., Hartig, A. (1991). Vector-mediated overexpression of catalase A in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* induces inclusion body formation. *Eur J Cell Biol* 54:305-312.

Birks, R. (1974). The relationship of transmitter release and storage to fine structure in a sympathetic ganglion. *J Neurocytol* 3:133-160.

Blake, D.J., Weir, A., Newey, S.E., Davies, K.E. (2002). Function and genetics of dystrophin and dystrophin-related proteins in muscle. *Physiol Rev*. 82(2):291-329.

Bornancin, F. and Parker, P.J. (1997). Phosphorylation of protein kinase C-alpha on serine 657 controls the accumulation of active enzyme and contributes to its phosphatase-resistant state. *J. Biol. Chem.* 272:3544-3549.

Bourque, M.J. and Robitaille, R. (1998). Endogenous peptidergic modulation of perisynaptic Schwann cells at the frog neuromuscular junction. *J Physiol.* 512:197-209.

Brandon, E.P., Idzerda, R.L., McKnight, G.S. (1997). PKA isoforms, neural pathways, and behaviour: making the connection. *Curr Opin Neurobiol.* 7(3):397-403. Review.

Brandt, D.T., Goerke, A., Heuer, M., Gimona, M., Leitges, M., Kremmer, E., Lammers, R., Haller, H., Mischak, H. (2003). Protein kinase C delta induces Src kinase activity via activation of the protein tyrosine phosphatase PTP alpha. *J Biol Chem.* 278(36):34073-8.

Brown, M.C., Jansen, J.K., Van Essen, D.C. (1976). Polyneuronal innervation of skeletal muscle in newborn rats and its elimination during maturation. *J.Physiol.* 261:387-422.

Brown, M.C., Hopkins, W.G., Keynes, R.J. (1982). Short and long-term effects of paralysis on the motor innervation of two different neonatal mouse muscles. *J Physiol* 339: 439-450.

Buffelli, M., Busetto, G., Cangiano, L., Cangiano, A. (2002). Perinatal switch from synchronous to asynchronous activity of motoneurons: link with synapse elimination. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99(20):13200-5.

Buffelli, M., Burgess, R.W., Feng, G., Lobe, C.G., Lichtman, J.W., Sanes, J.R. (2003). Genetic evidence that relative synaptic efficacy biases the outcome of synaptic competition. *Nature.* 424(6947):430-4.

Burden, S.J. (1977). Development of the neuromuscular junction in chick embryo: the number, distribution, and stability of acetylcholine receptors. *Dev. Biol.* 57:317-29.

Burden, S.J. (1998). The formation of neuromuscular synapses. *Genes Dev.* 12(2):133-48. Review.

Burgess, R.W., Nguyen, Q.T., Son, Y.J., Lichtman, J.W., Sanes, J.R. (1999). Alternatively spliced isoforms of nerve- and muscle-derived agrin: their roles at the neuromuscular junction. *Neuron* 23: 33-44.

Bursztajn, S., Schneider, L.W., Jong, Y.J., Berman, S.A. (1988). Phorbol esters inhibit the synthesis of acetylcholine receptors in cultured muscle cells. *Biol Cell.* 63(1):57-65.

Burton, K.A., Johnson, B.D., Hausken, Z.E., Westenbroek, R.E., Idzerda, R.L., Scheuer, T., Scott, J.D., Catterall, W.A., McKnight, G.S. (1997). Type II regulatory subunits are not required for the anchoring-dependent modulation of Ca²⁺ channel activity by cAMP-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94(20):11067-72.

Busetto, G., Buffelli, M., Cangiano, L., Cangiano, A. (2003). Effects of evoked and spontaneous motoneuronal firing on synapse competition and elimination in skeletal muscle. *J Neurocytol.* 32(5 8):795-802. Review.

Byrne, J.H. and Kandel, E.R. (1996). Presynaptic facilitation revisited: state and time dependence. *J Neurosci.* 16(2):425-35. Review.

Cadd, G. and McKnight, G.S. (1989). Distinct patterns of cAMP-dependent protein kinase gene expression in mouse brain. *Neuron.* 3:71-9.

Cantó, C., Suárez, E., Lizcano, J.M., Griñó, E., Shepherd, P.R., Fryer, L.G., Carling, D., Bertran, J., Palacín, M., Zorzano, A., Gumà, A. (2004). Neuregulin signaling on glucose transport in muscle cells. *J Biol Chem.* 279(13):12260-8.

Castonguay, A., Lévesque, S., Robitaille, R. (2001). Glial cells as active partners in synaptic functions. *Prog Brain Res.* 132:227-40. Review.

Catterall, W.A. (1999). Molecular properties of brain sodium channels: an important target for anticonvulsant drugs. *Adv Neurol.* 79:441-56. Review.

Caulfield, M.P. (1993). Muscarinic receptors--characterization, coupling and function. *Pharmacol Ther.* 58(3):319-79. Review.

Caulfield, M.P. and Birdsall, N.J. (1998) International Union of Pharmacology. XVII. Classification of muscarinic acetylcholine receptors. *Pharmacol Rev.* 50(2):279-90. Review.

Chang, Q. and Balice-Gordon, R.J. (1997). Nip and tuck at the neuromuscular junction: a role for proteases in developmental synapse elimination. *Bioessays.* 19(4):271-5. Review.

Chen, F., Qian, L., Yang, Z.H., Huang, Y., Ngo, S.T., Ruan, N.J., Wang, J., Schneider, C., Noakes, P.G., Ding, Y.Q., Mei, L., Luo, Z.G. (2007). Rapsyn interaction with calpain stabilizes AChR clusters at the neuromuscular junction. *Neuron.* 55(2):247-60.

Cleland, P.J., Appleby, G.J., Rattigan, S., Clark, M.G. (1989). Exercise-induced translocation of protein kinase C and production of diacylglycerol and phosphatidic acid in rat skeletal muscle in vivo. Relationship to changes in glucose transport. *J Biol Chem.* 264(30):17704-11.

Colakos, N. and Scheller, R.H. (1996). Synaptic vesicle biogenesis, docking, and fusion: a molecular description. *Physiol. Rev.* 76:1-29.

Coleman, P., Federoff, H., Kurlan, R. (2004). A focus on the synapse for neuroprotection in Alzheimer disease and other dementias. *Neurology.* 63(7):1155-62.

Colledge, M. and Scott, J.D. (1999). AKAPs: from structure to function. *Trends Cell Biol.* 9:216-21.

Colman, H., Nabekura, J., Lichtman, J.W. (1997). Alterations in synaptic strength preceding axon withdrawal. *Science.* 275(5298):356-61.

Comerford, P.T. and Fitzgerald, M.J.T. (1986). Motor innervation of rodent diaphragm. *J.Anat.* 149:171-175.

Courteaux, R. (1973). Motor endplate structure. In *Structure and Function of Muscle*, Vol. 2 ed. GH Bourne, pp.483-530. New York: Academic.

Coussens, L., Parker, P.J., Rhee, L., Yang-Feng, T.L., Chen, E., Waterfield, M.D., Francke, U., Ullrich, A. (1986). Multiple, distinct forms of bovine and human protein kinase C suggest diversity in cellular signaling pathways. *Science.* 233(4766):859-66.

Covault, J. and Sanes, J.R. (1986). Distribution of N-CAM in synaptic and extrasynaptic portions of developing and adult skeletal muscle. *J. Cell Biol.* 102:716-30.

Csukai, M., Chen, C.H., De Matteis, M.A., Mochly-Rosen, D. (1997). The coatamer protein beta'-COP, a selective binding protein (RACK) for protein kinase C epsilon. *J Biol Chem.* 272(46):29200-6.

Culican, S.M., Nelson, C.C., Lichtman, J.W. (1998). Axon withdrawal during synapse elimination at the neuromuscular junction is accompanied by disassembly of the postsynaptic specialization and withdrawal of Schwann cell processes. *J Neurosci.* 18(13):4953-65.

D'Angelo, E., Rossi, P., Tanzi, F., Taglietti, V. (1992). Protein Kinase C Facilitation of Acetylcholine Release at the Rat Neuromuscular Junction. *Eur J Neurosci.* 4(9):823-831.

Dai, Z. and Peng, H.B. (1995). Presynaptic differentiation induced in cultured neurons by local application of basic fibroblast growth factor. *J.Neuroscience.* 15:5466-75.

Dale, H.H., Feldberg, W., Vogt, M. (1936). Release of acetylcholine at voluntary motor nerve endings. *J. Physiol.* 86:353-80.

Dave, K.R., Raval, A.P., Purroy, J., Kirkinezos, I.G., Moraes, C.T., Bradley, W.G., Perez-Pinzon, M.A. (2005). Aberrant deltaPKC activation in the spinal cord of Wobbler mouse: a model of motor neuron disease. *Neurobiol Dis.* 18(1):126-33.

Davenport, R.W., Lanuza, M., Kim, S., Jia, M., Snyder, E., Nelson, P.G. (2000). Thrombin action decreases acetylcholine receptor aggregate number and stability in cultured mouse myotubes. *Brain Res Dev Brain Res.* 122(2):119-23.

Day, N.C., Wood, S.J., Ince, P.G., Volsen, S.G., Smith, W., Slater, C.R., Shaw, P.J. (1997). Differential localization of voltage-dependent calcium channel α 1 subunits at the human and rat neuromuscular junction. *J. Neurosci.* 17:6226-35.

DeChiara, T.M., Bowen, D.C., Valenzuela, D.M., Simmons, M.V., Poueymirou, W.T., Thomas, S., Kinetz, E., Compton, D.L., Rojas, E., Park, J.S., Smith, C., DiStefano, P.S., Glass, D.J., Burden, S.J., Yancopoulos, G.D. (1996). The receptor tyrosine kinase MuSK is required for neuromuscular junction formation in vivo. *Cell.* 85(4):501-12.

Del Castillo, J. and Katz, B. (1954) Quantal components of the end-plate potential. *J Physiol*, 124, 560-573.

De Troyer, A., Sampson, M., Sigrist, S., Macklem, P.T. (1981). The diaphragm: two muscles. *Science.* 213:237-238.

Disatnik, M.H., Buraggi, G., Mochly-Rosen, D. (1994). Localization of protein kinase C isozymes in cardiac myotubes. *Exp Cell Res.* 210(2):287-97.

Duclert, A. and Changeux, J.P. (1995). Acetylcholine receptor gene expression at developing neuromuscular junction. *Physiol. Rev.* 75:339-68.

Dutil, E.M., Toser, A., Newton, A.C. (1998). Regulation of conventional protein kinase C isozymes by phosphoinositide-dependent kinase 1 (PDK-1). *Curr. Biol.* 8, 1366-1375.

Duxon, M.J. (1982). The effect of postsynaptic block on development of the neuromuscular junction in postnatal rat. *J Neurocytol.* 11:395-408.

Dykes, A.C., Fultz, M.E., Norton, M.L., Wright, G.L. (2003). Microtubule-dependent PKC-alpha localization in A7r5 smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 285(1):76-87.

Edelman, A.M., Blumenthal, D.K., Krebs, E.G. (1987). Protein serine/threonine kinases. *Annu. Rev. Biochem.* 56:567-613.

Ekström, P.A., Bergstrand, H., Edström, A. (1992). Effects of protein kinase inhibitors on regeneration in vitro of adult frog sciatic sensory axons. *J. Neurosci. Res.* 31(3):462-9.

Engel, A.G. (1994). The neuromuscular junction. In *Myology: Basic and Clinical*, Vol 1, ed. AG.

Engel, A.G., Walls, T.J., Nagel, A., Uchitel, O. (1990) Newly recognized congenital myasthenic syndromes: I. Congenital paucity of synaptic vesicles and reduced quantal release. II. High-conductance fast-channel syndrome. III. Abnormal acetylcholine receptor (AChR) interaction with acetylcholine. IV. AChR deficiency and short channel-open time. *Prog Brain Res.* 84:125-137.

Ermilov, L.G., Mantilla, C.B., Rowley, K.L., Sieck, G.C. (2007). Safety factor for neuromuscular transmission at type-identified diaphragm fibers. *Muscle Nerve.* 35:800-803.

Ervasti, J.M. and Campbell, K.P. (1991). Membrane organization of the dystrophin-glycoprotein complex. *Cell.* 66(6):1121-31.

Ervasti, J.M. and Campbell, K.P. (1993). A role for the dystrophin-glycoprotein complex as a transmembrane linker between laminin and actin. *J Cell Biol.* 122(4):809-23.

Erzen, I., Cvetko, E., Obreza, S., Angaut-Petit, D. (2000). Fiber types in the mouse levator auris longus muscle: a convenient preparation to study muscle and nerve plasticity. *J. Neurosci. Res.* 59:692-697.

Eusebi, F., Grassi, F., Nervi, C., Caporale, C., Adamo, S., Zani, B.M., Molinaro, M. (1987). Acetylcholine may regulate its own nicotinic receptor-channel through the C-kinase system. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 230(1260):355-65.

Falls, D.L. (2003a). Neuregulins and the neuromuscular system: 10 years of answers and questions. *J Neurocytol.* 32(5-8):619-47. Review.

Falls, D.L. (2003b). Neuregulins: functions, forms, and signalling strategies. *Exp Cell Res.* 284(1):14-30. Review.

Fatt, P. and Katz, B. (1951). An analysis of the end-plate potential recorded with an intracellular electrode. *J Physiol.* 115:320-370.

Fatt, P. and Katz, B. (1952). Spontaneous subthreshold activity at motor nerve endings. *J Physiol.* 117:109-128.

Feliciello, A., Gottesman, M.E., Avvedimento, E.V. (2001). The biological functions of A-kinase anchor proteins. *J.Mol.Biol.* 308:99-114.

Festoff, B.W., Rao, J.S., Hantai, D. (1991). Plasminogen activators and inhibitors in the neuromuscular system: III. The serpin protease nexin I is synthesized by muscle and localized at neuromuscular synapses. *J Cell Physiol.* 147(1):76-86.

Fischbach, G.D. and Rosen, K.M. (1997). ARIA: a neuromuscular junction neuregulin. *Annu Rev Neurosci.* 20:429-58. Review.

Flucher, B.E. and Daniels, M.P. (1989). Distribution of Na⁺ channels and ankyrin in neuromuscular junctions is complementary to that of acetylcholine receptors and the 43kd protein. *Neuron* 3:163-75.

Foss, K.B., Simard, J., Bérubé, D., Beebe, S.J., Sandberg, M., Grzeschik, K.H., Gagné, R., Hansson, V., Jahnsen, T. (1992). Localization of the catalytic subunit C gamma of the cAMP-dependent protein kinase gene (PRKACG) to human chromosome region 9q13. *Cytogenet Cell Genet.* 60(1):22-5.

Friese, M.B., Blagden, C.S., Burden, S.J. (2007). Synaptic differentiation is defective in mice lacking acetylcholine receptor beta-subunit tyrosine phosphorylation. *Development.* 134(23):4167-76.

Froehner, S.C., Luetje, C.W., Scotland, P.B., Patrick, J. (1990). The postsynaptic 43K protein clusters muscle nicotinic acetylcholine receptors in *Xenopus* oocytes. *Neuron.* 5(4):403-10.

Froehner, S.C. (1991). The submembrane machinery for nicotinic acetylcholine receptor clustering. *J Cell Biol.* 114(1):1-7. Review.

Fu, A.K., Fu, W.Y., Cheung, J., Tsim, K.W., Ip, F.C., Wang, J.H., Ip, N.Y. (2001). Cdk5 is involved in neuregulin-induced AChR expression at the neuromuscular junction. *Nat Neurosci.* 4(4):374-81.

Fukunaga, K. and Miyamoto, E. (1998). Role of MAP kinase in neurons. *Mol Neurobiol.* 16(1):79-95. Review.

Ganguly, D.K. and Das, M. (1979). Effects of oxotremorine demonstrate presynaptic muscarinic and dopaminergic receptors on motor nerve terminals. *Nature.* 278(5705):645-6.

Garcia, N., Santafé, M.M., Salon, I., Lanuza, M.A., Tomàs, J. (2005). Expression of muscarinic acetylcholine receptors (M1-, M2-, M3- and M4-type) in the neuromuscular junction of the newborn and adult rat. *Histol Histopathol.* 20(3):733-43.

Gautam, M., Noakes, P.G., Mudd, J., Nichol, M., Chu, G.C., Sanes, J.R., Merlie, J.P. (1995). Failure of postsynaptic specialization to develop at neuromuscular junctions of rapsyn-deficient mice. *Nature*. 377(6546):232-6.

Gautam, M., Noakes, P.G., Moscoso, L., Rupp, F., Scheller, R.H., Merlie, J.P., Sanes, J.R. (1996). Defective neuromuscular synaptogenesis in agrin-deficient mutant mice. *Cell*. 85(4):525-35.

Georgiou, J., Robitaille, R., Trimble, W.S., Charlton, M.P. (1994). Synaptic regulation of glial protein expression *in vivo*. *Neuron* 12:443-455.

Georgiou, J. and Charlton, M.P. (1999). Non-myelin-forming perisynaptic schwann cells express protein zero and myelin-associated glycoprotein. *Glia*. 27(2):101-9.

Georgiou, J., Robitaille, R., Charlton, M.P. (1999). Muscarinic control of cytoskeleton in perisynaptic glia. *J Neurosci*. 19(10):3836-46.

Glass, D.J., Bowen, D.C., Stitt, T.N., Radziejewski, C., Bruno, J., Ryan, T.E., Gies, D.R., Shah, S., Mattsson, K., Burden, S.J., DiStefano, P.S., Valenzuela, D.M., DeChiara, T.M., Yancopoulos, G.D. (1996). Agrin acts via a MuSK receptor complex. *Cell* 85:513-23.

Glass, D.J. and Yancopoulos, G.D. (1997). Sequential roles of agrin, MuSK and rapsyn during neuromuscular junction formation. *Curr Opin Neurobiol*. 7(3):379-84. Review.

González CM. (2004). Tesi doctoral. El sistema par-1-proteïna quinasa C en el procés d'eliminació sinàptica durant el desenvolupament postnatal de la unió neuromuscular. Universitat Rovira i Virgili.

Goodnight, J.A., Mischak, H., Kolch, W., Mushinski, J.F. (1995). Immunocytochemical localization of eight protein kinase C isoenzymes overexpressed in NIH 3T3 fibroblasts. Isoform-specific association with microfilaments, Golgi, endoplasmic reticulum, and nuclear and cell membranes. *J Biol Chem* 270(17):9991-10001.

Grady, R.M., Zhou, H., Cunningham, J.M., Henry, M.D., Campbell, K.P., Sanes, J.R. (2000). Maturation and maintenance of the neuromuscular synapse: genetic evidence for roles of the dystrophin-glycoprotein complex. *Neuron*. 25(2):279-93.

Grand, R.J., Turnell, A.S., Grabham, P.W. (1996). Cellular consequences of thrombin-receptor activation. *Biochem J*. 313:353-68. Review.

Gray, P.C., Scott, J.D., Catterall, W.A. (1998). Regulation of ion channels by cAMP-dependent protein kinase and A-kinase anchoring proteins. *Curr Opin Neurobiol*. 8(3):330-4. Review.

Hall, Z.W. (1973). Multiple forms of acetylcholinesterase and their distribution in endplate and non-endplate regions of rat diaphragm muscle. *J. Neurobiol.* 4:343-361.

Hall, Z.W. and Sanes, J.R. (1993). Synaptic structure and development: the neuromuscular junction. *Cell.* 72:99-121.

Haraguchi, C.M. and Yokota, S. (2002). Immunofluorescence technique for 100-nm-thick semithin sections of Epon-embedded tissues. *Histochem Cell Biol* 117:81-85.

Hemmings, Jr H.C, Nairn, A.C., McGuinness, T.L., Huganir, R.L., Greengard, P. (1989). Role of protein phosphorylation in neuronal signal transduction. *Faseb J.* 3:1583-92.

Heuser, J.E. and Reese, T.S. (1973). Evidence for recycling of synaptic vesicle membrane during transmitter release at the frog neuromuscular junction. *J Cell Biol* 57: 315-344.

Heuser, J.E., Reese, T.S., Landis, D.M. (1974). Functional changes in frog neuromuscular junctions with freeze-fracture. *J Neurocytol* 3: 109-131.

Hietanen, M., Koistinaho, J., Recharadt, L., Roivainen, R., Pelto-Huikko, M. (1990). Immunohistochemical evidence for the presence of protein kinase C beta-subtype in rat motoneurons and myoneural junctions. *Neurosci Lett.* 115(2-3):126-30.

Hilgenberg, L. and Miles, K. (1995). Developmental regulation of a protein kinase C isoform localized in the neuromuscular junction. *J. Cell. Sci.* 108:51-61.

Hilgenberg, L., Yearwood, S., Milstein, S., Miles, K. (1996). Neural influence on protein kinase C isoform expression in skeletal muscle. *J Neurosci.* 16(16):4994-5003.

Hoover, F., Mathiesen, I., Skálhegg, B.S., Lømo, T., Taskén, K. (2001). Differential expression and regulation of the PKA signalling pathway in fast and slow skeletal muscle. *Anat Embryol* 203(3):193-201.

House, C. and Kemp, B.E. (1987). Protein kinase C contains a pseudosubstrate prototope in its regulatory domain. *Science.* 238(4834):1726-8.

Huang, L.J., Durick, K., Weiner, J.A., Chun, J., Taylor, S.S. (1997a). D-AKAP2, a novel protein kinase A anchoring protein with a putative RGS domain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94(21):11184-9.

Huang, L.J., Durick, K., Weiner, J.A., Chun, J., Taylor, S.S. (1997b). Identification of a novel protein kinase A anchoring protein that binds both type I and type II regulatory subunits. *J Biol Chem.* 272(12):8057-64.

Hubbard, J.I. and Wilson, D.F. (1973) Neuromuscular transmission in a mammalian preparation in the absence of blocking drugs and the effect of D-tubocurarine. *J Physiol.* 228:307-325.

Huganir, R.L., Miles, K., Greengard, P. (1984). Phosphorylation of the nicotinic acetylcholine receptor by an endogenous tyrosine-specific protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 81(22):6968-72.

Huganir, R.L. and Greengard, P. (1990). Regulation of neurotransmitter receptor desensitization by protein phosphorylation. *Neuron.* 5(5):555-67. Review.

Hunter, T. (1995). Protein kinases, and phosphatases: the yin, and yang of protein phosphorylation, and signaling. *Cell,* 80, 225-36.

Huxley, A.F. and Stampfli, R. (1949). Evidence for saltatory conduction in peripheral myelinated nerve fibers. *J Physiol.* 108:315-339.

Ibraghimov-Beskrovnaya, O., Ervasti, J.M., Leveille, C.J., Slaughter, C.A., Sernett, S.W., Campbell, K.P. (1992). Primary structure of dystrophin-associated glycoproteins linking dystrophin to the extracellular matrix. *Nature.* 355(6362):696-702.

Iliya, A.R. and Dum, R.P. (1984). Somatotopic relations between the motor nucleus and its innervated muscle fibers in the cat tibialis anterior. *Exp. Neurol.* 86:272-92.

Imaizumi-Scherrer, T., Faust, D.M., Bénichou, J.C., Hellio, R., Weiss, M.C. (1996). Accumulation in fetal muscle and localization to the neuromuscular junction of cAMP-dependent protein kinase A regulatory and catalytic subunits RI alpha and C alpha. *J Cell Biol.* 134(5):1241-54.

Imaizumi-Scherrer, T., Faust, D.M., Barradeau, S., Hellio, R., Weiss, M.C. (2001). Type I protein kinase a is localized to interphase microtubules and strongly associated with the mitotic spindle. *Exp Cell Res.* 264(2):250-65.

Inoue, M., Kishimoto, A., Takai, Y., Nishizuka, Y. (1977). Studies on a cyclic nucleotide-independent protein kinase and its proenzyme in mammalian tissues. II. Proenzyme and its activation by calcium-dependent protease from rat brain. *J Biol Chem.* 252(21):7610-6.

Ishihara, A., Roy, R.R., Edgerton, V.R. (1995). Succinate dehydrogenase activity and soma size of motoneurons innervating different portions of the cat tibialis anterior. *Neuroscience* 68:813-22.

Ishii, K., Chen, J., Ishii, M., Koch, W.J., Freedman, N.J., Lefkowitz, R.J., Coughlin, S.R. (1994). Inhibition of thrombin receptor signaling by a G-protein coupled receptor kinase. Functional specificity among G-protein coupled receptor kinases. *J Biol Chem.* 269(2):1125-30.

Jablecki, C. and Brimijoin, S. (1974). Reduced axoplasmic transport of choline acetyltransferase activity in dystrophic mice. *Nature* 250: 51-154.

Jahromi, B.S., Robitaille, R., Charlton, M.P. (1992). Transmitter release increases intracellular calcium in perisynaptic Schwann cells in situ. *Neuron* 8:1069-1077.

Jansen, J.K. and Fladby, T. (1990). The perinatal reorganization of the innervation of skeletal muscle in mammals. *Prog Neurobiol.* 34(1):39-90. Review.

Jia, M., Li, M., Dunlap, V., Nelson, P.G. (1999). The thrombin receptor mediates functional activity-dependent neuromuscular synapse reduction via protein kinase C activation in vitro. *J Neurobiol.* 38(3):369-81.

Jo, S.A., Zhu, X., Marchionni, M.A., Burden, S.J. (1995). Neuregulins are concentrated at nerve-muscle synapses and activated ACh-receptor gene expression. *Nature* 373:158-161.

Johnson, J.E., Giorgione, J., Newton, A.C. (2000). The C1 and C2 domains of protein kinase C are independent membrane targeting modules, with specificity for phosphatidylserine conferred by C1 domain. *Biochemistry.* 39(37):11360-9.

Johnson, L.N., Noble, M.E., Owen, D.J. (1996). Active and inactive protein kinases: structural basis for regulation. *Cell.* 85:149-58.

Kabuto, M., Kubota, T., Kobayashi, H., Nakagawa, T., Kitai, R., Kodera, T. (1995). Detection of mammosomatotroph cells and identification of the coexistence of growth hormone and prolactin within the same secretory granules in these cells using confocal laser scanning microscopy. *Histochem Cell Biol.* 104:363-367.

Kasthuri, N. and Lichtman, J.W. (2003). The role of neuronal identity in synaptic competition. *Nature.* 424(6947):426-30.

Katz, B. and Miledi, R. (1965). The measurement of synaptic delay, and the time course of acetylcholine release at the neuromuscular junction. *Proc R Soc Lond B.* 161:483-495.

Katz, B. (1966). *Nerve, muscle and synapse.* New York: McGraw-Hill.

Katz, B. and Miledi, R. (1979) Estimates of quantal content during 'chemical potentiation' of transmitter release. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 205:369-378.

Keller-Peck, C.R., Walsh, M.K., Gan, W.B., Feng, G., Sanes, J.R., Lichtman, J.W. (2001). Asynchronous synapse elimination in neonatal motor units: studies using GFP transgenic mice. *Neuron.* 31(3):381-94.

Kheifets, V. and Mochly-Rosen, D. (2007). Insight into intra- and inter-molecular interactions of PKC: design of specific modulators of kinase function. *Pharmacol Res.* 55(6):467-76.

Kim, C., Xuong, N., Taylor, S. (2005). Crystal structure of a complex between the catalytic and regulatory (RI α) subunits of PKA. *Science.* 307:690-96.

Kim, N., Stiegler, A.L., Cameron, T.O., Hallock, P.T., Gomez, A.M., Huang, J.H., Hubbard, S.R, (2008). Dustin ML, Burden SJ. Lrp4 is a receptor for Agrin and forms a complex with MuSK. *Cell.* 135(2):334-42.

Kim, S. and Nelson, P.G. (2000). Involvement of calpains in the destabilization of the acetylcholine receptor clusters in rat myotubes. *J Neurobiol.* 42(1):22-32.

Kim, S., Bondeva, T., Nelson, P.G. (2002). Activation of protein kinase C isozymes in primary mouse myotubes by carbachol. *Brain Res Dev Brain Res.* 137(1):13-21.

Knight, D., Tolley, L.K., Kim, D.K., Lavidis, N.A., Noakes, P.G. (2003). Functional analysis of neurotransmission at beta2-laminin deficient terminals. *J Physiol.* 546:789-800.

Knighton, D.R., Zheng, J.H., Ten Eyck L.F., Ashford, V.A., Xuong, N.H., Taylor, S.S., Sowadski, J.M. (1991). Crystal structure of the catalytic subunit of cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase. *Science.* 253(5018):407-14.

Kopp, D.M., Perkel, D.J., Balice-Gordon, R.J. (2000). Disparity in neurotransmitter release probability among competing inputs during neuromuscular synapse elimination. *J Neurosci.* 20:8771-8779.

Kose, A., Saito, N., Ito, H., Kikkawa, U., Nishizuka, Y., Tanaka, C. (1988). Electron microscopic localization of type I protein kinase C in rat Purkinje cells. *J. Neurosci.* 8:4262-4268.

Kraft, A.S. and Anderson, W.B. (1983). Phorbol esters increase the amount of Ca²⁺, phospholipid dependent protein kinase associated with plasma membrane. *Nature.* 301(5901):621-3.

Kuffler, S.W. and Yoshikami, D. (1975) The number of transmitter molecules in a quantum: an estimate from iontophoretic application of acetylcholine at the neuromuscular synapse. *J Physiol.* 251:465-482.

Kuffler, S.W. and Nicholls, J.G. (1982). De la neurona al cerebro. Aspectos celulares de la función del sistema nervioso. Ed. Reverté SA. Barcelona. Cap 5, p 102.

Kummer, T.T., Misgeld, T., Sanes, J.R. (2006). Assembly of the postsynaptic membrane at the neuromuscular junction: paradigm lost. *Curr Opin Neurobiol.* 16(1):74-82.

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.

Lafarga, M., Berciano, M.T., Carmo-Fonseca, M. (1997). Semithin cryosections as a tool to perform high resolution immunofluorescence and in situ hybridization analysis of the nervous tissue: a study in the supraoptic nucleus. *J Neurosci Methods* 75:137-145.

Lanuza, M.A., Li, M.X., Jia, M., Kim, S., Davenport, R., Dunlap, V., Nelson, P.G. (2000). Protein kinase C-mediated changes in synaptic efficacy at the neuromuscular junction in vitro: the role of postsynaptic acetylcholine receptors. *J Neurosci Res.* 61(6):616-25.

Lanuza, M.A., Garcia, N., Santafé, M., Nelson, P.G., Fenoll-Brunet, M.R., Tomàs, J. (2001). Pertussis toxin-sensitive G-protein and protein kinase C activity are involved in normal synapse elimination in the neonatal rat muscle. *J Neurosci Res.* 63(4):330-40.

Lanuza, M.A., Garcia, N., Santafé, M., González, C.M., Alonso, I., Nelson, P.G., Tomàs, J. (2002). Pre- and postsynaptic maturation of the neuromuscular junction during neonatal synapse elimination depends on protein kinase C. *J Neurosci Res.* 67(5):607-17.

Lanuza, M.A., Garcia, N., González, C.M., Santafé, M.M., Nelson, P.G., Tomàs, J. (2003). Role and expression of thrombin receptor PAR-1 in muscle cells and neuromuscular junctions during the synapse elimination period in the neonatal rat. *J Neurosci Res.* 73(1):10-21.

Lanuza, M.A., Gizaw, R., Vilorio, A., González, C.M., Besalduch, N., Dunlap, V., Tomàs, J., Nelson, P.G. (2006). Phosphorylation of the nicotinic acetylcholine receptor in myotube-cholinergic neuron cocultures. *J Neurosci Res.* 83(8):1407-14.

Lanuza, M.A., Besalduch, N., Garcia, N., Sabaté, M., Santafé, M.M., Tomàs J. (2007). Plastic-embedded semithin cross-sections as a tool for high-resolution immunofluorescence analysis of the neuromuscular junction molecules: Specific cellular location of protease-activated receptor-1. *J Neurosci Res.* 85(4):748-56.

Le Novère, N. and Changeux, J.P. (1995). Molecular evolution of the nicotinic acetylcholine receptor: an example of multigene family in excitable cells. *J Mol Evol* 40(2):155-72.

Lee, Y., Rudell, J., Yechikhov, S., Taylor, R., Swope, S., Ferns, M. (2008). Rapsyn carboxyl terminal domains mediate muscle specific kinase-induced phosphorylation of the muscle acetylcholine receptor. *Neuroscience.* 153(4):997-1007.

Lemke, G. (1996). Neuregulins in development. *Mol Cell Neurosci.* 7(4):247-62. Review.

Li, M.X., Jia, M., Jiang, H., Dunlap, V., Nelson, P.G. (2001). Opposing actions of protein kinase A and C mediate Hebbian synaptic plasticity. *Nat Neurosci.* 4(9):871-2.

Li, M.X., Jia, M., Yang, L.X., Dunlap, V., Nelson, P.G. (2002). Pre- and postsynaptic mechanisms in Hebbian activity-dependent synapse modification. *J Neurobiol.* 52(3):241-50.

Li, M.X., Jia, M., Yang, L.X., Jiang, H., Lanuza, M.A., Gonzalez, C.M., Nelson, P.G. (2004). The role of the theta isoform of protein kinase C (PKC) in activity-dependent synapse elimination: evidence from the PKC theta knock-out mouse in vivo and in vitro. *J Neurosci.* 24(15):3762-9.

Liddell, E.G.T. and Sherrington, C.S. (1925). Recruitment and some other factors of reflex inhibition. *Proc. R. Soc. Lon.* 97:488-518.

Lin, W., Dominguez, B., Yang, J., Aryal, P., Brandon, E.P., Gage, F.H., Lee, K.F. (2005). Neurotransmitter acetylcholine negatively regulates neuromuscular synapse formation by a Cdk5-dependent mechanism. *Neuron.* 46(4):569-79.

Liu, Y., Fields, R.D., Festoff, B.W., Nelson, P.G. (1994). Proteolytic action of thrombin is required for electrical activity-dependent synapse reduction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91(22):10300-4.

Lowry, O.H. Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275.

Luo, Z.G., Wang, Q., Zhou, J.Z., Wang, J., Luo, Z., Liu, M., He, X., Wynshaw-Boris, A., Xiong, W.C., Lu, B., Mei, L. (2002). Regulation of AChR clustering by Dishevelled interacting with MuSK and PAK1. *Neuron.* 35(3):489-505.

Marangi, P.A., Wieland, S.T., Fuhrer, C. (2002). Laminin-1 redistributes postsynaptic proteins and requires rapsyn, tyrosine phosphorylation, and Src and Fyn to stably cluster acetylcholine receptors. *J Cell Biol.* 157(5):883-95.

Maslah, E., Crews, L., Hansen, L. (2006). Synaptic remodeling during aging and in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 9(3):91-9. Review.

McCann, C.M., Nguyen, Q.T., Santo Neto, H., Lichtman, J.W. (2007). Rapid synapse elimination after postsynaptic protein synthesis inhibition in vivo. *J Neurosci.* 27(22):6064-7.

McHanwell, S. and Biscoe, T.J. (1981). The localization of motoneurons supplying the hindlimb muscles of the mouse. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B.* 293:477-508.

McLachlan, E.M. and Martin, A.R. (1981). Non-linear summation of end-plate potentials in the frog and mouse. *J Physiol.* 311:307-24.

McMahan, U.J. (1990). The agrin hypothesis. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 55:407-18.

Mellor, H. and Parker, P.J. (1998). The extended protein kinase C superfamily. *Biochem. J.* 332:281-92.

Miki, A. (1995). Developmental changes in the expression of alpha-, beta- and gamma-subspecies of protein kinase C at synapses in the ventral horn of the embryonic and postnatal rat spinal cord. *Brain Res Dev Brain Res.* 87(1):46-54.

Miledi, R. (1973). Transmitter release induced by injections of calcium ions nerve terminals. *Proc R Soc Lond B* 183:421-425.

Miledi, R., Molenaar, P.C., Polak, R.L. (1983) Electrophysiological and chemical determination of acetylcholine release at the frog neuromuscular junction. *J Physiol.* 334:245-254.

Miles, K. and Huganir, R.L. (1988). Regulation of nicotinic acetylcholine receptors by protein phosphorylation. *Mol Neurobiol.* 2(2):91-124. Review.

Miles, K. and Wagner, M. (2003). Overexpression of nPKC theta is inhibitory for agrin-induced nicotinic acetylcholine receptor clustering in C2C12 myotubes. *J Neurosci Res.* 71(2):188-95.

Minic, J., Molgó, J., Karlsson, E., Krejci, E. (2002). Regulation of acetylcholine release by muscarinic receptors at the mouse neuromuscular junction depends on the activity of acetylcholinesterase. *Eur J Neurosci.* 15(3):439-48.

Misgeld, T., Kummer, T.T., Lichtman, J.W., Sanes, J.R. (2005). Agrin promotes synaptic differentiation by counteracting an inhibitory effect of neurotransmitter. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102(31):11088-93.

Mochly-Rosen, D. (1995). Localization of protein kinases by anchoring proteins: a theme in signal transduction. *Science.* 268(5208):247-51.

Montal, M. and Opella, S.J. (2002). The structure of the M2 channel-lining segment from the nicotinic acetylcholine receptor. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1565:287-293.

Moraczewski, J., Nowotniak, A., Wrobel, E., Castagna, M., Gautron, J., Martelly, I. (2002). Differential changes in protein kinase C associated with regeneration of rat extensor digitorum longus and soleus muscles. *Int J Biochem Cell Biol.* 34(8):938-49.

Moransard, M., Borges, L.S., Willmann, R., Marangi, P.A., Brenner, H.R., Ferns, M.J., Fuhrer, C. (2003). Agrin regulates rapsyn interaction with surface acetylcholine receptors, and this underlies cytoskeletal anchoring and clustering. *J Biol Chem.* 278(9):7350-9.

Moscoco, L.M., Chu, G.C., Gautam, M., Noakes, P.G., Merlie, J.P., Sanes, J.R. (1995). Synapse-associated expression of an acetylcholine receptor-inducing protein, ARIA/heregulin, and its putative receptors, ErbB2 and ErbB3, in developing mammalian muscle. *Dev. Biol.* 172:158-69.

Nagao, M., Kato, S., Oda, M., Hirai, S. (1998). Decrease of protein kinase C in the spinal motor neurons of amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol.* 96(1):52-6.

Nakano, S., Shimohama, S., Saitoh, T., Akiguchi, I., Kimura, J. (1992). Localization of protein kinase C in human skeletal muscle. *Muscle Nerve.* 5(4):496-9.

Nalefski, E.A. and Newton, A.C. (2001). Membrane binding kinetics of protein kinase C beta II mediated by the C2 domain. *Biochemistry.* 40(44):13216-29.

Nathanson, N.M. (2000). A multiplicity of muscarinic mechanisms: enough signaling pathways to take your breath away. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97(12):6245-7.

Nelson, P.G., Lanuza, M.A., Jia, M., Li, M.X., Tomàs, J. (2003). Phosphorylation reactions in activity-dependent synapse modification at the neuromuscular junction during development. *J Neurocytol.* 32(5-8):803-16. Review.

Nelson, P.G. (2005). Activity-dependent synapse modulation and the pathogenesis of Alzheimer disease. *Curr Alzheimer Res.* 2(5):497-506. Review.

Nelson, P.G., Jia, M., Li, M. X., Gizaw, R., Lanuza, M.A. and Tomàs, J. (2005) Coordinated pre- and postsynaptic changes involved in developmental activity-dependent synapse elimination In: *Synaptic Plasticity and Transsynaptic signaling.* Stanton P., Brauham C. and Scharfman H (eds.) Springer. New York. 2005. pp 441-456.

Newell, A.E., Fiedler, S.E., Ruan, J.M., Pan, J., Wang, P.J., Deininger, J., Corless, C.L., Carr, D.W. (2008). Protein kinase A RII-like (R2D2) proteins exhibit differential localization and AKAP interaction. *Cell Motil Cytoskeleton.* 65(7):539-52.

Newton, A.C. (1993). Interaction of proteins with lipid headgroups: lessons from protein kinase C. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 22:1-25. Review.

Newton, A.C. (1995a). Protein Kinase C: structure, function, and regulation. *J Biol Chem.* 270:28495-28498.

- Newton, A.C. (1995b). Protein kinase C. Seeing two domains. *Curr Biol.* 5(9):973-6. Review.
- Newton, A.C. (1997). Regulation of protein kinase C. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9:161-7.
- Nguyen, Q.T., Parsadanian, A.S., Snider, W.D., Lichtman, J.W. (1998). Hyperinnervation of neuromuscular junctions caused by GDNF overexpression in muscle. *Science.* 279(5357):1725-9.
- Nicolopoulos-Stournaras, S. and Iles, J.F. (1983). Motor neuron columns in the lumbar spinal cord of the rat. *J. Comp. Neurol.* 217:75-85.
- Nimnual, A.S., Chang, W., Chang, N.S., Ross, A.F., Gelman, M.S., Prives, J.M. (1998). Identification of phosphorylation sites on AChR delta-subunit associated with dispersal of AChR clusters on the surface of muscle cells. *Biochemistry.* 37(42):14823-32.
- Nishikawa, K., Toker, A., Johannes, F.J., Songyang, Z., Cantley, L.C. (1997). Determination of the specific substrate sequence motifs of protein kinase C isozymes. *J. Biol. Chem.* 272:952-960.
- Nishimune, H., Sanes, J.R., Carlson, S.S. (2004). A synaptic laminin-calcium channel interaction organizes active zones in motor nerve terminals. *Nature.* 432(7017):580-7.
- Nishimune, H., Valdez, G., Jarad, G., Moulson, C.L., Müller, U., Miner, J.H., Sanes, J.R. (2008). Laminins promote postsynaptic maturation by an autocrine mechanism at the neuromuscular junction. *J Cell Biol.* 182(6):1201-15.
- Nishizaki, T. and Sumikawa, K. (1994). A cAMP-dependent Ca^{2+} signalling pathway at the endplate provided by the gamma to epsilon subunit switch in ACh receptors. *Brain Res Mol Brain Res.* 24(1-4):341-5.
- Nishizuka, Y. (1984). Turnover of inositol phospholipids and signal transduction. *Science.* 225(4668):1365-70. Review.
- Nishizuka, Y. (1986). Studies and perspectives of protein kinase C. *Science* 233(4761):305-12.
- Nishizuka, Y. (1992). Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science.* 258:607-614.
- Nishizuka, Y. (1995). Protein Kinase C and lipid signalling for sustained cellular responses. *FASEB J.* 9:484-496.
- Nitkin, R.M., Smith, M.A., Magill, C., Fallon, J.R., Yao, Y.M., Wallace, B.G., McMahan, U.J. (1987). Identification of agrin, a synaptic organizing protein from Torpedo electric organ. *J Cell Biol.* 105:2471-8.

Noakes, P.G., Gautam, M., Mudd, J., Sanes, J.R., Merlie, J.P. (1995). Aberrant differentiation of neuromuscular junctions in mice lacking s-laminin/laminin beta 2. *Nature*. 374(6519):258-62.

Numann, R., Hauschka, S.D., Catterall, W.A., Scheuer, T. (1994). Modulation of skeletal muscle sodium channels in a satellite cell line by protein kinase C. *J Neurosci*. 14(7):4226-36.

Oancea, E. and Meyer, T. (1998). Protein kinase C as a molecular machine for decoding calcium and diacylglycerol signals. *Cell*. 95(3):307-18.

Obata, T., Yaffe, M.B., Leparc, G.G., Piro, E.T., Maegawa, H., Kashiwagi, A., Kikkawa, R., Cantley, L.C. (2000). Peptide and protein library screening defines optimal substrate motifs for AKT/PKB. *J. Biol. Chem*. 275:36108-36115.

O'Brien, R.A., Ostberg, A.J., Vrbová, G. (1978). Observations on the elimination of polyneuronal innervation in developing mammalian skeletal muscle. *J Physiol*. 282:571-82.

O'Brien, R.A., Ostberg, A.J., Vrbova, G. (1984). Protease inhibitors reduce the loss of nerve terminals induced by activity and calcium in developing rat soleus muscles in vitro. *Neuroscience*. 12(2):637-46.

Ogata, T. (1988). Structure of motor endplates in the different fiber types of vertebrate skeletal muscles. *Arch. Histol. Cytol*. 51:385-424.

Okada, K., Inoue, A., Okada, M., Murata, Y., Kakuta, S., Jigami, T., Kubo, S., Shiraishi, H., Eguchi, K., Motomura, M., Akiyama, T., Iwakura, Y., Higuchi, O., Yamanashi, Y. (2006). The muscle protein Dok-7 is essential for neuromuscular synaptogenesis. *Science*. 312(5781):1802-5.

Parker, P.J., Coussens, L., Totty, N., Rhee, L., Young, S., Chen, E., Stabel, S., Waterfield, M.D., Ullrich, A. (1986). The complete primary structure of protein kinase C – the major phorbol ester receptor. *Science*. 233:853-9.

Patton, B.L., Cunningham, J.M., Thyboll, J., Kortessmaa, J., Westerblad, H., Edström, L., Tryggvason, K., Sanes, J.R. (2001). Properly formed but improperly localized synaptic specializations in the absence of laminin alpha4. *Nat Neurosci*. 4(6):597-604.

Patton, B.L., Chiu, A.Y., Sanes, J.R. (1998). Synaptic laminin prevents glial entry into the synaptic cleft. *Nature*. 393(6686):698-701.

Patton, B.L., Miner, J.H., Chiu, A.Y., Sanes, J.R. (1997). Distribution and function of laminins in the neuromuscular system of developing, adult, and mutant mice. *J Cell Biol*. 139(6):1507-21.

Pearson, R.B., Kemp, B.E. (1991). Protein kinase phosphorylation site sequences and consensus specificity motifs: tabulations. *Methods Enzymol.* 200:62-81.

Perkins, G.A., Wang, L., Huang, L.J., Humphries, K., Yao, V.J., Martone, M., Deerinck, T.J., Barraclough, D.M., Violin, J.D., Smith, D., Newton, A., Scott, J.D., Taylor, S.S., Ellisman, M.H. (2001). PKA, PKC, and AKAP localization in and around the neuromuscular junction. *BMC Neurosci.* 2:17.

Perrini, S., Henriksson, J., Zierath, J.R., Widegren, U. (2004). Exercise-induced protein kinase C isoform-specific activation in human skeletal muscle. *Diabetes.* 53(1):21-4.

Personius, K.E., Balice-Gordon, R.J. (2001). Loss of correlated motor neuron activity during synaptic competition at developing neuromuscular synapses. *Neuron.* 31(3):395-408.

Personius, K.E., Balice-Gordon, R.J. (2002). Activity-dependent synaptic plasticity: insights from neuromuscular junctions. *Neuroscientist.* 8(5):414-22. Review.

Personius, K.E., Chang, Q., Mentis, G.Z., O'Donovan, M.J., Balice-Gordon, R.J. (2007). Reduced gap junctional coupling leads to uncorrelated motor neuron firing and precocious neuromuscular synapse elimination. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104(28):11808-13.

Peyronnard, J.M., Charron, L.F., Lavoie, J., Messier, J.P. (1986). Motor, sympathetic and sensory innervation of rat skeletal muscles. *Brain Res.* 373:288-302.

Phillips, W.D., Kopta, C., Blount, P., Gardner, P.D., Steinbach, J.H., Merlie, J.P. (1991). ACh receptor-rich membrane domains organized in fibroblasts by recombinant 43-kilodalton protein. *Science.* 251(4993):568-70.

Phillips, W.D., Noakes, P.G., Roberds, S.L., Campbell, K.P., Merlie, J.P. (1993). Clustering and immobilization of acetylcholine receptors by the 43-kD protein: a possible role for dystrophin-related protein. *J Cell Biol.* 123(3):729-40.

Phillips, W.D., Vladeta, D., Han, H., Noakes, P.G. (1997). Rapsyn and agrin slow the metabolic degradation of the acetylcholine receptor. *Mol Cell Neurosci.* 10(1-2):16-26.

Pickering, M. and Jones James, F.X. (2002). The diaphragm: two physiological muscles in one. *J. Anat.* 201:305-312.

Pitts, E.V., Potluri, S., Hess, D.M., Balice-Gordon, R.J. (2006). Neurotrophin and Trk-mediated signaling in the neuromuscular system. *Int Anesthesiol Clin.* 44(2):21-76. Review.

Redfern, P.A. (1970). Neuromuscular transmission in new-born rats. *J.Physio.* 209:701-9.

- Ribchester, R.R. and Barry, J.A. (1994). Spatial versus consumptive competition at polyneuronally innervated neuromuscular junctions. *Exp Physiol.* 79(4):465-94. Review.
- Rich, M. and Lichtman, J.W. (1989). Motor nerve terminal loss from degenerating muscle fibers. *Neuron.* 3(6):677-88.
- Richter, E.A., Cleland, P.J., Rattigan, S., Clark, M.G. (1987). Contraction-associated translocation of protein kinase C in rat skeletal muscle. *FEBS Lett.* 217(2):232-6.
- Ridge, R.M. and Betz, W.J. (1984). The effect of selective, chronic stimulation on motor unit size in developing rat muscle. *J Neurosci.* 4(10):2614-20.
- Rimer, M., Cohen, I., Lomo, T., Burden, S.J., McMahan, U.J. (1998). Neuregulins and erbB receptors at neuromuscular junctions and at agrin-induced postsynaptic like apparatus in skeletal muscle. *Mol. Cell. Neurosci.* 12:1-15.
- Roberts, R.E. and McLean, W.G. (1997). Protein kinase C isozyme expression in sciatic nerves and spinal cords of experimentally diabetic rats. *Brain Res.* 754(1-2):147-56.
- Robitaille, R., Garcia, M.L., Kaczorowski, G.J., Charlton, M.P. (1993). Functional colocalization of calcium and calcium-gated potassium channels in control of neurotransmitter release. *Neuron.* 11:645-55.
- Robitaille, R. (1995). Purinergic receptors and their activation by endogenous purines at perisynaptic glial cells of the frog neuromuscular junction. *J Neurosci.* 15(11):7121-31.
- Robitaille, R., Bourque, M.J., Vandaele, S. (1996). Localization of L-type Ca²⁺ channels at perisynaptic glial cells of the frog neuromuscular junction. *J Neurosci.* 16(1):148-58.
- Robitaille, R., Jahromi, B.S., Charlton, M.P. (1997). Muscarinic Calcium responses resistant to muscarinic antagonists at presynaptic Schwann cells of the frog neuromuscular junction. *J. Physiol.* 504:337-347.
- Ron, D., Chen, C.H., Caldwell, J., Jamieson, L., Orr, E., Mochly-Rosen, D. (1994). Cloning of an intracellular receptor for protein kinase C: a homolog of the beta subunit of G proteins. *Proc Natl Acad Sci USA.* 91(3):839-43.
- Ron, D. and Kazanietz, M.G. (1999). New insights into the regulation of protein kinase C and novel phorbol ester receptors. *FASEB J.* 13(13):1658-76. Review.
- Rose AJ, Michell BJ, Kemp BE, Hargreaves M. (2004). Effect of exercise on protein kinase C activity and localization in human skeletal muscle. *J Physiol.* 561(3):861-70.

Ross, A., Rapuano, M., Prives, J. (1988). Induction of phosphorylation and cell surface redistribution of acetylcholine receptors by phorbol ester and carbamylcholine in cultured chick muscle cells. *J Cell Biol.* 107(3):1139-45.

Roux, P.P. and Barker, P.A. (2002). Neurotrophin signaling through the p75 neurotrophin receptor. *Prog Neurobiol.* 67(3):203-33. Review.

Rubin, C.S. (1994). A kinase anchor proteins and the intracellular targeting of signals carried by cyclic AMP. *Biochim. Biophys. Acta.* 1224:467-79.

Ruegg, M.A., Tsim, K.W., Horton, S.E., Kröger, S., Escher, G., Gensch, E.M., McMahan, U.J. (1992). The agrin gene codes for a family of basal lamina proteins that differ in function and distribution. *Neuron.* 8(4):691-9.

Sabaté M. (2006). Tesi doctoral. Estudi fisiopatològic de l'acció d'anticossos IgM anti-GM2 d'un pacient sobre la unió neuromuscular. Universitat Rovira i Virgili.

Safran, A., Neumann, D., Fuchs, S. (1986). Analysis of acetylcholine receptor phosphorylation sites using antibodies to synthetic peptides and monoclonal antibodies. *EMBO J.* 5(12):3175-8.

Safran, A., Sagi-Eisenberg, R., Neumann, D., Fuchs, S. (1987). Phosphorylation of the acetylcholine receptor by protein kinase C and identification of the phosphorylation site within the receptor delta subunit. *J Biol Chem.* 262(22):10506-10.

Safran, A., Provenzano, C., Sagi-Eisenberg, R., Fuchs, S. (1990). Phosphorylation of membrane-bound acetylcholine receptor by protein kinase C: characterization and subunit specificity. *Biochemistry.* 29(28):6730-4.

Saito, K., Ito, E., Takakwa, Y., Tamura, M., Kinjo, M. (2003). In situ observation of mobility and anchoring of PKCbeta1 in plasma membrane. *FEBS Lett.* 541(1-3):126-31.

Salón I. (2004). Tesi doctoral. Participació dels receptors muscarínics presinàptics (mAChRs) en l'eliminació de les connexions sinàptiques redundants durant el desenvolupament neuromuscular. Universitat Rovira i Virgili.

Salpeter, M.M. and Loring, R.H. (1985). Nicotinic acetylcholine receptors in vertebrate muscles: properties, distribution and neural control. *Progr. Neurobiol.* 25:297-325.

Salpeter, M.M., Marchaterre, M., Herris, R. (1988). Distribution of extrajunctional acetylcholine receptors on a vertebrate muscle: evaluated by using a scanning electron microscope autoradiographic procedure. *J. Cell Biol.* 106:2087-93.

Salvatori, S., Furlan, S., Millikin, B., Sabbadini, R., Betto, R., Margreth, A., Salviati, G. (1993). Localization of protein kinase C in skeletal muscle T-tubule membranes. *Biochem Biophys Res Commun.* 196(3):1073-80.

Sanes, J.R., Engvall, E., Butkowski, R., Hunter, D.D. (1990). Molecular heterogeneity of basal laminae: isoforms of laminin and collagen IV at the neuromuscular junction and elsewhere. *J Cell Biol.* 111(4):1685-99.

Sanes, J.R. and Lichtman, J.W. (1999). Development of the vertebrate neuromuscular junction. *Annu Rev Neurosci.* 22:389-442. Review.

Sanes, J.R., and Lichtman, J.W. (2001). Induction, assembly, maturation and maintenance of a postsynaptic apparatus. *Nat Rev Neurosci.* 2(11):791-805.

Santafé MM. (1993). Tesi doctoral. Cambios plásticos de adaptación ultraestructural de las conexiones nerviosas motoras en el adulto, en respuesta a un incremento fisiológico de actividad. Universitat Rovira i Virgili

Santafé, M.M., Garcia, N., Lanuza, M.A., Uchitel, O.D., Tomás, J. (2001). Calcium channels coupled to neurotransmitter release at dually innervated neuromuscular junctions in the newborn rat. *Neuroscience.* 102(3):697-708.

Santafé, M.M., Garcia, N., Lanuza, M.A., Uchitel, O.D., Salon, I., Tomàs, J. (2002). Decreased calcium influx into the neonatal rat motor nerve terminals can recruit additional neuromuscular junctions during the synapse elimination period. *Neuroscience.* 110(1):147-54.

Santafé, M.M., Salon, I., Garcia, N., Lanuza, M.A., Uchitel, O.D., Tomàs, J. (2003). Modulation of ACh release by presynaptic muscarinic autoreceptors in the neuromuscular junction of the newborn and adult rat. *Eur J Neurosci.* 17(1):119-27.

Santafé, M.M., Salon, I., Garcia, N., Lanuza, M.A., Uchitel, O.D., Tomàs, J. (2004). Muscarinic autoreceptors related with calcium channels in the strong and weak inputs at polyinnervated developing rat neuromuscular junctions. *Neuroscience.* 123(1):61-73.

Santafé, M.M., Lanuza, M.A., Garcia, N., Tomàs, J. (2005). Calcium inflow-dependent protein kinase C activity is involved in the modulation of transmitter release in the neuromuscular junction of the adult rat. *Synapse.* 57(2):76-84.

Santafé, M.M., Lanuza, M.A., Garcia, N., Tomàs, J. (2006). Muscarinic autoreceptors modulate transmitter release through protein kinase C and protein kinase A in the rat motor nerve terminal. *Eur J Neurosci.* 23(8):2048-56.

Santafé, M.M., Garcia, N., Lanuza, M.A., Tomàs, J. (2007a). Protein kinase C activity affects neurotransmitter release at polyinnervated neuromuscular synapses. *J Neurosci Res.* 85(7):1449-57.

Santafé, M.M., Lanuza, M.A., Garcia, N., Tomàs, M., Tomàs, J. (2007b). Coupling of presynaptic muscarinic autoreceptors to serine kinases in low and high release conditions on the rat motor nerve terminal. *Neuroscience.* 148(2):432-40.

Santafé, M.M., Garcia, N., Lanuza, M.A., Tomàs, M., Tomàs, J. (2009a). Interaction between protein kinase C and protein kinase A can modulate transmitter release at the rat neuromuscular synapse. *J Neurosci Res.* 87(3):683-90.

Santafé, M.M., Garcia, N., Lanuza, M.A., Tomàs, M., Besalduch, N., Tomàs, J. (2009b). Presynaptic muscarinic receptors, calcium channels, and protein kinase C modulate the functional disconnection of weak inputs at polyinnervated neonatal neuromuscular synapses. *J Neurosci Res.* 87(5):1195-1206.

Sardari, S., Pourmorad, F., Tiemoa, A., Nam, N.H., K., Parang. (2003). Protein kinases and their modulation in the central nervous system. *Curr Medicinal Chemistry.* 3(4):341-364.

Schlamp, C.L. and Williams, D.S. (1996). Myosin V in the retina: localization in the rod photoreceptor synapse. *Exp Eye Res.* 63:613-619.

Schmalz, D., Kalkbrenner, F., Hucho, F., Buchner, K. (1996). Transport of protein kinase C alpha into the nucleus requires intact cytoskeleton while the transport of a protein containing a canonical nuclear localization signal does not. *J Cell Sci.* 109(9):2401-6.

Scott, J.D. and McCartney, S. (1994). Localization of A-kinase through anchoring proteins. *Mol Endocrinol.* 8(1):5-11.

Scott, L.J., Bacou, F., Sanes, J.R. (1988). A synapse-specific carbohydrate at the neuromuscular junction: association with both acetylcholinesterase and glycolipid. *J. Neurosci.* 8:932-44.

Schroder, H.D. (1980). Organization of the motoneurons innervating the pelvic muscles of the male rat. *J. Comp. Neurol.* 192:567-87.

Sealock, R., Wray, B.E., Froehner, S.C. (1984). Ultrastructural localization of the Mr 43000 protein and the acetylcholine receptor in Torpedo postsynaptic membranes using monoclonal antibodies. *J.Cell Biol.* 98:2239-44 .

Si, J., Luo, Z., Mei, L. (1996). Induction of acetylcholine receptor gene expression by ARIA requires activation of mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem.* 271(33):19752-9.

Si, J. and Mei, L. (1999). ERK MAP kinase activation is required for acetylcholine receptor inducing activity-induced increase in all five acetylcholine receptor subunit mRNAs as well as synapse-specific expression of acetylcholine receptor epsilon-transgene. *Brain Res Mol Brain Res.* 67(1):18-27.

Sieck, G.C. and Prakash, Y.S. (1997). Morphological adaptations of neuromuscular junctions depend on fiber type. *Can J Appl Physiol.* 22(3):197-230.

Skálhegg, B.S. and Taskén, K. (1997). Specificity in the cAMP/PKA signaling pathway. differential expression, regulation, and subcellular localization of subunits of PKA. *Front Biosci.* 2:331-42. Review.

Slater, C.R. (1982a). Postnatal maturation of nerve-muscle junctions in hindlimb muscles of the mouse. *Dev Biol.* 94(1):11-22.

Slater, C.R. (1982b). Neural influence on the postnatal changes in acetylcholine receptor distribution at nerve-muscle junctions in the mouse. *Dev Biol.* 94(1):23-30.

Slater, C.R., Lyons, P.R., Walls, T.J., Fawcett, P.R., Young, C. (1992) Structure and function of neuromuscular junctions in the vastus lateralis of man. A motor point biopsy study of two groups of patients. *Brain.* 115(2):451-478.

Slutsky, I., Parnas, H., Parnas, I. (1999). Presynaptic effects of muscarine on ACh release at the frog neuromuscular junction. *J Physiol.* 514(3):769-82.

Smith, C.L., Mittaud, P., Prescott, E.D., Fuhrer, C., Burden, S.J. (2001). Src, Fyn, and Yes are not required for neuromuscular synapse formation but are necessary for stabilization of agrin-induced clusters of acetylcholine receptors. *J Neurosci.* 21(9):3151-60.

Son, Y.J., Patton, B.L., Sanes, J.R. (1999). Induction of presynaptic differentiation in cultured neurons by extracellular matrix components. *Eur J Neurosci.* 11(10):3457-67.

Son, Y.J. and Thompson, W.J. (1995). Schwann cell processes guide regeneration of peripheral axons. *Neuron.* 14:125-132.

Song, W.J., Tkatch, T., Surmeier, D.J. (2000). Adenosine receptor expression and modulation of Ca²⁺ channels in rat striatal cholinergic interneurons. *J Neurophysiol.* 83(1):322-32.

Souroujon, M.C., Neumann, D., Pizzighella, S., Fridkin, M., Fuchs, S. (1986). Mapping of the cAMP-dependent phosphorylation sites on the acetylcholine receptor. *EMBO J.* 5(3):543-6.

Steinbach, J.H. (1981). Developmental changes in acetylcholine aggregates at nerve-muscle junctions in the mouse. *Dev. Biol.* 94:23-30.

Sudhof, T.C. (1995). The synaptic vesicle cycle: a cascade of protein-protein. *Nature.* 375:645-53.

Sugiura, Y., Woppmann, A., Miljanich, G.P., Ko, C.P. (1995). A novel ω -conopeptide for the presynaptic localization of calcium channels at the mammalian neuromuscular junction. *J.Neurocytol.* 24:15-27.

Sun, Z., Arendt, C., Ellmeier, W., Schaeffer, E., Sunshine, M., Gandhi, L., Annes, J., Petrzilka, D., Kupfer, A., Schwartzberg, P., Littman, D. (2000). PKC-theta is required for TCR-induced NF-kappaB activation in mature but not immature T lymphocytes. *Nature.* 404:402-407.

Suzuki, N., Yokoyama, F., Nomizu, M. (2005). Functional sites in the laminin alpha chains. *Connect Tissue Res.* 46(3):142-52. Review.

Swope, S.L., Moss, S.J., Raymond, L.A., Haganir, R.L. (1999). Regulation of ligand-gated ion channels by protein phosphorylation. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res.* 33:49-78. Review.

Tanaka, C. and Nishizuka, Y. (1994). The protein kinase C family for neuronal signaling. *Annu Rev Neurosci.* 17:551-67. Review.

Tansey, M.G., Chu, G.C., Merlie, J.P. (1996). ARIA/HRG regulates AChR epsilon subunit gene expression at the neuromuscular synapse via activation of phosphatidylinositol 3-kinase and Ras/MAPK pathway. *J Cell Biol.* 134(2):465-76.

Tasaki, I. (1959). Conduction of nerve impulse. *Handbook of physiology.* Section 1, Vol 1, Chap. III. J. Field (Ed). pp 75-121. American Physiological Society: Bethesda MD.

Taylor, S.S. and Radzio-Andzelm, E. (1994). Three protein kinase structures define a common motif. *Structure.* 2(5):345-55. Review.

Thompson, W., Kuffler, D.P., Jansen, J.K.S. (1979). The effects of prolonged, reversible block of nerve impulses on the elimination of polyneuronal innervation of new-born rat skeletal muscle fibers. *Neurosci.* 4:271-281.

Thompson, W.J. (1983). Lack of segmental selectivity in elimination of synapses from soleus muscle of new-born rats. *J Physiol.* 335:343-52.

Thompson, W.J. (1985). Activity and synapse elimination at the neuromuscular junction. *Cell Mol Neurobiol.* 5(1-2):167-82.

Tokuyasu, K.T. (1973). A technique for ultracryotomy of cell suspensions and tissues. *J Cell Biol.* 57:551-565.

Tokuyasu, K.T. (1980). Immunocytochemistry on ultrathin frozen sections. *Histochem J.* 12(4):381-403.

Tomàs, J., Lanuza, M.A., Santafé, M., Fenoll-Brunet, M.R., Garcia, N. (2000). Topological differences along mammalian motor nerve terminals for spontaneous and alpha-bungarotoxin-induced sprouting. *Histol. Histopathol.* 15:43-52.

Trachtenberg, J.T. and Thompson, W.J. (1997). Nerve terminal withdrawal from rat neuromuscular junctions induced by neuregulin and Schwann cells. *J. Neurosci.* 17:6243-55.

Trinidad, J.C., Fischbach, G.D., Cohen, J.B. (2000). The agrin/MuSK signalling pathway is spatially segregated from the neuregulin/ErbB receptor signaling pathway at the neuromuscular junction. *J Neurosci.* 20:8762-70.

Tsuruno, S. and Hirano, T. (2007). Persistent activation of protein kinase C α is not necessary for expression of cerebellar long-term depression. *Mol Cell Neurosci.* 35(1):38-48.

Van Essen, D.C., Gordon, H., Soha, J.M., Fraser, S.E. (1990). Synaptic dynamics at the neuromuscular junction: mechanisms and models. *J Neurobiol.* 21(1):223-49. Review.

Van Ginneken, M.M., Keizer, H.A., Wijnberg, I.D., Van Dam, K.G., Schaart, G., de Graaf-Roelfsema, E., Van der Kolk, J.H., van Breda, E. (2004). Immunohistochemical identification and fiber type specific localization of protein kinase C isoforms in equine skeletal muscle. *Am J Vet Res.* 65(1):69-73.

Vary, T.C., Goodman, S., Kilpatrick, L.E., Lynch, C.J. (2005). Nutrient regulation of PKC ϵ is mediated by leucine, not insulin, in skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 289(4):684-94.

Wallace, B.G. (1988). Regulation of agrin-induced acetylcholine receptor aggregation by Ca⁺⁺ and phorbol ester. *J Cell Biol.* 107(1):267-78.

Wallace, B.G., Qu, Z., Haganir, R.L. (1991). Agrin induces phosphorylation of the nicotinic acetylcholine receptor. *Neuron.* 6(6):869-78.

Walsh, M.K. and Lichtman, J.W. (2003). In vivo time-lapse imaging of synaptic takeover associated with naturally occurring synapse elimination. *Neuron.* 37(1):67-73.

Wang, Z.Z., Mathias, A., Gautam, M., Hall, Z.W. (1999). Metabolic stabilization of muscle nicotinic acetylcholine receptor by rapsyn. *J Neurosci.* 19(6):1998-2007.

Weeks, O.I. and English, A.W. (1985). Compartmentalization of the cat lateral gastrocnemius motor nucleus. *J. Comp. Neurol.* 235:255-67.

Wessler, I., Karl, M., Mai, M., Diener, A. (1987). Muscarine receptors on the rat phrenic nerve, evidence for positive and negative muscarinic feedback mechanisms. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 335(6):605-12.

West, J.W., Numann, R., Murphy, B.J., Scheuer, T., Catterall, W.A. (1991). A phosphorylation site in the Na⁺ channel required for modulation by protein kinase C. *Science.* 254(5033):866-8.

Weston, C., Gordon, C., Teressa, G., Hod, E., Ren, X.D., Prives, J. (2003). Cooperative regulation by Rac and Rho of agrin-induced acetylcholine receptor clustering in muscle cells. *J Biol Chem.* 278(8):6450-5.

Wood, S.J. and Slater, C.R. (1997). The contribution of postsynaptic folds to the safety factor for neuromuscular transmission in rat fast- and Slow-twitch muscles. *J.Physiol.* 500:165-76.

Wood, S.J. and Slater, C.R. (1998). Beta-spectrin is colocalized with both voltage-gated sodium channels and ankyrin (g) at the adult rat neuromuscular junction. *J Cell Biol.* 140:675-84.

Yee, W.C., Pertronk, A., Alderson, K., Yuan, C.M. (1988). Regional heterogeneity in the distal motor axon: three zones with distinctive intrinsic components. *J. Neurocytol.* 17:649-56.

Zhang, B., Luo, S., Dong, X.P., Zhang, X., Liu, C., Luo, Z., Xiong, W.C., Mei, L. (2007). Beta-catenin regulates acetylcholine receptor clustering in muscle cells through interaction with rapsyn. *J Neurosci.* 27(15):3968-73.

Zhang, B., Luo, S., Wang, Q., Suzuki, T., Xiong, W.C., Mei, L. (2008). LRP4 serves as a coreceptor of agrin. *Neuron.* 60(2):285-97.

Zhu, X., Lai, C., Thomas, S., Burden, S.J. (1995). Neuregulin receptors, erbB3 and erbB4 are localized at neuromuscular synapses. *EMBO J.* 14:5842-48.

Zimmermann, B., Chiorini, J.A., Ma, Y., Kotin, R.M., Herberg, F.W. (1999). PrKX is a novel catalytic subunit of the cAMP-dependent protein kinase regulated by the regulatory subunit type I. *J Biol Chem.* 274(9):5370-8.

Zippel, R., Baldassa, S., Sturani, E. Chapter 12; Mature neurons: Signal transduction-serine/threonine kinases. *Molecular Biology of the Neuron*. Second Edition. Oxford University Press

Zoubine, M.N., Ma, J.Y., Smirnova, I.V., Citron, B.A., Festoff, B.W. (1996). A molecular mechanism for synapse elimination: novel inhibition of locally generated thrombin delays synapse loss in neonatal mouse muscle. *Dev Biol*. 179(2):447-57.

Zucker, R.S. (1996). Exocytosis: a molecular and physiological perspective. *Neuron*. (6):1049-55. Review.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

SERINA/TREONINA QUINASES A LA SINAPSI NEUROMUSCULAR: ESPECIALITZACIÓ DE LES ISOFORMES
DE LA PROTEÏNA QUINASA C

Núria Montserrat Besalduch Canes

ISBN:978-84-692-3232-3/DL:T-939-2009

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
SERINA/TREONINA QUINASES A LA SINAPSI NEUROMUSCULAR: ESPECIALITZACIÓ DE LES ISOFORMES
DE LA PROTEÏNA QUINASA C
Núria Montserrat Besalduch Canes
ISBN:978-84-692-3232-3/DL:T-939-2009

APORTACIONS CIENTÍFIQUES

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

SERINA/TREONINA QUINASES A LA SINAPSI NEUROMUSCULAR: ESPECIALITZACIÓ DE LES ISOFORMES
DE LA PROTEÏNA QUINASA C

Núria Montserrat Besalduch Canes

ISBN:978-84-692-3232-3/DL:T-939-2009

Del treball realitzat durant aquesta tesi s'han presentat 16 comunicacions a congressos nacionals i internacionals i s'han escrit diferents articles:

Articles científics:

- Garcia, N., Lanuza, M.A., Besalduch, N., Santafé, M.M., Jeromin, A., Tomàs, J. (2005). Localization of neuronal calcium sensor-1 at the adult and developing rat neuromuscular junction. J Neurosci Res. 82(1):1-9. PMID:16088942
- Lanuza, M.A., Gizaw, R., Vilorio, A., González, C.M., Besalduch, N., Dunlap, V., Tomàs, J., Nelson, P.G. (2006). Phosphorylation of the nicotinic acetylcholine receptor in myotube cholinergic neuron cocultures. J Neurosci Res. 83(8):1407-14. PMID:16555299
- Lanuza, M.A., Besalduch, N., Garcia, N., Sabaté, M., Santafé, M.M., Tomàs, J. (2007). Plastic-embedded semithin cross-sections as a tool for high-resolution immunofluorescence analysis of the neuromuscular junction molecules: Specific cellular location of protease-activated receptor-1. J Neurosci Res. 85(4):748-56. PMID: 17265467
- Santafé, M.M., Garcia, N., Lanuza, M.A., Tomàs, M., Besalduch, N., Tomàs J. (2009). Presynaptic muscarinic receptors, calcium channels, and protein kinase C modulate the functional disconnection of weak inputs at polyinnervated neonatal neuromuscular synapses. J Neurosci Res. 87(5):1195-1206. PMID: 19006081
- Besalduch, N., Tomàs, M., Santafé, M.M, Garcia, N., Tomàs, J., Lanuza, M.A. Synaptic activity-related classical-PKC isoforms localization in the adult rat neuromuscular synapse. Enviat al J. Comp. Neurol. en 1a revisió.
- Maria A. Lanuza, Núria Besalduch, Manel M. Santafé, Carmen Gonzalez, Neus Garcia, Marta Tomàs, Josep Tomàs. Abnormal phosphorylation of delta and epsilon subunits of the acetylcholine receptor coincides with delayed synapse elimination in the PKC theta knock-out mouse. En preparació per a enviar a la revista J. Neuroscience
- Maria A. Lanuza, Núria Besalduch, Manel M. Santafé, Neus Garcia, Marta Tomàs, Josep Tomàs. Transmitter release in the neuromuscular synapse of the protein kinase C theta knock-out adult mouse. En preparació per a enviar a la revista J. Neurosci. Res.

Comunicacions a congressos:

- Besalduch, N., Garcia, N., Lanuza, M.A, Santafé, M.M., Jeromin, A., Tomàs, J. “Localización en el terminal nervioso del sensor neural de calcio (NCS-1) en la unión neuromuscular de rata neonata y adulta”. XI Congreso de la Sociedad Española de Neurociencia (SENC). Torremolinos (Málaga) Setembre 2005. Comunicació tipus Pòster.
- Lanuza, M.A, Besalduch, N., Garcia, N., Santafé, M., Guarque, A., Tomàs, J. “PKA and PKC localization at the neuromuscular rat junction”. 5th Forum of European Neuroscience. FENS. Viena (Austria), Juliol 2006. Comunicació tipus Pòster.
- Besalduch, N., Sabaté, M., Lanuza, M.A, Garcia, N., Santafé, M., Tomàs, J. “Specific subcellular location of PAR-1 at the NMJ using a plastic embedded semithin cross-sections, a high resolution procedure”. 5th Forum of European Neuroscience. FENS. Viena (Austria), Juliol 2006. Comunicació tipus Pòster.
- Besalduch, N., Garcia, N., Sabaté, M., Santafé, M., Guarque, A., Bautista, A., Lanuza, M.A, Tomàs, J. “Localització de PKA i PKC en la unió neuromuscular de rata adulta”. VI Simposi de Neurobiologia Experimental. Barcelona, Novembre 2006. Comunicació tipus Pòster.
- Besalduch, N., Sabaté, M., Garcia, N., Santafé, M., Lanuza, M.A, Tomàs J. “Localització específica de PAR-1 en la unió neuromuscular utilitzant seccions semifines, un procés d’alta resolució”. VI Simposi de Neurobiologia Experimental. Barcelona, Novembre 2006. Comunicació tipus Pòster.
- Guarque, A., Lanuza, M.A., Besalduch, N., Garcia, N., Santafé, M.M, Tomas, J. “Protein kinase A and C localization at the adult rat neuromuscular junction” International medical students research congress IMSRC 2007. Istanbul 11-13 May 2007. Comunicació tipus Pòster.
- Besalduch, N., Tomàs, M., Santafé, M.M., Sabaté, M., Garcia, N., Lanuza, M.A., Tomàs, J. “Las isoformas de la proteína quinasa C en la modulación de la liberación del neurotransmisor a través de los autoreceptores muscarínicos en los terminales nerviosos motores de rata”. XII Congreso de la Sociedad Española de Neurociencias. Valencia, 5-9 Septiembre 2007. Comunicació tipus Pòster.

- Besalduch, N., Garcia, N., Santafé, M., Lanuza, M.A., Tomas, J. "Location of molecules at the neuromuscular junction by means of the análisis of immunofluorescence semithin cross sections embedded in resin of plastic". XIV Congreso Nacional de la Sociedad Española de Histología e Ingeniería Tisular. VIII Reunión de la Sociedad Andaluza de Histología Médica. II International Congress of Histology and Tissue Engineering. Córdoba, 8-13 Septiembre 2007. Comunicació Oral.
- Lanuza, M.A., Garcia, N., Santafé, M., Besalduch, N., Gonzalez, C., Tomas, J.. "Cambios pre- y postsinápticos durante el proceso postnatal de eliminación sináptica. Moléculas y reacciones de fosforilación implicadas". XXX Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular. Reunión de Bioquímica Perinatal. Málaga, 12-15 Septiembre, 2007. Comunicació Oral; Ponència invitada.
- Lanuza, M.A., Besalduch, N., Tomàs, M., Santafé, M.M., Sabaté, M., Garcia, N., Nelson, P.G., Tomàs, J. "Protein Kinase C in the modulation of the transmitter release through muscarinic autoreceptors in the rat motor nerve terminals". Neuroscience 2007. San Diego, California. USA. Novembre 2007. Comunicació tipus Pòster.
- Lanuza, M., Besalduch, N., Garcia, N., Santafé, M.M., Tomàs, M., Ortiz, N., Tomàs, J. "Postnatal neuromuscular synapse maturation in protein kinase C theta knock-out mice". 6th Forum of European Neuroscience. Ginebra 12-16 July 2008. Comunicació tipus Pòster.
- Besalduch, N., Tomàs, M., Santafé, M.M., Garcia, N., Ortiz, N., Lanuza, M., Tomàs J. "Activation of classical-protein kinase C isozymes in the presynaptic activity-dependent muscarinic mechanism of ACh release modulation". 6th Forum of European Neuroscience. Ginebra 12-16 July 2008. Comunicació tipus Pòster.
- Tomàs, M., Santafé, M.M., Lanuza, M., Ortiz, N., Besalduch, N., Garcia, N., Tomàs, J. "Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) involvement in the functional elimination of redundant synaptic contacts at polyinnervated neuromuscular synapses during development". 6th Forum of European Neuroscience. Ginebra 12-16 July 2008. Comunicació tipus Pòster.
- Besalduch, N., Tomàs, M., Santafé, M., Garcia, N., Ortiz, N., Lanuza, M.A., Tomàs, J. "Activació de les isoformes clàssiques de la proteïna quinasa C (cPKC) en el mecanisme, muscarínic presinàptic activitat depenent, de la modulació de l'alliberament d'ACh.". VII Simposio de Neurobiología experimental. Societat Catalana de Biologia. Barcelona. 28-29 Octubre, 2008. Comunicació tipus Pòster.

Aportacions científiques

- Lanuza, M., Besalduch, N., González, C., Garcia, N., Santafé, M.M., Tomàs, M., Ortiz, N. Tomàs J. "Maduració de la unió neuromuscular postnatal en ratolins deficients en la proteïna quinasa C theta." VII Simposi de Neurobiologia experimental. Societat Catalana de Biologia. Barcelona. 28-29 Octubre, 2008. Comunicació tipus Pòster.

- Tomàs, M., Santafé, M.M., Lanuza, M., Ortiz, N., Besalduch, N., Garcia, N., Tomàs J. "Implicació del Brain derived neurotrophic factor (BDNF) en l'eliminació funcional de contactes sinàptics redundants en la sinapsi neuromuscular poliinnervada durant el desenvolupament" VII Simposi de Neurobiologia experimental. Societat Catalana de Biologia. Barcelona. 28-29 Octubre, 2008. Comunicació tipus Pòster.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

SERINA/TREONINA QUINASES A LA SINAPSI NEUROMUSCULAR: ESPECIALITZACIÓ DE LES ISOFORMES
DE LA PROTEÏNA QUINASA C

Núria Montserrat Besalduch Canes

ISBN:978-84-692-3232-3/DL:T-939-2009

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

SERINA/TREONINA QUINASES A LA SINAPSI NEUROMUSCULAR: ESPECIALITZACIÓ DE LES ISOFORMES
DE LA PROTEÏNA QUINASA C

Núria Montserrat Besalduch Canes

ISBN:978-84-692-3232-3/DL:T-939-2009