



LA PROTEÍNA QUINASA C ÉPSILON EN LA UNIÓN NEUROMUSCULAR DE MAMÍFERO ADULTO: LOCALIZACIÓN, REGULACIÓN MEDIANTE ACTIVIDAD SINÁPTICA Y ACOPLAMIENTO A LA LIBERACIÓN DE ACETILCOLINA

Teresa Obis Ibáñez

Dipòsit Legal: T 1609-2015

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

WARNING. Access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

LA PROTEÍNA QUINASA C ÉPSILON EN LA UNIÓN NEUROMUSCULAR DE MAMÍFERO ADULTO: LOCALIZACIÓN,
REGULACIÓN MEDIANTE ACTIVIDAD SINÁPTICA Y ACOPLAMIENTO A LA LIBERACIÓN DE ACETILCOLINA.

Teresa Obis Ibáñez

Dipòsit Legal: T 1609-2015

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

LA PROTEÍNA QUINASA C ÉPSILON EN LA UNIÓN NEUROMUSCULAR DE MAMÍFERO ADULTO: LOCALIZACIÓN,
REGULACIÓN MEDIANTE ACTIVIDAD SINÁPTICA Y ACOPLAMIENTO A LA LIBERACIÓN DE ACETILCOLINA.

Teresa Obis Ibáñez

Dipòsit Legal: T 1609-2015

Teresa Obis Ibáñez

**La proteína quinasa C épsilon en la unión
neuromuscular de mamífero adulto:
Localización, regulación mediante actividad
sináptica y acoplamiento a la liberación de
acetilcolina**

TESIS DOCTORAL

Dirigida por :

Dr. Manel M. Santafé

Dra. Maria Angel Lanuza Escolano

Dr. Josep M. Tomàs

Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques

Unitat d'Histologia i Neurobiologia



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Reus, 2014

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

LA PROTEÍNA QUINASA C ÉPSILON EN LA UNIÓN NEUROMUSCULAR DE MAMÍFERO ADULTO: LOCALIZACIÓN,
REGULACIÓN MEDIANTE ACTIVIDAD SINÁPTICA Y ACOPLAMIENTO A LA LIBERACIÓN DE ACETILCOLINA.

Teresa Obis Ibáñez

Dipòsit Legal: T 1609-2015

Manel Santafé Martínez, profesor titular del Departamento de Ciencias Médicas Básicas de la Universidad Rovira i Virgili.

Maria Angel Lanuza Escolano, profesora titular del Departamento de Ciencias Médicas Básicas de la Universidad Rovira i Virgili.

Josep M. Tomàs Ferré, catedrático del Departamento de Ciencias Médicas Básicas de la Universidad Rovira i Virgili.

HAGO CONSTAR QUE el presente trabajo, titulado “La proteína quinasa C épsilon en la unión neuromuscular de mamífero adulto: Localización, regulación mediante actividad sináptica y acoplamiento a la liberación de acetilcolina”, que presenta Teresa Obis Ibáñez para la obtención del título de Doctora, ha sido realizado bajo mi dirección en el Departamento de Ciencias Médicas Básicas de esta Universidad y que cumple los requisitos para poder optar a la Mención Internacional.

Reus, de de 2014

Los codirectores de la tesis doctoral

Dr. Manel Santafé Martínez Dra. Maria Angel Lanuza Escolano Dr. Josep M. Tomàs Ferré

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

LA PROTEÍNA QUINASA C ÉPSILON EN LA UNIÓN NEUROMUSCULAR DE MAMÍFERO ADULTO: LOCALIZACIÓN,
REGULACIÓN MEDIANTE ACTIVIDAD SINÁPTICA Y ACOPLAMIENTO A LA LIBERACIÓN DE ACETILCOLINA.

Teresa Obis Ibáñez

Dipòsit Legal: T 1609-2015

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

LA PROTEÍNA QUINASA C ÉPSILON EN LA UNIÓN NEUROMUSCULAR DE MAMÍFERO ADULTO: LOCALIZACIÓN,
REGULACIÓN MEDIANTE ACTIVIDAD SINÁPTICA Y ACOPLAMIENTO A LA LIBERACIÓN DE ACETILCOLINA.

Teresa Obis Ibáñez

Dipòsit Legal: T 1609-2015

A Amalia y Javier

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

LA PROTEÍNA QUINASA C ÉPSILON EN LA UNIÓN NEUROMUSCULAR DE MAMÍFERO ADULTO: LOCALIZACIÓN,
REGULACIÓN MEDIANTE ACTIVIDAD SINÁPTICA Y ACOPLAMIENTO A LA LIBERACIÓN DE ACETILCOLINA.

Teresa Obis Ibáñez

Dipòsit Legal: T 1609-2015

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar debo agradecer al Dr. Josep Tomàs por recibirme en su laboratorio, guiarme durante el desarrollo de este trabajo, y haber confiado en mí.

Al Dr. Manel Santafé y a la Dra. Maria Angel Lanuza, que me dieron la oportunidad de realizar esta tesis bajo su supervisión, por su ayuda en el desarrollo de este trabajo y a la Dra. Neus García, por sus ánimos y consejos.

A la Dra. Rosa Fenoll, por sus palabras siempre amables y al Dr. Nico Ortiz, por su visión crítica y constructiva de mis resultados.

I would like to thank to Professor Unrao Monani and his team at the Motor Neuron Center (Columbia University Medical Center, NY) for allowing me to spend five thrilling and inspiring months in his lab. Many thanks to Dr. Shingo Kariya for his teaching and support during and after my stay.

A mis predecesoras Núria y Marta, gracias por vuestra amistad y vuestra ayuda desinteresada. A Silvia, por tu ayuda y buena predisposición. A Merche, por compartir estos años de doctorado. A Nahir, Sira y Ares, por compartir conmigo horas de set up permitiéndome aprender un poquito de cada una. A mis compis de laboratorio más recientes y mosqueteras, Erica y Laura, por ser tan buenas compañeras y amigas.

A Tania, Marga, Keith, Núria, Daisy, Mónica, Laura, Nacho, Vane, por todos los momentos compartidos dentro y fuera de la facultad desde el inicio de esta etapa.

A mi imprescindible familia de becarios Random. A Martí, Pablo, Ivancho, Ingrid, Nohora, Jordi, Cintia, Pol, Fiona, Pla, Jose, Marta, Andrés y Fadia, por tantas risas y sobre todo por vuestro cariño y amistad incondicionales, que continuará creciendo. A Jordi, por apoyarme siempre con su habitual optimismo y leer parte de esta tesis. A Pablo, que me ha aportado tantas cosas que es difícil enumerarlas, por su amistad honesta y fácil. A Martí, el meu company de rutina, gràcies per crear amb mi el 'magic kingdom', un lloc molt especial, que portarem amb nosaltres al nostre proper destí.

Y fuera de la facultad, quiero agradecer en especial a Isabel, Rosita y Berna, por hacerme sentir como en casa con el 'rincón de la Obis' ambulante. Esta etapa de mi vida siempre irá especialmente ligada a vosotros. Javi y Teresa 'Talas', por vuestra amistad y por ser siempre tan acogedores conmigo. A mis compañeras de Máster, África y Nuria, gracias por seguir compartiendo vuestras vivencias conmigo.

A la familia maña, Wyl y Nacho, mis faemino y cansado particulares, a Jorgín, Susana, Alicia, Teto, Julio, Alfredo, Laura, Berta, Fafan, Sandra, Itzi, Amanda, Raquel, Rubén, César, Jorge, Carlota, Silvia, Yolanda, Chabi...gracias por dejarme contar con vosotros cuando vuelvo a casa. A los Avogadros: Bea, Armando, Raquel, Horten, Kike, Jaime y Teresa, gracias por nuestra amistad de tantos años y nuestros momentos superfreak!

En especial, a Ana, Eva y Libe, gracias por estar siempre a mi lado aunque estemos lejos, todo lo que hago necesito compartirlo con vosotras para que tenga algún valor. Y a la family Paula, David y Asier. Gracias por estar a mi lado.

Y en este tiempo, entraron en mi vida Marta, goddess, gracias por ser mi compi HTV y por compartir conmigo mil aventuras, Kevin, Bea, Mariana, Carlos, Estela, Cris, Javi, Carmen, Juan Carlos, Andrea, Carol... gracias por convertir mi estancia en Nueva York en una feliz etapa que solo quiero repetir.

A mis padres y hermanos, os agradezco especialmente vuestra confianza ciega en mí y vuestro apoyo incansable en todas mis decisiones, aunque a veces signifique estar lejos de vosotros. A María y Ángela, las dos mayores alegrías de estos años. A Ángel y Elena, por ser también mi familia.

ÍNDICES.....	Página
ÍNDICE DE FIGURAS.....	i
ÍNDICE DE TABLAS.....	iv
LISTA DE ABREVIATURAS	v
RESUMEN.....	3
ABSTRACT.....	7
Capítulo I. INTRODUCCIÓN	
1. LA UNIÓN NEUROMUSCULAR: MODELO EXPERIMENTAL DE SINAPSIS.....	11
1.1. Componentes de la unión neuromuscular.....	14
2. NEUROTRANSMISIÓN EN LA NMJ.....	21
2.1. Naturaleza cuántica de la liberación del neurotransmisor.....	22
2.2. Participación del Ca ²⁺ en el proceso de neurotransmisión.....	23
2.3. Plasticidad sináptica a corto plazo.....	24
3. LA FAMILIA PKC.....	28
3.1. La proteína quinasa C: introducción.....	28
3.2. Las isoformas de la familia PKC.....	29
3.3. Estructura de las isoformas de la familia PKC.....	31
3.4. Activación de PKC.....	33
3.5. Regulación de PKC: interacciones proteína-proteína.....	34
3.6. Modulación de la función de PKC: péptidos derivados del dominio de unión a RACK.....	38

4. LA FAMILIA PKC Y LA NEUROTRANSMISIÓN EN LA NMJ	43
5. LA FAMILIA PKC Y LOS PROCESOS SINÁPTICOS DE ACTIVIDAD-DEPENDENCIA: EL CASO DE LA SUBFAMILIA $cPKC$. 47	
6. LA ISOFORMA NOVEL $nPKC\epsilon$	49
6.1. Introducción.....	49
6.2. Distribución tisular de $nPKC\epsilon$	49
6.3. $nPKC\epsilon$ y las funciones presinápticas.....	50
6.4. Estructura y regulación de $nPKC\epsilon$	52
6.5. Proteínas de anclaje y chaperonas de $nPKC\epsilon$	55
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	59
Capítulo II. MATERIALES Y MÉTODOS	
1. ANIMALES	65
2. MODELOS MUSCULARES ESQUELÉTICOS.....	66
2.1. Levator auris longus.....	66
2.2. Diafragma.....	68
3. ELECTROFISIOLOGÍA.....	70
3.1. Técnica de electrofisiología de registro intracelular.....	71
3.2. Registro de la neurotransmisión en las células musculares.....	73
3.3. Registro de la actividad sináptica a 40 Hz.....	77
3.4. Parámetros evaluados en los experimentos funcionales.....	77
4. ESTIMULACIÓN DEL MÚSCULO ESQUELÉTICO PARA LOS ESTUDIOS BIOQUÍMICOS.	79

5.	TRATAMIENTOS.....	80
5.1.	Bloqueo de la contracción muscular.....	80
5.2.	Incubaciones con moduladores de la neurotransmisión.....	82
5.3.	Denervación del Extensor digitorum longus (EDL).....	85
6.	OBTENCIÓN Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS PARA LAS TÉCNICAS BIOQUÍMICAS	85
6.1.	Obtención de los homogenados de músculo esquelético.....	85
6.2.	Valoración de la concentración de proteínas.....	87
7.	WESTERN-BLOT	87
7.1.	Preparación de las muestras y electroforesis en SDS-PAGE.....	88
8.	INMUNOHISTOQUÍMICA CONVENCIONAL.....	93
9.	INMUNOHISTOQUÍMICA EN SECCIONES SEMIFINAS	95
10.	ESTADÍSTICA	97

Capítulo III. RESULTADOS

1.	nPKC ϵ EN LA NMJ ADULTA: EXPRESIÓN Y LOCALIZACIÓN	101
1.1.	nPKC ϵ se expresa en el músculo esquelético.....	101
1.2.	nPKC ϵ se expresa en la fracción de la membrana sináptica del músculo esquelético.....	103
1.3.	Localización de nPKC ϵ en la NMJ adulta.....	104
1.3.1.	Inmunolocalización.....	104
1.3.2.	Denervación del músculo esquelético.....	107

2. LA EXPRESIÓN DE nPKCϵ ESTÁ MODULADA POR LA ACTIVIDAD SINÁPTICA.....	108
2.1. nPKC ϵ disminuye gradualmente con el tiempo en la preparación ex vivo.....	109
2.2. nPKC ϵ disminuye en condiciones de estimulación del nervio en ausencia de contracción muscular.....	110
2.3. nPKC ϵ aumenta en condiciones de estimulación del nervio resultando en contracción muscular.....	113
2.4. La contracción muscular provoca cambios en la expresión de nPKC ϵ a través de la actividad de TrkB.....	115
3. ACTIVIDAD CATALÍTICA DE nPKCϵ: FOSFORILACIÓN DE MARCKS.....	117
3.1. pMARCKS se expresa en el músculo esquelético.....	117
3.2. La fosforilación de MARCKS depende de nPKC ϵ	119
3.3. pMARCKS aumenta en condiciones de estimulación del nervio.....	123
3.4. La contracción muscular aumenta la fosforilación de MARCKS.....	126
3.5. La contracción muscular aumenta la fosforilación de MARCKS a través TrkB.....	127
4. EXPERIMENTOS FUNCIONALES: LA ISOFORMA nPKCϵ EN LA NEUROTRANSMISIÓN EVOCADA EN LA NMJ ADULTA	129
4.1. Participación de nPKC ϵ en la liberación evocada de ACh.....	129
4.1.1. Efecto del bloqueo de específico de nPKC ϵ en la neurotransmisión evocada en condiciones basales.....	131
4.1.2. Efecto del bloqueo específico de nPKC ϵ en la neurotransmisión evocada en alto Ca ²⁺ extracelular y bajo estimulación eléctrica del nervio.....	133

4.1.3. Efecto del bloqueo específico de nPKC ϵ en la neurotransmisión evocada en condiciones de potenciación inducida por PMA.....	137
4.1.4 Participación de nPKC ϵ en la depresión sináptica a 40 Hz.....	139
4.2. Participación de nPKC ϵ en la modulación de la neurotransmisión mediante la interacción con PKA y M1/M2 (mAChRs).....	141
4.2.1. nPKC ϵ y la actividad de PKA.....	142
4.2.2. nPKC ϵ y la vía de señalización a través de mAChRs.....	146

Capítulo IV. DISCUSIÓN

1. nPKC ϵ : EXPRESIÓN Y LOCALIZACIÓN EN LA NMJ ADULTA.....	151
2. LA ACTIVIDAD SINÁPTICA MODULA LA EXPRESIÓN DE LA ISOFORMA nPKC ϵ A TRAVÉS DE TrkB EN LA NMJ ADULTA	153
2.1. Actividad sináptica, nPKC ϵ y pMARCKS.....	153
2.2. Efecto de la contracción inducida por la actividad sináptica sobre nPKC ϵ a través de TrkB.....	156
3. nPKC ϵ Y SU ACOPLAMIENTO A LA LIBERACIÓN DE ACETILCOLINA EN LA NMJ ADULTA.....	159
3.1. nPKC ϵ y el estímulo eléctrico.....	160
3.2. nPKC ϵ y los iones Ca ²⁺	161
3.3. nPKC ϵ y la estimulación de PKC con el éster de forbol PMA.....	162
3.4. nPKC ϵ y la actividad de PKA en la NMJ.....	163
3.5. nPKC ϵ y el acoplamiento de PKC a la neurotransmisión a través de la modulación de M1 y M2 (mAChRs).....	166

CONCLUSIONES	171
CONCLUSIONS.....	175
BIBLIOGRAFÍA/BIBLIOGRAPHY	179
SCIENTIFIC CONTRIBUTIONS.....	209

ÍNDICE DE FIGURAS	Página
Figura I1. Transmisión sináptica química	13
Figura I2. NJM en adulto	14
Figura. I3 Componentes de la NMJ en adulto	20
Figura I4. Estructura primaria de las isoformas de la familia PKC.....	32
Figura I5. Modelo que muestra el ciclo de vida de PKC, desde su biosíntesis a su degradación.....	37
Figura I6. Secuencia parcial del dominio $\epsilon V1$ de rata y <i>Aplysia californica</i> que contiene la secuencia $\epsilon V1-2$	40
Figura I7. Modelo de regulación peptídica de las interacciones proteína-proteína entre las isozimas PKC y sus proteínas de anclaje	42
Figura I8. Diagrama de la estructura primaria de nPKC ϵ	54
Figura M1. Situación anatómica del músculo LAL en una rata P8.....	67
Figura M2. Levator auris longus (LAL)	67
Figura M3. Esquema de la inervación del hemidiafragma	68
Figura M4. Imágenes de los músculos LAL y diafragma diseccionados	70
Figura M5. Cámara de registro.....	72
Figura M6. Equipo básico de electrofisiología de registro intracelular.....	73
Figura M7. Potencial de placa evocado (EPP, del inglés <i>evoked endplate potential</i>) ..	74
Figura M8. Ejemplos de potenciales de placa espontáneos (MEPPs, del inglés <i>miniature endplate potentials</i>)	76
Figura M9. Bloqueo de la contracción muscular	81
Figura M10. Relación dosis- respuesta del DMSO en la neurotransmisión	84
Figura M11. Dibujo del diafragma indicando el área inervada del músculo	86
Figura M12. Inmunofluorescencia de NMJs.....	96
Figura R1. nPKC ϵ y pnPKC ϵ se expresan en el músculo esquelético neonato y adulto	102
Figura R2. nPKC ϵ y pnPKC ϵ se expresan en la fracción de la membrana sináptica en el músculo esquelético adulto.....	104

Figura R3. La isoforma nPKCϵ se localiza en el terminal nervioso de la NMJ adulta	106
Figura R4. Análisis de la expresión de nPKCϵ, pnPKCϵ en músculos EDL denervados	107
Figura R5. Curso temporal de los niveles de expresión de nPKCϵ y pnPKCϵ en la fracción de la membrana sináptica en músculos sin estimular	109
Figura R6. Curso temporal del efecto del estímulo (1 Hz) en los niveles de expresión de nPKCϵ y pnPKCϵ en la fracción de la membrana sináptica	111
Figura R7. Ratio del efecto de los métodos utilizados para abolir la contracción muscular en músculos estimulados.....	112
Figura R8. La contracción muscular aumenta los niveles de expresión de nPKCϵ y pnPKCϵ en la fracción de la membrana sináptica.....	114
Figura R9. El bloqueo selectivo de TrkB previene el incremento de la isoforma nPKCϵ inducido por la contracción muscular	116
Figura R10. Curso temporal de los niveles de expresión de pMARCKS en músculos sin estimular	118
Figura R11. Nivel de expresión de pMARCKS en músculos EDL denervados	118
Figura R12. Curso temporal del efecto de ϵV1-2 en los niveles de expresión de nPKCϵ y pnPKCϵ en la fracción de la membrana sináptica en músculos sin estimular.....	120
Figura R13. Curso temporal del efecto de ϵV1-2 en los niveles de expresión de Hsp70 en músculos sin estimular	121
Figura R14. Efecto de ϵV1-2 en los niveles de expresión de nPKCϵ, pMARCKS y Hsp70 en músculos sin estimular	122
Figura R15. Efecto del estímulo (1 Hz) en los niveles de expresión de pMARCKS y Hsp70	123
Figura R16a. Efecto de ϵV1-2 en los niveles de expresión de pMARCKS en músculos estimulados (1 Hz)	124
Figura R16 b-c. Efecto de ϵV1-2 en los niveles de expresión de nPKCϵ y pnPKCϵ en la fracción de la membrana sináptica en músculos estimulados (1 Hz)	125
Figura R17. La contracción muscular aumenta la fosforilación de MARCKS	126
Figura R18. La contracción muscular aumenta la fosforilación de MARCKS a través de TrkB.....	128
Figura R19. PKC no se acopla a la liberación de ACh en condiciones basales	130

Figura R20. Curva de concentraciones de $\epsilon V1-2$	132
Figura R21. Ejemplos de registros evocados y espontáneos del efecto de $\epsilon V1-2$	133
Figura R22. Efecto de CaC en presencia de alto Ca^{2+} , alto Mg^{2+} y ω -Agatoxina-IVA ..	134
Figura R23. Efecto de CaC y $\epsilon V1-2$ en presencia de alto Ca^{2+} y estímulo eléctrico (1 Hz)	136
Figura R24. Efecto de PMA en presencia de $\epsilon V1-2$	138
Figura R25. Ejemplos de registros evocados del efecto de PMA en presencia de $\epsilon V1-2$	139
Figura R26. Efecto de $\epsilon V1-2$ en la depresión sináptica	140
Figura R27. Modulación de la actividad de PKC y PKA	143
Figura R28. Efecto de $\epsilon V1-2$ en la actividad de PKA	145
Figura R29. Efecto de $\epsilon V1-2$ y CaC en la modulación de mAChRs (M1, M2)	148
Figura D1. Diagrama del mecanismo propuesto que relaciona la función regulatoria de nPKC ϵ , actividad-dependiente, en la secreción del neurotransmisor y la contracción muscular en las NMJs	158
Figura D2. Participación de la isoforma nPKC ϵ en relación a la actividad de la proteína quinasa C (PKC), proteína quinasa A (PKA) y mAChRs (M1 y M2), en la liberación de ACh.....	168

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. ANTICUERPOS PRIMARIOS	91
TABLA 2. ANTICUERPOS SECUNDARIOS.....	92

LISTA DE ABREVIATURAS

ACh	Acetylcholine
AChE	Acetylcholinesterase
AChRs	Acetylcholine receptors
ADO	Adenosine
AKAP79	A-kinase-anchoring protein 79
Akt/PKB	Protein kinase B
ANA-12	N-[2-[[[(Hexahydro-2-oxo-1H-azepin-3-yl)amino]carbonyl]phenyl]-benzo[b]thiophene-2-carboxamide
aPKC	Atypical PKC subfamily
APS	Amonium persulfate
A ₁ R	Adenosine A1 receptor
A _{2A} R	Adenosine A2A receptor
ATP	Adenosine triphosphate
ATR	Atropine
BDNF	Brain derived growth factor
BSA	Bovine serum albumin
Ca ²⁺	Calcium ion
CaC	Calphostin C
cAMP	Cyclic adenosine monophosphate

CEL	Chelerythrine
CFTR	Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
cPKC	Classical PKC subfamily
cPKC α	Classical PKC alpha isoform
cPKC β I	Classical PKC beta I isoform
cPKC β II	Classical PKC beta II isoform
Ctrl	Control
Cys	Cysteine
DAG	Diacyl-glycerol
Den	Denervated muscle
DMSO	Dimethyl sulfoxide
ECL	Enhanced chemiluminescent
EDL	Extensor digitorum longus
EPPs	End-plate potentials
Erb2/ Erb4	Receptor tyrosine-protein kinases
ES	Electrical stimulation without (muscle) contraction
ES+C	Electrical stimulation with (muscle) contraction
Ex	Extra synaptic fraction (diaphragm)
FGF2	Fibroblast growth factor 2
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

GAP43	Growth Associated Protein 43
H-89	Protein kinase A inhibitor
HCl	Hydrochloric acid
HRP	Horseradish peroxidase
Hsp70	Heat shock protein 70
Hz	Herz
IHQ	Immunohistochemistry
IP ₃	Inositol 1,4,5-trisphosphate
JI	Jackson Immunoresearch
K ⁺	Potassium ion
KDa	Kilodalton
KO	Knockout
LAL	Levator auris longus
LTP	Long term potentiation
m	Quantal content
M1/M2	Subtypes of muscarinic acetylcholine receptors
mA	Milliamperes (10 ⁻³ A)
mAChRs	Muscarinic acetylcholine receptors
MARCKS	Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate
MEPPs	Miniature end plate potentials

MET	Methoctramine
mg	Milligrams (10^{-3} g)
Mg ²⁺	Magnesium ion
ml	Milliliter (10^{-3} l)
mM	Millimolar (10^{-3} M)
mm	Millimeter (10^{-3} m)
MP	Molecular Probes
MP-3	Miniprotean-3
ms	Millisecond
mTOR	Mammalian target of rapamycin
MuSK	Muscle specific kinase
mV	Millivolts (10^{-3} V)
N	Number of independent active sites
Na ⁺	Sodium ion
nAChRs	Nicotinic acetylcholine receptors
N-CAM	Neural Cell Adhesion Molecule
nPKC	Novel PKC subfamily
nPKC δ	Novel PKC delta isoform
nPKC ϵ	Novel PKC epsilon isoform
nm	Nanometer

NT	Nerve terminal
OXO-M	Oxotremorine M
P	Probability of release at each site
P1Rs	Purinergic P1 receptors
P2Rs	Purinergic P2 receptors
PAR-1	Protease-activated receptor 1
PBS	Phosphate buffer saline
PDGF	Platelet-derived growth factor
PDK-1	Phosphoinositide-dependent kinase 1
PI3Ks	Phosphoinositide-3-kinases
PIP ₂ /PtdIns(4,5)P ₂	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate
PIR	Pirenzepine
PKA	Protein kinase A
PKC	Protein kinase C
PKD (PKC μ)	PKD (PKC μ)
PLC	Phospholipase C
PFA	Paraformaldehyde
PMA	Phorbol-12-myristate-13-acetate
pMARCKS	Phosphorylated MARCKS
PS	Phosphatidylserine

PVDF	Polyvinylidene difluoride
Q	Quantum
RACKs	Receptors for Activated C-Kinase
RecP	Recycling pool
rpm	Revolutions per minute
RP	Reserve pool
RRP	Readily-releasable pool
s	second
SD	Standard deviation
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SEM	Standard Error of the Mean
Syn	Synaptic fraction (diaphragm)
siRNA	Small interfering RNA
SLB	Sample Loading Buffer
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
Sp-8-cAMPs	8-Bromoadenosine- 3', 5'- cyclic monophosphorothioate, Sp- isomer
8-SPT	8-(p-Sulfophenyl)theophylline hydrate
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3

STICK	Substrates that interact with PKC
TAT	Transactivator of transcription
TBE	2,2,2-tribromoethanol, anestésico
TBS-T	Tris-buffered saline-0.1% Tween-20
TEMED	N, N, N', N'-tetramethylethylenediamine
TFRs	Trophic factor receptors
Thr	Threonine
TRICT	Tetramethylrhodamine
TrkB	Tropomyosin-related kinase B
TSCs	Terminal Schwann cells
TTX	Tetradotoxine
V	Volts
VDCC	Voltage dependent calcium channel
vs	Versus
v/v	Volume/volume
V1-V5	PKC variable regions
α -BTX	Alpha-bungarotoxin
B' COP	RACK2
β C2-4	C2-containing cPKC β inhibitor peptide

β IV5-3	V5-containing cPKC β I inhibitor peptide
δ V1	V1-containing nPKC δ inhibitor peptide
ϵ RACK	Receptors for Activated C-Kinase nPKC ϵ
ϵ V1-2	V1-containing nPKC ϵ inhibitor peptide
μ -CTX	μ -CgTx GIIB
μ g	Microgram (10^{-6} g)
μ l	Microlitre (10^{-6} l)
μ m	Micrometer (10^{-6} m)
μ M	Micromolar (10^{-6} M)

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

LA PROTEÍNA QUINASA C ÉPSILON EN LA UNIÓN NEUROMUSCULAR DE MAMÍFERO ADULTO: LOCALIZACIÓN,
REGULACIÓN MEDIANTE ACTIVIDAD SINÁPTICA Y ACOPLAMIENTO A LA LIBERACIÓN DE ACETILCOLINA.

Teresa Obis Ibáñez

Dipòsit Legal: T 1609-2015

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

LA PROTEÍNA QUINASA C ÉPSILON EN LA UNIÓN NEUROMUSCULAR DE MAMÍFERO ADULTO: LOCALIZACIÓN,
REGULACIÓN MEDIANTE ACTIVIDAD SINÁPTICA Y ACOPLAMIENTO A LA LIBERACIÓN DE ACETILCOLINA.

Teresa Obis Ibáñez

Dipòsit Legal: T 1609-2015

RESUMEN

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

LA PROTEÍNA QUINASA C ÉPSILON EN LA UNIÓN NEUROMUSCULAR DE MAMÍFERO ADULTO: LOCALIZACIÓN,
REGULACIÓN MEDIANTE ACTIVIDAD SINÁPTICA Y ACOPLAMIENTO A LA LIBERACIÓN DE ACETILCOLINA.

Teresa Obis Ibáñez

Dipòsit Legal: T 1609-2015

La proteína quinasa C (PKC) pertenece a la familia de las serina/treonina quinasas y participa en diferentes vías de señalización regulando diversas funciones neurales. Las proteínas intracelulares de unión a PKC, conocidas como receptores para las quinasas C activadas (RACKs), son esenciales para la interacción de las isoformas de PKC activadas con sus sustratos proteicos endógenos y contribuyen a la actividad catalítica de PKC. La isoforma novel épsilon (nPKC ϵ) está altamente expresada en el cerebro y regula diversas funciones neurales. No obstante, la localización de nPKC ϵ en la unión neuromuscular (NMJ) y su papel en la liberación de acetilcolina (ACh) dependiente de actividad no han sido descritas. Utilizando una combinación de técnicas de inmunohistoquímica y microscopía confocal se estudió la distribución de nPKC ϵ en la NMJ de mamífero adulto y se observó su localización exclusiva en los terminales nerviosos motores. Esta tesis se centra en el estudio de la participación de nPKC ϵ en los procesos sinápticos. Los estudios bioquímicos muestran que la contracción muscular inducida por la actividad sináptica promueve cambios en los niveles de nPKC ϵ en la membrana sináptica a través del receptor tirosina quinasa B (TrkB). Además, la actividad de nPKC ϵ resulta en la fosforilación de MARCKS, sustrato de PKC que participa en la neurotransmisión. Se ha estudiado, además, el papel de nPKC ϵ en la secreción de ACh, utilizando el péptido inhibidor de la translocación de nPKC ϵ (ϵ V1-2), que actúa interrumpiendo la interacción nPKC ϵ -RACK. Mediante técnicas de electrofisiología de registro intracelular, se investigó la implicación de nPKC ϵ en el mecanismo de secreción del neurotransmisor mediante la interacción con PKC, PKA y los autoreceptores muscarínicos M1/M2. La preincubación con ϵ V1-2 desacopla PKC del mecanismo de liberación de ACh en diversas condiciones de potenciación en la NMJ y altera al mecanismo muscarínico que modula la neurotransmisión a través de M1/M2.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

LA PROTEÍNA QUINASA C ÉPSILON EN LA UNIÓN NEUROMUSCULAR DE MAMÍFERO ADULTO: LOCALIZACIÓN,
REGULACIÓN MEDIANTE ACTIVIDAD SINÁPTICA Y ACOPLAMIENTO A LA LIBERACIÓN DE ACETILCOLINA.

Teresa Obis Ibáñez

Dipòsit Legal: T 1609-2015

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

LA PROTEÍNA QUINASA C ÉPSILON EN LA UNIÓN NEUROMUSCULAR DE MAMÍFERO ADULTO: LOCALIZACIÓN,
REGULACIÓN MEDIANTE ACTIVIDAD SINÁPTICA Y ACOPLAMIENTO A LA LIBERACIÓN DE ACETILCOLINA.

Teresa Obis Ibáñez

Dipòsit Legal: T 1609-2015

ABSTRACT

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

LA PROTEÍNA QUINASA C ÉPSILON EN LA UNIÓN NEUROMUSCULAR DE MAMÍFERO ADULTO: LOCALIZACIÓN,
REGULACIÓN MEDIANTE ACTIVIDAD SINÁPTICA Y ACOPLAMIENTO A LA LIBERACIÓN DE ACETILCOLINA.

Teresa Obis Ibáñez

Dipòsit Legal: T 1609-2015

Protein kinase C (PKC) comprises a family of serine/threonine kinases, which regulates a variety of neural functions by playing central roles in several signaling pathways. Intracellular PKC-binding proteins, known as receptors for activated C kinase (RACKs), are essential for the interaction of activated PKC isoforms with its endogenous protein substrates and contributes to the catalytic activity of PKC. The novel epsilon isoform of PKC (nPKC ϵ) is highly expressed in the brain and regulates several neural functions. However, the location of nPKC ϵ at the neuromuscular junction (NMJ) and its role in the activity dependent acetylcholine (ACh) release are not described. Using a combination of immunohistochemistry and confocal microscopy, we studied nPKC ϵ distribution in adult mammalian NMJ and we observed its exclusive localization at the motor nerve terminals. This dissertation focuses, moreover, on the study of nPKC ϵ participation in synaptic processes. Biochemical studies have shown that muscle contraction induced by changes in synaptic activity promotes nPKC ϵ levels in the synaptic membrane through receptor tyrosine kinase B (TrkB). Moreover, the activity of nPKC ϵ results in MARCKS phosphorylation, a PKC substrate involved in neurotransmission. Furthermore, we have studied the role of nPKC ϵ in neurotransmitter release, using the selective nPKC ϵ translocation inhibitor peptide (ϵ V1-2), which acts by disrupting the interaction nPKC ϵ -RACK. By electrophysiological techniques (intracellular recordings), we investigated nPKC ϵ involvement on the mechanism of neurotransmitter secretion by its interaction with PKC, PKA and muscarinic autoreceptors M1 / M2. Preincubation with ϵ V1-2 uncouples PKC to ACh release in different enhancement conditions and alters muscarinic mechanism that modulates neurotransmission via M1 / M2 at the NMJ.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

LA PROTEÍNA QUINASA C ÉPSILON EN LA UNIÓN NEUROMUSCULAR DE MAMÍFERO ADULTO: LOCALIZACIÓN,
REGULACIÓN MEDIANTE ACTIVIDAD SINÁPTICA Y ACOPLAMIENTO A LA LIBERACIÓN DE ACETILCOLINA.

Teresa Obis Ibáñez

Dipòsit Legal: T 1609-2015

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

LA PROTEÍNA QUINASA C ÉPSILON EN LA UNIÓN NEUROMUSCULAR DE MAMÍFERO ADULTO: LOCALIZACIÓN,
REGULACIÓN MEDIANTE ACTIVIDAD SINÁPTICA Y ACOPLAMIENTO A LA LIBERACIÓN DE ACETILCOLINA.

Teresa Obis Ibáñez

Dipòsit Legal: T 1609-2015

CAPÍTULO I.

INTRODUCCIÓN

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

LA PROTEÍNA QUINASA C ÉPSILON EN LA UNIÓN NEUROMUSCULAR DE MAMÍFERO ADULTO: LOCALIZACIÓN,
REGULACIÓN MEDIANTE ACTIVIDAD SINÁPTICA Y ACOPLAMIENTO A LA LIBERACIÓN DE ACETILCOLINA.

Teresa Obis Ibáñez

Dipòsit Legal: T 1609-2015

1. LA UNIÓN NEUROMUSCULAR: MODELO EXPERIMENTAL DE SINAPSIS

La unión neuromuscular (NMJ, del inglés *neuromuscular junction*) es la zona de contacto sináptico entre la neurona motora y la fibra muscular. Es un ejemplo de sinapsis química sobre el cual se han desarrollado múltiples estudios, tanto morfológicos como fisiológicos, en especial desde mediados del siglo XIX. Los avances en microscopía y en técnicas de tinción y fijación permitieron visualizar y denominar este modelo de sinapsis. Desde su descubrimiento hasta nuestros días, la NMJ ha sido un modelo básico para el análisis de la neurotransmisión debido a su gran tamaño y su localización periférica, que facilitan su manipulación. La mayoría de los trabajos pioneros en la transmisión neuromuscular fueron desarrollados por Bernard Katz y sus colaboradores en *University College London* durante 1950 y 1960. Aunque Katz trabajó principalmente en la NMJ de rana, numerosos experimentos posteriores han confirmado la aplicabilidad de sus observaciones no solo en la NMJ de otros modelos animales, sino también en sinapsis químicas del sistema nervioso central.

La primera demostración rigurosa sobre la transmisión sináptica química utilizó como modelo la NMJ adulta en vertebrados (Dale et al. 1936). Poco después, esta sinapsis sirvió a Bernard Katz y colaboradores para demostrar que la liberación del neurotransmisor, acetilcolina, es cuántica y vesicular (*Nerve, muscle and synapse*, Bernard Katz, McGraw-Hill Book Co., New York, 1966). Más tarde, fue purificado y clonado el primer receptor de un neurotransmisor, el receptor nicotínico de acetilcolina (nAChR, del inglés *nicotinic acetylcholine receptor*) (Duclert & Changeux 1995). Todos estos estudios y su gran accesibilidad experimental, han hecho de la NMJ un buen modelo para una gran cantidad de estudios electrofisiológicos y neurobiológicos de la comunicación sináptica. Aunque la NMJ en vertebrados es la más estudiada, los avances en biología molecular han permitido desarrollar otros modelos de sinapsis neuromuscular como *Drosophila* o *Crayfish*. La mayor parte de los trabajos pioneros sobre transmisión sináptica fueron realizados en preparaciones neuromusculares de rana y en la sinapsis gigante de calamar. Entre otras razones, las posibilidades técnicas, como la medición de los cambios en el potencial de membrana y la identificación visual de la unión neuromuscular, fueron determinantes en la elección de las preparaciones. Además, los descubrimientos de Otto Loewi en 1921 sobre la acción de la ACh en el

músculo cardíaco, ayudaron a establecer las bases de la actual comprensión de la neurotransmisión.

Aunque ya en 1848 se postuló la naturaleza química de la comunicación entre las motoneuronas y las fibras musculares en las ranas (Du Bois-Reymond), con la publicación de los trabajos realizados por Dale y sus colaboradores (Dale 1934; Dale et al. 1936; Brown & Feldberg 1936), describiendo la liberación de ACh sobre las fibras musculares, se estableció que una sustancia química es liberada y funciona como mensajero entre las células. A estos trabajos les siguió una gran cantidad de estudios enfocados a la fisiología y la biofísica del fenómeno de la transmisión sináptica.

La NMJ ha servido como modelo en estudios de investigación clínica al ser clave en diferentes enfermedades del sistema nervioso como la *miastenia gravis* (Finsterer et al. 2011); el síndrome miasténico de *Lambert-Eaton* (Luigetti et al. 2013); la distrofia muscular de *Duchenne* (Beytía et al. 2012), la esclerosis lateral amiotrófica (Schaefer et al. 2005; Kariya et al. 2012) o la atrofia muscular espinal (Kariya et al. 2008; Kariya et al. 2014).

- Descripción de la NMJ

La NMJ es la sinapsis entre una motoneurona α y una célula muscular esquelética. Es una sinapsis química, colinérgica nicotínica, haciendo referencia a su neurotransmisor (acetilcolina) y su agonista (nicotina). El objetivo de la NMJ es generar una sinapsis química que induzca el control nervioso sobre la contracción muscular.

Está formada por los elementos sinápticos de tres tipos celulares: motoneurona, fibra muscular y célula de Schwann (Couteaux & Pécot-Dechavassine 1973; Ogata 1988; Engel et al. 1994; J. Sanes & Lichtman 1999). En las sinapsis químicas se diferencia la parte presináptica y la parte postsináptica. La parte presináptica la compone el terminal nervioso de la motoneurona y la parte postsináptica está formada por la fibra muscular directamente opuesta al terminal nervioso (figura II).

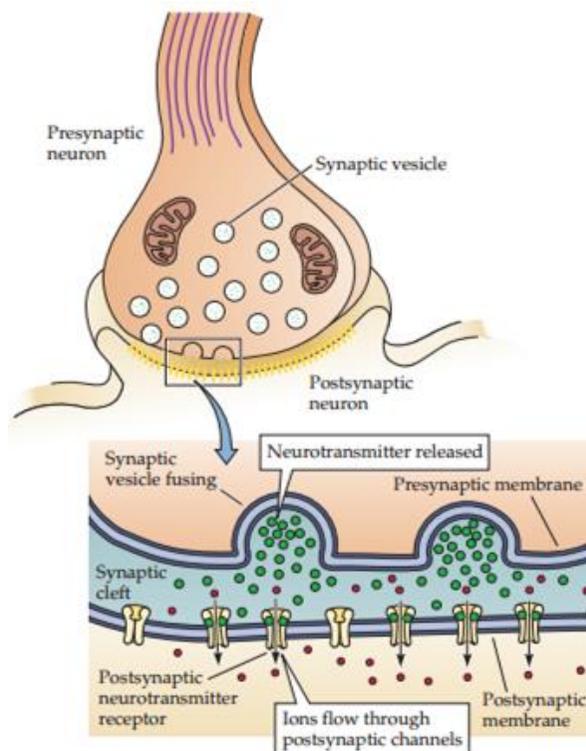


Figura 11. Transmisión sináptica química. En la sinapsis química, la corriente sináptica fluye a través de la membrana postsináptica únicamente en respuesta a la secreción de los neurotransmisores, que provocan la apertura o cierre de canales iónicos postsinápticos tras la unión a moléculas receptoras. Extraído de *Dale Purves, Neurosciences, 3ª ed. 2004, Sinauer Associates, Inc.*

La característica principal de la estructura sináptica es la alta especialización de las porciones sinápticas de los tres componentes celulares. Contienen orgánulos y moléculas específicos que se encuentran a bajas concentraciones en la parte extrasináptica.

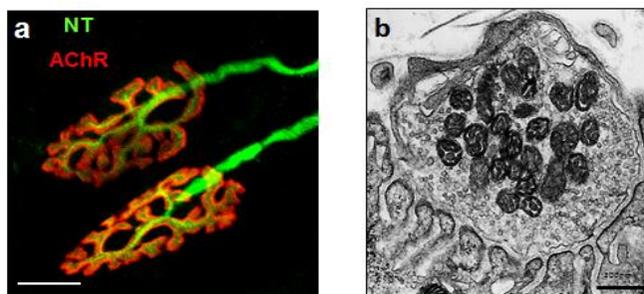


Figura 12. NJM en adulto. (a) Marcaje de NMJ con doble inmunofluorescencia: sintaxina/neurofilamento-200-NT (terminal nervioso, NT, en verde) y α -BTX-AChR (receptores de acetilcolina, AChR, en rojo); barra de escala = 10 μ m. (b) Imagen de microscopía electrónica de transmisión con los distintos tipos celulares que componen la NMJ y sus especializaciones; barra de escala = 250 nm.

1.1. Componentes de la unión neuromuscular

- Motoneurona y terminal nervioso

La motoneurona es una célula nerviosa que consta de un cuerpo celular o soma ubicado en la parte ventral de la médula espinal, unas prolongaciones especializadas denominadas dendritas y un axón que sale de la médula espinal donde se ramifica formando el terminal nervioso que contactará con la fibra muscular formando la sinapsis neuromuscular. Las motoneuronas tienen un diámetro de 70-100 μ m y conducen el impulso nervioso desde el sistema nervioso central hacia los órganos efectores (músculo y glándulas).

El soma contiene el núcleo de la célula y la mayoría de los orgánulos celulares, como los gránulos de Nissl, que son muy abundantes cerca del inicio del axón. Contiene mitocondrias, microtúbulos y neurofilamentos en abundancia. El aparato de Golgi está situado cerca del núcleo. En el citoplasma hay acumulaciones de pigmentos denominadas gránulos de lipofucsina. Desde el soma de la motoneurona irradian en todas las direcciones unas prolongaciones denominadas dendritas que confieren a la célula un aspecto multipolar. Reciben señales sinápticas de otras neuronas constituyendo la superficie receptora de la motoneurona. A medida que se alejan del soma disminuye su diámetro y se dividen, dando lugar a diversas ramificaciones formando un patrón de arborización complejo. Presentan un gradiente próximo-distal de orgánulos en su

interior. El axón se origina en una protrusión del soma celular y se extiende hacia el terminal nervioso, siendo esta la parte más distal en contacto con la fibra muscular. Transmite a las fibras musculares el impulso nervioso (propagación del potencial de acción) y transporta mensajeros químicos y determinados orgánulos y moléculas hasta su extremo distal. En su citoplasma se ubica el citoesqueleto especializado (microtúbulos y neurofilamentos). La longitud del axón varía mucho, pudiendo alcanzar los 125 cm (axón de la región lumbosacra que inerva el músculo plantar en un hombre de 180 cm de altura).

Los axones motores están aislados por unas cubiertas lipídicas que recubren el axón en todo su recorrido, las vainas de mielina, formadas por las células de Schwann. La cubierta lipídica o mielínica no es continua. A lo largo del axón existen bandas circulares sin mielina que se localizan entre las diferentes células de Schwann, los denominados nódulos de Ranvier, responsables de la conducción saltatoria del impulso nervioso. Normalmente, los axones inervan un solo músculo ya que no se ramifican durante el trayecto hacia el músculo, sino que lo hacen intramuscularmente. Los axones se dividen cuando están próximos al músculo diana y pueden llegar a inervar hasta un centenar de fibras musculares. Liddell y Sherrington (1925) definieron el concepto de unidad motora como el conjunto formado por una única motoneurona y los miocitos a los que inerva. Todos los miocitos de una unidad motora tienen las mismas características fisiológicas e histoquímicas.

La parte del axón que entra en contacto con la fibra muscular a inervar es el terminal nervioso o axonal y constituye la parte más especializada y distal de la motoneurona. Esta unión entre el terminal nervioso envuelto por las células de Schwann y la fibra muscular se denomina sinapsis neuromuscular. El terminal nervioso está especializado en la liberación de la molécula neurotransmisora. Hay una gran cantidad de vesículas sinápticas de aproximadamente 50 nm de diámetro que contienen el neurotransmisor que será liberado, la acetilcolina (ACh, del inglés *acetylcholine*), y numerosas mitocondrias que proporcionan la energía necesaria para la síntesis y liberación del neurotransmisor. Está polarizado y sus componentes distribuidos de forma adecuada a la función que realizan. La mayoría de las vesículas que contienen el neurotransmisor se encuentran en la parte del terminal nervioso que está en contacto con la fibra muscular y la mayor parte de las mitocondrias en la zona del terminal que queda bajo la célula de Schwann. Muchas vesículas sinápticas se fusionan con la membrana del terminal nervioso en unas zonas que se observan electrodensas al

microscopio electrónico de transmisión, denominadas zonas activas, donde se acumulan y liberan por exocitosis su contenido desde la membrana presináptica al espacio extracelular (hendidura sináptica). Se han identificado muchos componentes de estas zonas activas, algunos de ellos se asocian a canales de calcio y potasio dependientes de voltaje, que maximizan la eficacia de la liberación del neurotransmisor dependiente de calcio (Robitaille et al. 1993; Day et al. 1997). La parte del terminal axonal que no está en contacto con la fibra muscular contiene muchas menos vesículas sinápticas pero más mitocondrias que la parte que está en contacto y no se encuentran zonas activas. En esta zona hay microtúbulos y neurofilamentos siendo escasos en la zona de contacto con la célula postsináptica (Yee et al. 1988). Las moléculas mejor estudiadas del terminal nervioso son las proteínas que contienen las vesículas sinápticas: el neurotransmisor acetilcolina, su enzima de síntesis (acetilcolina transferasa) y el transportador de la acetilcolina vesicular (Südhof 1995; Calakos & Scheller 1996), así como las moléculas de la membrana vesicular que facilitan el proceso de exocitosis (Blasi et al. 1993; Xu et al. 2013).

- **Fibra muscular**

Los músculos estriados esqueléticos están formados por fibras musculares multinucleadas formadas durante la embriogénesis para la fusión de mioblastos que generan un miotubo que madurará como fibra muscular. Estas células tienen un diámetro entre 10-100 μm . Las fibras musculares observadas longitudinalmente bajo microscopio óptico presentan una serie de estriaciones debidas al citoesqueleto miofibrilar de la célula. Las miofibrillas son responsables de la contracción y relajación de las fibras musculares. Cada miofibrilla tiene un diámetro de 1-2 μm y está separada de la miofibrilla contigua por mitocondrias y por el sistema sarcoplásmico. Las miofibrillas se componen de actina y miosina y la disposición regular de estas dos proteínas confieren una apariencia estriada a las miofibrillas y a la fibra muscular. La membrana plasmática o sarcolema de la fibra muscular se rodea de una lámina basal y de células satélite (células con un papel importante en la regeneración muscular). El sarcolema emite prolongaciones digitiformes, denominadas túbulos T, hacia el interior del citoplasma (también denominado sarcoplasma). Los túbulos T establecen contacto con el retículo sarcoplásmico. Los numerosos núcleos que tiene la fibra muscular se localizan en la periferia de la célula, justo debajo del sarcolema. Las mitocondrias envuelven las miofibrillas que acaban ocupando el 80% del citoplasma.

El sarcolema de la fibra muscular tiene unas características especiales dependiendo de si la membrana es sináptica o extrasináptica. La membrana extrasináptica se encuentra a lo largo de toda la fibra muscular, exceptuando la fracción que forma parte de la unión neuromuscular. La membrana sináptica, también denominada postsináptica, forma parte de la unión neuromuscular y queda enfrente, por tanto, del componente presináptico o terminal nervioso de la sinapsis. Entre el componente presináptico y el componente postsináptico hay un espacio de unos 50 nm, la hendidura sináptica. La membrana postsináptica está altamente especializada para responder rápidamente y de una forma efectiva al efecto del neurotransmisor liberado por el terminal nervioso. Tiene una estructura y composición molecular diferente a la de la membrana extrasináptica, que se encuentra fuera del espacio sináptico. Presenta una concentración muy elevada de receptores de acetilcolina, más de 10.000 por μm^2 (Salpeter & Loring 1985).

Los nAChRs son receptores de tipo nicotínico que pertenecen a la superfamilia de canales iónicos activados por ligandos, compuestos por heterooligómeros de cinco subunidades con cuatro dominios transmembrana cada una (Le Novère & Changeux 1995). El nAChR tiene una estructura básica de pentámero, compuesto por cuatro cadenas polipeptídicas diferentes (2 α , 1 β , 1 δ y 1 ϵ). La ACh se une a la subunidad α cuyo dominio de unión al ligando presenta dos lugares de unión. Este dominio está expuesto a la superficie extracelular y está formado principalmente por la región N-terminal de las subunidades α (Montal & Opella 2002). Los cuatro dominios transmembrana que contiene cada subunidad, M1-M4, se estructuran formando un poro, siendo responsable de su formación sobre todo la secuencia M2. Asociados a los segmentos citoplasmáticos de los nAChR hay un complejo aparato citoplasmático cuya principal función descrita es la de mantener una densidad elevada de nAChR en la membrana sináptica, ya que aunque encontramos nAChR a lo largo de toda la fibra muscular, en la parte extrasináptica la densidad es aproximadamente de unos 10 por μm^2 (Salpeter et al. 1988).

La membrana postsináptica forma una depresión con invaginaciones de aproximadamente 1 μm de profundidad, situadas de forma que se enfrentan a las zonas activas de la membrana presináptica. El conjunto de estas invaginaciones reciben el nombre de pliegues sinápticos. Los receptores de acetilcolina se sitúan en la parte apical del pliegue o cresta, formando las zonas densas postsinápticas. En la base de los pliegues se encuentran los canales de sodio, moléculas de adhesión de células neurales (N-CAM)

y el receptor para la proteasa trombina (PAR-1) (Covault & Sanes 1986; Flucher & Daniels 1989; Lanuza et al. 2007). Se encuentran también moléculas que colocalizan con los canales de sodio: la anquirina, la α -distrobrevina-2, la distrofina y Erb2 y Erb4 y otras que colocalizan con los nAChR: α -distrobrevina-1, MuSK, rapsina y utrofina (Flucher & Daniels 1989; Wood & Slater 1998; Trinidad et al. 2000). Se ha sugerido que esta organización molecular heterogénea que delimita dominios en la membrana postsináptica puede aumentar la eficacia de la transmisión sináptica (Wood & Slater 1997; J. R. Sanes & Lichtman 1999).

- **Célula de Schwann**

Las células de Schwann son las células gliales del sistema nervioso periférico y envuelven a los axones. Tienen un citoplasma escaso, pocas mitocondrias y un aparato de Golgi pequeño. Estas células pueden regular en parte la sinapsis pero no está claro su papel en la formación de las uniones. Las células de Schwann pueden envolver al axón formando una vaina de mielina, una capa de membranas fosfolípídicas aislante y discontinua. Los lugares libres de mielina son los nódulos de Ranvier y garantizan que la conducción de la señal sea saltatoria.

Las células de Schwann que forman parte de la sinapsis neuromuscular son las células terminales o perisinápticas (TSCs, del inglés *terminal Schwann cells*), estrechamente asociadas a los elementos pre- y postsinápticos de la NMJ (Auld & Robitaille 2003). Envuelven al terminal nervioso aislando la unión neuromuscular del ambiente externo proporcionándole un medio adecuado y sustancias tróficas. Las TSCs no forman mielina y tienen diferente expresión génica que las células de Schwann no terminales (Georgiou & Charlton 1999). Estas células tienen un papel importante en la reparación de la sinapsis tras una lesión ya que guían al axón en proceso de regeneración (Son & Thompson 1995). También participan en el mantenimiento normal de las sinapsis, en la plasticidad sináptica y durante el desarrollo. Las TSCs podrían tener un papel clave en la comunicación entre el elemento pre- y postsináptico (Castonguay et al. 2001; Auld & Robitaille 2003). Tienen receptores muscarínicos de acetilcolina (mAChRs, del inglés *muscarinic acetylcholine receptors*) que unen la acetilcolina liberada por el terminal axonal (Robitaille et al. 1997; Georgiou et al. 1999), receptores purinérgicos (Robitaille 1995) y canales de calcio dependientes de voltaje tipo L (Robitaille et al. 1996). La activación de los mAChRs induce la aparición de segundos mensajeros que actúan sobre los almacenes de calcio intracelular haciendo aumentar el

calcio en el interior de las TSCs (Jahromi et al. 1992). El calcio liberado regula la expresión de determinados genes implicados en la formación de las prolongaciones de estas células (Georgiou et al. 1994). Las TSCs pueden modificar la arquitectura de las uniones neuromusculares (Trachtenberg & Thompson 1997) y la estrecha asociación de estas células con otros elementos de la unión neuromuscular facilita la capacidad de estas células para detectar cambios en el ambiente de la unión neuromuscular (Auld & Robitaille 2003).

- **Lámina basal**

La lámina basal envuelve cada fibra muscular pasando a través de la hendidura sináptica y se introduce también en el interior de los pliegues sinápticos. Los componentes mayoritarios de la lámina basal sináptica son muy similares a los de cualquier otra lámina basal extrasináptica (fibras de colágeno IV, laminina, entactina y proteoglicanos), pero difieren en la composición de las isoformas de estos componentes. La diferencia más relevante es la especificidad de algunos elementos como la acetilcolinesterasa (Hall & Sanes 1993), una serie de glicoconjugados (Scott et al. 1988), el factor de crecimiento de los fibroblastos 2 (FGF2, del inglés *fibroblast growth factor 2*) (Dai & Peng 1995) y dos moléculas de señalización, agrina (Samuel et al. 2012) y neuregulina (Jo et al. 1995). Estas moléculas específicas de la lámina basal sináptica participan durante el desarrollo y mantenimiento de la estructura sináptica y en el funcionamiento correcto de la neurotransmisión.

Las lamininas son proteínas grandes con multisubunidades de las cuales se han descrito 12 y muchas están presentes en el músculo (Suzuki et al. 2005). Las subunidades $\alpha 2$, $\alpha 4$ o $\alpha 5$ asociadas a $\beta 2$ y $\gamma 1$ de las lamininas son sintetizadas por fibras musculares y concentradas en la lámina basal que forma la hendidura sináptica de la NMJ (Fox et al. 2007). Las lamininas sinápticas actúan conjuntamente en las tres células de la NMJ para organizar y coordinar la maduración sináptica y son promotores autocrinos de la maduración postsináptica (Nishimune et al. 2008). La laminina $\alpha 4$ ayuda de forma específica a que tenga lugar el enfrentamiento preciso de las especializaciones pre-postsinápticas (Nishimune et al. 2008). Las lamininas $\beta 2$ actúan como organizadoras de la maduración sináptica, en parte por la unión con los canales de calcio dependientes de voltaje (VDCC, del inglés *voltage dependent calcium channel*) en la membrana presináptica (Fox et al. 2007; Knight et al. 2003; Nishimune et al. 2004), afectando también a la ubicación de las TSCs (Patton et al. 1998)

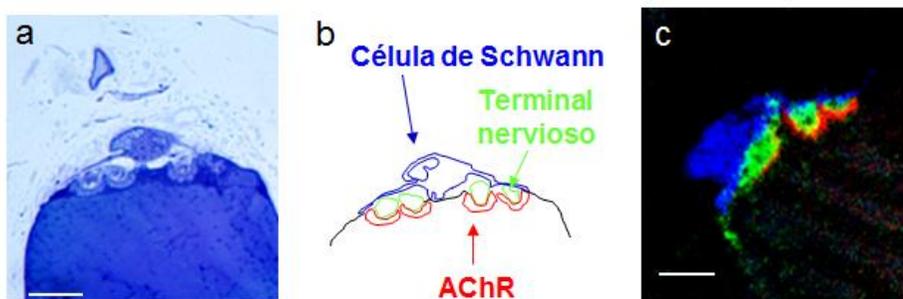


Figura. 13 Componentes de la NMJ en adulto. (a) Secciones semifinas (0.5 μm) de la NMJ, teñidas con azul de toluidina y (c) con triple marcaje con inmunofluorescencia: sintaxina/neurofilamento-200-NT (terminal nervioso, en verde); S-100 (célula de Schwann, en azul); y α -BTX-AChR (receptores de acetilcolina, en rojo). En (b), se subrayan los componentes celulares de (a). Imágenes reproducidas con el permiso de (Lanuza et al. 2007).

2. NEUROTRANSMISIÓN EN LA NMJ

Las células nerviosas generan señales eléctricas que serán la base para que tenga lugar la transmisión de información en el sistema nervioso. Un primer tipo de señal eléctrica, el potencial de acción, permite que la información viaje a lo largo de la célula nerviosa, mientras que un segundo tipo de señal se genera en las uniones entre células nerviosas o entre una neurona y una fibra muscular, en el caso de la sinapsis neuromuscular. Este último tipo de señal permite la transmisión de información entre las múltiples neuronas en el sistema nervioso. Estos dos tipos de mecanismos de señalización -potenciales de acción y potenciales sinápticos- son la base del procesamiento de información en el sistema nervioso.

La ACh actúa como intermediario químico en la transferencia del impulso nervioso desde el nervio al músculo. Permite amplificar el pequeño impulso que llega al terminal nervioso de tal manera que es capaz de disparar un potencial de acción en la fibra muscular. La enzima colintransferasa, localizada en el terminal axonal, sintetiza ACh en el terminal nervioso mediante la acetilación de la colina (Jablecki & Brimijoin 1974). La ACh se libera desde las vesículas sinápticas, donde se almacena, contribuyendo a la llegada del potencial de acción a las ramas distales del nervio motor y a su transmisión a la fibra muscular. Cuando llega un impulso al terminal, la membrana se despolariza abriendo los canales de Na^+ y se activan las corrientes de calcio dependientes de voltaje produciéndose una entrada masiva Ca^{2+} al terminal. Estos cationes Ca^{2+} apenas intervienen en el cambio de polaridad eléctrica pero su entrada en el terminal es responsable de la fusión de las membranas de las vesículas sinápticas con la membrana axoplásmica a nivel de las zonas activas, liberando ACh a la hendidura sináptica (Katz & Miledi 1965; Miledi 1973). Este proceso se confirmó al observar que el número de vesículas en el terminal disminuye tras estimular el nervio (Heuser & Reese 1973; Birks 1974), y las técnicas de criofactura permitieron visualizar las vesículas en el momento de la supuesta liberación del neurotransmisor (Heuser et al. 1974). Una vez las vesículas han descargado su contenido al espacio sináptico, la membrana de estas se fusiona con el axolema y el exceso de membrana se elimina del terminal nervioso para formar nuevas vesículas sinápticas. Este reciclaje tiene lugar en la periferia de la sinapsis donde la membrana presináptica integra la cubierta de las vesículas mediante su endocitosis (Heuser & Reese 1973). Por tanto, el estímulo para la secreción del neurotransmisor a la hendidura sináptica es la despolarización del terminal presináptico, producida por un

impulso nervioso, o bien artificialmente, en presencia de Ca^{2+} . En soluciones con baja concentración de Ca^{2+} o alta concentración de Mg^{2+} , se reduce e incluso se elimina la liberación de ACh.

La ACh liberada normalmente es suficiente para generar un potencial de placa postsináptico y, en consecuencia, se dispara un potencial de acción en la fibra muscular que resulta en la contracción muscular. Este fenómeno ocurre en escalas de tiempo del orden de ms e incluso de una fracción de ms. En la actualidad, se sabe que la neurotransmisión está finamente regulada a diferentes niveles y es inmensamente variable dependiendo de la sinapsis que se estudie. Estos mecanismos de regulación y las particularidades de cada sistema son los que le confieren a cada sinapsis la capacidad de codificar e integrar información, cumpliendo las funciones que caracterizan al sistema nervioso (Atwood & Karunanithi 2002; Abbott & Regehr 2004; Blitz et al. 2004).

2.1. Naturaleza cuántica de la liberación del neurotransmisor

En la década de 1950, Fatt y Katz describieron la existencia de un “ruido biológico” durante los registros de potenciales realizados con microelectrodos intracelulares en la placa neuromuscular de anfibios (Fatt & Katz 1950). A partir de esta observación, realizaron una descripción completa de lo que terminaron llamando potenciales “miniatura” (MEPPs, del inglés *miniature end plate potentials*). Estos autores demostraron que existe un gran parecido entre los potenciales miniatura y los potenciales de placa evocados y finalmente mostraron que las amplitudes siguen una distribución Gaussiana. El curso temporal y el efecto de varias drogas sobre los potenciales miniatura resultó ser indistinguible de los potenciales evocados (EPPs, del inglés *end plate potentials*) por estimulación del nervio. Debido a que la ACh es el transmisor en la sinapsis neuromuscular, tanto los MEPPs como los EPPs son aumentados y prolongados por el efecto de la prostigmina, una droga que inhibe la hidrólisis de la ACh por la acetilcolinesterasa (Fatt & Katz 1952). Del mismo modo, los potenciales de membrana (miniatura y evocados) son reducidos y eventualmente bloqueados por agentes que bloquean al receptor de ACh (Fatt & Katz 1952). También observaron que el incremento en la concentración de Mg^{2+} o la disminución en la concentración de Ca^{2+} extracelulares, bloqueaban la liberación de ACh y, en esta condición de baja eficiencia de liberación, la amplitud de los potenciales de placa evocados no seguía una distribución continua sino discreta (Del Castillo & Engbaek 1954; Del Castillo & Katz 1954). Estas observaciones llevaron a enunciar la hipótesis cuántica de la liberación del neurotransmisor, que postula

que los potenciales miniatura son unidades de liberación de neurotransmisor o quanta (Q , del latín *quantum*) y que los potenciales evocados son múltiplos enteros de un cuanto (Del Castillo & Katz 1954). La teoría cuántica permitió por primera vez modelar formalmente el proceso de neurotransmisión. Katz y sus colaboradores enunciaron el primer modelo formal que consiste en una distribución binomial de la amplitud de los EPPs que, bajo un régimen de baja probabilidad de liberación, se puede ajustar a una distribución de Poisson. En este modelo, los parámetros fundamentales que definen a una sinapsis son i) la amplitud de la respuesta producida por una única vesícula (tamaño de Q), ii) el número de sitios activos independientes (N) y la probabilidad de liberación en cada sitio (P). A partir de estos parámetros se puede definir el promedio de vesículas que se libera en cada potencial de acción como $P * N$. Este valor se conoce como “contenido cuántico” (m) y es un indicador de la fuerza de una sinapsis (Bennett & Kearns 2000).

Una vez caracterizada la naturaleza cuántica de la liberación en la placa neuromuscular de la rana, rápidamente se obtuvieron evidencias que validaron la hipótesis cuántica en los mamíferos (Liley 1956). En la actualidad, se reconoce la validez general de este modelo y se utiliza como marco teórico en el área de la transmisión sináptica en una variedad creciente de preparaciones, en sistemas y especies diferentes.

2.2. Participación del Ca^{2+} en el proceso de neurotransmisión

Durante las primeras décadas de estudio de la transmisión sináptica se describieron algunas características importantes. Entre ellas, se demostró la relevancia del Ca^{2+} en el proceso de liberación del neurotransmisor (Del Castillo & Stark 1952) y la relación supra lineal que existe entre la concentración extracelular de este ion y la cantidad de neurotransmisor liberado (Dodge & Rahamimoff 1967). Experimentos posteriores, realizados en la sinapsis gigante del calamar tratada con tetrodotoxina (TTX, del inglés *tetradotoxine*), mostraron que una despolarización de la presinapsis, independientemente de la ocurrencia de un potencial de acción, es suficiente para desencadenar la liberación del neurotransmisor y evocar potenciales sinápticos (Katz & Miledi 1966). La técnica de *voltage-clamp* permitió medir directamente la entrada de calcio al terminal presináptico en la sinapsis gigante de calamar. Con este abordaje experimental, se pudo establecer claramente la relación entre el potencial de acción y la entrada de calcio, mostrando también el curso temporal de la entrada de este ion. Además, por primera vez, se pudo medir directamente la relación entre la cantidad de

calcio que entra al terminal y la amplitud de la respuesta postsináptica (Llinás et al. 1972; Llinás & Nicholson 1975; Llinás 1982). En conjunto, estos trabajos evidenciaron la importancia del calcio como vínculo entre la actividad eléctrica y la actividad secretora (Katz & Miledi 1966).

- El Ca^{2+} y la actividad de PKC

En la actualidad, se utilizan diferentes modelos experimentales para estudiar los principios generales de la neurotransmisión así como las características particulares de cada sinapsis. En las motoneuronas de mamífero adulto, la transmisión neuromuscular depende en gran medida de la entrada de Ca^{2+} que proviene del medio externo a través de los canales VDCC (Katz & Miledi 1970), especialmente del tipo P/Q (Uchitel et al. 1992; Protti & Uchitel 1993; Hong & Chang 1995). La activación de PKC presináptica en las neuronas se asocia a la modulación de canales iónicos, a la desensitización de receptores y al aumento de exocitosis del neurotransmisor (Tanaka & Nishizuka 1994). Todos estos procesos participan en la modulación de la actividad y eficacia en variedad de sinapsis. Además, la actividad de PKC es dependiente del influjo de Ca^{2+} a través de los canales VDCC tipo P/Q (Santafé et al. 2005), de manera que aumenta cuando hay un aumento en el influjo de Ca^{2+} y se traduce en un aumento en la liberación del neurotransmisor (Santafé et al. 2007).

2.3. Plasticidad sináptica a corto plazo

En la mayor parte de las sinapsis químicas del sistema nervioso, la cantidad de neurotransmisor liberado por cada potencial de acción puede aumentar o disminuir dependiendo de la historia reciente del terminal presináptico. El incremento a corto plazo de la liberación de neurotransmisor se debe a la superposición de tres procesos presinápticos dependientes de Ca^{2+} que presentan distinta duración: un segundo o menos (facilitación), aproximadamente 30 segundos (aumentación) y varios minutos (potenciación posttetánica). Estos tres procesos se producen a causa de un aumento transitorio de la concentración de Ca^{2+} en el terminal presináptico tras la llegada de los potenciales de acción. Por otro lado, existen procesos de depresión presináptica que, al igual que los de facilitación, dependen de la probabilidad de liberación de neurotransmisor. De este modo, las sinapsis con alta probabilidad de liberación, como es el caso de la NMJ, presentan poca facilitación y se deprimen con mayor facilidad debido a que la liberación del contenido de todas las vesículas preparadas para liberarse

(depleción) ocurre con mayor rapidez. Por tanto, la plasticidad sináptica a corto plazo es un mecanismo que permite al sistema nervioso procesar e integrar temporalmente la información, ya sea amplificando o disminuyendo la capacidad de transmisión en los circuitos sinápticos.

En resumen, la sinapsis presenta diferentes formas de plasticidad sináptica dependiente de actividad. La plasticidad de corto término puede consistir en una disminución de la fuerza sináptica (depresión) o en un aumento de la misma (facilitación) (Zucker & Regehr 2002). El cambio puede durar, desde algunos milisegundos hasta varios segundos antes de que la sinapsis vuelva a funcionar dentro de sus niveles originales. Cuando la plasticidad sináptica funciona dentro de escalas temporales más largas, segundos a minutos, se habla de aumentación o potenciación postetánica. Del mismo modo, los fenómenos plásticos de duraciones todavía mayores se clasifican como plasticidad de largo término (LTP, del inglés *long term potentiation*). En todos los casos, las diferentes escalas temporales revelan la existencia de mecanismos de naturaleza diferente (Zucker & Regehr 2002; Fioravante & Regehr 2011). La plasticidad neta revela la interacción de diversos mecanismos que inciden sobre la fuerza sináptica. En muchas sinapsis, la actividad repetitiva lleva a una disminución transitoria de las respuestas postsinápticas.

- **Depresión sináptica a corto plazo**

La depresión sináptica puede darse por una depleción del *pool* de vesículas listas para ser liberadas (RRP, del inglés *readily-releasable pool*), por desensibilización del receptor postsináptico o por depresión de las corrientes de Ca^{2+} presinápticas, entre otras razones (Zucker & Regehr 2002). El *pool* de vesículas RRP, consiste en una proporción menor del total de vesículas sinápticas que se encuentran en el terminal (Rizzoli & Betz 2005). Cuando la actividad sináptica es más rápida que la tasa de reabastecimiento de este conjunto de vesículas, la fuerza sináptica disminuye ya que también hay disminución de la cantidad de vesículas disponibles. Esta visión predice que un aumento en la eficiencia inicial de liberación implica mayores niveles de depresión. Esto se cumple en muchos tipos de sinapsis: en el hipocampo (Debanne 1996) o en la córtico-talámica (Ran et al. 2009), entre otros ejemplos. En estos casos, la recuperación de la depresión puede durar varios segundos y también está relacionada con la elevación de la concentración de Ca^{2+} en el terminal presináptico (Dittman & Regehr 1998; Sakaba 2008). Una disminución de la entrada de calcio producida por la actividad repetitiva también podría

incidir sobre la tasa de liberación. Debido a la relación supralineal entre la concentración de Ca^{2+} y la liberación del neurotransmisor, pequeños cambios en la entrada de este ion pueden tener un fuerte impacto sobre la fusión de vesículas.

- **Facilitación**

La mayoría de las sinapsis que se caracterizan por tener una baja probabilidad de liberación inicial del neurotransmisor atraviesan procesos de facilitación (aumento de la fuerza sináptica) cuando son activadas en forma repetitiva (Katz & Miledi 1968). Este aumento en la amplitud de las respuestas sinápticas es dependiente del aumento de la concentración de Ca^{2+} en el terminal nervioso y puede durar hasta algunos segundos (Zucker & Regehr 2002; Fioravante & Regehr 2011). Uno de los mecanismos propuestos para explicar este fenómeno es la saturación de los *buffers* presinápticos ante la estimulación repetitiva (Neher 1998; Matveev et al. 2004).

- **Agrupaciones de vesículas sinápticas**

Una de las características primordiales de las sinapsis químicas es la existencia de un conjunto de vesículas localizadas en la proximidad del punto de contacto entre células. Desde los estudios pioneros sobre neurotransmisión se identificaron diferentes agrupaciones de vesículas que contenían a los neurotransmisores (Liley & North 1953; Elmqvist et al. 1964), además de un *pool* de reserva al que recurrir en situaciones de mucha actividad sináptica.

Las vesículas atraviesan un ciclo de reciclado que permite a las células la reutilización de las proteínas y lípidos que las componen. Normalmente la proporción de vesículas asociadas a la membrana es pequeña respecto al total. Las características fisiológicas permiten postular la existencia de varios conjuntos de vesículas: el *pool* de vesículas listas para liberarse (RRP), el *pool* de vesículas reciclables (RecP, del inglés *recycling pool*) y el *pool* de reserva (RP, del inglés *reserve pool*) (Sudhof 2004; Rizzoli & Betz 2005).

Cuando una sinapsis es estimulada de forma repetitiva durante períodos largos de tiempo, se puede observar una primera fase en la que se produce una disminución de la liberación hasta alcanzar una tasa estacionaria. La depresión sináptica inicial refleja la depleción del *pool* RRP mientras que el nivel de liberación que se mantiene en el estado estacionario refleja el reabastecimiento del RRP desde el RecP o desde el RP (Schneppenburger et al. 2002). Al número total de vesículas que participan de la exo- y endocitosis durante protocolos largos de estimulación se lo denomina RecP. Este *pool*

está compuesto por vesículas del RRP y vesículas del RP que reabastecen al primero (Sudhof 2004). El tamaño del RRP determina, parcialmente, la amplitud de las respuestas sinápticas. Modificaciones en el tamaño del *pool*, así como los cambios en la dinámica del ciclo de reciclado de vesículas, inciden sobre la eficiencia de liberación de las sinapsis y durante regímenes de actividad repetitiva (Sudhof 2004; Hosoi et al. 2007).

3. LA FAMILIA PKC

3.1. La proteína quinasa C: introducción

La proteína quinasa C (PKC, del inglés *protein kinase C*) es una enzima anfitrópica, es decir, que puede existir como forma soluble en el citosol y como proteína de unión a la membrana. Los componentes de esta superfamilia de quinasas tienen papeles clave en la regulación de multitud de procesos celulares entre los que se encuentran mecanismos de señalización de mitogénesis y proliferación celular, apoptosis, activación plaquetaria, reordenamiento del citoesqueleto de actina, modulación de canales iónicos, secreción y plasticidad sináptica (Ono et al. 1986; Nishizuka 1988; Ono et al. 1989; Bell & Burns 1991; Nishizuka 1995; Zhang et al. 1997; Lanuza et al. 2014; Tomàs et al. 2014).

En 1977, el equipo de Nishizuka definió por primera vez a la proteína C como una proenzima presente en la fracción soluble en tejido de mamífero que por proteólisis parcial adquiriría la función de una quinasa activa capaz de fosforilar sustratos (Inoue et al. 1977). Años después, Nishizuka estudió la activación de la PKC *in vivo* a través de lípidos y calcio (Nishizuka 1984). Más adelante se profundizó en el estudio del mecanismo de activación de esta familia de quinasas y se concluyó que la activación de la PKC se desencadena a partir de la unión de diversos compuestos extracelulares a sus receptores específicos lo que ocasiona la activación de la fosfolipasa C (PLC, del inglés *phospholipase C*). Ésta hidroliza fosfolípidos de membrana como el fosfatidilinositol (PIP_2 o $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$, del inglés *phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate*) y produce los segundos mensajeros diacilglicerol (DAG, del inglés *diacyl-glycerol*) e inositol trisfosfato (IP_3 , del inglés *inositol 1,4,5-trisphosphate*) (Nishizuka 1988), provocando un aumento de la concentración de calcio que afecta a numerosos procesos intracelulares, entre otros, la migración de algunas isoformas de PKC hasta su compartimento subcelular para ser activada por DAG. Precisamente, algunas PKC se han identificado como principales dianas de DAG, de forma que se activan cuando interactúan con este compuesto (Newton 1993; König et al. 1985) (König et al. 1985). Sin embargo, más adelante se descubrió que existían diversas isoformas de PKC que diferían en sus requerimientos de activación. Por otro lado, el descubrimiento de algunas PKC como receptores de alta afinidad para ésteres de forbol (Castagna et al. 1982), moléculas promotoras de tumores (Ashendel 1985), ha establecido la implicación de las PKC en procesos de carcinogénesis y también ha proporcionado herramientas farmacológicas con las que manipular estas

quinasas (Blumberg 1988). Esto pone de manifiesto la relevancia de la familia PKC en los mecanismos de señalización celular y, a su vez, la importancia de su estudio para el conocimiento de las vías intracelulares en las que está implicada.

Se han llevado a cabo numerosos estudios acerca de la base molecular de su activación y regulación que han ayudado a determinar la función de las diferentes isoformas de esta familia. De esta manera, en la actualidad se conocen distintos factores implicados en la regulación de su actividad enzimática como los cofactores lipídicos (DAG, fosfolípidos aniónicos, entre otros) (Ron & Kazanietz 1999) o el ion calcio, el estado de fosforilación de la enzima, su interacción con otras macromoléculas y su translocación a diversos compartimentos celulares (Mochly-Rosen 1995a; Dempsey et al. 2000; Newton 2001).

3.2. Las isoformas de la familia PKC

La proteína quinasa C (PKC) comprende una familia de 10 isozimas serina/treonina quinasas estructuralmente homólogas, que se encuentran ampliamente distribuidas en todas las células y se encuentran a elevadas concentraciones en el tejido nervioso (ver más adelante). En particular, la fosforilación presináptica de proteínas llevada a cabo por las isoformas de PKC es un importante mecanismo que regula la liberación de neurotransmisores (West et al. 1991; Numann et al. 1994; Byrne & Kandel 1996; Catterall 1999; Santafé et al. 2005). Se clasifican en tres grupos de acuerdo a sus características estructurales y a los cofactores que requieren para su activación. Las isozimas PKC clásicas o convencionales (cPKCs; α , β I, β II, y γ) son activadas por los segundos mensajeros Ca^{2+} y DAG (o ésteres de forbol) en presencia de fosfatidilserina (PS, del inglés *phosphatidylserine*). Las isozimas β I y β II son productos del mismo gen y sólo difieren en una pequeña región en el extremo carboxilo-terminal.

Las PKC noveles (nPKCs; ϵ , δ , η y θ) también requieren PS y DAG (o ésteres de forbol) para su completa activación pero son insensibles al ion Ca^{2+} . Ambas familias, cPKC y nPKC son dianas para el promotor tumoral PMA (del inglés, *phorbol-12-myristate-13-acetate*), que se ha usado extensamente en el estudio de la función de PKC. La tercera subfamilia la componen las PKC atípicas (aPKCs; ζ y ι/λ) y su activación no responde a ninguno de los segundos mensajeros (Mellor & Parker 1998).

La activación de estas isoformas *in vivo* implica su translocación desde el citosol a una fracción particular (Kraft & Anderson 1983) como respuesta a diferentes estímulos. A pesar de que su activación depende de fosfolípidos de membrana (Takai et al. 1979),

se localizan en una gran variedad de compartimentos diferentes a la membrana plasmática, incluyendo elementos del citoesqueleto (Mochly-Rosen et al. 1990), el aparato de Golgi (Saito et al. 1989), el perinúcleo (Mochly-Rosen et al. 1990), el núcleo (Masmoudi et al. 1989) o las mitocondrias (Budás & Mochly-Rosen 2007). La localización específica de las distintas isoformas de la familia PKC es crucial para responder eficientemente a la señal de los segundos mensajeros y para acceder a los sustratos de forma rápida (Newton 1997).

Las distintas isoformas presentan una distribución celular y tisular muy variada, lo que sugiere su participación específica en diversas funciones celulares (Tanaka & Nishizuka 1994; Mochly-Rosen & Gordon 1998). Muchas se expresan en las mismas células, responden a los mismos estímulos pero se translocan a distintos compartimentos intracelulares para mediar funciones únicas (Goodnight et al. 1995) o incluso funciones opuestas (Disatnik et al. 1994). Esta diversidad funcional ha supuesto un reto para los investigadores y durante las últimas décadas se han utilizado a menudo los activadores inespecíficos PMA y DAG y los inhibidores celeritrina (CEL, del inglés *chelerythrine*) y calfosteína (CaC, del inglés *calphostin C*) para asignar funciones biológicas específicas a PKC. Aunque estos métodos pueden establecer un papel para la PKC, son relativamente no-selectivos para las diferentes isozimas (Mochly-Rosen & Kauvar 1998; Tamaoki & Nakano 1990; Szallasi et al. 1994).

Se han utilizado con éxito diferentes aproximaciones para identificar las funciones específicas de estas isoformas: la introducción de un RNA pequeño de doble cadena siRNA (del inglés, *small interfering RNA*) para reducir la expresión de un gen específico (Rask-Madsen & King 2008); la sobreexpresión de diversas isozimas de PKC, que ha permitido relacionar a nPKC δ , nPKC ϵ y cPKC β I con las funciones cardíacas (Sun et al. 2011; Ferreira et al. 2011); o el uso de modelos *knockout*, por ejemplo, de la isoforma novel nPKC ϵ , que la implica en las señales nociceptivas y en la sensibilidad neuronal al etanol (Khasar et al. 1999; Hodge et al. 1999).

Durante las últimas décadas, el grupo de la Dra. Mochly-Rosen de la Universidad de Stanford ha desarrollado con éxito una aproximación diferente para modular específicamente la actividad de determinadas isozimas. En 1991, este equipo propuso la existencia de proteínas que actúan como receptores isozima-selectivos para las quinasas C activadas (RACKs, del inglés *Receptors for Activated C-Kinase*) y que actúan como responsables de la localización subcelular de éstas (D Mochly-Rosen et al. 1991). Así, la interacción de las isoformas de la PKC activadas con sus respectivas

proteínas de anclaje es imprescindible para que las quinasas se sitúen cerca de los sustratos para su fosforilación. La interrupción de estas interacciones selectivas proteína-proteína altera la localización de PKC impidiendo su función quinasas (Mochly-Rosen & Gordon 1998).

3.3. Estructura de las isoformas de la familia PKC

La categorización de las isoformas de la familia PKC basándose en sus propiedades enzimáticas se ve reforzada si comparamos la relación de éstas a nivel de su secuencia proteica. Desde el punto de vista estructural, todas las isozimas constan de una sola cadena polipeptídica donde se pueden identificar dos regiones bien definidas: la región reguladora en el extremo amino-terminal y la región catalítica en el extremo carboxilo-terminal, las cuales quedan separadas por la región variable V3 o región bisagra (Coussens et al. 1986; Newton 1993). En todas las subfamilias, las principales diferencias residen en la región reguladora, que determina la respuesta a los activadores, mientras que la región catalítica conserva una elevada homología entre las diferentes isoformas (Parker et al. 1986; Dempsey et al. 2000; Nishizuka 1995).

En los años 80 se clonó la primera isoforma de PKC y esto reveló la existencia de cuatro dominios conservados (C1-C4, unos reguladores y otros catalíticos) y cinco regiones variables (V1-V5) (Coussens et al. 1986). La región reguladora es un módulo funcional de unión a la membrana que incluye la secuencia denominada pseudosustrato y los dominios C1 y C2 (Newton 1995a). La región catalítica contiene el dominio quinasas o dominio catalítico, donde C3 y C4 contienen los sitios de unión para el ATP y para el sustrato susceptible de fosforilación por PKC (Kemp & Pearson 1990; Taylor & Radzio-Andzelm 1994).

Numerosos análisis bioquímicos y mutacionales han terminado de definir la función de cada uno de los dominios. Así, el dominio C1 posee una región rica en residuos de Cys y aparece duplicado en tándem (C1A y C1B) en las isoformas cPKC y nPKC, siendo el responsable de la unión al DAG y a los ésteres de forbol y por tanto de su activación (Ono et al. 1989; Bell & Burns 1991; Bittova et al. 2001). Las isoformas aPKCs, contienen una única copia de la secuencia y se les denomina dominios C1 atípicos (Mellor & Parker 1998; Newton & Johnson 1998). Los dominios C2 contienen los sitios de enlace para fosfolípidos ácidos (como la PS) y, en el caso de las isoformas clásicas, para los iones Ca^{2+} (Corbalán-García & Gómez-Fernández 2010). Este dominio está presente en las isozimas cPKCs y nPKCs pero no en las aPKCs (Newton & Johnson

1998). Tiene motivos proteínicos altamente conservados que se encuentran en una gran variedad de proteínas implicadas en la señalización celular o en el transporte de vesículas (Csukai et al. 1997; Corbalán-García & Gómez-Fernández 2010). Se ha demostrado que la interacción del dominio C2 de PKC con las proteínas RACK es determinante para la adecuada localización de la proteína en los diferentes compartimentos celulares (Ron et al. 1995). El extremo N-terminal del dominio C1 también contiene la secuencia pseudosustrato, la más conocida de las interacciones intramoleculares inhibitorias. Por último, el extremo C-terminal de la proteína contiene el dominio V5, presente en todas las isoformas de la PKC, que incluye sitios de fosforilación reguladores de la actividad de la proteína (Kheifets & Mochly-Rosen 2007). La región V5 de PKC también contiene sitios de unión específicos para RACK (Stebbins & Mochly-Rosen 2001) (figura I4).

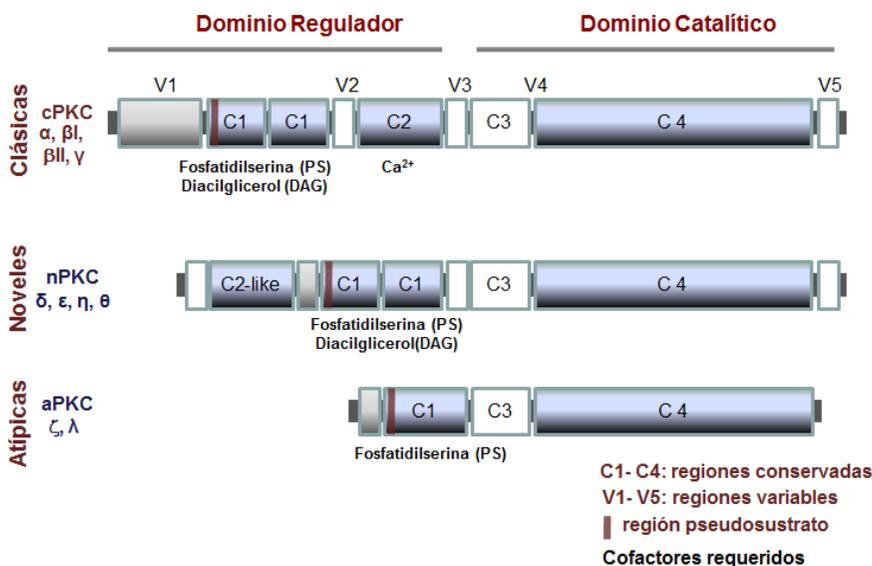


Figura I4. Estructura primaria de las isoformas de la familia PKC. Adaptación de *Molecular Biology of the Neuron*, Davies, R. W. and Morris, B. J.

3.4. Activación de PKC

La activación de PKC se produce como consecuencia de la llegada a la célula de señales extracelulares -neurotransmisores, hormonas, factores de crecimiento- que estimulan a los receptores de la superficie de la membrana. La principal ruta de activación de las isoformas cPKCs y nPKCs es la mediada por la familia de isozimas PLC, que están asociadas a la membrana plasmática. Estas isozimas catalizan la hidrólisis del PIP_2 para generar DAG y un aumento de los niveles intracelulares de Ca^{2+} (Nishizuka 1986).

Las isoformas PLC de tipo β y ϵ se activan a través de la interacción de receptores de membrana acoplados a proteínas G; las PLC de tipo γ se activan por estimulación de los receptores tirosina quinasa de la familia Trk (del inglés, *tropomyosin-receptor kinase*); y por último, la isoforma PLC de tipo δ , la isoforma más simple y ancestral, no responde a la activación de receptores y se especula que pudo emerger como generador de DAG Ca^{2+} -dependiente (Katan & Williams 1997; Wing et al. 2003). Los niveles de DAG en la membrana sufren una elevación transitoria debido a la acción de la PLC (Nishizuka 1995). El DAG sintetizado se mantiene en la membrana donde, además de activar por sí mismo a las isoformas cPKCs y nPKCs, actúa como precursor de otros compuestos lipídicos capaces de activar a las enzimas. Así, mientras el DAG queda asociado a la membrana, el IP_3 es soluble y se libera al citosol. El IP_3 interviene únicamente en la activación de las cPKCs de forma indirecta, provocando la liberación de iones Ca^{2+} desde los reservorios intracelulares al citoplasma tras la activación de los receptores IP_3 . Como resultado de la actuación del IP_3 , la concentración de Ca^{2+} libre en el citoplasma llega a aumentar hasta 100 veces (Nishizuka 1995). Las isoformas nPKCs no se unen a Ca^{2+} pero tienen mayor afinidad por el DAG que las isoformas clásicas (Nishizuka 1986), produciéndose un balance de respuestas a los activadores similar. Por otro lado, la activación de la PKC requiere también su fosforilación e interacciones específicas proteína-proteína.

El modelo actual para la activación de las isoformas cPKCs sugiere que la unión a Ca^{2+} aumenta la afinidad de PKC por la PS en la membrana celular. Esto permite a las quinasas 'buscar' y unirse a las pocas moléculas de DAG que se encuentran en las membranas biológicas (Nalefski & Newton 2001). La unión de dos dominios reguladores a la membrana libera a la secuencia pseudosustrato auto inhibitoria provocando cambios conformacionales en la quinasa. En la conformación inactiva de la enzima, el dominio pseudosustrato es capaz de bloquear el sitio activo presente en el dominio catalítico

inhibiendo así su actividad enzimática (House & Kemp 1987). Una vez que PKC está fosforilada y se ha unido a la membrana mediante la interacción con diversos efectores lipídicos, el pseudosustrato se libera de la región catalítica y esta queda accesible para la unión de los sustratos adoptando así su conformación activa (Newton 1995b; Ron & Kazanietz 1999; Johnson et al. 2000) (figura I5).

Por su parte, los ésteres de forbol, del mismo modo que el DAG, aumentan la actividad catalítica de la enzima. Sin embargo, la interacción de PKC con los ésteres de forbol es más fuerte y se mantiene durante más tiempo que su interacción con DAG. Esto se debe principalmente a que la metabolización de los ésteres se produce de forma más lenta que la del DAG (Nishizuka 1986; Mosior & Newton 1996). El descubrimiento de los ésteres de forbol como promotores tumorales (PMA) (Castagna & Yoshimi 1982) ha impulsado enormemente su investigación como herramienta farmacológica para la manipulación de PKC (Blumberg 1988). Los resultados de varios estudios experimentales han confirmado la especificidad de unión de los ésteres de forbol a las distintas isoformas de PKC y, además, ha quedado demostrado que las propiedades de estas interacciones son dependientes de la asociación de la proteína a la membrana (Hofmann 1997; Slater et al. 2002).

3.5. Regulación de PKC: interacciones proteína-proteína

Las interacciones proteína-proteína tienen un papel crítico en las vías de señalización intracelular (Mochly-Rosen 1995b; Liu et al. 2008). Además de las interacciones con lípidos y Ca^{2+} , mediadas por su unión a los dominios C1 y C2, se han descrito múltiples interacciones entre PKC y otras moléculas: proteínas adaptadoras, sustratos, elementos del citoesqueleto y receptores de quinasas activadas. Mientras que las interacciones intramoleculares auto-inhedoras regulan el estado de activación de la enzima, las denominadas intermoleculares determinan la especificidad de la función de PKC.

La regulación de las interacciones proteína-proteína es esencial para la ulterior activación de PKC y su localización subcelular y permite iniciar diversas cascadas de señalización. Una vez que PKC se ha activado en respuesta a la señal adecuada la proteína está preparada para fosforilar a los sustratos. Sin embargo, la promiscuidad de fosforilación que muestra PKC *in vitro* cuando hay proximidad enzima-sustrato, indica la necesidad de un mecanismo de interacción que regule su unión específica. Entre las proteínas que intervienen en esta interacción PKC-sustrato, se establecen dos grupos: las

proteínas RACK y las proteínas STICK (del inglés, *substrates that interact with PKC*) (Jaken & Parker 2000).

Las proteínas RACK no son sustratos de PKC pero se unen a la forma fosforilada activa de la enzima y facilitan su localización en determinadas zonas de las membranas celulares en proximidad a los sustratos de PKC (Daria Mochly-Rosen et al. 1991; Mochly-Rosen & Gordon 1998). Su interacción directa proteína-proteína facilita la fosforilación de los sustratos proteicos en los compartimentos subcelulares adecuados (Mochly-Rosen 1995b). Se han identificado varios sitios de unión a RACK en las isoformas β , ε y δ (*ver apartado 3.6.*); sobre las que actúan selectivamente (Daria Mochly-Rosen et al. 1991; Jaken & Parker 2000). Se ha propuesto un mecanismo de actuación para las proteínas RACK, según el cual, cuando estas proteínas receptoras se unen a la forma activa de PKC, lo hacen en un lugar ocupado por un dominio pseudo-RACK, cuyo desplazamiento por parte de la proteína RACK, favorecería la actividad fosforiladora de PKC (Ron & Mochly-Rosen 1995; Mochly-Rosen & Gordon 1998) (figura I5).

Se han clonado y caracterizado dos proteínas que cumplen los criterios para RACK: se unen únicamente a isozimas activas, de forma específica y saturable (D Mochly-Rosen et al. 1991). El primer RACK identificado y clonado fue RACK1 y se describió como una proteína selectiva para las isoformas clásicas cPKC β (Ron et al. 1994; Ron et al. 1995; Rodriguez et al. 1999). RACK1 no es un sustrato para PKC, sin embargo, en su presencia aumenta la fosforilación de sustratos por acción de la quinasa (Ron et al. 1994). Se une a cPKC β sólo en presencia de los activadores adecuados (DAG, Ca²⁺ y PS) e incrementa la actividad de PKC. Contiene aproximadamente 40 aminoácidos implicados en las interacciones proteína-proteína (Ron & Kazanietz 1999) y une cPKC β a través de una región situada en el dominio C2 (Ron et al. 1995) y una región adicional situada en el dominio V5 (Stebbins & Mochly-Rosen 2001). Más adelante se identificó a ε RACK, una proteína coatómero involucrada en el transporte vesicular. También conocida como β' COP (del inglés, *coatomer subunit beta'*), esta proteína es selectiva para la isoforma nPKC ε (Csukai et al. 1997).

El lugar de la interacción PKC-proteína varía según la isoenzima PKC y la proteína con la que se establezca dicha interacción. En algunos casos, la región reguladora de PKC media en la interacción y, en otros, es el dominio catalítico (Newton 2001). Como ejemplos de esta variabilidad, nPKC ε interacciona con la proteína ε RACK a través de la región variable 1 (V1) (Csukai et al. 1997); mientras que es el dominio C1

de esta misma isoenzima el que establece su interacción con la F-actina (Prekeris et al. 1996; Prekeris 1998). Sin embargo, la interacción de la F-actina con la ϵ PKC β se produce a través de la región variable 5 (V5) de su dominio catalítico (Blobe et al. 1996).

A diferencia de RACK, las proteínas STICK son sustratos de PKC y su asociación a la enzima está regulada por el estado de fosforilación de la misma (Jaken & Parker 2000; Jaken 1996). Otro caso de interacción PKC-proteína, lo constituyen las proteínas que se unen simultáneamente a PKC y a otras proteínas implicadas en señalización celular, lo que facilita la interacción entre distintas rutas de transmisión de señales. A este tipo de proteínas se las conoce como “proteínas soporte” o “proteínas de anclaje” y como ejemplo de las mismas se puede citar a la proteína AKAP79 (del inglés, *A-kinase-anchoring protein 79*), que interacciona simultáneamente con PKC y con la proteína quinasa A (PKA, del inglés *protein kinase A*), coordinando las actividades de ambas (Jaken & Parker 2000). Las proteínas RACK actúan en algunos casos como “proteínas soporte”. En este sentido, está demostrado que la proteína RACK1 media la interacción de ϵ PKC con el regulador transmembrana de la fibrosis quística (CFTR, del inglés *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) y con las integrinas, formando complejos trimoleculares, lo que pone de manifiesto un nuevo mecanismo que relaciona la activación de PKC con la adhesión y motilidad celular mediada por integrinas (Besson et al. 2002; Liedtke et al. 2002). El extremo C-terminal de todas las isoformas de PKC contiene sitios de fosforilación imprescindibles para la localización y la actividad de las quinasas (Newton 2003). La regulación de la región variable V5 de autofosforilación involucra a la chaperona molecular Hsp70 (del inglés, *heat shock protein 70*) y a la proteína PDK-1 (del inglés, *phosphoinositide-dependent kinase*), cuya unión protege esta región de su defosforilación y degradación (Gao et al. 2001). En estado defosforilado, PKC es sensible a degradación por proteólisis vía ubiquitinación (Lee et al. 1997; Lu et al. 1998). En este mismo estado, PKC interacciona con la chaperona molecular Hsp70 que la estabiliza y permite su reciclaje como una enzima soluble y reactivable. Por lo tanto, el bloqueo de la asociación PKC/Hsp70 facilita la interacción de PKC con elementos del citoesqueleto y su eventual degradación mediante proteólisis (Gao & Newton 2002) (figura I5).

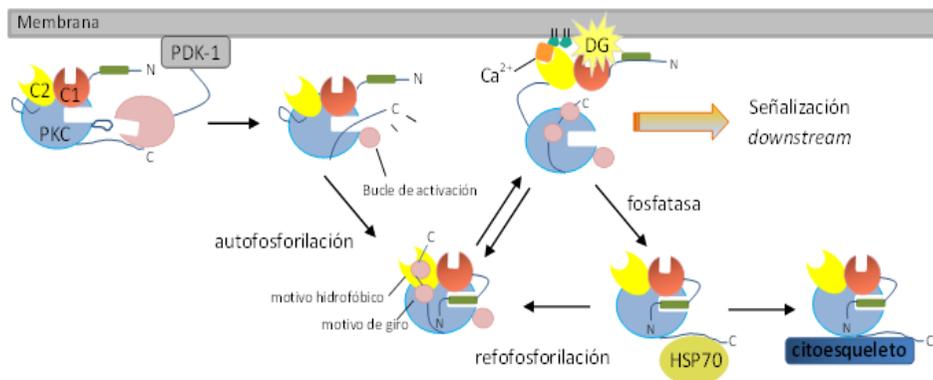


Figura 15. Modelo que muestra el ciclo de vida de PKC, desde su biosíntesis a su degradación. La PKC recién sintetizada se asocia con la membrana en una conformación abierta, en la que el dominio pseudo-sustrato (en verde) es liberado del dominio de unión a sustrato (se muestra como una cavidad rectangular en PKC) y por tanto el extremo C-terminal está expuesto para permitir la unión de PDK-1. PDK-1 fosforila un segmento en PKC (bucle de activación) y es liberado del extremo C-terminal. Este C-terminal liberado, accede al dominio de unión al sustrato que se autofosforila por un mecanismo intramolecular. La enzima fosforilada es liberada al citosol (PKC madura y catalíticamente competente), donde se mantiene en una conformación inactiva por el enlace pseudo-sustrato. La generación de Ca^{2+} y DAG dirigen a PKC a la membrana. La unión de los dominios C1 y C2 a la membrana proporciona la energía necesaria para liberar al pseudo-sustrato del segmento de unión al sustrato, permitiendo los eventos de señalización intracelular. En su conformación activa, PKC es rápidamente defosforilada. La chaperona molecular Hsp70 se une al motivo de giro defosforilado y estabiliza a PKC, permitiendo que ésta sea refosforilada y que entre de nuevo en el *pool* de PKC catalíticamente competentes para la señalización. En ausencia de unión de Hsp70, o como resultado de una activación crónica, PKC defosforilada se acumula en una fracción celular detergente-insoluble, donde será eventualmente degradada. Adaptación de *Alexandra C. Newton, Biochemical Journal, 370, 361-371, 2003.*

3.6. Modulación de la función de PKC: péptidos derivados del dominio de unión a RACK

La interacción de diferentes dominios de PKC con los receptores RACK determina la localización subcelular de las isoformas, anclando la isozima activa cerca de su sustrato específico (J. Johnson et al. 1996; Csukai et al. 1997). La especificidad de la interacción RACK-PKC está mediada por los dominios C2 y V5 de PKC. Por lo tanto, los péptidos derivados de estas regiones tiene capacidad de inhibir selectivamente la translocación de las isozimas al compartimento subcelular correspondiente y, por tanto, sus funciones celulares (Mochly-Rosen & Gordon 1998) (*ver apartado 5.2., materiales y métodos*); o por el contrario, actuarán como activadores de la translocación de las isoformas, activando también su función celular isozima-específica.

El valor terapéutico potencial de los inhibidores y activadores de la translocación isozima-selectivos presenta un gran interés tanto en la investigación básica como en la industria farmacéutica. Estos péptidos, que contienen los lugares de unión a RACK, pueden introducirse directamente en las células y así determinar los roles específicos que presentan las diferentes isozimas en las múltiples vías de señalización (Dempsey et al. 2000; Battaini & Mochly-Rosen 2007). El estudio de la regulación de estas isoformas permite identificar su papel en diversas patologías como cáncer (Griner & Kazanietz 2007), dolor (Khasar et al. 1999), diabetes (Sampson & Cooper 2006), adicción (Newton & Ron 2007), infarto de miocardio (G. Budas et al. 2007), isquemia (Budas & Mochly-Rosen 2007), angiogénesis (Teicher et al. 2002) o la regulación de la respuesta inmune (Isakov & Altman 2002).

Se han diseñado péptidos cortos derivados de diferentes dominios de PKC (Bommert et al. 1993; Ron & Mochly-Rosen 1995) que actúan como antagonistas competitivos de la interacción específica isozima-RACK y péptidos que actúan como agonistas, como se verá a continuación. Estos péptidos constan de 6-10 aminoácidos y se introducen en las células por diferentes métodos: permeabilización celular transitoria en presencia del péptido (Johnson et al. 1996; Gray et al. 1997), uso de péptidos *carrier* como TAT (del inglés, *transactivator of transcription*) o péptidos cortos de poliarginina (Chen et al. 2001; Wadia & Dowdy 2003), expresión de los péptidos como transgenes (Dorn et al. 1999; Mochly-Rosen et al. 2000) o microinyección del péptido (Ron et al. 1995).

- Péptidos inhibidores de la función de cPKC β

El primer péptido inhibidor de la translocación de PKC fue descrito para las isoformas clásicas cPKC β (Ron & Mochly-Rosen 1995). El péptido β C2-4, derivado del dominio C2, inhibe la translocación de las isoformas cPKC β I y cPKC β II en cultivos de cardiomiocitos (Ron et al. 1995) y se ha utilizado para definir funciones celulares de cPKC β (Yedovitzky et al. 1997; Wu et al. 1999). Por ejemplo, el uso de este péptido implica a las isoformas de PKC que contienen este dominio en la regulación de canales de Ca²⁺ tipo L (Zhang et al. 1997). Además, involucra a estas isoformas en la proliferación celular en cultivos de células mesangiales de rata (Wu et al. 1999; Ron & Mochly-Rosen 1995).

Las isoformas clásicas cPKC β I y cPKC β II, como productos de *splicing* del mismo gen, difieren únicamente en su extremo C-terminal, la región variable V5 (Ono et al. 1986; Ono et al. 1987). Se ha visto que la especificidad de unión a RACK de ambas isozimas es conferida por distintas secuencias en los dominios β IV5 y β IIV5. Por lo tanto, para estudiar el papel de cPKC β I y cPKC β II en diversos procesos celulares, se han sintetizado péptidos cortos derivados de las regiones menos conservadas entre los dominios β IV5 y β IIV5. Entre otras funciones, el péptido β IV5-3 (aminoácidos 646-651) inhibe la hipertrofia inducida por PMA en cultivos de cardiomiocitos (Stebbins & Mochly-Rosen 2001).

- Péptidos inhibidores de la función de nPKC ϵ y nPKC δ

La región variable V1 de la isoforma novel nPKC ϵ es el dominio de unión a su receptor ϵ RACK (o β 'COP, ya que es parte del complejo coatómero COPI). La unión del receptor a nPKC ϵ sólo sucede en presencia de activadores y es esencial en el transporte vesicular de proteínas (Csukai et al. 1997). Se ha identificado un fragmento peptídico de 8 residuos contenido en la región ϵ V1 denominado ϵ V1-2 (Johnson et al. 1996). Su secuencia primaria, EAVSLKPT, está muy conservada entre especies remotas evolutivamente como son *Aplysia* y rata (Gray et al. 1997; Yedovitzky et al. 1997) (figura I6).

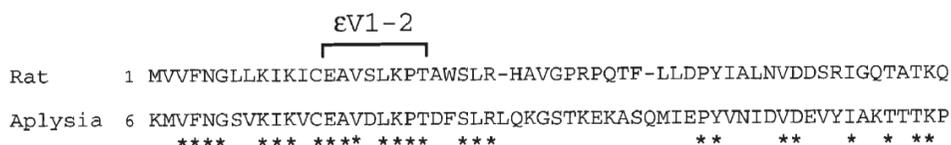


Figura 16. Secuencia parcial del dominio εV1 de rata y *Aplysia californica* que contiene la secuencia εV1-2. Los asteriscos indican los residuos aminoácidos idénticos. Extraído de *Souroujon and Mochly-Rosen, Nature Biotechnology, 1998*.

Se ha identificado también un fragmento derivado de la región variable VI de la isoforma novel nPKCδ, denominado δV1 (Johnson et al. 1996) (Gerstin et al. 1998), a través del cual nPKCδ se une a su RACK específico. La interacción PKC-RACK en el caso de la subfamilia novel ocurre a través del dominio C2-like, que no une Ca²⁺ (Mochly-Rosen & Gordon 1998; Way et al. 2000) (Way et al. 2000). Por lo tanto, los péptidos derivados de esta región no inhiben a las isoformas clásicas ya que son dependientes de Ca²⁺ y no contienen este dominio. Se han utilizado los péptidos inhibidores εV1-2 y δV1 (ambos derivados de la región VI de PKC) de las isoformas nPKCε y nPKCδ respectivamente (Souroujon & Mochly-Rosen 1998), para su inhibición específica. Diversos estudios demuestran que estas isoformas presentan funciones opuestas en el mismo tipo celular (cardiomiocitos) (Gray et al. 1997; Csukai & Mochly-Rosen 1999; Dorn et al. 1999), mostrándose por tanto la especificidad de isoforma de los péptidos. Otros estudios muestran que los efectos producidos por la inhibición de la translocación de nPKCε con εV1-2 se confirman también en ratones *knockout* (Khasar et al. 1999; Di-Capua et al. 2003). Además, εV1-2 inhibe las actividades inducidas por PMA en cultivos de cardiomiocitos (Johnson & Mochly-Rosen 1995; J. Johnson et al. 1996) demostrando que también modula la función de nPKCε.

El uso de εV1-2 ha revelado el papel cardioprotector de nPKCε en un modelo de muerte celular inducida por isquemia (Gray et al. 1997; G. R. Budas et al. 2007), frente a excitabilidad cardíaca (J. Johnson et al. 1996; Hu et al. 2000; Ferreira et al. 2012), en la supervivencia celular (Mayne & Murray 1998) y un papel protector frente a tumores tiroideos (Knauf et al. 1999). Además, esta isoforma tiene un importante papel en la regulación de la actividad de los canales de Ca²⁺ tipo L, situados en los túbulos T de cardiomiocitos (Hu et al. 2000), donde colocan la isoforma nPKCε activada y su εRACK (Disatnik et al. 1995; Csukai et al. 1997).

- Péptidos activadores de la función de PKC

La habilidad de los inhibidores de la translocación de PKC para bloquear selectivamente la función de las isozimas indica que para que éstas sean funcionales, se requiere su translocación. Por lo tanto, los activadores de la translocación de la PKC deben ser también agonistas de su función, independientemente de los segundos mensajeros que normalmente activan a la PKC. Según el modelo presentado en la figura I7, para que un péptido cumpla la definición de agonista de PKC, debe unirse a PKC y provocar que el sitio catalítico quede expuesto y permita la unión a RACK.

Se han identificado varios péptidos que, una vez introducidos en las células, provocan la translocación de las isoformas cPKCs y activan la función de la isoforma cPKC β (Ron & Mochly-Rosen 1994; Ron & Mochly-Rosen 1995). También se han identificado activadores isozima-selectivos para la isoforma novel nPKC ϵ , el péptido pseudo- ϵ RACK (aminoácidos 85-92), derivado de su dominio regulador (Dorn et al. 1999). La activación de la isoforma nPKC ϵ con el péptido pseudo- ϵ RACK, es suficiente para conferir a los cardiomiocitos protección frente a la isquemia en estudios realizados *in vitro* e *in vivo* (Souroujon & Mochly-Rosen 1998; Dorn et al. 1999); también involucra a nPKC ϵ en mecanismos de hiperalgesia por alteraciones mitocondriales (Parada et al. 2003; Joseph et al. 2007; Joseph & Levine 2010).

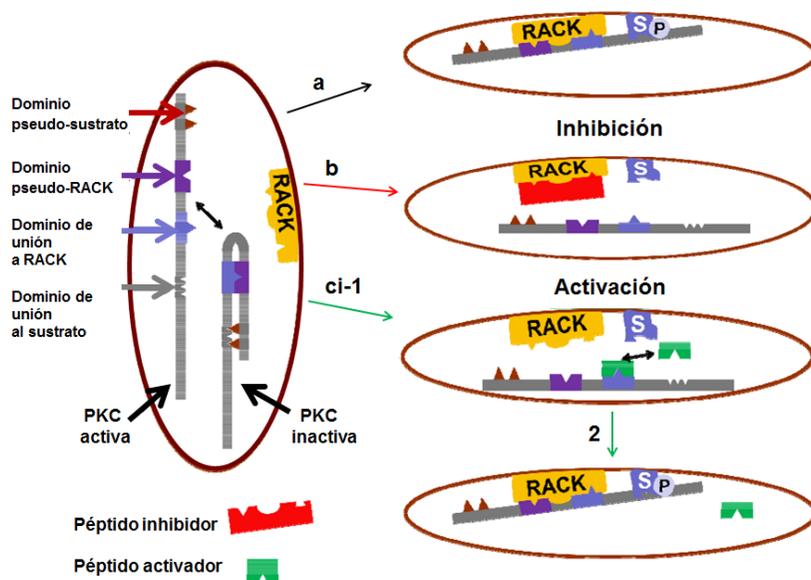


Figura 17. Modelo de regulación peptídica de las interacciones proteína-proteína entre las isoformas PKC y sus proteínas de anclaje. Se muestran los receptores para las quinasas C activadas (RACKs), proteínas de anclaje específicas para las isoformas PKC (en naranja) y la correspondiente isoforma PKC (en gris). La isoforma está en equilibrio entre las conformaciones activa e inactiva. Se señalan cuatro dominios de interacción intramolecular: el dominio pseudo-sustrato, el dominio pseudo-RACK y los dominios de unión a RACK y al sustrato. (a) Tras su activación, las isoformas de PKC se unen a las moléculas receptoras RACK, permitiendo la fosforilación de sus respectivos sustratos localizados en la proximidad (en azul). (b) El péptido inhibidor-antagonista competitivo (en rojo), que corresponde a una secuencia contenida en PKC, se une al sitio de unión de PKC en RACK, compitiendo con la interacción proteína-proteína entre PKC y RACK de forma que inhibe la fosforilación del sustrato. (c) Agonista alostérico (1) El péptido activador (en verde) deriva del dominio pseudo-RACK de PKC. Se une a la isoforma PKC en el lugar de unión a RACK, desplazando el equilibrio hacia la conformación activa. (2) La afinidad del péptido pseudo-RACK con la PKC es menor que la afinidad con RACK, permitiendo a PKC unirse a RACK y fosforilar al sustrato. Adaptación de *Ni Qvit and Daria Mochly-Rosen, Drug Discovery Today: Disease Mechanisms, 2010.*

4. LA FAMILIA PKC Y LA NEUROTRANSMISIÓN EN LA NMJ

En los últimos años se ha investigado ampliamente la participación local de los receptores de membrana presinápticos en la liberación de ACh y su interrelación en la neuromodulación presináptica. En este contexto, se ha estudiado el papel de las serina/treonina quinasas intracelulares como principales efectoras de la modulación sináptica. Como parte del mecanismo de regulación de la liberación del neurotransmisor, los autorreceptores presinápticos muscarínicos (mAChRs) y los autoreceptores purinérgicos de adenosina (PIRs, del inglés *purinergic PI receptors*) se acoplan directamente a la liberación de ACh (Caulfield 1993; Garcia et al. 2005; Minic et al. 2002; Santafé et al. 2007; Santafé et al. 2004; Santafe et al. 2003; Slutsky et al. 1999) y a la secreción de adenosina (ADO, del inglés *adenosine*), respectivamente (Correia-de-Sá et al. 1991). También, los receptores purinérgicos de ATP (del inglés, *adenosine triphosphate*), P2Rs, participan en el control de la transmisión neuromuscular en las NMJ de rana y rata (Salgado et al. 2000; Grishin et al. 2005; De Lorenzo et al. 2006; Garcia et al. 2014). Por otra parte, los receptores de factores tróficos (TFRs, del inglés *trophic factor receptors*) tales como los receptores presinápticos de neurotrofinas (Bibel 2000; Roux & Barker 2002; Pitts et al. 2006) y los receptores presinápticos de citoquinas tróficas (Stoop & Poo 1995; Nai et al. 2010) cooperan en el control local de la neurotransmisión. Por lo tanto, la confluencia de diversas rutas de señalización mediadas por receptores metabotrópicos en las quinasas efectoras, que actúan fosforilando sustratos proteicos, contribuye a la funcionalidad de las sinapsis. Las quinasas de la familia serina/treonina, en particular las proteínas quinasas A y C, son elementos básicos en el proceso de señalización. Ambas quinasas son las más ubicuas y participan en la exocitosis del neurotransmisor en las NMJs (West et al. 1991; Numann et al. 1994; Tanaka & Nishizuka 1994; Byrne & Kandel 1996; Catterall 1999; Santafé et al. 2005).

Los receptores mAChRs, PIRs y TFRs se encuentran localizados en la NMJ de adulto (Santafe et al. 2003; Garcia et al. 2013; Tomàs et al. 2014). Todos están presentes en los terminales nerviosos de la motoneurona, siendo esta una condición necesaria para su participación directa en la modulación de la neurotransmisión. A continuación, se resume su participación individual en la liberación de ACh espontánea y evocada.

En las sinapsis colinérgicas, los autorreceptores presinápticos mAChRs modulan la liberación del neurotransmisor. En la NMJ adulta, los subtipos de receptores muscarínicos, M1 y M2, modulan la liberación evocada de ACh mediante *feedbacks* positivos y negativos, respectivamente (Slutsky et al. 1999; Minic et al. 2002; Santafé et

al. 2006; Santafé et al. 2003). Los receptores M2 inhiben la liberación de ACh ya que su bloqueo selectivo con metoctramina (MET, del inglés *methoctramine*) aumenta la neurotransmisión evocada. Por el contrario, el bloqueo de M1 con pirenzepina (PIR, del inglés, *pirenzepine*) la reduce, por tanto este receptor participa en el *feedback* positivo aumentando la liberación de ACh en el terminal. El bloqueo y la activación inespecíficos de mAChRs con atropina (AT, del inglés *atropine*) y oxotremorina M (OXO-M, del inglés *oxotremorine M*), producen un aumento y disminución de la neurotransmisión evocada en un 150% y un 65%, respectivamente. Por lo tanto, cuando la ACh endógena modula la función de M1-M2 predomina la función del receptor M2, relacionada con la inhibición tónica de la neurotransmisión evocada. Además, el mecanismo muscarínico influye directamente en la actividad quinasa de PKA y PKC (Santafé et al. 2007; Santafé et al. 2009). Mientras que PKA tiene un papel constitutivo en la liberación normal del neurotransmisor, PKC se acopla a la neurotransmisión cuando hay un bloqueo selectivo de los receptores M1 o M2 (Santafé et al. 2005). Esto permite a PKC aumentar la liberación de ACh en condiciones tónicas, ya que la CaC tiene un efecto inhibitorio (Santafé et al. 2006). Sin embargo, PKA permanece desacoplada (Santafé et al. 2005). Estos estudios destacan, por tanto, la participación coordinada de ambas quinasas en las cascadas de señalización intracelular en relación a la activación de mAChRs, y enfatizan en el papel de PKA y PKC en el control de la transmisión en la sinapsis neuromuscular. En cuanto a la neurotransmisión espontánea, la modulación de M1 y/o M2 resulta en la disminución de la frecuencia de los MEPPs. Por lo tanto, la liberación espontánea y evocada de ACh disminuye cuando hay un desequilibrio en la función normal de los receptores M1 y M2.

Los autoreceptores PIRs (del inglés *purinergic PI receptors*), denominados A₁R (del inglés *adenosine A1 receptor*) y A_{2A}R (del inglés *adenosine A2A receptor*) se localizan en los tres componentes celulares (García et al. 2013). Desde los estudios pioneros de Ribeiro y Walker (1973), se conoce que la adenosina y el ATP liberados por los terminales nerviosos modulan el mecanismo presináptico a través de los autoreceptores purinérgicos P1Rs y P2Rs, respectivamente (Correia-de-Sá et al. 1991). De hecho, la actividad en el terminal nervioso y también en el músculo, contribuyen a generar la adenosina extracelular (Cunha & Sebastião 1993). La evaluación de los diversos efectos de los ligandos de PIRs apunta a un complejo mecanismo purinérgico (Ribeiro et al. 1996; Sebastião & Ribeiro 2000; Fredholm et al. 2005). Nuestro grupo ha reevaluado algunos aspectos relacionados con el papel de los receptores de adenosina,

A₁R y A_{2A}R, en la modulación de la liberación de ACh en la NMJ. Ambos receptores limitan la neurotransmisión espontánea y reducen la depresión sináptica durante actividad repetitiva, por lo que parecen tener un papel conservador y protector de la función sináptica (García et al. 2013). En cuanto a su interdependencia con otros receptores presinápticos, se ha visto que el funcionamiento normal de los receptores mAChRs depende de la operatividad normal de los receptores PIRs y, de forma recíproca, el bloqueo de mAChRs no permite la modulación de la neurotransmisión a través de PIRs. Además, la adenosina puede transactivar la vía de señalización TrkB de forma independiente a la unión de neurotrofinas, regulando por tanto también esta vía (Wiese et al. 2007).

Los receptores presinápticos de neurotrofinas también participan en el control local de la neurotransmisión en el modelo neuromuscular (Pitts et al. 2006). El receptor TrkB (del inglés, *tropomyosin-related kinase B*) es el único receptor de neurotrofinas involucrado hasta el momento en el control inmediato de la liberación de ACh en adulto (Zhan et al. 2003; Pitts et al. 2006). La adición exógena de BDNF y NT-4 provoca el aumento de la neurotransmisión evocada a través de TrkB, mientras que su bloqueo farmacológico con K-252-a, anti-TrkB (47/TrkB) o ANA-12 (N2-(2-((2-oxoazepan-3-yl) amino) carbonyl) phenyl) benzo[b]thiophene-2 carboxamide) resulta en la reducción de la neurotransmisión evocada (García et al. 2010). Se han investigado las interacciones funcionales de TrkB con PKA y PKC y se ha visto que actúan en cooperación en la liberación de ACh (Santafé et al. 2014). TrkB modula la neurotransmisión sólo si la vía de señalización a través de PKC está operativa. Además, la activación de PKA necesita que la vía TrkB sea funcional (Santafé et al. 2014). Se ha encontrado una relación de interdependencia entre las vías mAChRs y BDNF-TrkB, encontrándose que el funcionamiento normal del mecanismo muscarínico es un prerrequisito para el acoplamiento de TrkB a la neurotransmisión. De forma recíproca, el funcionamiento normal de TrkB modula la vía muscarínica (García et al. 2010). Respecto a la neurotransmisión espontánea, al contrario que sucede con los receptores mAChRs, la estimulación o inhibición de TrkB siempre conlleva su aumento.

En la NMJ, los receptores mAChRs, los receptores de adenosina y los receptores de neurotrofinas y otros factores tróficos, cooperan en la modulación de la plasticidad sináptica a corto plazo (facilitación y depresión) (Tomàs et al. 2014). En condiciones basales es poco probable que sucedan fenómenos de facilitación en las NMJs, sin embargo, son más probables los fenómenos de depresión durante actividad

repetitiva (Zucker & Regehr 2002; Holohean & Magleby 2011). Este modelo de sinapsis presenta una alta probabilidad de liberación del neurotransmisor tras un impulso nervioso y, en estas condiciones, la depresión sináptica se observa típicamente como una disminución de la amplitud de los EPPs durante estimulación eléctrica repetitiva del terminal nervioso (Liley & North 1953; Mallart & Martín 1968; Magleby 1973; Wu & Betz 1998; Dittman et al. 2000; Stevens & Williams 2007). Esta actividad repetitiva resulta en la liberación del contenido (depleción) de las vesículas del *pool* RRP y, por tanto, en la disminución de vesículas liberadas tras un potencial de acción, lo que causa la depresión sináptica. De acuerdo con este modelo de depleción, la magnitud de la depresión dependerá del número de vesículas del *pool* de reserva, del número de vesículas del *pool* RRP y de la tasa de transición entre ambas agrupaciones de vesículas.

En conclusión, la función sináptica es el resultado de la confluencia de diversas vías de señalización mediadas por receptores metabotrópicos que modulan la respuesta sináptica final. Estos receptores se acoplan a un repertorio limitado de isoformas de PKC que serán activadas. Dado que una o más isoformas presinápticas de PKC parecen estar implicadas en la modulación de la neurotransmisión, el estudio de su actividad nos proporciona las herramientas necesarias para conocer con mayor profundidad el proceso de transmisión sináptica.

5. LA FAMILIA PKC Y LOS PROCESOS SINÁPTICOS DE ACTIVIDAD-DEPENDENCIA: EL CASO DE LA SUBFAMILIA ϵ PKC

La actividad sináptica en las neuronas es esencial para el desarrollo y el funcionamiento normal del sistema nervioso. Todas las sinapsis químicas tienen en común un mecanismo de acción básico: la liberación del neurotransmisor por acción del influjo de calcio durante el potencial de acción presináptico (Zucker 1996). La acción presináptica de PKC y PKA se encuentra entre los mecanismos que modulan la liberación del neurotransmisor provocando cambios en la eficacia sináptica (Santafé et al. 2005; Santafé et al. 2006; Santafé et al. 2009) y, en el sistema neuromuscular, se ha descrito como una acción dependiente de la estimulación eléctrica (Jia et al. 1999; Lanuza et al. 2000; Li et al. 2001). En concreto, la fosforilación presináptica llevada a cabo por PKC es un importante mecanismo que regula la liberación del neurotransmisor.

Han sido descritas varias isoformas de la familia PKC en la NMJ: α , β , ϵ , δ , θ , ζ y η (Nakano et al. 1992; Arakawa et al. 1993; Hilgenberg & Miles 1995; Lanuza et al. 2000; Perkins et al. 2001; Kim et al. 2002; Brandt et al. 2003; Perrini et al. 2004; Rose et al. 2004; Vary et al. 2005; Besalduch et al. 2010; Lanuza et al. 2010; Lanuza et al. 2014; Besalduch et al. 2013). En este modelo de sinapsis, algunas isoformas participan en la liberación presináptica de ACh, en la contracción de las fibras musculares (ambos procesos Ca^{2+} -dependientes) y en procesos de actividad-dependencia tales como la eliminación sináptica durante el desarrollo postnatal. Como se ha comentado anteriormente en términos generales, los estudios sobre la distribución subcelular de la familia PKC indican que la actividad quinasa se asocia predominantemente con la fracción de la membrana plasmática (Kraft & Anderson 1983; Oancea & Meyer 1998; Tsuruno & Hirano 2007) y que la selectividad por los sustratos determina la compartimentalización de las isoformas. Por lo tanto, conocer la localización subcelular de las diferentes isozimas en la sinapsis neuromuscular es imprescindible para evaluar su participación en las actividades sinápticas. Así mismo, es necesario identificar los mecanismos que las activan y sitúan en los compartimentos subcelulares para conocer mejor el papel fisiológico que desempeñan.

Se ha estudiado la distribución de las isoformas clásicas en los tres componentes de la NMJ. La isoforma PKC β I está exclusivamente localizada en los terminales

nerviosos (Besalduch et al. 2010), por tanto podría tener un papel específico en la liberación del neurotransmisor. En este sentido, cPKC α también podría estar involucrada en esta función, ya que se encuentra en el terminal presináptico, pero su expresión es más ubicua. Las isoformas cPKC α y cPKC β II se expresan en el componente postsináptico y en las células de Schwann (Besalduch et al. 2010), mientras que la isoforma cPKC γ se ha detectado principalmente en el sistema nervioso central y en la médula espinal (Nishizuka 1995), siendo prácticamente inexistente en la NMJ.

Varios estudios establecen que la contracción muscular inducida por estímulo eléctrico incrementa la translocación de PKC a su lugar de acción (Antipenko et al., 1999; Cleland et al., 1989; Richter et al., 1987). Estudios recientes relacionan a las isoformas clásicas con la actividad sináptica, encontrando que el aumento de la actividad acompañado de contracción muscular provoca el incremento de las isoformas α , β I y β II en la fracción de la membrana sináptica pero no en el citosol (Besalduch et al. 2010), además de una mayor actividad quinasa. Por el contrario, cuando la contracción muscular está bloqueada, la estimulación eléctrica de las fibras musculares provoca un descenso en los niveles de estas isoformas y la fosforilación de los sustratos disminuye (Besalduch et al. 2010). En resumen, la contracción muscular parece necesaria para mantener o aumentar los niveles de las isoformas cPKCs en la membrana y sugiere que podría requerir un *feedback* neurotrófico positivo desde el componente postsináptico. Por tanto, la contracción muscular tendría un efecto trófico positivo en la activación de estas isoformas en la NMJ.

Estudios realizados sobre preparaciones neuromusculares eléctricamente inactivas, muestran que PKC permanece desacoplada del mecanismo de liberación del neurotransmisor, ya que su inhibición inespecífica con CaC no afecta a la liberación evocada de ACh (Santafé et al. 2005). Sin embargo, en presencia de alto Ca²⁺ (5 mM) la neurotransmisión se incrementa en un 100% y, en estas mismas condiciones, el bloqueo inespecífico de PKC provoca su reducción (Besalduch et al. 2010). Además, la estimulación eléctrica de las fibras de la NMJ a baja frecuencia (1 hora de estimulación eléctrica continua a 1 Hz para inducir una actividad fisiológica moderada) también acopla a PKC a la neurotransmisión. Por tanto, parece que PKC está involucrada en el mantenimiento de la actividad sináptica y cuando está activada, es factible que una o varias isoformas modulen la liberación del neurotransmisor. Dado que la isoforma nPKC ϵ participa en varias funciones neurales, incluyendo la liberación del

neurotransmisor (Shirai et al. 2008), en este trabajo de tesis estudiaremos su participación en diversos procesos sinápticos de actividad-dependencia.

6. LA ISOFORMA NOVEL nPKC ϵ

6.1. Introducción

La quinasa nPKC ϵ es una de las isoformas principales de la subfamilia novel de PKC. A través de la fosforilación de residuos de serina y treonina, nPKC ϵ puede modificar funciones proteicas con eficacia y de forma reversible, afectando a diversos eventos celulares. Aunque fue extensamente caracterizada en la pasada década y es una de las isoformas de PKC predominantes en el cerebro, todavía no se conoce con exactitud su papel en las neuronas. Sin embargo, esta isoforma parece ser un factor esencial en las vías de transducción de señales neurales. Los avances en biología molecular han permitido el estudio de las funciones de nPKC ϵ *in vivo*, implicándola en funciones biológicas en las neuronas y asociándola a enfermedades neurogénicas tales como el preconditionamiento isquémico (Budás & Mochly-Rosen 2007), el dolor (Khasar et al. 1999), la inflamación (Aksoy et al. 2004), la adicción al alcohol (Newton & Ron 2007) o la ansiedad (Lesscher et al. 2008).

Datos preliminares de nuestro grupo localizan a la isoforma nPKC ϵ en la NMJ de rata adulta (Lanuza *et al.*, FENS 2006), sugiriendo su participación en las funciones sinápticas en este modelo neuromuscular. Su localización exacta y su participación en la neurotransmisión en la NMJ serán exploradas en este trabajo de tesis doctoral.

6.2. Distribución tisular de nPKC ϵ

La isoforma nPKC ϵ se expresa en gran variedad de tejidos y células. Se encuentra en grandes cantidades en el sistema nervioso central (Shirai et al. 2008), en el músculo esquelético (Moraczewski et al. 2002; Rose et al. 2004; Vary et al. 2005), y en otros tejidos periféricos como el cardiovascular, el pancreático o el sistema nervioso entérico (Erdbrügger et al., 1997; Evans et al., 2003; Furness et al., 2006). Estudios de inmunohistoquímica relevan una mayor expresión de esta isoforma en el hipocampo, las islas de Calleja, el tubérculo olfatorio (Akita 2002), y una expresión moderada en el córtex cerebral, en el núcleo olfatorio anterior, en el *nucleus accumbens* y en el *striatum* (Minami et al. 2000; Patten et al. 2007).

La inmunoreactividad de nPKC ϵ es evidente en las fibras nerviosas y la observación precisa mediante microscopía electrónica del hipocampo revela su

localización presináptica (Saito et al. 1993; Tanaka & Nishizuka 1994). Esta distribución sugiere la participación de nPKC ϵ en las funciones del componente presináptico, entre ellas, la liberación del neurotransmisor o la regulación de canales iónicos (Shirai et al. 2008; Van Kolen et al. 2008; Sieburth et al. 2007). También participa en la formación de sinapsis en el cerebro, ya que su expresión aumenta de forma coincidente con la construcción de la red neuronal (Shirai et al. 2008). Diversos estudios funcionales, que vamos a ver a continuación, demuestran que la activación de nPKC ϵ es consistente con su papel en las neuronas.

6.3. nPKC ϵ y las funciones presinápticas

Estudios farmacológicos y electrofisiológicos involucran a la isoforma nPKC ϵ en la potenciación a largo plazo (LTP), uno de los componentes del mecanismo de aprendizaje y memoria en el hipocampo, consistente con la localización de nPKC ϵ en el componente presináptico de las fibras musgosas (Tao et al. 1996; Hussain & Carpenter 2001). La nPKC ϵ presináptica también tiene un papel clave en la maduración de las sinapsis (Dumuis et al. 1988). Hama y colaboradores (2004) demostraron que la sinaptogénesis excitatoria es bloqueada por inhibidores de PKC, siendo nPKC ϵ la isoforma involucrada. Además, la regulación de la eficacia sináptica y sinaptogénesis inducida por PMA parece mediada por la activación de las isoformas nPKC δ y nPKC ϵ , contribuyendo a la plasticidad sináptica del sistema nervioso (Kim et al. 2013). Por lo tanto, nPKC ϵ participa en la regulación y modulación presináptica, aunque no hay consenso en el papel de nPKC ϵ en LTP.

La isoforma nPKC ϵ participa en la liberación del neurotransmisor. Generalmente, la activación sostenida de PKC es necesaria para la regulación presináptica de la plasticidad neural (Saito et al. 1993) pero únicamente la isoforma nPKC ϵ puede unir directamente F-actina, que mantiene a nPKC ϵ en su conformación catalíticamente activa (Prekeris et al. 1996; Prekeris 1998). Esta unión es estable y ancla a la isozima a la matriz del citoesqueleto, donde mantiene la exocitosis de glutamato en el terminal presináptico (Prekeris et al. 1996). nPKC ϵ también regula la endocitosis vía F-actina en las células epiteliales (Song et al. 1999) y en las células secretoras (Muallem et al. 1995). Más aún, nPKC ϵ participa en el aumento de la exocitosis de glutamato inducida por ésteres de forbol en el terminal nervioso (Saitoh et al. 2001) y en la potenciación sináptica inducida por ésteres de forbol (Dumuis et al. 1988).

También se relaciona a esta isoforma con la regulación de canales iónicos. En las neuronas del hipocampo, la unión de ACh a los receptores mAChRs activa, a través de PLC, a la isozima nPKC ϵ y esta fosforila a los canales de Na⁺ reduciéndose de los picos de corriente producidos (Chen et al. 2005). La reducción de las corrientes de Na⁺ por nPKC ϵ se relaciona con la nocicepción inducida por un estímulo inflamatorio repetitivo (Villarreal et al. 2009). Por otro lado, la activación de nPKC ϵ aumenta la actividad de los canales de Ca²⁺ tipo N potenciándose la potencia la transmisión sináptica rápida (Chen et al. 2006). Además, se ha involucrado a nPKC ϵ en la regulación de los canales VDCC en astrocitos en cultivo (Burgos et al. 2007). Otros estudios sugieren que las interacciones nPKC ϵ -VDCC tienen implicaciones en disminución de las respuestas nociceptivas (Saegusa et al. 2001). En el hipocampo de rata, nPKC ϵ inicia una vía de señalización por fosforilación del canal mitocondrial K-ATP (+), una diana importante en el preconditionamiento isquémico (Raval et al., 2007). Esta respuesta adaptativa a la isquemia se ha relacionado en diversos trabajos con la isoforma nPKC ϵ .

La localización de nPKC ϵ en la membrana plasmática y/o el citoesqueleto cortical (Shirai et al. 2008) relacionan a esta isoforma con un papel mediador de varios factores neurotrogénicos (Kolkova et al. 2005). La isoforma nPKC ϵ activada interactúa con PIP₂ y F-actina en la membrana participando en la inducción del crecimiento neurítico (Hundle et al. 1995; Zeidman et al. 2002; Shirai et al. 2007) a través de su dominio regulador. Por lo tanto, la asociación de nPKC ϵ con la actina también es esencial para el desarrollo neurítico. Se han propuesto diversas proteínas asociadas a nPKC ϵ que involucran a esta isoforma en la función neurítica, como el sustrato MARCKS (del inglés, *myristoylated alanine-rich C-kinase substrate*) (Yamaguchi et al. 2009) o la proteína asociada al crecimiento neuronal (GAP43, del inglés *growth-associated protein 43*).

6.4. Estructura y regulación de nPKC ϵ

La isoforma nPKC ϵ fue definida como una serina/treonina quinasa Ca²⁺-independiente y activable por DAG y ésteres de forbol (Akita 2002)(Yonezawa et al. 2009). Comparte varias características estructurales con otros miembros de la familia PKC, que incluyen un dominio C1 de unión a DAG (y a ésteres de forbol), un dominio C2-like de unión a fosfolípidos, un dominio pseudosustrato, los dominios catalíticos C3 y C4 que contienen el sitio de unión para ATP, un bucle de activación y un dominio de reconocimiento del sustrato (Newton & Ron 2007; Newton & Messing 2010) (figura I8). Presenta una secuencia de 6 aminoácidos de unión a actina (LKKQET), localizada en los aminoácidos 223-228 del dominio C1 (Prekeris et al. 1996). Esta secuencia no se encuentra en el resto de la familia PKC y está implicada en los cambios morfológicos en las neuronas (Zeidman et al. 2002).

La isoforma nPKC ϵ catalíticamente madura es activada por diferentes segundos mensajeros, DAG, PIP3 y ácidos grasos, producidos por estímulos fisiológicos como PDGF (del inglés, *platelet-derived growth factor*) o bradiquinina (Moriya et al. 1996; Graness et al. 1998). El activador endógeno principal de esta isoforma es DAG, que puede ser imitado por el forbol éster PMA, un potente e inespecífico agonista de PKC. Estudios previos indican que la liberación evocada de ACh es fuertemente potenciada por PMA (Santafé et al. 2005) mediante su unión al dominio C1 de PKC. La localización subcelular de la quinasa depende parcialmente de qué segundo mensajero se una a los dominios C1A y C1B (Stahelin et al. 2005). En respuesta a DAG y a ácidos tridecanoicos, nPKC ϵ se localiza en la membrana plasmática y/o en el citoesqueleto; mientras que la unión de los ácidos araquidónico (AA) y linoleico la sitúan en el aparato de Golgi (Shirai et al. 1998; Shirai et al. 2007). Los residuos aminoacídicos que están exclusivamente en la isoforma nPKC ϵ , concretamente en el dominio regulador C1, unen F-actina de forma estable (Prekeris et al. 1996) y localizan a esta isoforma activada en la fracción del citoesqueleto. Esta unión estimula un aumento persistente de la actividad constitutiva de nPKC ϵ , pudiendo mantenerla activa durante horas independientemente de su actividad catalítica (Prekeris et al. 1996; Prekeris 1998).

Los mecanismos de regulación de nPKC ϵ son los mismos que para el resto de isozimas: unión de cofactores, fosforilación e interacciones proteína-proteína. Para llevar a cabo su actividad enzimática y responder a los reguladores alostéricos, nPKC ϵ debe estar en su conformación activa. La quinasa PDK-1 fosforila el bucle de activación,

mientras que el motivo de giro y el motivo hidrofóbico se autofosforilan (Cenni et al. 2002). Aunque en el caso de nPKC ϵ , recientes evidencias apuntan a mTOR (del inglés *mammalian target of rapamycin*) como responsable de la fosforilación de ambos sitios (Facchinetti et al. 2008). Estos eventos de fosforilación, que son constitutivos en el caso de las isozimas cPKCs, parecen estar regulados para la isoforma nPKC ϵ . Por lo tanto, existe un *pool* de nPKC ϵ sin fosforilar que puede ser reclutado para la señalización a través de receptores acoplados a PI3Ks (del inglés, *phosphoinositide-3-kinases*), que a su vez activan a PDK-1 (Cenni et al. 2002; Olive et al. 2005). Varios estudios de inmunoprecipitación y co-localización sitúan a nPKC ϵ inmadura en el aparato de Golgi (Takahashi et al. 2000) asociada a proteínas de anclaje.

La activación de nPKC ϵ implica su translocación a múltiples localizaciones subcelulares (Disatnik et al. 1995). El dominio C2-like de esta isoforma contiene la secuencia que une ϵ RACK/ β 'COP y ancla a nPKC ϵ a su sitio de acción intracelular (Brandman et al. 2007). Por lo tanto, la interrupción de esta unión con péptidos inhibidores reduce la señalización a través nPKC ϵ (Churchill et al. 2009). Estas secuencias están conservadas evolutivamente en nPKC ϵ , difieren de las secuencias correspondientes a otras isoformas de PKC y participan en interacciones intramoleculares que estabilizan a nPKC ϵ en una conformación cerrada inactiva que será interrumpida por la activación de la misma (J. Johnson et al. 1996; Schechtman et al. 2004) (figura I8).

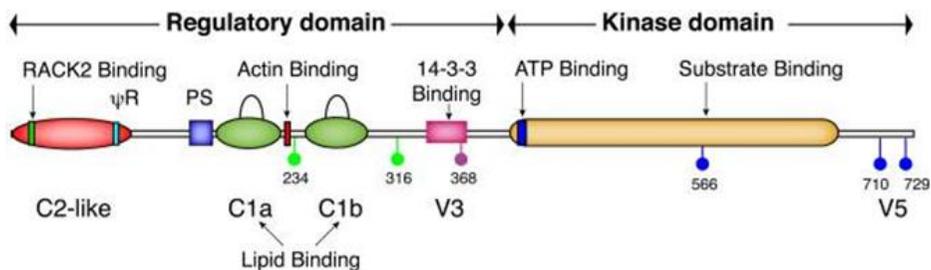


Figura 18. Diagrama de la estructura primaria de nPKCε. Se muestran las regiones conservadas comunes (C) entre los miembros de la familia PKC, incluyendo al dominio pseudosustrato (PS) que se une al dominio de unión al sustrato cuando la enzima está inactiva, los dominios C1a y C1b que unen DAG, PS y ésteres de forbol (p.e. PMA) y el dominio C2-like que contiene una secuencia (EAVSLKPT, aminoácidos 14-21), de unión a εRACK y una secuencia pseudo-RACK, homóloga al sitio de unión en εRACK. Se muestra también el dominio quinasa, que está muy conservado entre los miembros de la familia, y que contiene los sitios de unión para ATP y los sustratos proteicos. Las regiones únicas de nPKCε incluyen un sitio de unión a actina situado entre los dos dominios C1, y una región bisagra V3 que contiene un sitio de autofosforilación (Ser-368) necesario para la unión de las proteínas 14-3-3. Como el resto de las quinastas, nPKCε debe ser cebada para mostrar su actividad. La fosforilación de los sitios en el bucle de activación, el motivo de giro y el motivo hidrofóbico se muestran también (en azul) en los dominios quinasa y V5. En verde, se muestran otros sitios que pueden ser autofosforilados *in vitro*.

6.5. Proteínas de anclaje y chaperonas de nPKC ϵ

La interacción nPKC ϵ - ϵ RACK es responsable de la localización de la nPKC ϵ activa en el aparato de Golgi (Csukai et al. 1997) o en los miofilamentos (Huang 2004), donde nPKC ϵ ejerce su función. Sin embargo, se han identificado otras proteínas que sitúan a esta isoforma en otras localizaciones subcelulares y, además de actuar como proteínas de anclaje o chaperonas, en ocasiones son también sustratos de nPKC ϵ .

Por ejemplo, la unión de la familia de proteínas adaptadoras 14-3-3 a nPKC ϵ , estabiliza a la isoforma activa en ausencia de lípidos y, además, la formación de este complejo es imprescindible en la fase final del ciclo de mitosis celular (Saurin et al. 2008). Otro sustrato relevante de nPKC ϵ es la histona H1 (Zhao et al. 2004), que ancla a la isozima activada en el núcleo donde participa en la regulación de la expresión génica. La unión de nPKC ϵ a F-actina estabiliza la conformación activa de la isoforma (Prekeris et al. 1996; Prekeris 1998) y, por tanto, representa un papel de proteína de anclaje y chaperona específica para nPKC ϵ . Recientemente se ha demostrado que la chaperona Hsp90 es responsable de la translocación nPKC ϵ a las mitocondrias, donde ejerce funciones de cardioprotección (Budás et al. 2010).

La isoforma nPKC ϵ está involucrada en la regulación de diversas funciones celulares, aunque sólo han sido positivamente identificadas tres proteínas como sustratos directos de nPKC ϵ en las numerosas vías de señalización en las que participa. Estas son las quinasas Akt/PKB (del inglés, *protein kinase B*) y PKD (conocida como PKC μ) y el factor de transcripción STAT3 (del inglés, *signal transducer and activator of transcription 3*), siendo este último el único factor de transcripción conocido hasta la fecha como sustrato de nPKC ϵ . Su fosforilación directa tiene efecto cardioprotector (Rozengurt et al. 2005) e inductor de angiogénesis.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

LA PROTEÍNA QUINASA C ÉPSILON EN LA UNIÓN NEUROMUSCULAR DE MAMÍFERO ADULTO: LOCALIZACIÓN,
REGULACIÓN MEDIANTE ACTIVIDAD SINÁPTICA Y ACOPLAMIENTO A LA LIBERACIÓN DE ACETILCOLINA.

Teresa Obis Ibáñez

Dipòsit Legal: T 1609-2015

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

LA PROTEÍNA QUINASA C ÉPSILON EN LA UNIÓN NEUROMUSCULAR DE MAMÍFERO ADULTO: LOCALIZACIÓN,
REGULACIÓN MEDIANTE ACTIVIDAD SINÁPTICA Y ACOPLAMIENTO A LA LIBERACIÓN DE ACETILCOLINA.

Teresa Obis Ibáñez

Dipòsit Legal: T 1609-2015

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

LA PROTEÍNA QUINASA C ÉPSILON EN LA UNIÓN NEUROMUSCULAR DE MAMÍFERO ADULTO: LOCALIZACIÓN,
REGULACIÓN MEDIANTE ACTIVIDAD SINÁPTICA Y ACOPLAMIENTO A LA LIBERACIÓN DE ACETILCOLINA.

Teresa Obis Ibáñez

Dipòsit Legal: T 1609-2015

En el presente trabajo de tesis doctoral se formula la siguiente **hipótesis**:

La isoforma novel épsilon de la familia de las serina/treonina quinasas C (nPKC ϵ) se expresa y se localiza presinápticamente en la sinapsis neuromuscular adulta, indicando la especialización de esta isoforma en funciones particulares de la sinapsis neuromuscular. La actividad sináptica provoca la activación de la isoforma nPKC ϵ y la contracción muscular regula su acción presináptica mediante la acción del receptor de neurotrofinas TrkB. Además, la actividad de nPKC ϵ regula la fosforilación de MARCKS, una molécula implicada en la exocitosis de vesículas sinápticas. Finalmente, nPKC ϵ está implicada en el mecanismo de la liberación evocada de ACh en la sinapsis neuromuscular adulta a través de las actividades de PKC, PKA y de los autoreceptores muscarínicos M1/M2.

El presente trabajo de tesis doctoral tiene como **objetivo genérico** el análisis de la localización, función y regulación de la isoforma novel nPKC ϵ en la unión neuromuscular adulta. Específicamente, se analiza la localización de la isoforma novel nPKC ϵ en la unión neuromuscular, sus cambios de expresión en relación a la actividad sináptica, su regulación por la contracción muscular, su posible implicación en la fosforilación de MARCKS, así como su implicación en el mecanismo de secreción del neurotransmisor.

En trabajos previos realizados en la Unidad de Histología y Neurobiología de la URV, se ha determinado que PKC se acopla a la liberación de ACh cuando se impone una actividad moderada en la NMJ adulta mediante la aplicación de un estímulo eléctrico continuo de 1 Hz, directamente en el nervio frénico. Esto indica la participación de esta familia de quinasas en la liberación del neurotransmisor y su regulación por parte de la actividad sináptica. Sin embargo, no se conoce qué isoforma/s participa/n y/o tiene/n el papel efector en el mecanismo de la neurotransmisión. Se conoce que la isoforma novel nPKC ϵ se expresa en el cerebro y está implicada en funciones sinápticas. Sin embargo, se desconoce si esta isoforma se localiza en la unión neuromuscular y su distribución celular precisa en la misma, así como su implicación funcional.

La contracción muscular inducida por estimulación eléctrica moderada incrementa la translocación de PKC a la membrana, indicando la activación de PKC y, por tanto, el aumento de su actividad catalítica. Sin embargo, no se ha estudiado si esta contracción afecta específicamente a la translocación de la isoforma nPKC ϵ .

Estudios realizados con el pan-inhibidor de PKC, CaC, demuestran que PKC se acopla a la liberación del neurotransmisor cuando se introduce una actividad fisiológica moderada (1 Hz). También sucede cuando el medio contiene una concentración elevada de Ca²⁺ extracelular. Sin embargo, no se conoce qué isoforma/s de la familia PKC es inhibida por CaC y, por tanto, responsable de su acoplamiento a la neurotransmisión.

Todas las isoformas de la familia PKC son activadas por ésteres de forbol, tales como el PMA, que actúa potenciando la liberación de ACh. Sin embargo, no se ha determinado si la isoforma nPKC ϵ interviene en el aumento de la liberación de ACh inducida por PMA.

Las PKCs presinápticas participan en la modulación de la neurotransmisión en relación con PKA, que modula su acoplamiento a la liberación de ACh. Sin embargo, no se conoce la relación funcional de las serinas/ quinasas nPKC ϵ y PKA en la modulación de la neurotransmisión.

Las PKCs presinápticas participan en la modulación de la neurotransmisión en relación con los autoreceptores muscarínicos, que las necesitan para operar correctamente. A su vez, la modulación muscarínica de la liberación de ACh a través de los receptores presinápticos M1/M2 controla la actividad de PKC. Sin embargo, no se conoce a través de qué isoformas/s opera este mecanismo.

Dados los antecedentes explicados en la introducción y justificados brevemente en los párrafos anteriores, los **objetivos específicos** planteados en este trabajo son los siguientes:

1- Estudio de la expresión y localización de nPKC ϵ en el músculo esquelético

- Conocer los niveles de nPKC ϵ en el músculo esquelético de rata de 6 días y adulta.
- Conocer si nPKC ϵ se expresa en la fracción de la membrana sináptica en el músculo esquelético adulto.
- Conocer la localización de nPKC ϵ en la NMJ adulta.

2- Estudio de la regulación de nPKC ϵ por la actividad presináptica y la contracción muscular

- Conocer la expresión y la fosforilación de la nPKC ϵ en músculos en reposo y estimulados eléctricamente.
- Conocer el efecto de la contracción muscular sobre los niveles de nPKC ϵ y de pnPKC ϵ en la fracción de la membrana sináptica.
- Conocer si TrkB está implicado en los cambios en la expresión de nPKC ϵ provocados por contracción muscular.
- Analizar si la fosforilación de la molécula relacionada con la exocitosis MARCKS depende de nPKC ϵ en la NMJ y si esta fosforilación depende de la actividad sináptica (con y sin contracción muscular).

3- Estudio de la implicación de nPKC ϵ en la neurotransmisión

- Estudiar el acoplamiento de nPKC ϵ a la liberación evocada de ACh en la NMJ.
- Conocer la participación de nPKC ϵ en la potenciación de la neurotransmisión inducida por la acción de PMA.
- Conocer la participación de nPKC ϵ en la modulación de la neurotransmisión mediante la interacción con PKA y M1/M2 (mAChRs)

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

LA PROTEÍNA QUINASA C ÉPSILON EN LA UNIÓN NEUROMUSCULAR DE MAMÍFERO ADULTO: LOCALIZACIÓN,
REGULACIÓN MEDIANTE ACTIVIDAD SINÁPTICA Y ACOPLAMIENTO A LA LIBERACIÓN DE ACETILCOLINA.

Teresa Obis Ibáñez

Dipòsit Legal: T 1609-2015

CAPÍTULO II.

MATERIALES Y MÉTODOS

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

LA PROTEÍNA QUINASA C ÉPSILON EN LA UNIÓN NEUROMUSCULAR DE MAMÍFERO ADULTO: LOCALIZACIÓN,
REGULACIÓN MEDIANTE ACTIVIDAD SINÁPTICA Y ACOPLAMIENTO A LA LIBERACIÓN DE ACETILCOLINA.

Teresa Obis Ibáñez

Dipòsit Legal: T 1609-2015

1. ANIMALES

Para la realización de los experimentos con animales, se dispuso de la autorización del Comité Ético de Experimentación Animal de la Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud de la Universidad Rovira i Virgili, en Reus. Los animales fueron tratados de acuerdo con las directrices establecidas por la ley 5/1995 de protección de los animales utilizados para la experimentación y para otras finalidades científicas, aprobada el año 1995 por el Parlamento de Catalunya. Se utilizaron roedores de dos especies diferentes: ratones machos adultos (25-30 g) de la cepa Swiss y ratas Sprague-Dawley (neonatas y adultas). En el periodo adulto, se utilizaron animales de 30-45 días postnatales (80-100 g). Se trabajó también con ratas de 6-7 días obtenidas a partir de cruzamientos controlados en el estabulario de la Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud de la Universidad Rovira i Virgili. Se examinaron las posibles diferencias entre las dos especies en relación a la neurotransmisión colinérgica y no se encontraron para ninguno de los parámetros estudiados.

Los animales fueron suministrados por la casa comercial Charles River (Criffa, Barcelona) y se mantuvieron en el estabulario en jaulas estándar de MakrolonR (23x46x14 cm³). La temperatura ambiental se mantuvo constante a 20-22 °C, regulada por un termostato electrónico, y una humedad relativa del 60-70 %. Los ciclos de luz artificial fueron de 12 horas con neón de luz blanca y 12 horas de oscuridad. La alimentación e hidratación de los animales adultos se realizó *ad libitum*, a base de pienso de mantenimiento para rata y ratón del tipo VRF-1 suministrada por la firma comercial Charles River, y agua clorada.

Los animales fueron anestesiados con la administración intraperitoneal de tribromoetanol al 2 % (TBE, 0,15 ml por cada 10 g del peso corporal). La eficacia de la anestesia se comprobó observando la pérdida de reflejos del animal. Una vez anestesiado, el animal fue desangrado para proceder a la extracción del músculo esquelético (*ver apartado 2*).

2. MODELOS MUSCULARES ESQUELÉTICOS

2.1. Levator auris longus

El músculo levator auris longus (LAL) fue descrito por primera vez por Denis Angaut-Petit y colaboradores, en 1987. Es un músculo adecuado para los estudios de localización mediante inmunohistoquímica debido a sus características morfológicas y a su fácil manipulación (*ver apartado 9*). El LAL es un músculo superficial ubicado en la parte dorsal de la cabeza y el cuello de los mamíferos. Este músculo consiste en una parte craneal y otra caudal. La porción craneal es fina y plana, está constituida por capas de fibras musculares que se originan en las espinas de la cuarta vértebra cervical y se dirigen hacia la parte anterior de la base del pabellón auricular donde están insertadas. La porción caudal es más gruesa que la porción craneal, sus fibras se extienden desde la cuarta y quinta vértebra cervical hacia la parte posterior de la base del pabellón auricular. Estas porciones están separadas entre sí por una zona delgada de tejido conectivo. Ambas regiones se encuentran inervadas por la rama auricular posterior del nervio facial que sigue la arteria auricular posterior y alcanza al músculo en su borde caudal, cerca de la aurícula (figura M1). El nervio pasa sobre la superficie ventral del músculo, donde se divide en pequeñas ramificaciones que se distribuyen sobre las fibras. La mayoría de los terminales neuromusculares se encuentran en la superficie ventral, los restantes están localizados en la parte dorsal que linda con la piel o entre las capas de fibras.

Se trata de un músculo muy plano, con unas 5 o 6 capas de células (5.25 ± 0.78) en la parte craneal (Lanuza et al. 2001) y con una parte caudal más gruesa (Angaut-Petit et al. 1987; Erzen et al. 2000). Esta propiedad facilita la manipulación histológica *in toto* (Tomas et al. 2000), permitiendo observar la inervación de todo el músculo sin tener que hacer secciones de este. El grosor del músculo LAL, su patrón de inervación y su transparencia son favorables para realizar experimentos electrofisiológicos (Angaut-Petit et al. 1987; Santafé et al. 2001) y de fluorescencia (Lanuza et al. 2007). En la figura M2 se muestran imágenes de microscopía confocal de una inmunohistoquímica realizada en el músculo LAL. Debido a su morfología plana y fina, las terminaciones nerviosas quedan al descubierto, pudiéndose intuir la localización de las placas motoras (Tomas et al. 2000). En la figura M2a-b se muestran imágenes laterales de un corte semifino de un LAL teñido con azul de metileno, donde se aprecian las pocas capas de miocitos e incluso una rama nerviosa intramuscular.

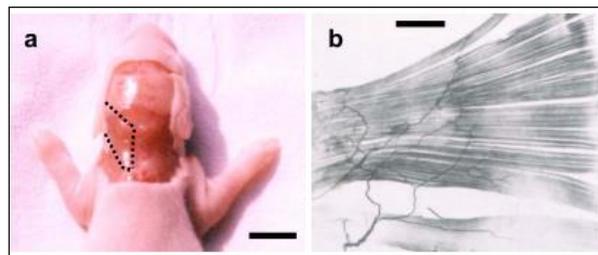


Figura M1. Situación anatómica del músculo LAL en una rata P8. Impregnación argéntica del músculo LAL. (a) Rata de 8 días de vida postnatal (P8) donde se ha marcado con líneas discontinuas la posición que ocupa el músculo LAL. Barra de escala = 1 cm. (b) Imagen de Angaut-Petit (1987). Preparación histológica, impregnación argéntica de Gros-Bielschowsky, donde se observa el músculo LAL con su inervación (Angaut-Petit et al. 1987). Barra de escala = 1.2 mm.

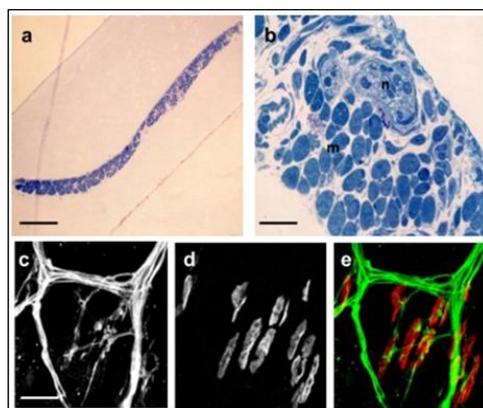


Figura M2. Levator auris longus (LAL). (a) y (b) Corte semifino transversal de un músculo LAL teñido con azul de metileno. Destaca la presencia de un nervio (n) entre los miocitos (m). Barra de escala = 150 µm (a) y 50 µm (b). (c), (d) y (e): Imágenes de inmunofluorescencia del músculo LAL obtenidas por proyección 3D de las imágenes secuenciales obtenidas con un microscopio confocal. En (c) se han marcado los axones con un anticuerpo anti-neurofilamento 200. En (d), el conjunto de receptores nAChRs se ha marcado con fluorescencia (α -bungarotoxina conjugada con rodamina). En la imagen (e) se observa la colocalización de los dos marcajes. Barra de escala = 10 µm.

2.2. Diafragma

El diafragma es un músculo esquelético delgado y plano, con la zona de inervación muy bien definida, cuya función es producir los movimientos respiratorios. Es un modelo idóneo para los estudios de electrofisiología debido a la fácil localización de las fibras musculares individuales y de las sinapsis aisladas. El patrón de inervación que presenta permite separar las áreas sinápticas de las extrasinápticas con relativa facilidad (figura M3). Forma una pared entre el tórax y el abdomen y lo constituyen una región muscular periférica (parte costal) y una aoneurótica central en forma de trébol (De Troyer et al. 1981; Pickering & Jones 2002). Por la parte anterior tiene su inserción en el extremo costal. Está inervado por el nervio frénico que procede de los segmentos cervicales C3-C5 de la médula espinal y desciende por el tórax hasta el diafragma, donde se divide para inervar a los dos hemidiafragmas que lo forman. La inervación de cada hemidiafragma se inicia en la parte central e interna y se divide en tres ramas: una hacia la parte anterior y dos hacia la parte posterior. Desde cada una de las ramas salen diferentes ramas más pequeñas, inervando de una forma masiva, en forma de árbol, la parte externa donde se forman las diferentes sinapsis, definiendo una zona de inervación bien limitada.

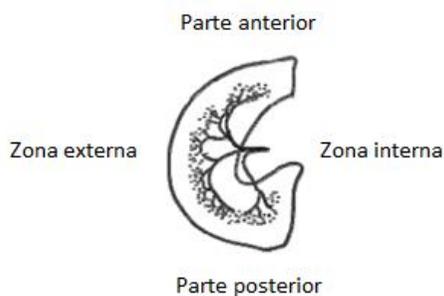


Figura M3. Esquema de la inervación del hemidiafragma. Adaptación de Comerford y Fitzgerald, 1986.

- **Extracción de los músculos esqueléticos**

Como se ha descrito previamente (*ver apartado 1*), los animales fueron anestesiados con TBE por inyección intraperitoneal y desangrados inmediatamente. El músculo LAL fue extraído y disecado con su respectivo nervio. La disección se realizó sobre una cámara de Petri cubierta con un elastómero de silicona (Sylgard®) para permitir la sujeción y estiramiento del músculo mediante agujas de disección (figura M4). La disección del músculo LAL requiere el uso de una lupa estereoscópica y manipulación microquirúrgica. Como se ha descrito previamente, es el músculo más superficial de la zona dorsal de la cabeza y se observa inmediatamente después de cortar la piel (figura M1a). Para los estudios de localización mediante inmunohistoquímica, los músculos LAL fueron fijados inmediatamente con paraformaldehído al 4% (PFA, del inglés *paraformaldehyde*; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) durante 30 minutos (*ver apartado 9*).

Para los estudios electrofisiológicos y bioquímicos, se extrajo el músculo diafragma con su respectivo nervio sobre una cámara de Petri cubierta con Sylgard® (*ver apartados 3 y 4*). La preparación fue transferida a una cámara de registro para los estudios de electrofisiología. Esta cámara fue diseñada con una forma rectangular y un volumen de 1 ml, un suelo de Sylgard® para sujetar el músculo, y dos electrodos de platino soldados a bornes en el extremo superior para montar el nervio (figura M4). Los electrodos se conectaron a una unidad aisladora del estímulo conectada a su vez a un estimulador (CS-20, Cibertec, Madrid, Spain). En los experimentos de estimulación repetitiva se realizó la succión del nervio. Para ello, la preparación fue transferida a una cámara rectangular, únicamente con suelo de Sylgard® para sujetar el músculo a la base. Se realizó la disección del hemidiafragma izquierdo para los estudios de electrofisiología (figura M4) y de ambos hemidiafragmas para los estudios bioquímicos (*ver apartados 3 y 4*).



Figura M4. Imágenes de los músculos LAL y diafragma diseccionados. (a) Músculo LAL de rata adulta. (b) Hemidiafragma izquierdo y nervio frénico de ratón adulto, diseccionados en una placa de Petri con base de Sylgard®.

3. ELECTROFISIOLOGÍA

Para realizar los estudios electrofisiológicos se utilizó la técnica de registro intracelular en la zona de la placa motora de la fibra muscular. Los registros electrofisiológicos son una medición fiable de la transmisión sináptica con una resolución de milisegundos, obteniéndose los potenciales de placa postsinápticos durante la actividad sináptica evocada y espontánea (*ver apartado 3.2*).

A diferencia de los registros extracelulares, estos detectan pequeños cambios en los potenciales de membrana locales causados por eventos sinápticos. Los registros intracelulares requieren la introducción de un microelectrodo en la célula para medir la diferencia de potencial entre la punta del electrodo intracelular y el electrodo de referencia situado en el exterior. Así, los electrodos intracelulares miden diferencias de potencial en unidades de milivoltios (mV). Los registros se llevaron a cabo sobre muestras de músculo diafragma extraídas *ex vivo*, preservándose en una solución salina y a una temperatura adecuada. Esta técnica permite reproducir *in vitro* la fisiología neuromuscular manteniendo el músculo esquelético vivo.

En el presente trabajo, se evaluó la función de la isoforma nPKC ϵ en la neurotransmisión, utilizando el péptido ϵ V1-2 como inhibidor específico de su translocación a la membrana y, por tanto, de su función. Así mismo, se evaluó su relación con PKA y con los receptores presinápticos en la NMJ adulta. Los estudios de localización en conjunto con los estudios funcionales permiten conocer la participación de nPKC ϵ en el mantenimiento de la sinapsis y en la modulación de la neurotransmisión.

3.1. Técnica de electrofisiología de registro intracelular

El músculo diafragma extraído *ex vivo* se montó en una cámara rectangular como se muestra en la figura M5, que contenía una solución salina de Ringer normal con la siguiente composición (en mM): NaCl, 137; KCl, 5; CaCl₂, 2; MgSO₄, 1; NaHCO₃, 12; NaHPO₄, 1; glucosa, 11. La solución salina fue continuamente burbujeadada (95% O₂, 5% CO₂) y renovada cada 15 minutos. La temperatura y la humedad fueron reguladas durante los registros a 26 °C y 50 %, respectivamente. La temperatura del baño fue monitorizada durante los experimentos (23.4 °C ± 1.7, Digital Thermometer TMP 812, Leticia, Barcelona, Spain). Además, se realizaron experimentos manteniendo la temperatura del baño a 31 °C y no se encontraron cambios significativos en el efecto de las diferentes drogas utilizadas (Garcia et al. 2013). La cámara se colocó sobre la platina de un microscopio equipado para realizar los registros electrofisiológicos de los potenciales de placa evocados por estimulación o EPPs y de los potenciales de placa espontáneos o MEPPs, utilizando técnicas convencionales con microelectrodos intracelulares. Para prevenir la contracción de las fibras musculares durante los registros de los potenciales evocados, se añadió a la solución de Ringer una concentración 1.5 µM - 3 µM de µ-conotoxina GIIB (µ-CgTx GIIB; ICS, International Clinical Service GmbH, München). De forma paralela, en algunos casos, se realizó además la técnica de *cut* muscular para evitar la contracción (*ver apartado 5.1*). La correcta ubicación del microelectrodo de registro respecto al terminal neuromuscular fue constatada por el tiempo de subida de los EPPs (menor a 1.5 ms). Se considera tiempo de subida al transcurso temporal entre el 10 y 90 % de la amplitud total del EPP.

Los microelectrodos de registro consisten en una pipeta cargada con una solución salina altamente conductora, en cuyo interior se coloca un alambre de plata clorurado conectado a un dispositivo llamado *holder*. Las pipetas fueron preparadas a partir de capilares de borosilicato de aluminio con microfilamento (GC150F-10, Harvard Apparatus ltd., diámetro interno 0.86 mm, diámetro externo 1.5 mm) y se cargaron con una solución salina de KCl 3 M. Mediante un *puller* (Narishige, Japón) el capilar es calentado y estirado de modo que se obtienen dos electrodos con una punta fina (menos de 1 µm de diámetro), idóneos para los registros intracelulares. Se utilizaron los microelectrodos con una resistencia entre 20 y 40 MΩ.

El microelectrodo de registro se conectó a través del *holder* al cabezal del amplificador diferencial (AMS02; Tektronics Inc., Beaverton, OR, USA), que filtra y amplifica la señal eléctrica 10 veces. Se filtraron las señales eléctricas en todos los casos.

En la neurotransmisión evocada filtramos la señal a 1 kHz (inferior) y 1 Hz (superior) y en la espontánea filtramos a 0.2 KHz (inferior) y 1 Hz (superior). El electrodo de referencia, de Ag-AgCl, se colocó a una distancia muy pequeña de la preparación y se conectó a la solución del baño, donde se sumerge la muestra, mediante un puente de Agar (3.5% Agar en 137 mM de NaCl). El cabezal del amplificador se montó sobre un micromanipulador para colocar con precisión el microelectrodo. La señal de salida del amplificador fue enviada a una placa convertora analógico-digital (DIGIDATA 1322A Inter-face, Axon Instruments Inc., Foster City, CA, USA). Las señales digitalizadas fueron adquiridas y analizadas con el programa Axoscope 9.0 (Axon Instruments Inc, CA, USA). El equipo de electrofisiología de registro intracelular se muestra en la figura M6. Todo el sistema fue montado sobre una mesa antivibratoria para minimizar las posibles vibraciones del entorno de trabajo y evitar perturbaciones mecánicas en el microelectrodo, situada a su vez dentro de una caja de Faraday construida de un material conductor para bloquear las interferencias eléctricas externas.

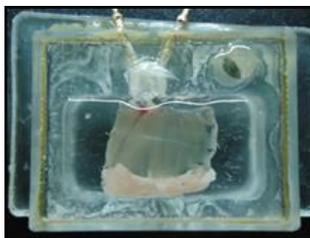


Figura M5. Cámara de registro. Hemidiafragma de ratón y nervio frénico montados en una cámara de registro con base de Sylgard® para los estudios electrofisiológicos.

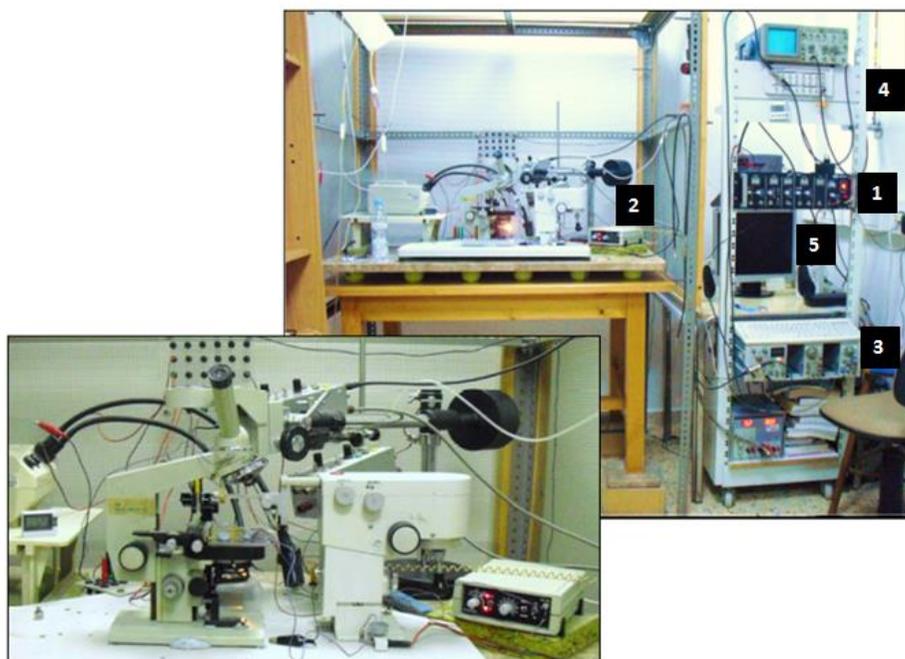


Figura M6. Equipo básico de electrofisiología de registro intracelular. 1) Unidad estimuladora; 2) Unidad aisladora ; 3) Amplificador; 4) Tabla digitalizadora ; 5) Sistema informático (Axoscope 9.0).

3.2. Registro de la neurotransmisión en las células musculares

- Neurotransmisión evocada

La neurotransmisión evocada se provocó mediante la administración de un estímulo eléctrico al nervio de la preparación neuromuscular y se registra a nivel postsináptico. El registro de la actividad sináptica evocada o EPP es la respuesta a la despolarización local de la membrana de la célula muscular provocada por el estímulo aplicado. Observado de izquierda a derecha (figura M7), consiste en una línea de base que presenta, primero, un pico de poca duración, correspondiente al artefacto del estímulo eléctrico provocado por el experimentador. Le sigue una fase de corta duración (1-2 ms, "latencia"), que corresponde a la conducción del estímulo e indican, por tanto, variaciones en la conducción del estímulo. Por último, se observa una onda de mayor duración con una amplitud medida en mV, correspondiente al potencial de placa evocado o EPP. Esta onda es la respuesta a la despolarización local de la membrana de la célula muscular.

Para registrar los EPPs se bloqueó previamente la contracción muscular (*ver apartado 5.1.*). Estos registros reflejan el movimiento iónico postsináptico desencadenado por la unión del neurotransmisor ACh a sus receptores nicotínicos. Nos dan información cuantificable en relación a la efectividad en la liberación del neurotransmisor por medio de su amplitud, que corresponde a la distancia desde la base hasta el punto más alto del EPP en el eje Y.

Para confirmar que los registros realizados fueran próximos a la placa motora se observó el *tiempo de subida* del EPP (distancia en el eje X desde el punto donde comienza el episodio hasta el punto donde se alcanza la amplitud máxima; figura M7). Sólo se consideraron válidos los registros con valores inferiores o iguales a 1.5 ms, descartándose los registros con valores superiores a este valor.

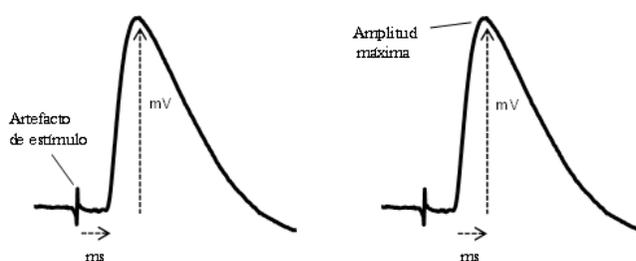


Figura M7. Potencial de placa evocado (EPP, del inglés evoked endplate potential). A la izquierda, ejemplo de episodio evocado o EPP. La distancia entre el artefacto de estímulo hasta el principio del EPP se denomina latencia (en ms, flecha horizontal). La amplitud del EPP es la distancia entre la base y el pico del evento (en mV, flecha vertical). A la derecha, se señalan el punto de amplitud máxima (mV) y el tiempo de subida del episodio (en ms, flecha horizontal).

Para reproducir artificialmente la respuesta fisiológica de una sinapsis neuromuscular bajo diversas condiciones experimentales, se utilizó una unidad estimuladora (CS-20, Cibertec, Madrid, Spain). Esta se utiliza para provocar los potenciales de acción nerviosos por aplicación de estímulo eléctrico. La unidad estimuladora está asociada a su vez a una unidad aisladora de estímulos con la que se generaron pulsos de 1-10 Voltios, a una frecuencia entre 0.5 y 100 Hz, y una duración de 0.1-0.2 ms. El estímulo eléctrico fue administrado a través de un electrodo de platino u oro en contacto directo con el nervio, o bien mediante un sistema de succión del nervio. La respuesta neuromuscular se recogió en un sistema de adquisición de datos

digitalizando la señal para su posterior análisis (figura M6). El voltaje de trabajo se determinó a partir de la intensidad mínima del estímulo que necesitamos aplicar a la preparación neuromuscular para que haya actividad eléctrica (estímulo umbral). Este valor umbral lo multiplicamos por 3 (supramax) para asegurar que todas las fibras responden al estímulo aplicado. Una vez introducido el electrodo de registro en la fibra muscular se aplicaron diferentes paradigmas de estimulación: a baja frecuencia de estimulación (1 Hz) y a alta frecuencia de estimulación (trenes de 40 Hz).

En la mayoría de los experimentos, el nervio fue estimulado de forma continua siguiendo un protocolo de 70 estímulos a 1 Hz registrándose únicamente los últimos 50 episodios. Las incubaciones con diversas sustancias (*ver apartado 5.2.*) se realizaron durante 1 hora y se evaluaron un mínimo de 15 fibras por músculo y un mínimo de 5 músculos por experimento, seleccionando únicamente las fibras con un potencial de membrana no inferior a -65 mV (con excepción de los registros de fibra única). En todos los casos descartamos las variaciones que superan los 5 mV durante los registros de cada fibra. En cuanto a los experimentos de fibra única (curva temporal del efecto de las sustancias en los EPPs en una misma fibra que se mantiene empalada permanentemente por el electrodo de registro), una vez añadido el agente a la solución de Ringer, se registraron los EPPs de la forma descrita, cada 15 minutos, durante un mínimo de 60 minutos. En este periodo de tiempo, el potencial de membrana en ocasiones cayó por debajo de -65 mV. En estos casos, se descartaron los registros cuando se alcanzaron potenciales de membrana menores de -45 mV.

Se realizó también la estimulación repetitiva del nervio frénico a alta frecuencia (trenes de 40 Hz durante 2 minutos) para evaluar el efecto de diferentes sustancias en la depresión sináptica. Para permitir la recuperación del músculo, se dejaron 10 minutos de intervalo entre los trenes de estímulos. Se evaluaron los cambios en la depresión sináptica entre los 15 primeros EPPs y los 15 últimos EPPs registrados durante los 2 minutos. En estos experimentos de agotamiento se estudiaron entre 8 y 10 fibras por músculo, y un mínimo de 5 músculos para cada condición. Únicamente se seleccionaron las fibras con un potencial de membrana mayor o igual a -65 mV, descartando las variaciones de potencial superiores a 5 mV para cada registro.

- Neurotransmisión espontánea

Se denomina neurotransmisión espontánea a los EPPs miniatura o MEPPs. Estos registros aportan información relativa al efecto postsináptico de las sustancias químicas a evaluar. El estudio de los MEPPs no necesita la activación del potencial de acción axonal por parte de la unidad estimuladora ya que se obtienen de forma espontánea a una frecuencia mínima de 60 eventos por minuto. Por tanto, no es necesario realizar el bloqueo de la contracción muscular.

Para registrar la actividad espontánea, se introdujo el electrodo en la fibra muscular y se registraron todos los MEPPs obtenidos en 60 segundos o hasta la adquisición de 100 episodios. Su amplitud media es de 0.5 mV. Para su análisis, se tuvieron en cuenta los parámetros: amplitud, tiempo de subida y frecuencia de aparición de los episodios espontáneos (*ver apartado 3.3*). Los dos primeros parámetros se evaluaron siguiendo el mismo procedimiento que se ha descrito para los EPPs.

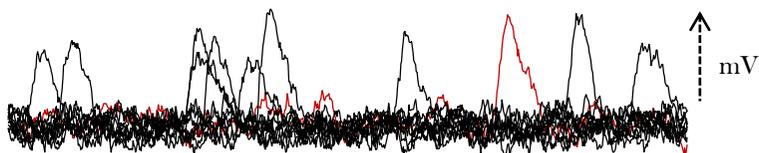


Figura M8. Ejemplos de potenciales de placa espontáneos (MEPPs, del inglés *miniature endplate potentials*). La flecha señala la amplitud en mV de un episodio espontáneo o MEPP (en rojo).

3.3. Registro de la actividad sináptica a 40 Hz

Para estudiar el efecto de diferentes sustancias sobre la depresión sináptica, se aplicaron estímulos de forma continua durante 2 minutos a 40 Hz, mediante la succión del nervio frénico. Para permitir la recuperación del músculo, se fijó un intervalo de 10 minutos entre los trenes de estímulos. Se evaluaron los cambios en la depresión sináptica entre los 15 primeros EPPs y los 15 últimos EPPs registrados durante los 2 minutos. En estos experimentos de agotamiento se estudiaron entre 8 y 10 fibras por músculo, y un mínimo de 5 músculos para cada condición. Únicamente se seleccionaron las fibras con un potencial de membrana mayor o igual a -65 mV, descartando las variaciones de potencial superiores a 5 mV para cada registro.

3.4. Parámetros evaluados en los experimentos funcionales

Los parámetros evaluados en los experimentos de electrofisiología aportan información a nivel presináptico y postsináptico. Se evaluó la amplitud de los EPPs y la amplitud y frecuencia de los MEPPs. Con esta información, se obtuvo el valor del contenido cuántico, o número de vesículas liberadas durante el impulso nervioso.

- Amplitud de los EPPs

La amplitud de los episodios evocados en adulto puede alcanzar valores entre 30-40 mV. Esta variable aporta información cuantificable como es la eficacia en la liberación del neurotransmisor. De esta manera, el incremento en la amplitud del episodio evocado se atribuye a una potenciación de la liberación de ACh mientras que la disminución de la amplitud del registro evidencia la disminución en la liberación del neurotransmisor. En este último caso, consideramos que la eficacia sináptica ha disminuido.

Se ha utilizado el método de sumación no lineal (McLachlan & Martin 1981) para calcular la media de la amplitud de cada fibra (mV), asumiendo en este caso un potencial de membrana de -80 mV. Se han estudiado 15 fibras control y 15 fibras experimento (8-10 fibras en el caso de los experimentos de agotamiento) por músculo.

- **Amplitud y frecuencia de los MEPPs**

Las variaciones en la amplitud de los episodios espontáneos nos informan sobre cambios producidos a nivel del componente postsináptico, como el número de nAChRs disponibles en la membrana de la fibra muscular o el tiempo de apertura de los canales. Para calcular la amplitud de los MEPPs, se ha utilizado el método de sumación no lineal (McLachlan & Martin 1981), cuya corrección asume un potencial de membrana de -45 mV. En el modelo de NMJ utilizado en este trabajo descartamos el efecto postsináptico de las sustancias con las que trabajamos ya que evaluamos su efecto únicamente a nivel del componente presináptico.

En el caso de registros a 40 Hz se tuvo en cuenta la posible modificación en la sensibilidad de los nAChRs. Se evaluó el tamaño de los MEPPs durante los trenes de agotamiento y no se observó ningún cambio con las diferentes drogas utilizadas. Como ejemplo, se calculó la variación en la amplitud de los MEPPs durante estimulación repetitiva a 40 Hz en presencia de adenosina 25 μ M fue de 14.90 ± 2.07 % y en presencia del antagonista purinérgico 8-SPT (del inglés *8-(p-sulfophenyl) theophylline hydrate*) fue de 2.41 ± 4.65 % ($p < 0.05$) (García et al. 2013).

Por otro lado, la variación en la frecuencia de los MEPPs nos informa sobre los cambios producidos a nivel del componente presináptico, como el número de vesículas del *pool* RRP que contienen ACh. Se realizó el registro de los episodios espontáneos durante 60 segundos, o hasta la obtención de 100 episodios / eventos para cada fibra evaluada.

- **Contenido cuántico**

El contenido cuántico (QC, del inglés *quantal content*) es el número de quanta (Q) o de vesículas sinápticas liberadas por impulso nervioso. La media del contenido cuántico (m) de la respuesta evocada se estimó mediante el método directo, por tanto fue calculada obteniendo la ratio entre la amplitud media de los EPPs de cada fibra registrada y la amplitud media de los MEPPs de la misma fibra:

$$m = X \text{ EPPs} / X \text{ MEPPs}$$

4. ESTIMULACIÓN DEL MÚSCULO ESQUELÉTICO PARA LOS ESTUDIOS BIOQUÍMICOS

Se llevaron a cabo estudios bioquímicos de expresión proteica dependientes de actividad, utilizando muestras de músculo esquelético (*ver apartados 2, 3 y 4; resultados*). Para ello, se siguió un protocolo de estimulación continua del músculo diafragma imponiendo actividad moderada. El diafragma y el nervio frénico fueron extraídos y sumergidos en una solución de Ringer normal oxigenada de forma continua (95% O₂, 5% CO₂) a temperatura ambiente. La estimulación del nervio frénico se realizó a través de un electrodo de succión acoplado a un generador de pulsos o estimulador, asociado a una unidad aisladora de estímulos. La unidad estimuladora crea pulsos con una diferencia de potencial de pocos voltios, y el voltaje viene determinado por el valor mínimo de estimulación necesario para que se observe actividad eléctrica en una fibra muscular. Por lo tanto, antes de comenzar el protocolo de estimulación, se fijó el valor mínimo de intensidad de estimulación (o intensidad umbral) para el cual se observó contracción del diafragma. Este valor umbral se multiplicó por 3, trabajando con valores de intensidad supramáximos. Estos pulsos se generaron a una frecuencia de 0.5 Hz (1 estímulo cada dos segundos) y con una duración de 0.1 ms. El grupo de músculos estimulados según este patrón (en ellos el estímulo del nervio frénico provoca contracción muscular) se denominaron ES+C.

En un grupo de músculos estimulados (denominados ES) se bloqueó la contracción muscular por incubación con la neurotoxina μ -Conotoxina GIIIB (μ -CgTx GIIIB), o bien cortando las fibras musculares al límite de la zona de inervación (técnica de *cut*; *ver apartado 5.1.*). En este último caso, antes de iniciar el protocolo de estimulación, se realizaron varios lavados de la muestra con Ringer durante 30-60 minutos con la finalidad de eliminar las secreciones del músculo liberadas al cortar las fibras.

5. TRATAMIENTOS

5.1. Bloqueo de la contracción muscular

Todos los registros electrofisiológicos, así como parte de los estudios bioquímicos (Western blot, músculos ES), se realizaron suprimiendo la contracción muscular. En el caso de los registros intracelulares, se requiere la abolición completa de la contracción para evitar la ruptura de la membrana postsináptica ya que para registrar la actividad sináptica se introduce un electrodo en la fibra muscular. Existen diferentes métodos para abolir la contracción muscular, entre ellos, la reducción de la liberación de ACh. Esto se consigue modificando el medio extracelular aumentando la concentración de Mg^{2+} o disminuyendo la concentración de Ca^{2+} . Sin embargo, en ambos casos se interfiere directamente sobre la neurotransmisión. En este trabajo de tesis se utilizaron en paralelo dos métodos para bloquear la contracción del músculo, dejando ambos intacta la maquinaria de la neurotransmisión: incubación con la μ -Conotoxina GIIIB y *cut* de las fibras musculares.

Las conotoxinas se obtienen de los conductos venenosos de los caracoles depredadores *Conus geographus* y se encuentran principalmente en aguas tropicales (figura M9). Se ha estimado que el veneno de cada especie *Conus* presenta entre 50 y 200 componentes peptídicos. La denominada μ -Conotoxina GIIIB es una versión sintética del péptido y actúa bloqueando selectivamente los canales de Na^+ voltaje-dependientes ($Na_v1.4$), que se expresan de forma predominante en el músculo, preservando la fisiología de la NMJ (Alonso et al. 2003). Se utilizan como herramientas farmacológicas de gran valor ya que actúan sobre canales de sodio en el músculo, y en mucha menor medida en las neuronas, e inhiben el flujo de sodio hacia la célula paralizando al organismo. Actúan impidiendo la generación de los potenciales de acción musculares permitiendo por tanto el registro de la neurotransmisión evocada en condiciones fisiológicas.

La técnica de *cut* de las fibras musculares consiste en cortar a ambos lados de la rama nerviosa intramuscular principal, bloqueando así la contracción muscular (Hubbard & Wilson 1973) (figura M9). Para descartar cualquier artefacto debido al *cut* de la preparación neuromuscular, se realizó en paralelo la incubación de las preparaciones musculares con μ -Conotoxina GIIIB (Li et al. 2003) para los estudios bioquímicos y de electrofisiología de registro intracelular. De este modo, se reprodujeron los resultados obtenidos en músculos *cut* y en músculos paralizados con la neurotoxina

μ -CgTx GIIB no observándose ninguna diferencia en los parámetros electrofisiológicos de la neurotransmisión (contenido cuántico, frecuencia y tamaño de los MEPPs y amplitud de los EPPs) o en los estudios bioquímicos.



Figura M9. Bloqueo de la contracción muscular. A la izquierda, *Conus geographus*. A la derecha, preparación *cut* de hemidiafragma de rata adulta.

5.2. Incubaciones con moduladores de la neurotransmisión

Para evaluar la neurotransmisión y los procesos de actividad-dependencia en nuestro modelo neuromuscular, se realizaron incubaciones seriadas del diafragma con diferentes sustancias que se enumeran a continuación.

Sustancias moduladoras de la actividad de PKC

El agonista inespecífico de PKC, PMA (del inglés, *phorbol 12-myristate 13-acetate*; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), se preparó en DMSO (del inglés, *dimethyl sulfoxide*; Tocris, Ellisville, MO, USA) y se almacenó a -20 °C a una concentración 10 mM. Se trabajó a una concentración 10 nM.

La solución del antagonista inespecífico de PKC, calfosteína (CaC, del inglés *calphostin C*; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), se preparó a una concentración stock 2.5 mM en DMSO y se almacenó a -20 °C. La solución de trabajo fue 10 µM. Para su activación, se expuso 20-30 minutos a una luz artificial y se trabajó en un medio con una concentración elevada de Ca²⁺ (5 mM) o bien estimulando el nervio a 1 Hz.

El péptido εV1-2 miristoilado, inhibidor específico de la translocación de nPKCε (*myristoylated nPKCε-translocation inhibitor peptide, EAVSLKPT*; ref. 539522, Calbiochem, Merck KGaA, Germany) se disolvió en agua bidestilada o solución de Ringer normal, a una concentración 1 mM y se conservó a -20 °C. Se prepararon distintas soluciones de trabajo: 1, 10 y 100 µM. Como control negativo del péptido, se utilizó una versión que contenía los mismos aminoácidos pero en distinto orden en la secuencia (εV1-2-s, LSETKPAV; Calbiochem, Merck KGaA, Germany). Se preparó del mismo modo que εV1-2 y se trabajó a las concentraciones 1, 10 y 100 µM.

Sustancias moduladoras de la actividad de PKA

El inhibidor selectivo de PKA, H-89 (*N-[2-((p-Bromocinnamyl) amino) ethyl]-5-isoquinolinesulfonamide, 2HCl*; Calbiochem, Merck KGaA, Germany) se disolvió en DMSO a una concentración de 5 mM y se conservó a -20 °C. Se trabajó a una concentración 5 µM.

El agonista selectivo de PKA, Sp-8-BrcAMPs (*adenosine 3',5'-cyclic monophosphorothioate, 8-Bromo-, Rp-Isomer, sodium salt*; Calbiochem, Merck KGaA, Germany) se preparó en agua bidestilada a una concentración 5 mM y se conservó a -20 °C. Se trabajó a una concentración 10 µM.

- **Sustancias moduladoras de la actividad de mAChR (M1, M2)**

El antagonista muscarínico con alta afinidad por el receptor muscarínico M1, pirenzepina (PIR, del inglés *pirenzepine dihydrochloride*), fue suministrado por Tocris Bioscience (Bristol, UK). Se almacenó a 4 °C a una concentración 10 mM en agua bidestilada y se trabajó con una solución 10 µM de la misma.

El antagonista muscarínico con alta afinidad por el receptor tipo M2, metoctramina, (MET, del inglés *methoctramine tetrahydrochloride*) fue suministrado por Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Se almacenó a 4 °C a una concentración 1 mM en agua bidestilada y se trabajó a una concentración de 1 µM.

El antagonista inespecífico de ambos mAChRs, M1 y M2, atropina (AT, del inglés *atropine*) fue suministrado por Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Se almacenó a 4 °C a una concentración 200 µM en agua bidestilada y a partir de esta se trabajó a una concentración 2 µM.

- **Sustancias moduladoras de la actividad de TrkB**

El agonista de TrkB (BDNF, *human brain-derived neurotrophic factor*, Alomone Labs), se preparó en agua bidestilada a 0.37 µM. Se trabajó a una concentración de 10 nM.

El ligando selectivo de TrkB, el péptido ANA-12 (*N2-(2-((2-oxoazepan-3-yl) amino) carbonyl) phenyl) benzo[b]thiophene-2-carboxamide*, cat. no. BTB06525, Maybridge, Cornwall, UK), de bajo peso molecular (MW 407.5 g/mol), se utilizó para estudiar la vía de señalización BDNF/TrkB (Cazorla et al. 2011). ANA-12 se disolvió en DMSO a una concentración 10 mM y se almacenó a -20 °C. Se trabajó a una concentración 10 µM.

El anticuerpo anti-TrkB (*clone 47/TrkB*; cat. no. 610102, BD Transduction Laboratories, Lexington, KY; 250 µg/ml) se preparó a una concentración de trabajo 10 µg/ml.

La quimera trkB/Fc recombinante humana (trkB-Fc; 688-TK, R&D Systems, Minneapolis, 100 µg/ml) se preparó a una concentración de trabajo 1-5 µg/ml.

- DMSO

La concentración final de DMSO en las preparaciones control y tratadas fue ≤ 0.1% (v/v).

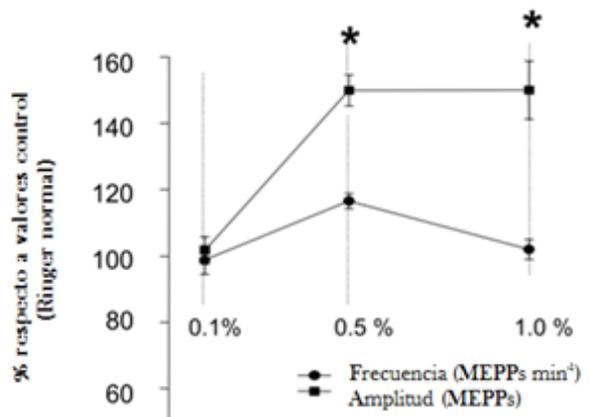


Figura M10. Relación dosis- respuesta del DMSO en la neurotransmisión. La utilización de soluciones que contienen 0.1 % v/v de DMSO no provoca cambios en los parámetros estudiados atribuibles a este disolvente. (Katz 1996; Rosato Siri & Uchitel 1999; Tomas et al. 2000; Santafé et al. 2001). * P < 0.05.

5.3. Denervación del Extensor digitorum longus (EDL)

Se anestesiaron ratas adultas jóvenes (30-40 meses, macho) con una inyección intraperitoneal de TBE (2 % ,15 ml /10 g en peso corporal). Para aislar el nervio ciático, se realizó una escisión de 0.5 cm en el lado externo de la pata a 1 cm aproximadamente sobre el nivel de la rodilla del animal. La escisión fue realizada con cuidado hasta observar claramente el nervio evitando dañar el tejido. Finalmente, el nervio ciático fue cortado, se extrajo un segmento de 2 cm y se cosió la herida. Unos días después (1-3), las ratas fueron anestesiadas y se extrajo el músculo EDL (Son & Thompson 1995; Li & Thompson 2011).

6. OBTENCIÓN Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS PARA LAS TÉCNICAS BIOQUÍMICAS

6.1. Obtención de los homogenados de músculo esquelético

Para los estudios bioquímicos, la obtención de proteínas totales del tejido esquelético se realizó a partir de muestras de músculo diafragma previamente extraídas, congeladas en nitrógeno líquido y conservadas a - 80 °C.

Se realizó el lisado celular de los músculos con un homogeneizador automático (overhead stirrer, VWR International, Clarksburg, MD) en una solución de lisis de composición: 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 1% NP-40 y 2 mM EDTA suplementada con 1% Triton X-100, 1 mM PMSF (del inglés *phenylmethylsulfonyl fluoride*; P7626, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), 50 mM NaF (del inglés, *sodium fluoride*; 201154, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), 1 mM Na₂VO₄ (del inglés sodium orthovanadate; S6508, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) y un cóctel inhibidor de proteasas (P8340, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), siguiendo una relación de 2 ml de tampón de lisis por 1 g de tejido (20% w / v). Para separar los componentes de la matriz extracelular de los restos celulares no lisados, se eliminó el material insoluble mediante centrifugación a 3200 rpm durante 10 minutos a 4 °C, descartando el precipitado. Los sobrenadantes se recuperaron y se realizó una segunda centrifugación a 13200 rpm durante 20 minutos. Finalmente, se recogieron los sobrenadantes (lisados de proteína total) y se conservaron a - 80 °C.

Se separaron las regiones sináptica (zona de inervación que queda delimitada) y extrasináptica (zona libre de tejido nervioso) para realizar parte de los experimentos. En la mayoría de los músculos las zonas sinápticas o neurales concentran gran parte de

las NMJs cerca de la región central de las células musculares, facilitando la separación de ambas regiones de forma precisa. La separación se realizó bajo una lupa para comprobar que todas las sinapsis y recorridos nerviosos quedasen en la zona sináptica. Se llevaron a cabo experimentos control para verificar que el protocolo de separación fuese correcto (Besalduch et al. 2010). Para realizar este control, se realizó la tinción de los músculos con alfa-bungarotoxina (α -BTX, del inglés *alfa-bungarotoxin*) conjugada con TRICT (marcaje de los AChRs) y posteriormente se separaron las regiones sináptica y extrasináptica. Se realizó también la tinción de los nervios con un anticuerpo anti-neurofilamento-200, no detectándose marcaje en las zonas extrasinápticas.

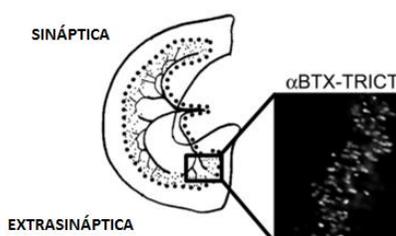


Figura M11. Dibujo del diafragma indicando el área inervada del músculo. Las líneas punteadas indican la separación entre las regiones sináptica y extrasináptica. La imagen de fluorescencia muestra las NMJs detectadas con α -BTX-TRICT. Las NMJs se sitúan en la parte sináptica y no se detectan en la parte extrasináptica (Besalduch et al. 2010).

Una vez separadas ambas regiones, los músculos fueron homogenizados y lisados de la forma descrita y el material insoluble fue eliminado mediante centrifugación a 1000 g durante 10 minutos. En este caso el sobrenadante se recogió y se realizó la segunda centrifugación a 130000 g durante 1 hora. El sobrenadante se recuperó como la fracción citosólica y el pellet como la fracción membranosa. Las muestras se conservaron a - 80 °C. Para evaluar la separación de las fracciones de membrana y citosólica, se utilizó un anticuerpo vs GAPDH (del inglés, *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*), una proteína específica de la fracción del citosol. En ningún caso se observó inmunoreactividad de GAPDH en la fracción de la membrana.

6.2. Valoración de la concentración de proteínas

Obtenidos los extractos de proteínas del diafragma, se determinó la concentración proteica mediante el ensayo colorimétrico de proteínas *DC Protein Assay* (VersaDoc, Bio-Rad; Hercules, CA). Este método es adecuado para cuantificar muestras que han sido solubilizadas utilizando detergentes. La reacción que sucede es similar a la que tiene lugar mediante el método de Lowry (Lowry et al. 1951). Adicionalmente se construyó una curva patrón de albúmina de suero bovino 10 mg/ml (BSA, del inglés *bovine serum albumin*; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) a concentraciones de 0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1, 5 y 10 mg/ml. Por extrapolación de los valores de absorbancia con la recta patrón de concentración conocida se pudo calcular la concentración de proteína en los extractos. La determinación de la absorbancia se realizó en un espectrofotómetro (CECIL, CE2030) a una longitud de onda de 750 nm.

7. WESTERN-BLOT

Las técnicas de detección de proteínas se basan en la utilización de anticuerpos específicos para detectar y analizar cuantitativa o cualitativamente la presencia de ciertas proteínas. Además, nos permite evaluar la especificidad de los anticuerpos utilizados. La utilización combinada de la electroforesis en geles de poliacrilamida SDS-PAGE (del inglés, *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) y la técnica de Western blot (también denominada *immunoblot*) permite detectar cuantitativamente la presencia de una proteína e incluso su estado de modificación post-transcripcional (cambios de expresión, estado de fosforilación, etc.). Es el método más comúnmente utilizado para medir la expresión de una proteína en experimentos de señalización celular. El procedimiento consiste en la separación de diferentes proteínas de una muestra heterogénea, únicamente por su peso molecular. Se llevó a cabo el método de transferencia o *blotting* sobre membranas sintéticas de PVDF (del inglés, *polyvinylidene difluoride*) para la inmovilización de las proteínas separadas en el gel SDS-PAGE y se realizó su detección mediante inmunomarcaje.

7.1. Preparación de las muestras y electroforesis en SDS-PAGE

La electroforesis SDS-PAGE es una de las técnicas más utilizadas para la separación de proteínas según su peso molecular (Laemmli 1970). La base de la electroforesis SDS-PAGE es la separación de las muestras en presencia de un campo eléctrico perpendicular a un gel compuesto por una mezcla de acrilamida/ bisacrilamida, que forma un entramado reticular. El gel actúa como un filtro físico de modo que las proteínas de mayor tamaño viajarán relativamente más despacio que las proteínas de menor tamaño.

Composición de los geles y tampones a utilizar

- Gel concentrador:

Contiene un 5% de acrilamida y permite la alineación de las proteínas previa a su separación. Para un gel se necesitó: 2.85 ml de agua destilada, 0.85 ml de acrilamida-bisacrilamida (30% w/v; ProtoGel, Georgia, USA), 1.25 ml de Tris 0.5 M a pH 6.8, 50 µl SDS al 10%, 50 µl de persulfato amónico al 10% (APS, del inglés, *ammonium persulfate*) y 10 µl de TEMED (nomenclatura, *N, N, N', N'-tetramethylethylenediamine*), ambos de la casa comercial Sigma-Aldrich.

- Gel separador:

Permite separar las proteínas según su tamaño. Las proteínas a estudiar presentaban un peso molecular de entre 70 y 150 KDa, por lo que la proporción de acrilamida fue de 8-10%. Para un gel se necesitó: 4.7 ml de agua destilada, 2.7 ml de acrilamida -bisacrilamida, 2.5 µl de Tris 1.5 M a pH 8.8, 100 µl SDS al 10%, 100 µl de APS (10%) y 10 µl de TEMED.

- Tampón de electroforesis:

Tampón 25 mM Tris base, 250 mM glicina, 0.1 % SDS p/v. Se preparó concentrado diez veces y se mantuvo a temperatura ambiente.

- Marcadores de peso molecular:

Se utilizaron los estándares Precision Plus Protein Dual Xtra standards #161-0377 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) y RPN800E Full-Range Rainbow Molecular Weight Markers (Amersham, GE Healthcare) con marcadores de pesos moleculares pre-teñidos entre 2 y 250 kDa.

- Tampón de carga SLB:

Se utilizó un tampón reductor SBL (del inglés, *sample Laemmli buffer*) concentrado 5 veces, de composición 12.5 % β -mercaptoetanol, Tris 150 mM pH 6.8, 5% SDS, azul de bromofenol. El SDS, un detergente cargado negativamente que se une a las regiones hidrofóbicas de la proteína haciéndola soluble, confiere carga negativa neta a la proteína independientemente de su composición aminoacídica. De este modo, la proteína migra según su peso molecular (Laemmli 1970).

Procedimiento

Se separaron muestras proteicas de 20-50 μ g en geles SDS-PAGE mediante un sistema de electroforesis Mini-Protean 3 (MP-3, Bio-Rad laboratories, Hercules, CA) y se añadió un tampón con la composición descrita a la cubeta de electroforesis. Se utilizaron estándares de peso molecular para controlar la separación de las proteínas durante la electroforesis. Se aplicó un campo eléctrico fijando el voltaje (90-100 mV) hasta observar el frente de carga al final del gel. En primer lugar, las proteínas del gel se transfirieron a una membrana de PVDF aplicando un campo eléctrico mediante un sistema rápido de transferencia semi-seco (rapid Trans-Blot® Turbo™ Transfer Starter System: 170-4155). Se usó un kit comercial de membranas de PVDF (Trans-Blot® Turbo™ RTA Mini PVDF Transfer Kit: 170-4272). Las membranas fueron bloqueadas durante 1 hora a temperatura ambiente en una solución de TBS-T (Tris-buffered saline-0.1% Tween-20) con un 5% (W/V) de leche desnatada en polvo, en BSA, o en TBS-T con un 5% de suero de cabra (*goat serum*; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), según las indicaciones de la casa comercial o su eficacia. Para preservar los antígenos de las fosfoproteínas, se utilizó un agente bloqueante específico (PhosphoBLOCKER™; Cell Biolabs, Inc., San Diego, CA).

Tras el bloqueo de los sitios inespecíficos, la membrana se incubó toda la noche a 4 °C con el anticuerpo primario diluido en el mismo tampón de bloqueo (*ver tabla 1*). Después de lavar las membranas con TBS-T, se realizó la incubación con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano (HRP, del inglés *horseradish peroxidase*), durante 1 hora y media, a temperatura ambiente. Para visualizar la proteína deseada, se utilizó una solución quimioluminiscente (ECL Advance Western Blotting Detection Kit, Amersham Life Science, Arlington Heights, IL) y las membranas se visualizaron con VersaDoc 3000 (Bio-Rad, Hercules, CA).

Para analizar la densidad de las bandas, se utilizó el programa de densitometría MetaMorph. Para normalizar la densidad óptica integrada de las bandas se utilizó la proteína β -actina (SC-81178, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). Se realizó también el análisis de la proteína total (Sypro Ruby protein blot Stain; Bio-Rad laboratories, Hercules, CA), transferida a las membranas de PVDF, como control interno de carga adicional. Para todos los casos, no se encontraron diferencias en los resultados cuantitativos utilizando la actina o la proteína total. Las variaciones relativas entre las bandas en las muestras del experimento y del control se calcularon en la misma imagen. Los datos obtenidos provienen de medidas densitométricas realizadas en al menos tres experimentos independientes, calculadas respecto a sus controles.

A continuación se detallan los anticuerpos comerciales que se han utilizado (*ver tablas 1 y 2*).

TABLAS DE ANTICUERPOS

TABLA 1. Anticuerpos primarios.

Anticuerpo primario (AC1)	Ref. AC1	Dilución	Peso molecular	Especie	Técnica
β -ACTINA	ACTBD11B7 (SC-81178)	1:1000	43 kDa	Mouse	WB ¹
GAPDH	(IMG-3073)	1:5000	37 kDa	Goat	WB
cPKC α	C-20 (SC-208)	1:100	76.7 kDa	Rabbit	WB
nPKC ϵ	C-15 (SC-214)	1:1000	90 kDa	Rabbit	IHQ ² /WB
pPKC ϵ	Ser729 (SC-12355)	1:100	90 kDa	Goat (phospho blocker)	WB
Sintaxina	S0664 clone HPC-1	1:1000	-----	Mouse	IHQ
Sintaxina	S1172	1:1000	-----	Rabbit	IHQ
Neurofilamento- 200	N5389 clone NE14	1:1000	-----	Mouse	IHQ
S-100	DM377 clone 4C4.9	1:100	-----	Mouse	IHQ
pMARCKS	S152, S156 PPS010	1:500	80 kDa	Rabbit	WB

¹ WB: Western blot

² IHQ: Inmunohistoquímica

Anticuerpo primario (AC1)	Ref. AC1	Dilución	Peso molecular	Especie	Técnica
Hsp70	P08107	1:500	66-78 kDa	Rabbit	WB

TABLA 2. Anticuerpos secundarios.

Especie	Ref. AC2	Dilución	Diana	Conjugado	Técnica
Goat	A9044	1:10000	mouse	HRP	IHQ
Donkey	JI 711-035-152	1:10000	rabbit	HRP	IHQ
Rabbit	MP R21459	1:10000	goat	HRP	IHQ
Donkey	MP A21202	1:200	mouse	Alexa Fluor 488	IHQ
Donkey	MP A31573 A9044	1:300	rabbit	Alexa Fluor 647	IHQ
* ³	JI	1:300	α -BTX	TRICT	IHQ
*	MP	1:300	α -BTX	Alexa Fluor 647	IHQ

³* La α -BTX se incubó en la muestra junto a los anticuerpos secundarios en la técnica de IHQ. Por esta razón se ha incluido en la tabla junto a ellos, aunque esta molécula no es un anticuerpo secundario.

8. INMUNOHISTOQUÍMICA CONVENCIONAL

La técnica de inmunohistoquímica convencional por fluorescencia (IHQ, del inglés *immunohistochemistry*) permite identificar estructuras y moléculas con gran precisión mediante el uso de anticuerpos específicos como marcadores de alguna molécula o proteína presente en las estructuras que conforman los tejidos. Estos anticuerpos específicos contra el antígeno se denominan anticuerpos primarios. Estos a su vez se marcan con los anticuerpos denominados secundarios, conjugados con fluorocromos, que son moléculas capaces de emitir luz de un determinado espectro cuando son excitadas a la longitud de onda apropiada. Mediante esta técnica convencional, se marcaron proteínas presentes en los tres elementos de la NMJ para poder visualizarlos conjuntamente, además de la proteína problema (nPKC ϵ).

Procedimiento

Previamente a la IHQ, se disecaron los músculos LAL de animales con edad postnatal de 6-7 días y de adultos de 30-45 días. Una vez adquirido el paquete muscular, se colocó con ayuda de unas agujas entomológicas en una placa de Petri con una base de polímero sintético Sylgard®. El músculo se fijó con PFA diluido al 4% en tampón fosfato (PBS, del inglés *phosphate buffer saline*; 2.7 mM KCl, 1.5 mM KH₂PO₄, 140 mM NaCl, 8.1 mM NaH₂PO₄, pH 7.4) durante 30-40 minutos a 4 °C. Una vez fijado, se realizaron 3 lavados de 5 minutos con PBS y se incubó con glicina 0.1 M y PBS durante un mínimo de 30 minutos para detener la acción del PFA y bloquear los grupos aldehído que hayan podido quedar libres. Durante los lavados y la incubación con glicina, se realizó la disección fina del músculo bajo la lupa. Una vez fijado, aislado y libre de tejido conectivo, se realizó el protocolo de inmunohistoquímica.

En primer lugar, la muestra se trató con BSA al 4% y Tritón X-100 al 0.5-1 % en PBS (dependiendo del anticuerpo utilizado) para su bloqueo y su permeabilización. Este primer paso se realizó durante toda la noche a 4 °C o bien durante unas 4 horas a temperatura ambiente. Tras el bloqueo de la muestra, se realizó el marcaje con el anticuerpo primario o con una mezcla de anticuerpos (dependiendo del tipo de marcaje, simple o múltiple). Las proteínas de la NMJ marcadas fueron: S-100, presente en la célula de Schwann; syntaxina y neurofilamento 200 presentes en el axón y los terminales nerviosos y los receptores de acetilcolina postsinápticos (nAChRs) que se marcan con α -

BTX, una toxina que se une irreversiblemente a los nAChRs y se puede utilizar conjugada con TRICT o con Alexa 647 (dilución 1:600; Molecular Probes).

El anticuerpo primario se incubó durante toda la noche a 4 °C con el mismo tampón de bloqueo y permeabilización que se utilizó en el primer tratamiento. Una vez transcurrido este tiempo, se realizaron 3 lavados de 10 minutos con PBS para eliminar el anticuerpo sobrante. A continuación, la muestra se incubó con el anticuerpo secundario o con una mezcla de éstos, según el marcaje a realizar (*ver tabla 2*). Los nAChRs se marcaron con α -BTX-TRICT (en rojo), que se añadió a la mezcla al mismo tiempo que los anticuerpos secundarios. La incubación con los anticuerpos secundarios, conjugados con un fluorocromo específico, se realizó durante 4 horas a temperatura ambiente y en oscuridad para no perder la señal fluorescente. Después de la incubación, las muestras se lavaron de nuevo con PBS (3 lavados de 10 minutos) para eliminar los anticuerpos en exceso. Finalmente, las muestras se montaron en el portaobjetos (Thermo scientific Menzel-Gläser, Braunschweig, Germany) con un medio de Mowiol (Mowiol® 4-88 reagent; Calbiochem, Merck KGaA, Germany) con p-fenilenediamina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) para prolongar la marca fluorescente y se visualizaron con un microscopio láser confocal Nikon eclipse TE-2000-E (Nikon Instruments Inc., Melville, NY).

Para evitar las posibles reacciones cruzadas no apropiadas entre los anticuerpos secundarios y primarios, se realizaron varios controles para detectar posibles marcas fluorescentes no específicas. Se incubaron muestras en ausencia del anticuerpo primario y en presencia del secundario, o bien con un anticuerpo primario producido en una especie diferente a la especie que reconoce el anticuerpo secundario. También se utilizó como control el péptido de bloqueo del anticuerpo anti-nPKC ϵ para comprobar la ausencia de fluorescencia.

9. INMUNOHISTOQUÍMICA EN SECCIONES SEMIFINAS

La técnica de inmunofluorescencia de alta resolución consiste en adquirir secciones semifinas de unas 0.5-0.7 micras de espesor, de la muestra o tejido de estudio una vez se ha incluido en un medio que le proporciona consistencia: distintos tipos de resinas sintéticas (Epoxy, Spurr, etc...), resinas acrílicas o policarbonatos. El proceso consta de diferentes pasos, comenzando con una batería creciente de alcoholes y acetona con el fin de deshidratar la muestra y la posterior inclusión en la resina. Adquirir los cortes semifinos es el paso previo a la obtención de los cortes ultrafinos para microscopía electrónica de transmisión, aunque esta no ha sido la finalidad en este trabajo.

Procedimiento

La obtención de secciones transversales semifinas de músculo LAL incluido en resina es un método simple y sensible que permite analizar la distribución específica celular y subcelular de las moléculas de la unión neuromuscular (Lanuza et al. 2007). Esta técnica permite mejorar la resolución de las imágenes obtenidas por inmunomarcaje fluorescente de la forma comentada en la sección anterior (*ver apartado 8*). Se utilizó el músculo LAL que por sus características (*ver apartado 2.1.*) permite trabajar con el músculo entero permitiendo ver la inervación del músculo al completo. Esta técnica presenta una resolución suficiente para poder identificar de forma independiente los tres elementos celulares que forman la unión neuromuscular. Una vez realizada la inmunohistoquímica, se seleccionaron las zonas del músculo ricas en uniones neuromusculares, con la observación de los receptores de ACh marcados con α -BTX-TRICT mediante un microscopio de fluorescencia. Se cortaron fragmentos de músculo de unos 3 mm² y una vez seleccionados los fragmentos se inició el proceso para la obtención de bloques de resina-Spurr y la posterior obtención de los cortes semifinos.

En primer lugar, los fragmentos de músculo se deshidrataron utilizando una batería de alcoholes: 10 minutos en alcohol 30%, 10 minutos en alcohol 50%, 10 minutos en alcohol 70%, 10 minutos en alcohol 96%, 3 x 10 minutos alcohol 100%, 3 x 15 minutos en acetona. Una vez realizada la deshidratación se hizo la pre-inclusión de los fragmentos en acetona-resina Spurr durante 1.5-2 horas con 3:1 (acetona: resina) a temperatura ambiente, en agitación y con los viales que contienen la muestra tapados. En las mismas condiciones, se realizó de nuevo durante 1.5-2 horas con 1:1 (acetona: resina) y por tercera vez con 1:3 durante 1 hora a temperatura ambiente. Se incubó toda

la noche a 4°C en agitación y con los viales tapados. Una vez realizada la pre-inclusión, se realizó la inclusión de los fragmentos en resina Spurr pura. Se realizaron 3 baños de resina de 1.5-2 horas cada baño, a temperatura ambiente, en agitación y con los viales destapados para evaporar el exceso de acetona. El fragmento de músculo se colocó transversalmente en el molde de silicona para hacer los bloques y estos se colocaron en una estufa a 60°C durante 48 horas para solidificar la resina. Una vez solidificados, se realizaron los cortes semifinos (de un grosor de 0.5-0.7 µm, con el micrótopo Reichert Ultracut E microtome (Leica Microsystems, Bannockburn, IL). Los semifinos resultantes se colocaron en un portaobjetos y se observaron con el microscopio confocal (TE 2000-E, Nikon). Se obtuvo una imagen transversal de la unión neuromuscular donde se identificaron los tres elementos celulares que la forman con escasos o nulos puntos de coincidencia entre ellos.

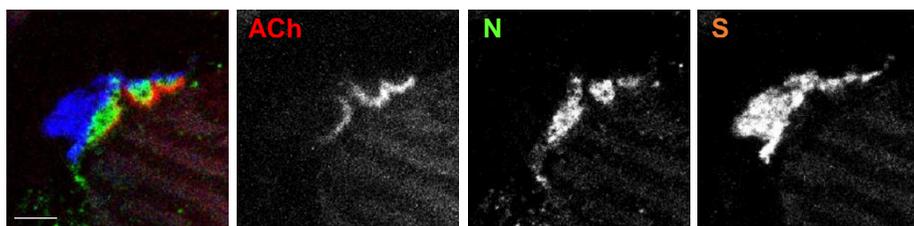


Figura M12. Inmunofluorescencia de NMJs. Marcaje con sintaxina/neurofilamento-200 [terminal nervioso (NT) en verde], S-100 [Schwann cell (SC) en azul], y α -BTX (AChR en rojo). Barra de escala: 10 µm.

Microscopía laser confocal

Para visualizar los músculos, nervios y uniones neuromusculares marcadas con fluorescencia se utilizó un microscopio láser Scanning Confocal NIKON (TE 2000-E). Las imágenes se captaron con un objetivo de 63X o 100X de 1.4 de apertura numérica para aceite (UPlan-Apochromatic objective). Los fluorocromos Alexa fluor 488 (verde), TRICT (rojo) y Alexa fluor 647 (azul) se excitaron secuencialmente con las líneas de 488 nm, 568 nm y 633 nm con láseres de argón-kriptón-He-Ne. Se tuvo en cuenta la fuerza de los láseres para evitar cualquier señal de contaminación de un canal a otro. Las secciones X e Y se recogieron en la dirección Z de una muestra utilizando un *Z-stage* (platina móvil) de elevada resolución. Las proyecciones de máxima intensidad de las sucesivas secciones X, Y se transformaron en proyecciones 3D utilizando un software específico del microscopio láser confocal.

10. ESTADÍSTICA

En los experimentos electrofisiológicos, los datos se han presentado como la media \pm error estándar (media \pm S.E.M). Para evaluar las diferencias entre grupos se utilizó el análisis de varianza (ANOVA) y el test de Bonferroni para las comparaciones múltiples. Para evaluar las diferencias entre dos grupos, se utilizó el t-test de Welch (para valores independientes y asumiendo varianzas distintas). En el caso de la cuantificación de los niveles de proteína, se testaron las diferencias estadísticas entre grupos realizando el t-test o el U-test de Mann-Whitney. Para comparar porcentajes se realizó el test de la Chi cuadrado. Los datos pasaron un test de normalidad (test de Kolmogorov-Smirnov). Los valores se expresaron como media \pm desviación estándar en estos experimentos (media \pm SD). El criterio de significación se fijó en $p < 0.05$.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

LA PROTEÍNA QUINASA C ÉPSILON EN LA UNIÓN NEUROMUSCULAR DE MAMÍFERO ADULTO: LOCALIZACIÓN,
REGULACIÓN MEDIANTE ACTIVIDAD SINÁPTICA Y ACOPLAMIENTO A LA LIBERACIÓN DE ACETILCOLINA.

Teresa Obis Ibáñez

Dipòsit Legal: T 1609-2015

CAPÍTULO III.

RESULTADOS

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

LA PROTEÍNA QUINASA C ÉPSILON EN LA UNIÓN NEUROMUSCULAR DE MAMÍFERO ADULTO: LOCALIZACIÓN,
REGULACIÓN MEDIANTE ACTIVIDAD SINÁPTICA Y ACOPLAMIENTO A LA LIBERACIÓN DE ACETILCOLINA.

Teresa Obis Ibáñez

Dipòsit Legal: T 1609-2015

1. nPKC ϵ EN LA NMJ ADULTA: EXPRESIÓN Y LOCALIZACIÓN

La técnica de Western blot permite medir los niveles relativos de proteínas entre muestras y también permite determinar la especificidad de los anticuerpos que se usarán más adelante en los estudios de inmunomarcaje. Por tanto, se utilizó esta técnica para realizar un estudio bioquímico de la nPKC ϵ y su forma fosforilada y, una vez detectada nPKC ϵ en el músculo esquelético adulto, se identificó su localización precisa en los tres componentes celulares de la NMJ (célula muscular, célula de Schwann y terminal nervioso) utilizando técnicas de inmunohistoquímica (IHQ). Para evaluar la especificidad de los anticuerpos primarios y secundarios se realizaron diversos controles. Los anticuerpos primarios y secundarios fueron omitidos en algunos músculos durante ambos procedimientos para obtener los controles negativos. Las muestras control no exhibieron tinción positiva ni revelaron bandas del peso molecular adecuado en los protocolos respectivos. En los protocolos de dobles tinciones, la omisión de uno de los dos anticuerpos primarios eliminó completamente la tinción correspondiente a ese anticuerpo y, además, no se produjo reacción cruzada con el otro anticuerpo primario. La preincubación de un anticuerpo primario con un exceso del péptido de bloqueo correspondiente (entre tres y ocho veces en exceso) previno también la inmunodetección.

1.1. nPKC ϵ se expresa en el músculo esquelético

Como se ha indicado, para detectar la presencia de la isoforma nPKC ϵ en el músculo esquelético se realizó la técnica de Western blot utilizando un anticuerpo policlonal anti-nPKC ϵ (*ver tabla 1, materiales y métodos*). Este anticuerpo reconoce únicamente a nPKC ϵ y no se producen reacciones cruzadas entre las isoformas de la subfamilia novel {hoja de datos del fabricante; (Hafeez et al. 2011)}. Los análisis de cuantificación por densitometría permitieron analizar la densidad de las bandas y evaluar la cantidad relativa de nPKC ϵ en adulto y en neonato. Como control interno de carga se utilizó un anticuerpo policlonal para la β -actina (peso molecular de 43 kDa; *ver tabla 1, materiales y métodos*).

Los análisis de expresión de nPKC ϵ muestran la presencia de bandas en un peso molecular de 90 kDa en las diferentes muestras de lisado de diafragma de rata: neonatas (P6) y adultas jóvenes (P30-P40). Las bandas detectadas coinciden con el peso molecular predicho para nPKC ϵ (figura R1). La isoforma nPKC ϵ es más abundante en

el músculo esquelético neonato que en el adulto (ratio adulto/neonato = 0.45 ± 0.03 , $n=3$). Debido a que la isoforma nPKC ϵ , igual que el resto de isoformas de PKC, tiene que estar autofosforilada para estar activa, también se estudió la expresión de la isoforma nPKC ϵ fosforilada (pnPKC ϵ). Para ello se utilizó el anticuerpo policlonal anti-pnPKC ϵ (ver tabla 1, materiales y métodos), que detecta el sitio de autofosforilación de nPKC ϵ (Ser-719). La fosforilación de PKC regula su translocación de un compartimento subcelular a otro (Newton 1996; Mochly-Rosen & Gordon 1998) siendo un requisito para la actividad catalítica de PKC (Bornancin & Parker 1997; Dutil et al. 1998). Los análisis densitométricos revelan la presencia de pnPKC ϵ en el músculo esquelético adulto y neonato, siendo su ratio adulto/neonato = 0.50 ± 0.02 , $n=3$. En conclusión, en condiciones de reposo (los músculos no reciben potenciales de acción desde el soma de la motoneurona) nPKC ϵ y pnPKC ϵ se expresan de forma abundante en el músculo esquelético adulto y neonato.

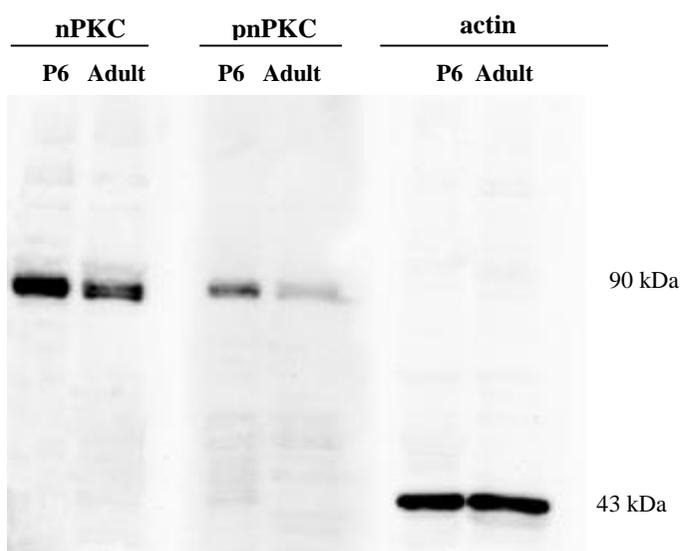


Figura R1. nPKC ϵ y pnPKC ϵ se expresan en el músculo esquelético neonato y adulto. Análisis de Western blot de los niveles de nPKC ϵ y pnPKC ϵ a partir de lisados de diafragma de ratas neonatas (P6) y adultas jóvenes (P30-P40). La cantidad de proteína cargada fue de 15-20 μ g. El peso molecular predicho para ambas moléculas es el indicado (90 kDa). En todos los experimentos se usó β -actina (43 kDa) como control interno de carga para los análisis densitométricos y se obtuvo la proteína total como segundo control. En la figura que muestra la actina, la membrana también fue preincubada con el péptido de bloqueo del anticuerpo anti-nPKC ϵ (100 μ g/0.5 ml).

1.2. nPKC ϵ se expresa en la fracción de la membrana sináptica del músculo esquelético

Con el objetivo de identificar las funciones sinápticas de la isoforma nPKC ϵ se investigó la distribución de nPKC ϵ y pnPKC ϵ en la membrana sináptica y/o extrasináptica en el músculo esquelético adulto siguiendo el protocolo descrito anteriormente (*ver figura M10, materiales y métodos*), (Besalduch et al. 2010).

El músculo diafragma presenta un patrón de inervación conocido. Las zonas sinápticas o neurales concentran gran parte de las NMJs cerca de la región central de las células musculares, facilitando la separación de ambas regiones de forma precisa. En primer lugar, mediante técnicas de fluorescencia (*ver apartado 2.2, materiales y métodos*), se realizaron experimentos control separando las áreas sináptica (Syn) y extrasináptica (Ex) del músculo esquelético para detectar las NMJs en ambas regiones. La imagen fluorescente de la figura M10 (*ver materiales y métodos*) muestra la localización de las NMJs exclusivamente en la región denominada sináptica de las NMJs, marcadas con α -bungarotoxina conjugada con TRICT.

Los análisis de Western blot para nPKC ϵ y pnPKC ϵ se realizaron utilizando los mismos anticuerpos policlonales que en el apartado anterior (*ver tabla 1, materiales y métodos*), en muestras de lisados de membrana de diafragma de ratas adultas jóvenes (P30-P40). Para los análisis de cuantificación por densitometría se utilizó β -actina como control interno de carga (*ver tabla 1*). Los análisis cuantitativos indican que la isoforma nPKC ϵ y su forma fosforilada (pnPKC ϵ) se expresan en la fracción sináptica de la membrana y no se detectan en la fracción extrasináptica.

En conjunto, los análisis de expresión revelan que la isoforma nPKC ϵ y su forma fosforilada, pnPKC ϵ , se expresan únicamente en la fracción de la membrana sináptica en la célula muscular lo que sugiere una implicación selectiva de esta isoforma en las funciones sinápticas.

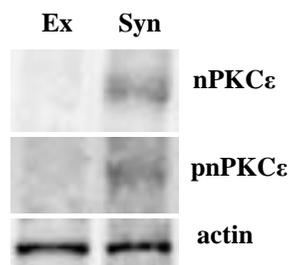


Figura R2. *nPKC ϵ* y *pnPKC ϵ* se expresan en la fracción de la membrana sináptica en el músculo esquelético adulto. Los análisis de Western blot muestran la presencia de *nPKC ϵ* y de *pnPKC ϵ* en la fracción sináptica (Syn) en muestras de diafragma de rata adulta. Se detectaron bandas a 90 kDa en ambos casos, correspondientes al peso molecular predicho. Los valores se normalizaron con los niveles totales de β -actina (43 kDa).

1.3. Localización de *nPKC ϵ* en la NMJ adulta

1.3.1. Inmunolocalización

Para determinar las funciones de las isoformas de la familia PKC es crucial el conocimiento preciso de su localización celular en los elementos pre-, post- y/o perisinápticos de la NMJ. Por lo tanto, se realizaron análisis de inmunofluorescencia indirecta (IFI) combinados con análisis de microscopía confocal para determinar la localización de la isoforma *nPKC ϵ* en la NMJ adulta, en los músculos LAL y diafragma. Se realizaron varios controles de especificidad, tal y como se ha explicado al inicio de este apartado y, en ningún caso, se detectó marcaje inespecífico.

Todas las imágenes de la figura R3 muestran una intensa reactividad para la isoforma *nPKC ϵ* en el área sináptica como indica la coincidencia de inmunomarcaje de *nPKC ϵ* con el marcaje de AChR. La figura R3A muestra una NMJ con doble marcaje: AChRs en rojo y *nPKC ϵ* en verde. La figura R3B muestra una NMJ con triple marcaje: AChRs en rojo, *nPKC ϵ* en verde y la célula de Schwann en azul. Se observa el inmunomarcaje positivo para la isoforma *nPKC ϵ* , que aparece concentrada en el elemento presináptico, situada sobre las hendiduras del elemento postsináptico (*asteriscos*). Este marcaje se aprecia en las secciones confocales semiconsecutivas (A2-4,

B2-4) y en las proyecciones máximas (A1, B1) de las NMJs. Sin embargo, no se aprecia marcaje en las células gliales ni en las células musculares (figura R3B).

Para mejorar el análisis de la distribución celular de la quinasa en la NMJ se obtuvieron secciones semifinas de los músculos teñidos con inmunofluorescencia múltiple (Lanuza et al. 2007). Como se observa en la figura R3C, se realizó una tinción triple de colocalización de la isoforma nPKC ϵ con los marcadores moleculares de los tres elementos celulares en la NMJ: la célula muscular (nAChR marcada con α -bungarotoxina marcada con fluorescencia), el terminal nervioso (sintaxina o syntaxina y neurofilamento) y la célula de Schwann (S-100). En la imagen de colocalización (figura R3C1) vemos, cuando se tiñe nPKC ϵ con α -bungarotoxina y S-100, el marcaje de nPKC ϵ (en verde) en forma de pequeñas áreas granulares localizadas sobre la superficie del postsináptico de nAChRs (en rojo) y rodeado por la célula de Schwann (en azul). Este marcaje coincide con los botones axonales del terminal nervioso ya que colocaliza con la tinción syntaxina/neurofilamento (inserción en C1, fig. R3C). En la figura R3A1 se observa que el axón preterminal es también positivo para nPKC ϵ .

Por lo tanto, los resultados indican la localización única de nPKC ϵ en el componente presináptico: se expresa exclusivamente en los terminales nerviosos de la NMJ.

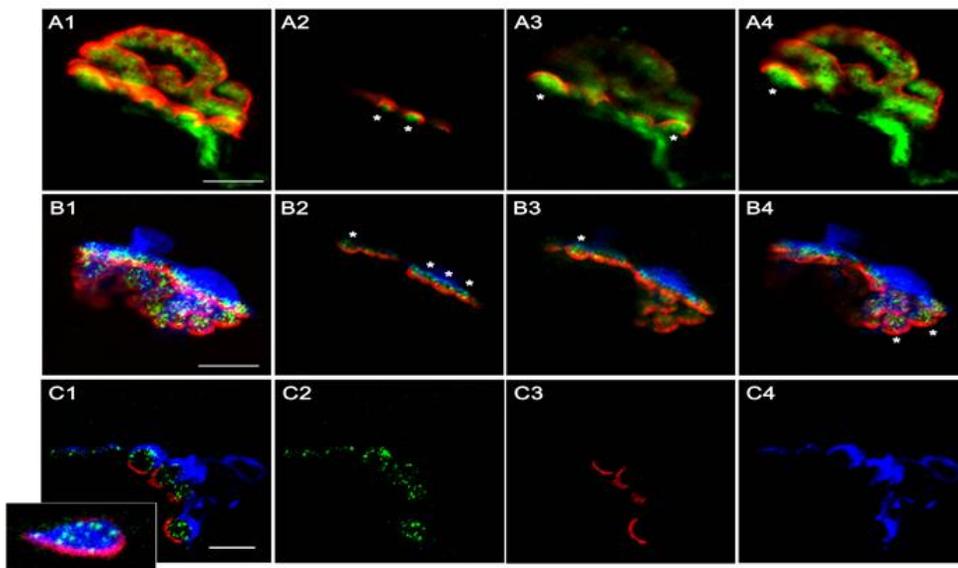


Figura R3. La isoforma nPKCε se localiza en el terminal nervioso de la NMJ adulta.

A1. Muestra la reconstrucción de una NMJ marcada con α -bungarotoxina fluorescente (en rojo) para los AChRs y con un anticuerpo específico para la isoforma nPKCε (en verde). **A2-A4.** Muestra varias secciones confocales semiconsecutivas de la NMJ mostrada en A1. El (*) indica la localización de la isoforma nPKCε en los botones presinápticos del terminal nervioso, sobre las hendiduras postsinápticas que delimitan los AChRs. **B1.** Reconstrucción de una NMJ en la que se identifican los tres componentes de la sinapsis con triple marcaje: se observan en rojo los AChRs (α -bungarotoxina fluorescente), en azul las células de Schwann (inmunomarcaje con un anticuerpo anti S-100) y en verde la isoforma nPKCε (inmunomarcaje con un anticuerpo anti-nPKCε). **B2-B4.** Secciones confocales semiconsecutivas de la NMJ mostrada en B1. El (*) indica en inmunomarcaje granular de positivo para nPKCε concentrado en los terminales nerviosos sobre las hendiduras sinápticas. No se observa marcaje de la glía ni de la célula muscular. **C.** Inmunohistoquímica de alta resolución en secciones semifinas de un músculo marcado con triple inmunofluorescencia. En **C1**, la imagen de colocación muestra el inmunomarcaje de nPKCε (en verde, **C2**), AChRs (en rojo, **C3**) y SCs (en azul, S-100, **C4**) donde nPKCε queda situada en medio del sándwich formado por la célula glial y la célula muscular. En la imagen insertada (en **C1**) el triple marcaje de nPKCε (en verde), AChRs (en rojo) y terminal nervioso (en azul, neurofilamento-200/sintaxina), se muestra la colocación de los marcajes de nPKCε y sintaxina. Las barras de escala indican 10 μ m

1.3.2. Denervación del músculo esquelético

Para confirmar que nPKC ϵ se localiza exclusivamente en la fracción neural, se realizó la denervación del músculo EDL (del inglés, *extensor digitorum longus*), se esperó 1-3 días, y se detectaron los niveles de nPKC ϵ y pnPKC ϵ mediante la técnica del Western blot (figura R4). Los análisis mediante Western blot revelan la desaparición casi completa de ambas proteínas 1 día después de su denervación (ratio denervado/control 0.11 ± 0.08 , $p < 0.05$), indicando que nPKC ϵ está localizada en el nervio. Por el contrario, la expresión de la isoforma cPKC α , de localización ubicua (Besalduch et al. 2010), disminuye pero mucho menos 3 días después de la denervación del EDL (ratio 0.69 ± 0.12 $p < 0.05$); ver figura R4). Por lo tanto, se puede concluir que nPKC ϵ y pnPKC ϵ se expresan selectivamente en el nervio.

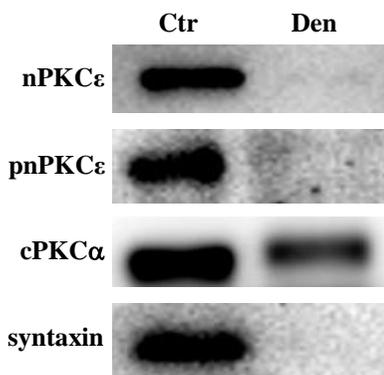


Figura R4. Análisis de la expresión de nPKC ϵ , pnPKC ϵ y cPKC α en músculos EDL denervados. El Western blot muestra la completa desaparición de la isoforma presináptica nPKC ϵ y de su forma fosforilada (pnPKC ϵ) en un lisado de EDL tres días después de su denervación (Den) respecto a los niveles obtenidos en el músculo sin denervar (Ctr). Sin embargo, la expresión de la isoforma pre- y postsináptica (cPKC α) disminuye poco (ratio 0.69 ± 0.12 $p < 0.05$). Como control interno se utilizó la sintaxina, que está presente únicamente en el nervio.

2. LA EXPRESIÓN DE nPKC ϵ ESTÁ MODULADA POR LA ACTIVIDAD SINÁPTICA

La acción presináptica de PKC es uno de los mecanismos de modulación de la liberación del neurotransmisor y provoca cambios en la eficacia sináptica (Santafé et al. 2005; Santafé et al. 2006; Santafé et al. 2009). Además, se ha descrito como una acción dependiente de la estimulación eléctrica en el sistema neuromuscular (Jia et al. 1999; Lanuza et al. 2000; Li et al. 2001; Besalduch et al. 2010). Por lo tanto, una vez localizada nPKC ϵ en el terminal nervioso de las NMJs y confirmada la expresión de nPKC ϵ y pnPKC ϵ en la membrana sináptica, se investigó si los niveles de expresión de nPKC ϵ en la membrana sináptica están modulados por la actividad sináptica.

Para ello, se evaluó el efecto del estímulo eléctrico, con y sin la consiguiente contracción muscular, que denominaremos (ES + C) y ES, respectivamente, en los niveles de expresión de nPKC ϵ y pnPKC ϵ , siguiendo el protocolo de estimulación descrito previamente (*ver apartado 4, materiales y métodos*). Los cambios de expresión con el estímulo indicarían la participación de esta isoforma en funciones sinápticas dependientes de actividad.

Se analizaron diferentes homogenados de hemidiafragma de rata adulta (P30-40) por inmunoreactividad mediante la técnica de Western blot. Para la detección de nPKC ϵ y pnPKC ϵ en el músculo esquelético, se utilizaron anticuerpos específicos para estas proteínas (*ver tabla 1, materiales y métodos*). Para cada experimento independiente, los dos hemidiafragmas del mismo animal se utilizaron para la condición experimental y para el control, con el objetivo de minimizar las diferencias entre individuos. Se utilizaron un mínimo de 3 animales por cada experimento independiente. Los músculos fueron tratados bajo diferentes condiciones experimentales, detalladas a continuación.

2.1. nPKC ϵ disminuye gradualmente con el tiempo en la preparación *ex vivo*

En primer lugar, se realizaron los análisis de expresión de nPKC ϵ y pnPKC ϵ en muestras de diafragma sin estimular eléctricamente (condiciones basales). Los diafragmas fueron extraídos *ex vivo* y equilibrados en Ringer normal oxigenado durante 10, 30, 60 y 90 minutos.

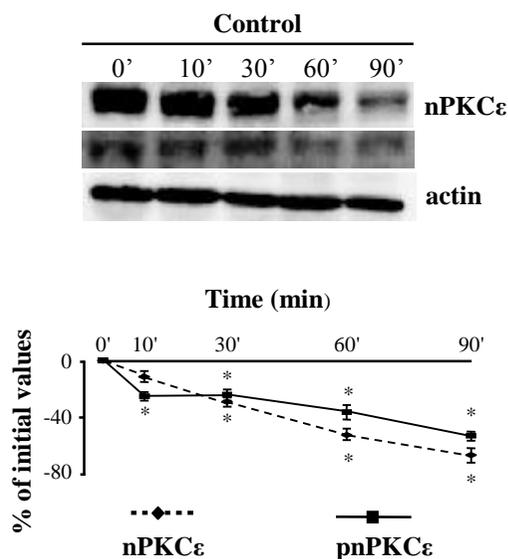


Figura R5. Curso temporal de los niveles de expresión de nPKC ϵ y pnPKC ϵ en la fracción de la membrana sináptica en músculos sin estimular. Los análisis de Western blot (arriba) muestran los niveles de expresión de nPKC ϵ y de pnPKC ϵ en el músculo diafragma a diferentes tiempos. El curso temporal representa el tiempo que la preparación neuromuscular permaneció equilibrada en Ringer normal oxigenado desde su extracción *ex vivo*. Los valores de nPKC ϵ y pnPKC ϵ se normalizaron con los niveles totales de β -actina. El gráfico de puntos (abajo) muestra los niveles de nPKC ϵ y de pnPKC ϵ detectados a diferentes tiempos desde su extracción, expresados en porcentaje respecto a los valores iniciales ($t = 0$). Los resultados se expresan como media \pm SD de 3 experimentos independientes. * $P < 0.05$.

Los resultados muestran la disminución gradual en los niveles de expresión de nPKC ϵ y pnPKC ϵ con el tiempo, en preparaciones neuromusculares no estimuladas. Considerando que la isoforma nPKC ϵ está presente de forma constitutiva en la membrana presináptica (*ver apartado 1.2., resultados*) y que la fosforilación de PKC es indicativa de su actividad quinasa (Newton 1995b; Ron & Kazanietz 1999; Johnson et al. 2000), se puede suponer que esta caída en la expresión de nPKC ϵ es el resultado de la inactividad neural de las preparaciones extraídas *ex vivo*. A continuación, se analizó el efecto del estímulo en los niveles de expresión de nPKC ϵ y pnPKC ϵ .

2.2. nPKC ϵ disminuye en condiciones de estimulación del nervio en ausencia de contracción muscular

La estimulación eléctrica del nervio frénico a baja frecuencia (1 Hz) no produce *per se* fenómenos de facilitación o depresión que afecten a las funciones presinápticas (Katz & Miledi 1968). Además, PKC se acopla a la liberación de ACh cuando imponemos una actividad moderada a las NMJs mediante estimulación eléctrica continua de 1 Hz (Besalduch et al. 2010). Por lo tanto, se aplicó un paradigma de estimulación continua del nervio frénico (1 Hz; t = 10 y t = 60 min), siguiendo el protocolo descrito anteriormente (*ver apartado 4, materiales y métodos*), y se estudiaron los niveles de expresión de nPKC ϵ y de pnPKC ϵ en la membrana sináptica (figura R6).

Para estudiar el efecto de la actividad sináptica en los niveles de expresión de nPKC ϵ en la membrana sináptica, se evaluaron por separado los efectos del estímulo en el componente presináptico y de la contracción muscular en el componente postsináptico (*ver apartado 5.1., materiales y métodos*). La estimulación eléctrica del músculo (ES) produjo la disminución de la cantidad de nPKC ϵ y de su forma fosforilada en la membrana sináptica de forma significativa (figura R6), sugiriendo que la estimulación conlleva algún consumo de la quinasa relacionado con la actividad sináptica. La contracción se abolió mediante la técnica denominada *cut* (Santafé et al. 2001; Santafé et al. 2004; Santafé et al. 2009) o utilizando la neurotoxina μ -Conotoxina GIIIB (1.5 μ M; μ -CgTx GIIIB; (Santafé et al. 2007; Santafé et al. 2009).

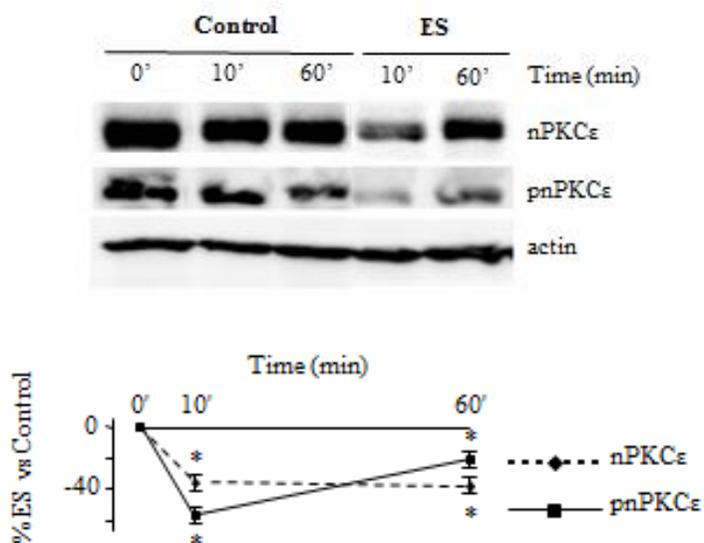


Figura R6. Curso temporal del efecto del estímulo (1 Hz) en los niveles de expresión de nPKCε y pnPKCε en la fracción de la membrana sináptica. Los análisis de Western blot (arriba) muestran los cambios en la expresión de nPKCε y de pnPKCε en músculos estimulados de forma continua a 1 Hz durante 10 y 60 minutos, y en músculos sin estimular (control, mantenidos en Ringer normal). Se bloqueó la contracción mediante la técnica *cut*. El gráfico de puntos (abajo) muestra los niveles de expresión de nPKCε y de pnPKCε a diferentes tiempos de aplicación del estímulo eléctrico ($t = 10$ min; $t = 60$ min), expresados en porcentaje respecto a los niveles obtenidos en los hemidiafragmas control. Los niveles de nPKCε y pnPKCε se normalizaron con los niveles totales de β-actina. Los resultados muestran la media \pm SD de 3 experimentos independientes. * $P < 0.05$.

El análisis cuantitativo muestra una reducción inicial ($t = 10$ min) y la recuperación posterior y mantenimiento (durante 60 minutos) de los niveles de expresión de ambas proteínas cuando se aplica el estímulo eléctrico en las preparaciones estimuladas (ES) respecto a las preparaciones sin estimular (control).

Se realizaron estudios complementarios para detectar artefactos debido al método de bloqueo de la contracción utilizado (figura R7). Para ello, se hicieron varios Western blot de nPKCε para comparar el efecto de los distintos métodos de abolición de la contracción muscular: *cut* y μ -CgTx GIIB (ver apartado 5.1., materiales y

métodos). Los datos cuantitativos muestran que: (1) los niveles de nPKC ϵ no difieren significativamente en los músculos en los que se realizó el *cut* muscular (que denominaremos Cut) de los obtenidos por abolición de la contracción muscular con μ -CgTX GIIIB (que denominaremos μ CTX); (2) nPKC ϵ disminuye significativamente en músculos estimulados en los que la contracción muscular fue suprimida mediante μ -CgTX (ES/ μ CTX) de forma similar a la observada en músculos estimulados en los que la contracción fue suprimida mediante *cut* (ES/Cut) (figura R8). (3) No existen diferencias significativas entre las ratios μ CTX vs Cut en músculos estimulados. Estos resultados, por tanto, descartan los posibles artefactos que pudieran ser introducidos por los distintos métodos utilizados para abolir la contracción muscular.

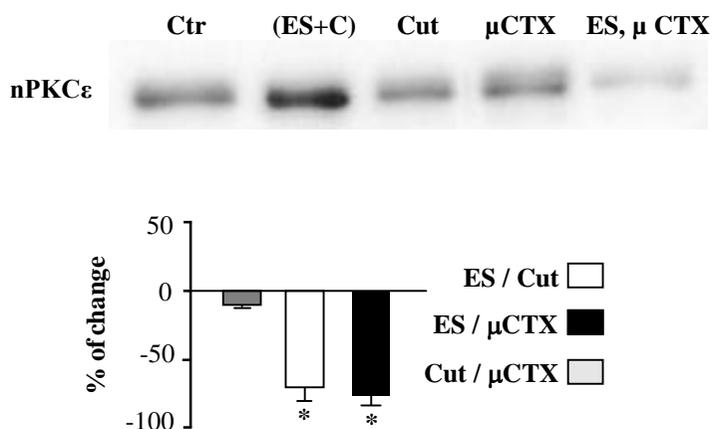


Figura R7. Ratio del efecto de los métodos utilizados para abolir la contracción muscular en músculos estimulados. El análisis de Western blot (arriba) muestra los niveles de nPKC ϵ obtenidos en diferentes situaciones: (1) en músculos no estimulados y sin abolir la contracción muscular (Ctr), en músculos no estimulados a los que se realizó el *cut* muscular (Cut) o fueron tratados con μ -CgTx GIIIB (μ CTX); (2) en músculos estimulados sin abolición de la contracción (ES+C); (3) en músculos estimulados eléctricamente y tratados con μ -CgTx GIIIB (ES, μ CTX). Los datos cuantitativos muestran las ratios Cut vs μ CTX en los músculos estimulados (abajo). Los niveles de nPKC ϵ se normalizaron con los niveles totales de β -actina. Los resultados muestran la media \pm SD de 3 experimentos independientes. * $P < 0.05$.

2.3. nPKC ϵ aumenta en condiciones de estimulación del nervio resultando en contracción muscular

La contracción del músculo esquelético, inducida por estímulo eléctrico, provoca la translocación de PKC a la membrana sináptica, que a su vez es un marcador de la activación de la quinasa (Richter et al. 1987; Cleland et al. 1989; Antipenko et al. 1999). Además, se ha demostrado que el incremento de la actividad sináptica acompañada por la contracción muscular resultante provoca el aumento en los niveles de expresión de las isoformas convencionales (cPKCs) en la fracción de la membrana (Besalduch et al. 2010). Sin embargo, no hay antecedentes que relacionen la actividad sináptica y los cambios de expresión de la isoforma novel nPKC ϵ .

Cuando se aplica el paradigma de estimulación del músculo esquelético (1 Hz, 30 min) se generan *inputs* sinápticos y la consecuente contracción muscular. Esto provoca un incremento de forma significativa de la cantidad de nPKC ϵ y de su forma fosforilada en la fracción de la membrana sináptica (figura R8). Estos resultados indican que la contracción muscular induce un cambio en nPKC ϵ que revierte el efecto producido únicamente por el estímulo nervioso presináptico.

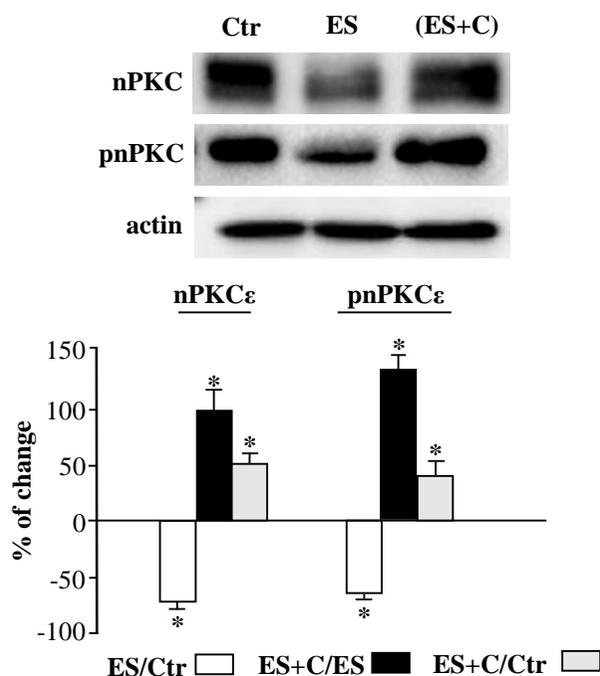


Figura R8. La contracción muscular aumenta los niveles de expresión de nPKCε y pnPKCε en la fracción de la membrana sináptica. Los análisis de Western blot (arriba) muestran la disminución de los niveles de nPKCε y pnPKCε en la membrana sináptica en músculos estimulados de forma continua (1 Hz, 30 min) cuando la contracción muscular es abolida con *cut* (ES) respecto a los niveles detectados en músculos *cut* sin estimular (Ctr). Por el contrario, aplicando el mismo paradigma de estimulación, sin bloquear la contracción muscular (ES+C), los niveles de expresión de ambas proteínas aumentan de forma significativa. Los histogramas (abajo) muestran las ratios de nPKCε y pnPKCε, expresadas en porcentajes de variación, comparando las diferentes condiciones. Los niveles de nPKCε y pnPKCε se normalizaron con los niveles totales de β-actina. Los resultados muestran la media ± SD de 3 experimentos independientes. * $P < 0.05$.

2.4. La contracción muscular provoca cambios en la expresión de nPKC ϵ a través de la actividad de TrkB

Los resultados expuestos anteriormente (figuras R6 y R8) muestran que, en los músculos sometidos a contracción muscular, los niveles de nPKC ϵ y de su forma fosforilada se incrementan de manera significativa en la fracción de la membrana sináptica. Por el contrario, cuando la actividad sináptica no va acompañada por la actividad contráctil del músculo, los mecanismos para mantener y activar la nPKC ϵ no se producen y, en consecuencia, los niveles de la isoforma disminuyen significativamente. La contracción muscular induce por tanto un cambio que puede revertir el efecto de la estimulación nerviosa *per se*. A partir de estos resultados, hipotetizamos que la causa de este aumento de nPKC ϵ en la membrana presináptica podría deberse a la acción de neurotrofinas provenientes del componente postsináptico y que contribuirían a este aumento dependiente de la contracción muscular a través del receptor tirosina quinasa B (TrkB), localizado en los músculos esqueléticos adultos, y único receptor de neurotrofinas involucrado hasta el momento en el control inmediato de la liberación de ACh en adulto (Zhan et al. 2003; Pitts et al. 2006) (*apartado 4, introducción*).

Para demostrar si la activación de TrkB, como resultado de la contracción muscular, es un mecanismo crítico que afecta a los niveles de nPKC ϵ en la membrana, se suprimió de forma selectiva la actividad de TrkB de los músculos en contracción utilizando inhibidores selectivos de TrkB. Se bloqueó selectivamente TrkB con el ligando ANA-12 (*ver apartado 5.2, materiales y métodos*), que se une al receptor sin alterar las funciones de TrkA y TrkC (Cazorla et al. 2011) e inhibe la fosforilación inducida por la unión TrkB-BDNF. Se utilizó también el anticuerpo anti-TrkB (clone 47/TrkB), que actúa inhibiendo la unión de BDNF a TrkB de forma efectiva (Balkowiec & Katz 2000).

Los análisis de expresión muestran una disminución significativa de la isoforma nPKC ϵ , y su forma fosforilada en los músculos estimulados con contracción (ES + C) e incubados con ANA-12 o anti-TrkB (clone 47/TrkB) (figura R9). Estos resultados demuestran que la contracción muscular inducida por actividad eléctrica del nervio promueve el aumento de la isoforma presináptica nPKC ϵ a través de la actividad del receptor TrkB. Esto sugiere que la contracción del músculo induce el aumento de la interacción específica de un factor de neurotrófico con TrkB que activa la señalización intracelular a través del receptor aumentando los niveles de la isoforma en la membrana

sináptica. Se añadió exógenamente BDNF (10 nM, 30 minutos) en músculos estimulados sin contracción (ES) y se detectó un aumento significativo de la cantidad de pnPKC ϵ (58,78% \pm 2,1% de cambio, $p < 0,05$). Este resultado indica también que el BDNF exógeno imita efecto de contracción muscular en los niveles de nPKC ϵ . Se eligió la dosis de BDNF en base a un estudio previo temporal de dosis-respuesta realizado en el mismo músculo para determinar su efecto sobre el tamaño de la EPP evocado (N. Garcia et al. 2010).

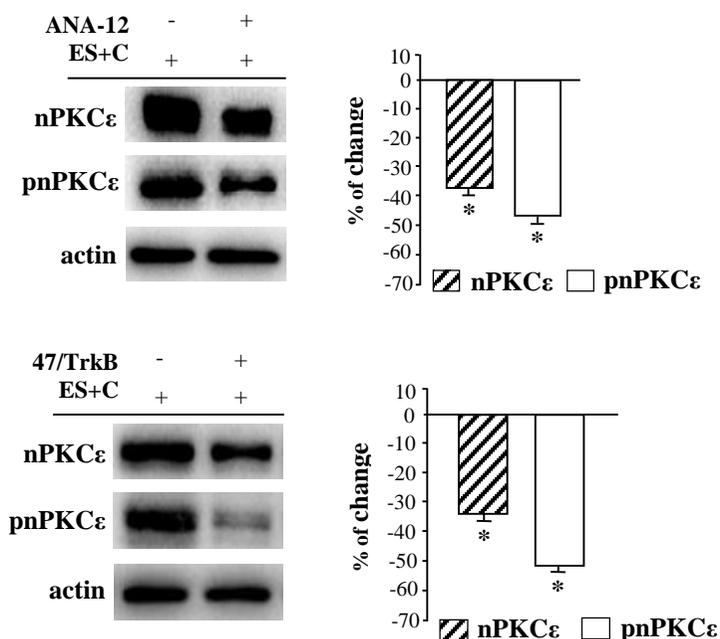


Figura R9. El bloqueo selectivo de TrkB previene el incremento de la isoforma nPKC ϵ inducido por la contracción muscular. Los análisis de Western blot (izquierda) muestran los niveles de inmunoreactividad de nPKC ϵ y pnPKC ϵ en músculos con contracción (ES+C) en presencia (+) o ausencia (-) de los inhibidores selectivos de TrkB: ANA-12 (A) y anti-TrkB (47/TrkB) (B). En todos los músculos, el nervio frénico fue estimulado a 1 Hz de forma continua durante 30 minutos. Los histogramas cuantitativos (derecha) muestran la disminución de la isoforma en valores de porcentaje, en músculos (ES+C) e incubados con el inhibidor de TrkB vs músculos (ES+C). Los valores se normalizaron con β -actina y se expresan como media \pm SD. Para cada columna: $n = 3$ músculos. * $P < 0,05$.

3. ACTIVIDAD CATALÍTICA DE nPKC ϵ : FOSFORILACIÓN DE MARCKS

Para comprender mejor el papel de nPKC ϵ en las funciones sinápticas, en este apartado se analizó la fosforilación de un posible sustrato. Aunque la translocación y fosforilación de PKC son indicativas de su activación (Kraft et al. 1982), una medida más directa de su actividad catalítica es la fosforilación de los sustratos. No se conocen sustratos específicos para nPKC ϵ , de modo que se evaluó la fosforilación de un conocido sustrato de PKC que participa en la dinámica del citoesqueleto, la motilidad celular y la exocitosis (Arbuzova et al. 2002), la proteína denominada MARCKS. MARCKS se ha descrito como una molécula involucrada en la neurotransmisión (Park et al. 2006) debido a su papel clave en la exocitosis en las sinapsis (Prekeris et al. 1996; Rosé et al. 2001; Arbuzova et al. 2002; Park et al. 2006), que a su vez es regulada por la quinasa nPKC ϵ (Park et al. 2006). Por otro lado, la fosforilación de MARCKS se utiliza como indicador tanto de la activación como de la inhibición de la función de PKC (Brandman et al. 2007). El conocer si la fosforilación de MARCKS depende de nPKC ϵ en la NMJ y si esta fosforilación depende de la actividad sináptica (con y sin contracción muscular) han sido los objetivos de este apartado de la tesis.

3.1. pMARCKS se expresa en el músculo esquelético

En primer lugar, se analizó la expresión de pMARCKS en el músculo diafragma. La figura R10 muestra el curso temporal de los niveles de expresión de pMARCKS en músculos *ex vivo*, sin estimular. La expresión de pMARCKS disminuye inicialmente ($22.05\% \pm 3.4$; $t = 10$ min) y se estabiliza con el tiempo ($t = 90$ minutos)

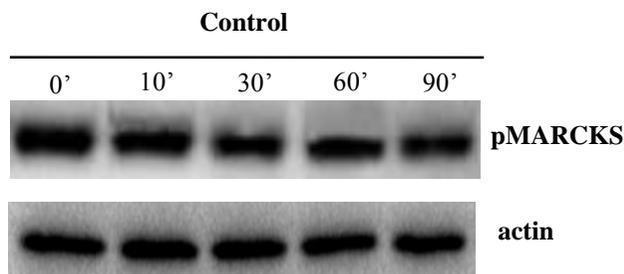


Figura R10. Curso temporal de los niveles de expresión de pMARCKS en músculos sin estimular. Los análisis de Western blot muestran los niveles de expresión de pMARCKS a diferentes tiempos desde la extracción del diafragma ex vivo, que se mantiene equilibrado en Ringer normal oxigenado. La expresión de pMARCKS disminuye inicialmente ($22.05\% \pm 3.4$; $t = 10$ min) y se estabiliza con el tiempo ($t = 90$ minutos). Los niveles de expresión de pMARCKS se normalizaron con los niveles totales de β -actina.

La denervación del músculo EDL elimina totalmente la inmunodetección de pMARCKS (figura R11) lo que indica su localización presináptica. En la figura R11 también se muestra que la syntaxina, una molécula situada exclusivamente en el componente presináptico en la NMJ y que se ha utilizado como control, tampoco se detecta después de la denervación.

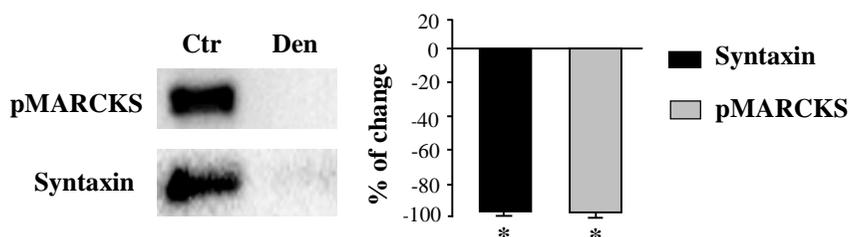


Figura R11. Nivel de expresión de pMARCKS en músculos EDL denervados. Los análisis mediante Western blot de pMARCKS y syntaxina muestran los niveles de ambas proteínas en músculos control (Ctr) y denervados (Den). El histograma de la derecha muestra la disminución de pMARCKS y syntaxina, en valores de porcentaje, en los músculos denervados. Los niveles de expresión de pMARCKS se normalizaron con los niveles totales de β -actina. Los resultados muestran la media \pm SD de 3 experimentos independientes. * $P < 0.05$.

3.2. La fosforilación de MARCKS depende de nPKC ϵ

Con el objetivo de analizar la posible participación constitutiva de nPKC ϵ en la fosforilación de MARCKS, se utilizó una herramienta no farmacológica, el péptido inhibidor específico de la translocación nPKC ϵ , ϵ V1-2 (J. Johnson et al. 1996). Este péptido interfiere en la unión de nPKC ϵ con su proteína de anclaje ϵ RACK impidiendo la translocación específica de nPKC ϵ a la membrana y previene por tanto su actividad catalítica (*ver apartado 5.2., materiales y métodos*) (Mochly-Rosen & Gordon 1998). Por lo tanto se usó el péptido para bloquear la actividad de la isoforma nPKC ϵ y evaluar la fosforilación de MARCKS en la NMJ bajo estas condiciones.

En primer lugar, se evaluó el curso temporal del efecto de ϵ V1-2 en los niveles de expresión de nPKC ϵ y pnPKC ϵ en preparaciones de hemidiafragma incubadas con el péptido. La figura R12 muestra cómo la incubación con el péptido ϵ V1-2 (100 nM) produce una rápida (10 min) disminución significativa de los niveles de nPKC ϵ y pnPKC ϵ y esta se mantiene hasta 60 minutos.

Se analizó también el efecto del péptido sobre los niveles de la chaperona molecular Hsp70 (figura 13). Esta molécula se une a PKC madura y la estabiliza, permitiendo así que entre de nuevo en el *pool* de moléculas catalíticamente competentes para la señalización (Gao & Newton 2002).

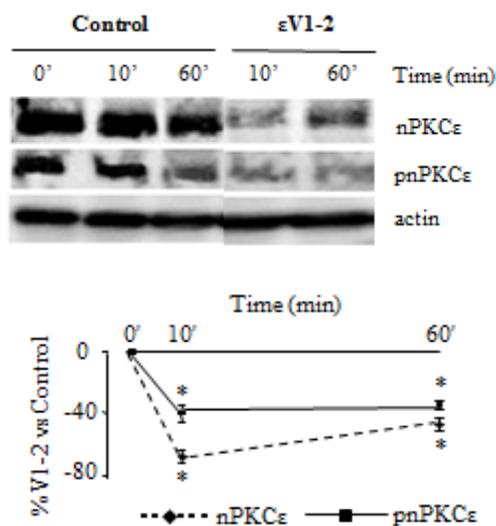


Figura R12. Curso temporal del efecto de $\epsilon V1-2$ en los niveles de expresión de nPKC ϵ y pnPKC ϵ en la fracción de la membrana sináptica en músculos sin estimular. Los análisis de Western blot (arriba) muestran los niveles de nPKC ϵ y de su forma fosforilada en músculos incubados con el péptido $\epsilon V1-2$ (100 μM) durante 10 y 60 minutos y en músculos mantenidos en Ringer normal (control). El gráfico puntos muestra los niveles de nPKC ϵ y de pnPKC ϵ a diferentes tiempos de incubación con el péptido $\epsilon V1-2$, expresados en porcentajes de variación respecto a los obtenidos en el control. Los niveles de nPKC ϵ y pnPKC ϵ se normalizaron con los niveles totales de β -actina. Los resultados muestran la media \pm SD de tres experimentos independientes. * $P < 0.05$.

Estos resultados indican que nPKC ϵ puede estar involucrada tónicamente en algún mecanismo del terminal nervioso ya que al bloquear su translocación a la membrana sináptica, y por tanto su actividad, en condiciones basales, se observa una disminución significativa de la isoforma. Se observa, además, que la inhibición de nPKC ϵ con el péptido tiene un efecto diferente sobre nPKC ϵ y pnPKC ϵ (nPKC ϵ : 70 %; pnPKC ϵ : 40 %; t = 10 min).

La figura R13 muestra que Hsp70 aumenta de forma significativa en presencia del péptido inhibidor de nPKC ϵ . Este resultado sugiere que podría existir una mayor interacción de Hsp70 con pnPKC ϵ , lo cual podría prolongar la vida media de la nPKC ϵ activa (pnPKC ϵ) que mantendría así su función catalítica.

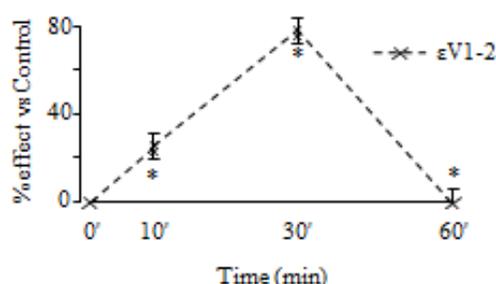
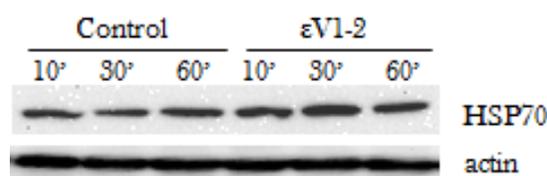


Figura R13. Curso temporal del efecto de ϵ V1-2 en los niveles de expresión de Hsp70 en músculos sin estimular. Los análisis mediante Western blot muestran los niveles de Hsp70 en músculos sin estimular, incubados con ϵ V1-2 (100 μ M) a diferentes tiempos. Las bandas control corresponden a las preparaciones mantenidas en Ringer normal sin incubar con el péptido. El gráfico de puntos muestra el efecto del péptido sobre los niveles de Hsp70, expresado en porcentajes de variación respecto a los valores obtenidos en los músculos control. Los niveles de Hsp70 se normalizaron con los niveles totales de β -actina. * $P < 0.05$.

Debido a la disminución significativa de los niveles de nPKC ϵ y pnPKC ϵ en la membrana sináptica en presencia del péptido ϵ V1-2, se evaluó la posible relación entre la actividad de nPKC ϵ y la fosforilación de MARCKS en el músculo esquelético. La figura R14 muestra cómo la incubación del músculo diafragma con el péptido ϵ V1-2 durante 10 minutos provoca la disminución significativa de pMARCKS. Muestra también la disminución significativa de nPKC ϵ y pnPKC ϵ y el aumento de Hsp70 en estas mismas

condiciones. Estos resultados muestran la relación entre nPKC ϵ y la fosforilación de MARCKS en el músculo esquelético.

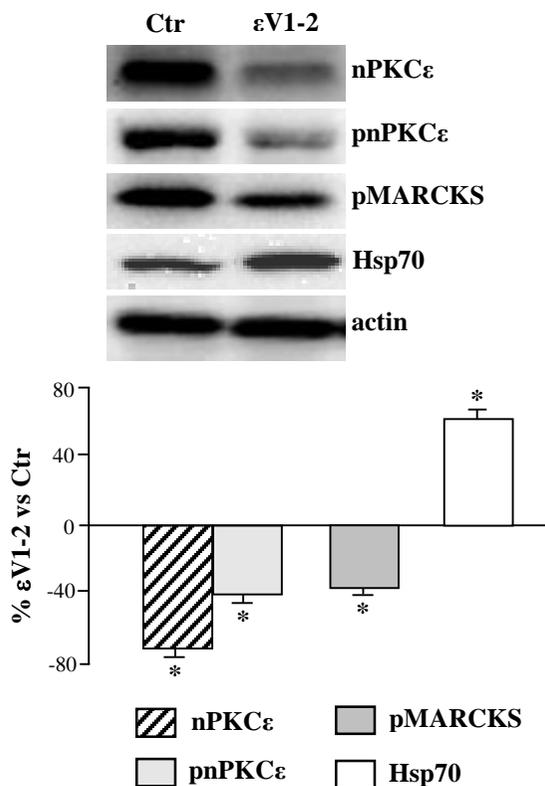


Figura R14. Efecto de ϵ V1-2 en los niveles de expresión de nPKC ϵ , pMARCKS y Hsp70 en músculos sin estimular. Los análisis de Western blot (arriba) muestran los niveles de expresión de las proteínas indicadas en músculos tratados con el péptido ϵ V1-2 (100 μ M, 10 minutos) desde la extracción del músculo *ex vivo*. Los valores control (Ctr) corresponden a los niveles de expresión de las diferentes proteínas en músculos extraídos y equilibrados en Ringer normal oxigenado. Los histogramas (abajo) muestran el efecto del péptido ϵ V1-2 en los músculos sin estimular, expresado en valores de porcentaje respecto a los valores control (músculos sin tratar con el péptido). Los niveles de las proteínas se normalizaron con los niveles totales de β -actina. Los resultados muestran la media \pm SD de 3 experimentos independientes. * $P < 0.05$.

3.3. pMARCKS aumenta en condiciones de estimulación del nervio

Para determinar si la estimulación a 1 Hz (actividad sináptica *per se*, en ausencia de contracción muscular) induce la actividad catalítica de nPKC ϵ sobre MARCKS en el músculo esquelético, se sometieron los extractos de proteínas de los músculos estimulados a inmunotransferencia para detectar pMARCKS. El análisis cuantitativo muestra un aumento significativo en pMARCKS en músculos estimulados durante 10 minutos de forma continua. Este resultado indica que la fosforilación de MARCKS depende de la actividad sináptica *per se* (figura R15). Además, el aumento de pMARCKS se mantiene y es significativo en músculos estimulados durante 30 minutos ($55.24\% \pm 3.21\%$, $p < 0.05$). La chaperona molecular Hsp70 aumenta de nuevo de forma significativa en estas condiciones de estimulación del componente presináptico (1 Hz, 10 min), coincidente con la disminución de la isoforma nPKC ϵ y de su forma activa (figura R6).

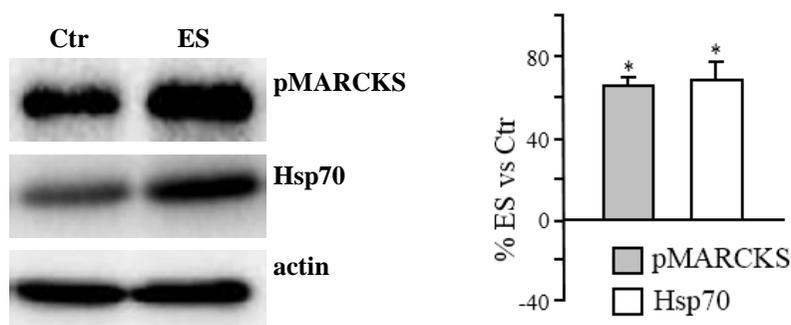


Figura R15. Efecto del estímulo (1 Hz) en los niveles de expresión de pMARCKS. Los análisis de detección mediante Western blot (izquierda) muestran los niveles de expresión de pMARCKS y Hsp70 en músculos *cut* estimulados de forma continua durante 10 minutos (1 Hz). Los valores control corresponden a las preparaciones *cut* sin estimular y mantenidas en Ringer normal oxigenado durante 10 minutos. A la derecha, los análisis densitométricos muestran el efecto del estímulo, expresado en porcentajes de variación respecto a los músculos control, sobre pMARCKS y Hsp70. Los niveles de ambas proteínas se normalizaron con los niveles totales de β -actina. Los resultados muestran la media \pm SD de 3 experimentos independientes. * $P < 0.05$.

A continuación, para profundizar en el estudio de la relación entre el efecto de la actividad eléctrica y la actividad de nPKC ϵ , se estimularon los músculos (ES) incubados

previamente con el péptido ϵ V1-2 (V) (figura R16a). El análisis cuantitativo muestra cómo la expresión de pMARCKS disminuye de forma significativa en los músculos estimulados e incubados previamente con ϵ V1-2 (V+ES) respecto a los músculos estimulados sin bloqueo de la contracción muscular. Este resultado demuestra la participación de nPKC ϵ en la fosforilación MARCKS durante la actividad presináptica.

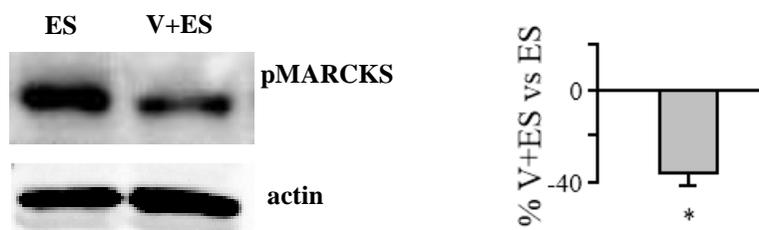


Figura R16a. Efecto de ϵ V1-2 en los niveles de expresión de pMARCKS en músculos estimulados (1 Hz). Los análisis de Western blot (izquierda) muestran la inmunoreactividad para pMARCKS en músculos estimulados con bloqueo de la contracción (μ -CgTx GIIB) e incubados con ϵ V1-2 (100 μ M, 30 min) (V+ES). Como control, se obtuvieron también los niveles de pMARCKS en músculos estimulados (1 Hz, 30 min) sin incubar con el péptido (ES). El análisis cuantitativo (derecha) muestra el efecto de ϵ V1-2 en los músculos estimulados. Los valores de expresan en porcentaje respecto a los niveles de pMARCKS obtenidos en los músculos control a t = 30 min. Los niveles de pMARCKS se normalizaron con los niveles totales de β -actina. Los resultados muestran la media \pm SD de 3 experimentos independientes * $P < 0.05$.

En concordancia con este resultado, se observó una disminución significativa en los niveles de nPKC ϵ y pnPKC ϵ en músculos estimulados e incubados con el péptido de bloqueo respecto a los músculos estimulados (figura R16b-c). Este resultado sugiere el efecto aditivo de los dos mecanismos (ϵ V1-2 y estímulo eléctrico) enfatizando el papel de nPKC ϵ en la fosforilación de MARCKS. Sin embargo, no se puede descartar que algunas moléculas de pnPKC ϵ todavía activas actúen fosforilando a MARCKS. La incubación con el péptido inactivo (ϵ V1-2-s) no modificó los niveles de la isoforma o de su forma activa obtenidos con la estimulación eléctrica.

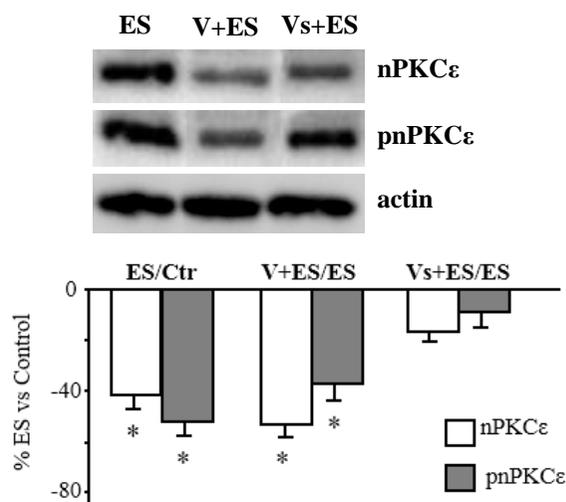


Figura R16 b-c. Efecto de ϵ V1-2 en los niveles de expresión de nPKC ϵ y pnPKC ϵ en la fracción de la membrana sináptica en músculos estimulados (1 Hz). Los análisis de Western blot muestran los niveles de nPKC ϵ y pnPKC ϵ obtenidos en músculos estimulados e incubados con el péptido o con su versión *scrambled* durante 30 minutos (V + ES) y (Vs+ES) y aplicando únicamente estímulo eléctrico (ES). Los histogramas muestran los análisis de densitometría del efecto de ϵ V1-2 (V) en los niveles de nPKC ϵ y pnPKC ϵ así como el efecto del estímulo eléctrico sobre preparaciones sin estimular (Ctr). El tratamiento con ϵ V1-2-s (Vs) no modifica de forma significativa los niveles de nPKC ϵ y pnPKC ϵ . Los valores se expresan en porcentaje respecto a los niveles obtenidos sólo con el estímulo (ES, 1 Hz). Se utilizó β -actina como control interno de carga en los análisis de Western blot. Los resultados muestran la media \pm SD de 3 experimentos independientes y fueron normalizados con actina. * $P < 0.05$.

3.4. La contracción muscular aumenta la fosforilación de MARCKS

Una vez obtenido que la fosforilación de MARCKS está regulada por la actividad de nPKC ϵ y que la actividad presináptica *per se* aumenta su fosforilación, se investigó si la contracción muscular tiene un efecto adicional sobre la fosforilación de este sustrato. Para ello, se analizaron los niveles de pMARCKS en músculos diafragma estimulados con contracción muscular (ES+C) respecto a músculos estimulados en ausencia de contracción (ES), que ha sido bloqueada con μ -Conotoxina GIIB (1.5-3 μ M). La estimulación eléctrica, durante 30 minutos y acompañada de contracción muscular, aumentó significativamente la fosforilación de MARCKS (figura R17). Este resultado indica que la actividad sináptica con contracción del músculo tiene un mayor efecto en la fosforilación de MARCKS que la propia actividad presináptica.

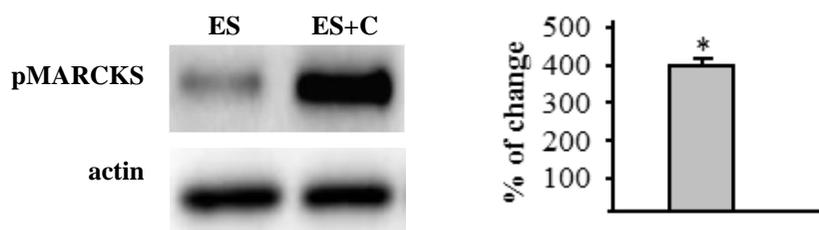


Figura R17. La contracción muscular aumenta la fosforilación de MARCKS. A la izquierda se muestra la inmunoreactividad de pMARCKS en la membrana sináptica en el músculo esquelético estimulado con (ES+C) y sin (ES) contracción muscular. En todos los experimentos, el nervio frénico fue estimulado a 1 Hz durante un periodo de 30 minutos y la contracción muscular fue prevenida (ES) o no (ES+C). A la derecha, se muestran los análisis de densitometría de los niveles de pMARCKS en músculos ES+C expresados en porcentaje respecto a los niveles del sustrato en músculos estimulados con bloqueo de la contracción muscular. Los resultados muestran la media \pm SD de 3 experimentos independientes y se utilizó β -actina como control interno. * $P < 0.05$.

3.5. La contracción muscular aumenta la fosforilación de MARCKS a través TrkB

Debido a que la contracción muscular inducida por la actividad eléctrica promueve cambios en nPKC ϵ a través de la actividad TrkB (figura R9), se estudió si la contracción muscular también podría afectar a la fosforilación de MARCKS a través de la actividad TrkB. Para ello, se analizó la cantidad de pMARCKS en músculos contráctiles en los que se había inhibido selectivamente la actividad de TrkB utilizando el anticuerpo anti-TrkB (47/TrkB) o la proteína de fusión TrkB-Fc (quelante de BDNF o NT-4 endógenos). La figura R18 muestra que el bloqueo de TrkB provocó una disminución significativa en pMARCKS. Se obtuvo el mismo resultado con los dos métodos de bloqueo. Estos resultados demuestran que la contracción muscular inducida por la actividad eléctrica promueve cambios en pMARCKS a través de la actividad TrkB.

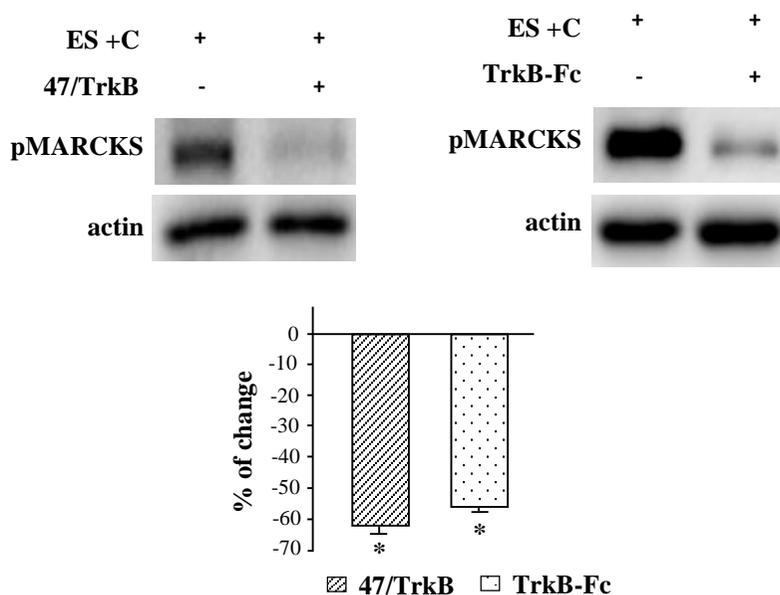


Figura R18. La contracción muscular aumenta la fosforilación de *MARCKS* a través de *TrkB*. Los análisis de Western blot muestran los niveles de inmunoreactividad de pMARCKS en músculos con contracción (ES+C) en los que se ha inhibido selectivamente la actividad de TrkB (+) utilizando el anticuerpo anti-TrkB (47/TrkB) o la proteína de fusión trkB-Fc (quelante endógeno de BDNF/NT-4), y en músculos ES+C sin bloqueo de TrkB (-). En todos los experimentos, el nervio frénico fue estimulado a 1 Hz durante un periodo de 30 minutos resultando en contracción muscular. Los histogramas muestran los análisis de densitometría de los niveles de pMARCKS en músculos ES+C con bloqueo de TrkB expresados en porcentaje respecto a los niveles del sustrato en músculos ES+C. Los resultados muestran la media \pm SD de 3 experimentos independientes y fueron normalizados con actina. * $p < 0.05$.

En conjunto, los resultados de este apartado indican que: a) la isoforma nPKC ϵ regula la fosforilación de MARCKS en el terminal nervioso de la NMJ; b) la actividad presináptica promueve la fosforilación de MARCKS, que a su vez depende de nPKC ϵ ; c) la contracción muscular inducida por la actividad sináptica aumenta adicionalmente la fosforilación de MARCKS a través de la vía de señalización que opera a través de TrkB.

4. EXPERIMENTOS FUNCIONALES: LA ISOFORMA nPKC ϵ EN LA NEUROTRANSMISIÓN EVOCADA EN LA NMJ ADULTA

Uno de los objetivos principales del presente trabajo de tesis es investigar la participación de la isoforma calcio-independiente nPKC ϵ en la liberación de ACh evocada (EPP) en la NMJ de mamífero adulto. Para ello, se evaluó cómo el péptido inhibidor de la translocación de nPKC ϵ (ϵ V1-2) afecta a las acciones bien establecidas de PMA y CaC en la neurotransmisión y, en una segunda parte, se estudió cómo esta isoforma está implicada en la modulación de la neurotransmisión en diferentes vías de señalización que implican a la quinasa PKA y a los receptores muscarínicos M1/M2 presinápticos.

4.1. Participación de nPKC ϵ en la liberación evocada de ACh

En los experimentos explicados anteriormente en la primera parte de esta tesis, se ha demostrado mediante las técnicas de Western blot e inmunohistoquímica, la presencia y localización de la isoforma nPKC ϵ en el terminal nervioso de la NMJ. Con el propósito de estudiar el posible papel de nPKC ϵ en la neurotransmisión evocada, se realizaron registros intracelulares mediante la estimulación del nervio de las preparaciones neuromusculares a 1 Hz de forma continua (70 estímulos consecutivos cada 5 minutos). Para poder realizar el registro de los EPPs, se bloqueó la contracción muscular mediante la técnica *cut* o con la neurotoxina μ -Conotoxina GIIIB (μ -CTX GIIIB), siendo esta última una toxina que bloquea los canales de sodio de la membrana de la célula muscular evitando la contracción del músculo sin alterar el funcionamiento normal de la sinapsis neuromuscular. En estas condiciones, se registraron simultáneamente los EPPs y los MEPPs y se calculó el contenido cuántico por el método directo (*ver apartado 5.1., materiales y métodos*). Se siguió el siguiente protocolo: En primer lugar, se realizó el registro de 15 fibras musculares que se utilizaron como control (en el caso de las incubaciones seriadas, se preincubó la muestra durante 1 hora con un primer modulador) y, a continuación, se realizó el registro de otras 15 fibras para obtener el registro experimento (1 hora adicional de incubación con un segundo modulador). Se evaluó, por tanto, la acción de este último modulador sobre la neurotransmisión. Se trabajó con un mínimo de 3-5 músculos diafragma de rata adulta (30-40 días) para cada experimento realizado.

Estudios previos (Santafé et al. 2005; Santafé et al. 2006) realizados con el pan-inhibidor de PKC, CaC, que actúa sobre el dominio regulador (C1) de las isoformas de la familia PKC, demuestran que PKC permanece desacoplada constitutivamente del mecanismo de neurotransmisión evocada en condiciones basales, ya que CaC (10 μ M) no modifica la amplitud de los EPPs (figura R19) (% de variación: 6.42 ± 2.08 , $p < 0.05$, $n = 5$, mínimo 15 fibras por músculo).

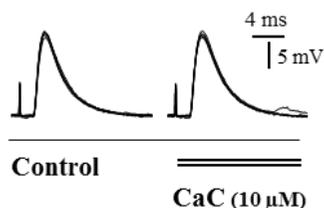


Figura R19. PKC no se acopla a la liberación de ACh en condiciones basales. Se muestra la superposición de los episodios representativos evocados (EPPs) registrados antes (control) y después ($t = 60$ min) de incubar las preparaciones neuromusculares con el pan-inhibidor de PKC, CaC (10 μ M).

Así, PKC permanece desacoplada del mecanismo de liberación de ACh cuando la preparación neuromuscular *ex vivo* está eléctricamente inactiva. Sin embargo, cuando las fibras nerviosas que inervan las NMJs son estimuladas a baja frecuencia (1 hora de estímulo eléctrico continuo a 1Hz) para introducir una actividad fisiológica moderada, PKC se acopla a la liberación del neurotransmisor (Besalduch et al. 2010). Este acoplamiento se manifiesta mediante la reducción de la liberación de ACh, de forma significativa, cuando la quinasa se inhibe con el inhibidor inespecífico CaC. Además, el estímulo eléctrico de las fibras nerviosas a baja frecuencia, por sí solo, no modifica la amplitud de los EPPs (Besalduch et al. 2010). Estos resultados preliminares indican que PKC está implicada en el mantenimiento de la actividad sináptica continua. Además, la participación de PKC en la liberación de ACh se ha observado bajo otras condiciones experimentales en las que la neurotransmisión está potenciada: estímulo, alto Ca^{2+} extracelular, estimulación de PKC (con PMA), estimulación de PKA (con Sp-8-BrcAMP) o modulación de los autoreceptores mAChRs presinápticos M1/M2 (Santafé et al. 2005; Santafé et al. 2009).

Definimos, por tanto, el acoplamiento funcional de PKC a la potenciación o mantenimiento de la liberación de ACh (en respuesta a cualquier manipulación experimental de las vías moleculares) cuando el pan-inhibidor CaC actúa disminuyendo el contenido cuántico en respuesta a la intervención experimental realizada.

Siguiendo esta premisa, y a pesar de que PKC no está acoplada a la liberación evocada de ACh en condiciones basales, se ha querido comprobar primero que, en estas mismas condiciones, la isoforma nPKC ϵ tampoco está acoplada a la secreción del neurotransmisor (*ver apartado 4.1.1*). Posteriormente, se investigó la participación de nPKC ϵ en la neurotransmisión en las condiciones de potenciación en las que se ha observado que PKC modula la liberación de ACh (*ver apartados 4.1.2, 4.1.3 y 4.2*).

4.1.1. Efecto del bloqueo de específico de nPKC ϵ en la neurotransmisión evocada en condiciones basales

Los experimentos que se describen en este apartado de tesis fueron realizados para comprobar que el bloqueo de la translocación de nPKC ϵ a la membrana no modifica los parámetros relacionados con la liberación de ACh en condiciones basales (del mismo modo que no lo hace el bloqueo inespecífico de las isoformas de la familia PKC con CaC). Para ello, se realizaron registros intracelulares de los potenciales evocados (EPPs) y espontáneos (MEPPs) antes (registros control) y después de incubar la preparación neuromuscular con el péptido ϵ V1-2 (1 h, registros experimento) a diferentes concentraciones de trabajo (figura R20). Se utilizó un rango de valores de ϵ V1-2 común en la literatura. Por ejemplo, se ha trabajado con concentraciones de 1 μ M o 5 μ M en cultivos celulares de miocitos ventriculares (Pravdic et al. 2009) y en cultivos celulares de isquemia cerebral (Agudo-López et al. 2010). Los valores de 100 μ M se han utilizado en cultivos neuronales de la raíz dorsal (Yamamoto et al. 2006) o en cultivos celulares de cáncer de pulmón (Felber et al. 2007).

El contenido cuántico de cada fibra muscular fue calculado a partir de los registros intracelulares de EPPs y MEPPs (*ver ap. 3.2, y 3.4, materiales y métodos*). Los resultados muestran que el péptido inhibidor no produce cambios significativos en el contenido cuántico de los EPPs o en la frecuencia y amplitud de los MEPPs para ninguno de los valores de concentración utilizados (figura R20) (*ver raw data* figura R21). Por lo tanto, escogemos el valor intermedio de concentración del péptido, ϵ V1-2 (10 μ M), previamente utilizado en muestras de tejido muscular isquémico (Hassouna et al. 2004),

como concentración de trabajo para el resto de experimentos. Ocasionalmente, se trabajó a la máxima concentración (100 μM).

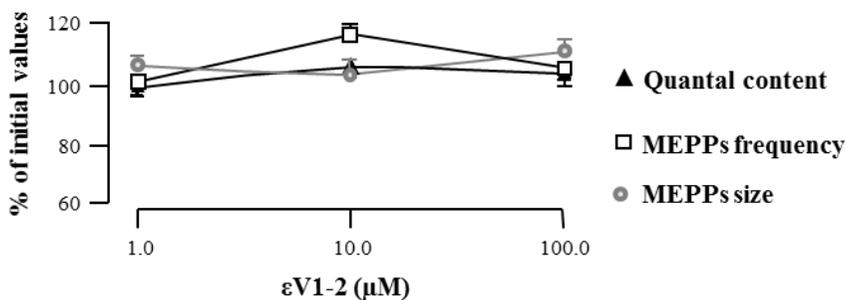


Figura R20. Curva de concentraciones de $\epsilon\text{V1-2}$. Se muestran los valores de amplitud y frecuencia de los MEPPs y el contenido cuántico de los EPPs a diferentes dosis del péptido $\epsilon\text{V1-2}$, como porcentajes de variación respecto a los valores iniciales (registros control, realizados antes de añadir $\epsilon\text{V1-2}$). El contenido cuántico no se modifica para ningún valor de concentración utilizado. $n=3$ muestras de diafragma, mínimo 15 fibras por músculo.

Para descartar un tiempo de incubación insuficiente de $\epsilon\text{V1-2}$ como factor limitante, se realizaron incubaciones con el péptido (10 μM) durante 3 horas. En estas condiciones tampoco se obtuvieron variaciones significativas en el contenido cuántico respecto a los valores iniciales (% de variación del contenido cuántico: $4.14\% \pm 1.56$; $p > 0.05$ ($n=3$ muestras de diafragma, mínimo 15 fibras por músculo)).

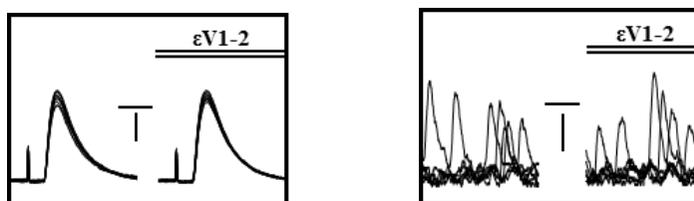


Figura R21. Raw data de los registros evocados y espontáneos del efecto de $\epsilon V1-2$. Se muestra la superposición de los episodios representativos evocados (EPPs, izquierda) y espontáneos (MEPPs, derecha) registrados antes (control) y después ($t = 1$ h) de incubar las preparaciones neuromusculares con el péptido $\epsilon V1-2$ ($10 \mu M$). No se observaron variaciones significativas de los parámetros evaluados (amplitud y frecuencia) de los registros experimento respecto a los registros control. EPPs: barras verticales: 5 mV; barras horizontales: 4 ms. MEPPs: barras verticales: 0.5 mV; barras horizontales: 20 ms.

4.1.2. Efecto del bloqueo específico de nPKC ϵ en la neurotransmisión evocada en alto Ca^{2+} extracelular y bajo estimulación eléctrica del nervio

En primer lugar, en nuestro estudio se evaluó el efecto del pan-inhibidor CaC en un medio extracelular con elevadas concentraciones de Ca^{2+} , y en medios en los que reducimos la entrada de este ion a través de los canales VDCC. La figura R22 muestra las variaciones del contenido cuántico en presencia de Ca^{2+} , Mg^{2+} y ω -Agatoxina-IVA (columnas 1, 3 y 5). La histograma muestra, además, cómo el aumento de la neurotransmisión en alto Ca^{2+} (5 mM) puede estar mediado en parte por la activación de PKC ya que CaC reduce la liberación de ACh en estas condiciones (columna 2). Sin embargo, cuando la entrada de Ca^{2+} se reduce incubando las preparaciones con elevadas concentraciones de Mg^{2+} (5 mM) (entra en el axón a través de los canales VDCC compitiendo con los iones Ca^{2+}) o en presencia de ω -Agatoxina-IVA (100 nM), que bloquea los canales VDCC tipo P/Q, el inhibidor CaC deja de tener efecto sobre el contenido cuántico, reflejando el desacoplamiento de PKC a la neurotransmisión (columnas 4 y 6, respectivamente).

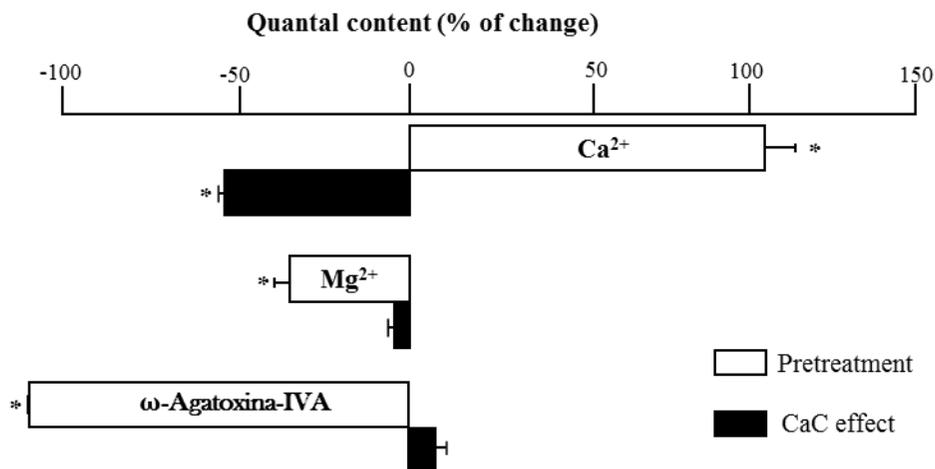


Figura R22. Efecto de CaC en presencia de alto Ca²⁺, alto Mg²⁺ y ω-Agatoxina-IVA. El histograma muestra que el aumento del contenido cuántico observado en alto Ca²⁺ (5 mM) (columna de pre-tratamiento) puede estar mediado por PKC ya que CaC reduce la neurotransmisión en estas condiciones. Sin embargo, CaC no tiene efecto en alto Mg²⁺ (5 mM) o en presencia de ω-Agatoxina-IVA (100 nM). Los valores son: media ± SEM. Para cada columna: n = 3 músculos y un mínimo de 15 fibras por músculo. * P < 0.05.

La isoforma novel nPKCε es Ca²⁺-independiente y se activa mediante DAG; únicamente las isoformas clásicas (cPKCs) se activan por unión del ion Ca²⁺. Sin embargo, el proceso de exocitosis asociado a la liberación de ACh depende del incremento intracelular de Ca²⁺ y, variaciones en la concentración de Ca²⁺ extracelular acompañadas de la entrada de Ca²⁺ en los terminales nerviosos, producen cambios en la liberación de ACh (Santafé et al. 2005; Del Castillo & Stark 1952). Una vez comprobado el efecto del pan-inhibidor CaC modulando la entrada de Ca²⁺ al terminal nervioso, evaluamos el efecto de εV1-2. Se evaluó la participación de nPKCε en el acoplamiento de PKC a la liberación de ACh en estas mismas condiciones. Para ello, se realizaron experimentos en alto Ca²⁺ y también bajo estimulación eléctrica continua del nervio frénico (1 Hz).

Según la literatura, PKC se acopla a la liberación de ACh cuando el medio extracelular presenta elevadas concentraciones de Ca²⁺ (5 mM) (Santafé et al. 2005; Santafé et al. 2006) o bajo estimulación eléctrica continua (1 Hz) de las NMJs (Besalduch et al. 2010). En estas condiciones, el contenido cuántico disminuye significativamente cuando PKC se inhibe de forma inespecífica con CaC. En este sentido, las columnas 2 y 3 de la figura R23 muestran un efecto similar de CaC en ambas condiciones: alto Ca²⁺ y

durante la estimulación eléctrica del nervio. No obstante, en condiciones basales, no se produce el acoplamiento de PKC (columna 1, figura R23).

En primer lugar, se preincubó la preparación en un medio con una concentración 5 mM de Ca^{2+} y, a continuación, se evaluó el efecto del péptido $\epsilon\text{V1-2}$ (10 μM , 1 h adicional). Se repitió el experimento con estimulación eléctrica del nervio (1 Hz, 1 h). No se observaron variaciones del contenido cuántico en ninguna de las dos condiciones experimentales (columnas 4 y 5, figura R23). Estos resultados indican, por tanto, que el pan-inhibidor CaC (en alto Ca^{2+} o durante actividad eléctrica) probablemente inhiba a otra/s isoforma/s de la familia PKC.

Debido a que el bloqueo de la translocación de nPKC ϵ a la membrana no produce ningún efecto sobre la neurotransmisión cuando las condiciones de trabajo (alto Ca^{2+} y 1 Hz) están previamente establecidas, se llevó a cabo el pretratamiento con el péptido $\epsilon\text{V1-2}$ (10 μM , 1 h de incubación) y una segunda incubación con CaC (10 μM , 1 h adicional). Se trabajó primero en un medio con alto Ca^{2+} (5 mM) y, a continuación, se replicó el experimento aplicando esta vez estimulación eléctrica continua a la preparación (1 Hz, 1 h). Las columnas 6 y 7 de la figura R23 muestran cómo, en estas dos condiciones experimentales, no se produce el efecto inhibitor esperado de CaC sobre la neurotransmisión. Por lo tanto, el acoplamiento de PKC a la neurotransmisión en estas condiciones no puede ser revertido por $\epsilon\text{V1-2}$ una vez se ha producido (columnas 4 y 5, figura R23) pero puede ser prevenido mediante la incubación con el péptido (columnas 6 y 7, figura R23). Esto implica a la isoforma nPKC ϵ en la secreción del neurotransmisor en ambas condiciones.

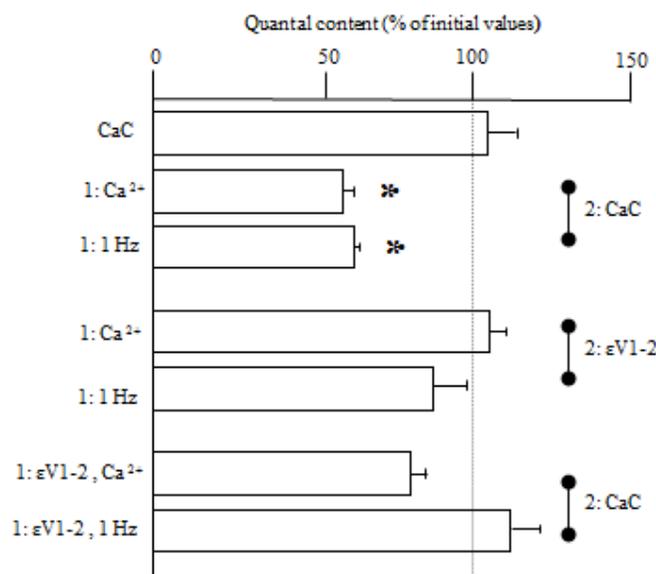


Figura R23. Efecto de CaC y ϵ V1-2 en presencia de alto Ca^2 y estímulo eléctrico (1 Hz).

En preparaciones neuromusculares *ex vivo*, sin generar potenciales de acción o contracción muscular, la inhibición inespecífica de PKC mediante calfosteína C (CaC; 10 μ M, 1 h) no produjo cambios en el contenido cuántico de las NMJs. Para descartar cualquier efecto negativo debido al estímulo eléctrico continuado del diafragma a 1 Hz, se evaluó el contenido cuántico estimulándolo durante más de 5 horas y no se obtuvo ningún cambio (% de variación: 107.08 ± 6.32 ; $n = 3$ músculos y un mínimo de 15 fibras por músculo, $P > 0.05$). El péptido inhibidor de nPKC ϵ , ϵ V1-2, no modificó la liberación del neurotransmisor en condiciones basales, en un medio externo con alto calcio (5 mM) o con estimulación eléctrica a 1 Hz. El inhibidor inespecífico CaC no afectó al contenido cuántico tras el pretratamiento con ϵ V1-2 (10 μ M, 1 h de incubación) previo a una segunda incubación con CaC (1 h adicional), ni en el medio con alto Ca^{2+} ni con estimulación eléctrica. La línea punteada marca los valores iniciales expresados en porcentaje. Por encima de estos valores consideramos que hay potenciación y por debajo inhibición de la secreción del neurotransmisor. Los valores son: media \pm SEM. Para cada columna: $n = 3$ músculos y un mínimo de 15 fibras por músculo. * $P < 0.05$.

4.1.3. Efecto del bloqueo específico de nPKC ϵ en la neurotransmisión evocada en condiciones de potenciación inducida por PMA

El éster de forbol (PMA) es un potente e inespecífico agonista de la familia PKC. En estudios previos, se ha demostrado que la liberación de ACh evocada es fuertemente potenciada por PMA {columna 1, figura R24; ver también (Santafé et al. 2005; Santafé et al. 2009)}. PMA ejerce su efecto sobre la neurotransmisión con o sin estimulación eléctrica del nervio (columnas 1 y 2, figura R24) y acopla farmacológicamente a PKC para producir la potenciación (100 % aproximadamente). Este efecto puede ser ocluido mediante la preincubación con CaC que actúa en el mismo dominio (C1) que PMA (columna 4, figura R24). Para investigar si la acción de PMA en la neurotransmisión es dependiente de nPKC ϵ (de forma similar a la observada con la CaC), se llevaron a cabo una serie de experimentos que se describen continuación.

Se realizó la preincubación con el péptido ϵ V1-2 (1-10-100 μ M, 1 h) y una segunda incubación con PMA (10 nM, 1 h adicional), en condiciones basales. A continuación, se repitió el experimento aplicando estimulación eléctrica continua del nervio frénico (1 Hz) a una concentración intermedia del péptido. Según los resultados observados en la figura R24 podemos destacar que, en condiciones basales, el aumento de la neurotransmisión normalmente ejercido por el agonista PMA, se ve reducido en presencia del péptido ϵ V1-2 (1-10 μ M, 1 h) (columnas 5 y 6). Más aún, aplicando un estímulo continuo a la preparación (1Hz), el péptido, a una concentración 10 μ M, bloquea completamente el efecto inducido por PMA (columna 8). Así mismo, la preincubación con el péptido (ϵ V1-2, 100 μ M, 1 h) tiene el mismo efecto ocluidor que la condición anterior (columna 7). Por lo tanto, se obtiene una inhibición completa del efecto potenciador de PMA cuando el péptido ϵ V1-2 está presente a una concentración 10 μ M y coincide con la estimulación eléctrica a 1 Hz o cuando el péptido está a una concentración 100 μ M. La inhibición es parcial cuando el péptido está a una concentración 1 μ M (*raw data* figura R25). En resumen, el acoplamiento tónico de PKC (para mantener la neurotransmisión durante la actividad eléctrica) y el acoplamiento inducido por PMA (que resulta en la potenciación de la liberación de ACh) podrían compartir una vía común a través de nPKC ϵ .

Según estos resultados, el efecto del éster de forbol PMA en la neurotransmisión es, del mismo modo que el efecto de CaC, dependiente de la isoforma nPKC ϵ . PMA no potencia la neurotransmisión si ϵ V1-2 está presente en el medio si, a

su vez, nPKC ϵ es activada mediante actividad eléctrica o está presente a elevadas concentraciones. En conjunto, estos resultados indican la relevancia de la isoforma nPKC ϵ en las tres condiciones de acoplamiento de PKC a la potenciación de la neurotransmisión: la establecida por la acción del PMA, en un medio con alto Ca²⁺ o por la actividad sináptica inducida por estímulo eléctrico.

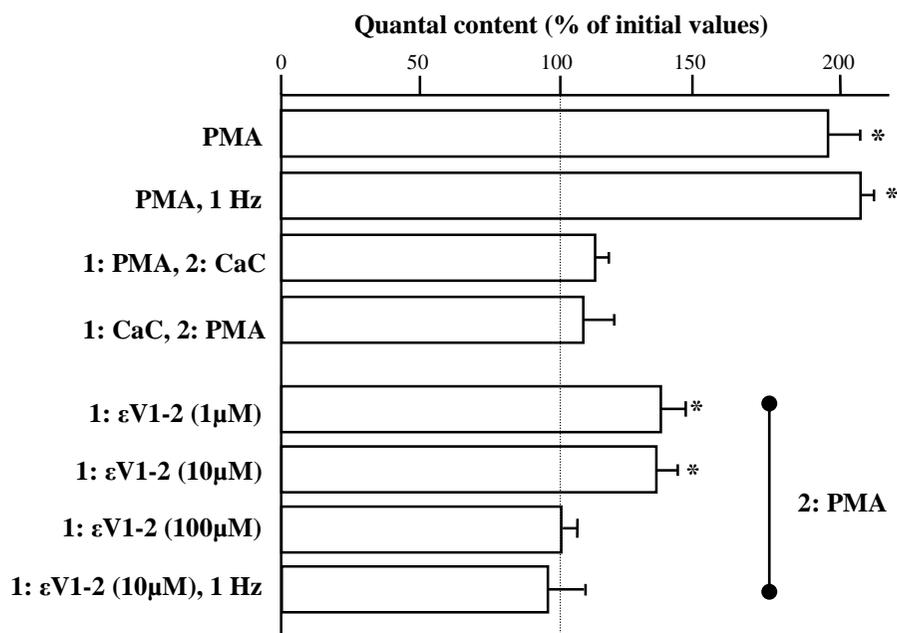


Figura R24. Efecto de PMA en presencia de ϵ V1-2. Realizamos una serie de experimentos con el agonista PMA (10nM) para reproducir el efecto en la liberación de ACh evocada. Como se ha visto en estudios previos (Santafé et al. 2005; Santafé et al. 2009), PMA potencia aproximadamente en un 100 % (respecto a los valores iniciales) la secreción evocada de ACh, en condiciones normales y con estímulo eléctrico (1 Hz). Sorprendentemente, encontramos que tras la preincubación con ϵ V1-2 (1-10 μ M), PMA potencia en menor porcentaje (aproximadamente un 36%). Más aún, si estimulamos la preparación a 1Hz o preincubamos con ϵ V1-2 (100 μ M), se previene el aumento inducido por el éster de forbol. El orden de incubación, cuando hay incubaciones sucesivas, se señala con los números 1 y 2 (1: preincubación; 2: incubación). Los valores de expresan como media \pm SEM. Para cada columna: n = 3 músculos y un mínimo de 15 fibras por músculo. * $P < 0.05$ vs valores iniciales (línea punteada).

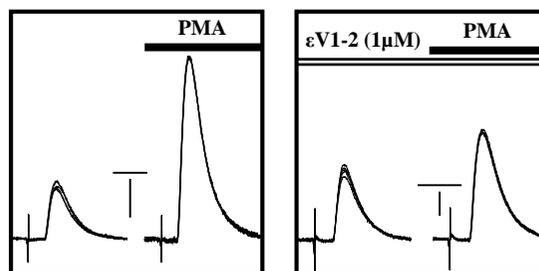


Figura R25. Ejemplos de registros evocados del efecto de PMA en presencia de ϵ V1-2.

Se muestra la superposición de los episodios representativos evocados (EPPs) registrados antes (control) y después ($t = 1$ h) de incubar las preparaciones neuromusculares con PMA (10 nM). A la izquierda, se observa el aumento de la amplitud de los EPPs con el éster de forbol PMA respecto a los registros control ($97.41\% \pm 9.66$, $P < 0.05$). A la derecha, no se observaron variaciones significativas en la amplitud de los EPPs en muestras preincubadas con el péptido ϵ V1-2 e incubadas con PMA. EPPs (izquierda): barras verticales: 10 mV; barras horizontales: 4 ms. EPPs (derecha): barras verticales: 5 mV; barras horizontales: 4 ms.

4.1.4. Participación de nPKC ϵ en la depresión sináptica a 40 Hz

En el apartado 4.1.1. se ha demostrado que la isoforma nPKC ϵ no está acoplada al mecanismo de neurotransmisión evocada cuando la actividad sináptica es moderada (1 Hz) en una situación en la que la maquinaria sináptica está intacta (bloqueando la contracción muscular con μ -Conotoxina GIIB 1.5-3 μ M). Por lo tanto, se decidió analizar la actividad de nPKC ϵ en condiciones de actividad sináptica intensa (*ver protocolo en el apartado 3.3., materiales y métodos*) bloqueando la contracción muscular con la neurotoxina. Para realizar este análisis, se bloqueó la translocación de nPKC ϵ a la membrana con el péptido inhibidor ϵ V1-2 (100 μ M, 1 h).

Se realizaron una serie de experimentos con trenes de estímulos, aplicando una frecuencia de 40 Hz durante 2 minutos, con intervalos de descanso de 10 minutos entre los registros (figura R26). Primero, se registraron los EPPs control en presencia de μ -Conotoxina GIIB en un mínimo de 8 fibras, incubando la muestra en una solución de Ringer normal. A continuación, la preparación neuromuscular se incubó con ϵ V1-2 y se realizó el registro de los EPPs problema para evaluar la acción del péptido.

Para analizar la depresión sináptica, se midió el valor medio de la amplitud de los 15 últimos registros evocados (EPPs) y de los 15 primeros EPPs de cada fibra. En los registros control se produce una depresión aproximadamente del 40-60 % (las amplitudes de los 15 últimos EPPs de cada tren son la mitad que las amplitudes de los 15 primeros EPPs).

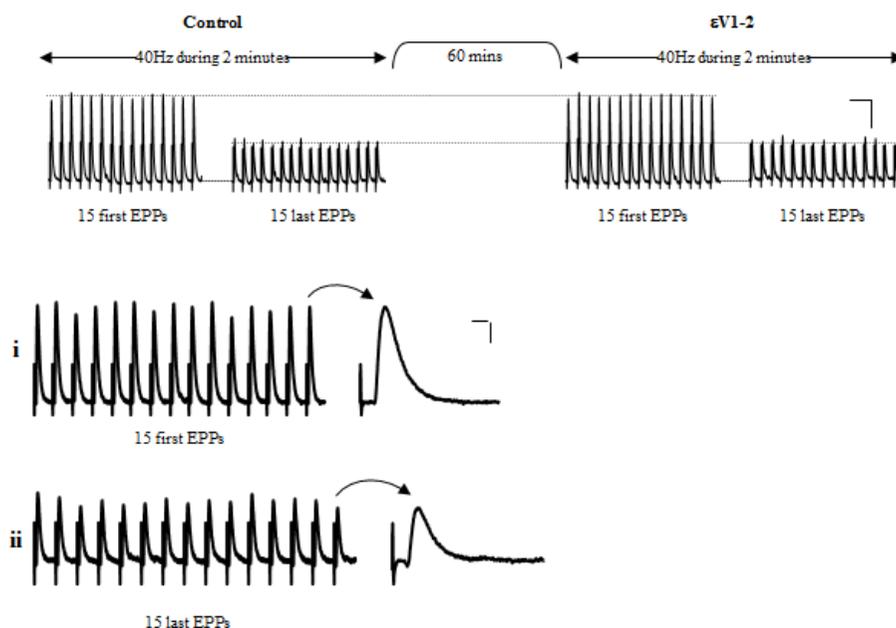


Figura R26. Efecto de ϵ V1-2 en la depresión sináptica. Se estimuló de forma continua el nervio frénico (40 Hz, 2 minutos de estímulo *supra máximo*) y se analizó el efecto del péptido ϵ V1-2 (100 μ M, 1 h) en la modulación de la depresión sináptica. Se comparó el la amplitud media de los primeros 15 EPPs de cada tren (i) y la amplitud de los últimos 15 EPPs (ii). La figura muestra los registros representativos o *raw data*. En los registros control (la muestra se mantiene en una solución de Ringer normal), se observa la depresión sináptica de los últimos 15 EPPs en el tren de estímulos respecto a los primeros 15 EPPs. A su derecha, después de 60 minutos de incubación con el péptido ϵ V1-2, los registros obtenidos muestran cómo la depresión sináptica durante la actividad impuesta no se modifica respecto a la condición anterior (ratio de variación: 0.83 ± 5.26 ; $p > 0.05$). Los valores de expresan como media \pm SEM. $n = 5$ músculos y un mínimo de 8 fibras por músculo. Barra horizontal: 50 ms. Barra vertical: 10 mV.

Según estos resultados, el bloqueo de la translocación de nPKC ϵ a la membrana no tiene efecto por sí mismo en la depresión sináptica que se produce normalmente durante actividad repetitiva en los EPPs.

4.2. Participación de nPKC ϵ en la modulación de la neurotransmisión mediante la interacción con PKA y M1/M2 (mAChRs)

Las PKCs presinápticas participan en la modulación de la neurotransmisión de la NMJ de ratas adultas (Santafé et al. 2005) en relación con los receptores muscarínicos, que las necesitan para operar correctamente (Santafé et al. 2006) y en relación con PKA, que modula su acoplamiento a la liberación de ACh en condiciones basales. Ya que no se conoce el papel específico de las diferentes isoformas de PKC en estas vías, se analizó la participación de la isoforma nPKC ϵ en el mecanismo de liberación de ACh evocada mediante su interacción con la quinasa PKA y con los autoreceptores presinápticos P1Rs y mAChRs basando este análisis en los resultados obtenidos previamente con la quinasa PKC en general y que se resumen a continuación. En las sinapsis colinérgicas de varias especies se han detectado mecanismos conservativos de la neurotransmisión asociados a los receptores presinápticos de adenosina (P1Rs) y a los autoreceptores muscarínicos (mAChRs). Estos últimos participan en la modulación de la neurotransmisión y en la eficacia de sinapsis colinérgicas a través del acoplamiento a las quinasas PKC y PKA (Caulfield 1993; Santafé et al. 2003). Ambas quinasas estimulan la neurotransmisión, aunque durante la función sináptica basal sólo PKA está activa (Santafé et al. 2006; Santafé et al. 2009). Sin embargo, el desequilibrio de los mAChRs (M1 y M2) produce una inversión de las funciones complementarias de las quinasas que conduce a la potenciación mediada por PKC y a la inhibición mediada por PKA de la neurotransmisión (Santafé et al. 2006). Cuando la función muscarínica es suprimida con atropina (ATR) ambas quinasas promueven el incremento de la liberación del neurotransmisor. Esto sugiere que en condiciones basales los mAChRs tienen una función conservativa limitando la secreción de ACh (Santafé et al. 2006).

4.2.1. nPKC ϵ y la actividad de PKA

En este apartado se estudia la relación funcional de las serinas quinanas nPKC ϵ y PKA en la modulación de la neurotransmisión. En estudios previos se analizaron los efectos de los moduladores genéricos de PKC (PMA y CaC) y de las sustancias moduladoras de la actividad de PKA (Sp-8-BrcAMPs y H-89; *ver apartado 5.2, materiales y métodos*) en la amplitud de los EPPs (Santafé et al. 2006; Santafé et al. 2009). Se han repetido los experimentos bloqueando la contracción muscular con μ -Conotoxina GIIIB (1.5-3 μ M), obteniéndose resultados similares (columnas 1 y 2, figura R27). El estudio de la interacción PKC/PKA demuestra que, en condiciones basales, PKA modula la liberación de ACh independientemente de la actividad de PKC (columnas 3 y 4, figura R27), mientras que la estimulación de PKA causa el acoplamiento de PKC a la neurotransmisión evocada (columna 7, figura R27). Por el contrario, la inhibición de PKA previene la estimulación de PKC (con el éster de forbol) y el acoplamiento a la secreción de ACh (Santafé et al. 2009) (columna 6, figura R27). Además, la columna 5 de la figura 27 muestra cómo PMA no es capaz de potenciar la neurotransmisión una vez que esta ha sido potenciada por Sp-8-BrcAMPs.

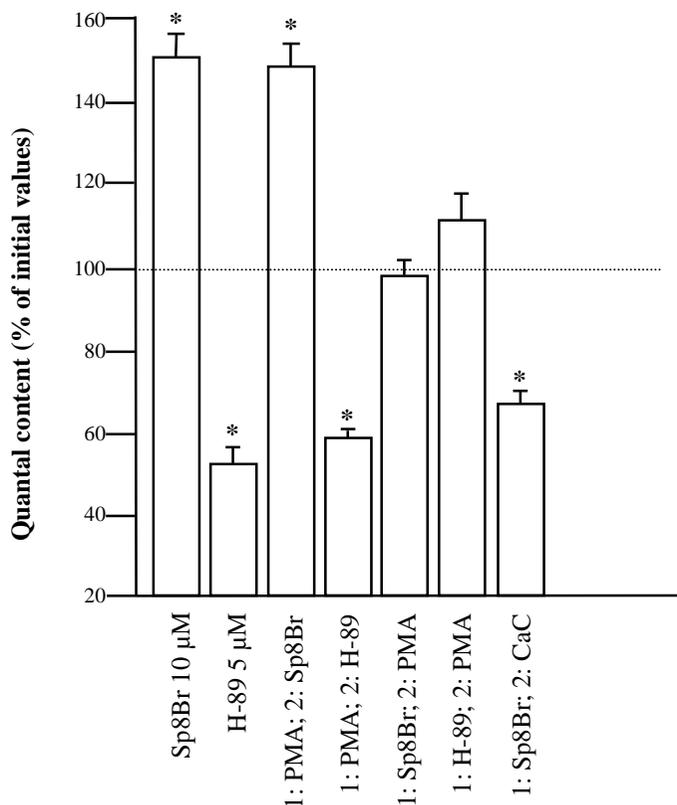


Figura R27. Modulación de la actividad de PKC y PKA. La activación de PKA con Sp-8-BrcAMPs provoca el acoplamiento de la familia de quinasas PKC a la potenciación de la neurotransmisión ya que puede ser inhibida por CaC. La inhibición de PKA (H-89, 5 μ M) disminuye significativamente el contenido cuántico mientras que su estimulación (Sp-8-BrcAMPs, 10 μ M) provoca su aumento. La modulación de la neurotransmisión mediante PKA es independiente de la actividad de PKC ya que una vez potenciada la actividad de PKC mediante PMA, se produce el aumento o disminución provocados por los moduladores de PKA. Los valores de expresan como media \pm SEM. Para cada columna: n = 3 músculos y un mínimo de 15 fibras por músculo. * $P < 0.05$ vs valores iniciales (línea punteada).

Dada la interacción funcional existente entre PKA y PKC, se analizó el papel de nPKC ϵ en esta vía de activación de PKC, PKA-dependiente, realizando 2 incubaciones sucesivas con los agentes inhibidores y/o activadores de las serinas quinasas nPKC ϵ y PKA.

La figura R28 muestra los resultados obtenidos tras la incubación consecutiva con los moduladores de PKA y nPKC ϵ . Las columnas 1 y 2 muestran que, al preincubar la preparación neuromuscular con el péptido ϵ V1-2 (10 μ M, 1 h) para bloquear la translocación de nPKC ϵ a la membrana, la inhibición de PKA con H-89 provoca la reducción normal del contenido cuántico. Por lo tanto, PKA estaría activa y su acoplamiento a la neurotransmisión puede ser inhibido normalmente por H-89 independientemente del status de nPKC ϵ . Sin embargo, la estimulación de PKA con Sp-8-BrcAMPs no se produce después de la preincubación con el péptido ϵ V1-2. En este caso no se observa el aumento esperado del contenido cuántico. Este resultado apunta a que la translocación de nPKC ϵ sería una condición necesaria para el acoplamiento de PKA al aumento de la liberación de ACh.

Una vez PKA fue estimulada o inhibida (Sp-8-BrcAMPs 10 μ M y H-89 5 μ M, respectivamente) después de 1 hora de incubación, se realizó una segunda incubación con el péptido ϵ V1-2 (10 μ M, 1 h adicional) (columnas 3 y 4) para bloquear la translocación de nPKC ϵ . El resultado muestra que la actividad de PKA no se ve afectada por la inhibición posterior de nPKC ϵ y, por tanto, ϵ V1-2 no modifica la actividad sobre estimulada por la acción de Sp-8-BrcAMPs. Sin embargo, cuando PKC es inhibida inespecíficamente con CaC tras la activación de PKA, la neurotransmisión evocada disminuye, indicando que PKC ha sido previamente reclutada (Santafé et al. 2009) (columna 7). Por lo tanto, interpretamos que la inhibición de nPKC ϵ no modifica la actividad sobre estimulada por la acción de Sp-8-BrcAMPs, pero no se puede descartar que esta isoforma sea necesaria para el acoplamiento general de PKC a la neurotransmisión, como sugieren estos resultados.

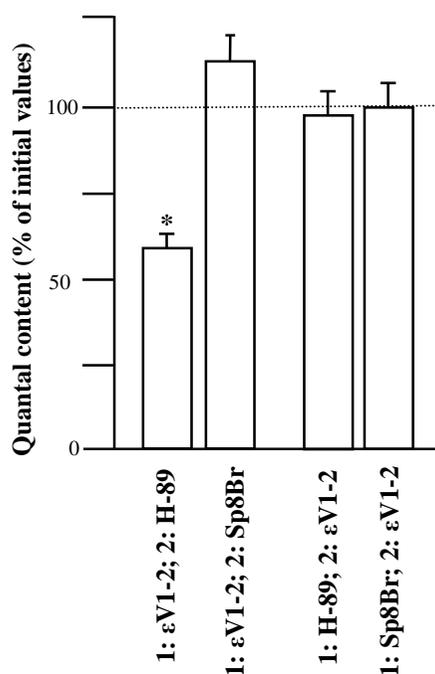


Figura R28. Efecto de ϵ V1-2 en la actividad de PKA. PKA fue estimulada (Sp-8-BrcAMPs, 10 μ M) o inhibida (H-89, 5 μ M) para evaluar posibles cambios en el contenido cuántico, provocados por la inhibición de nPKC ϵ con el péptido ϵ V1-2 (10 μ M, 1 h). El orden de incubación de los moduladores está indicado al lado de la columna correspondiente (abajo). Los valores de expresan como media \pm SEM. Para cada columna: n = 5 músculos y un mínimo de 15 fibras por músculo. * $P < 0.05$ vs valores iniciales (línea punteada).

Según estos resultados, nPKC ϵ podría estar implicada en la activación de PKA y en el acoplamiento indirecto de PKC a la liberación del neurotransmisor. En este caso, una vez PKA y PKC son activadas, la inhibición de la translocación de nPKC ϵ no modifica su actividad. La figura D2 (*ver discusión*) muestra la posible participación de PKC/nPKC ϵ y PKA en la modulación funcional de la liberación del neurotransmisor en la NMJ adulta de mamífero.

Resumiendo, los resultados expuestos hasta ahora permiten definir cuatro condiciones que provocan el acoplamiento de PKC a neurotransmisión evocada: i) actividad sináptica continua, provocada por la estimulación eléctrica de la preparación

neuromuscular; ii) alto Ca^{2+} en el medio extracelular; iii) estimulación directa de PKC con PMA, y iv) estimulación de PKA con Sp-8-BrcAMPs. Estas cuatro condiciones se caracterizan por provocar un aumento en la secreción de ACh debida a un incremento del contenido cuántico (en los casos de alto Ca^{2+} , PMA y Sp-8-BrcAMPs) o la secreción repetitiva de vesículas repletas de ACh durante la estimulación eléctrica a 1 Hz. Cuando nPKC ϵ es bloqueada con el péptido $\epsilon\text{V1-2}$, el acoplamiento de PKC a la liberación del neurotransmisor (evidenciado por el uso de CaC) no puede ser demostrado en condiciones de estimulación eléctrica y alto Ca^{2+} . Más aún, la potenciación normal de la neurotransmisión que sucede en alto Ca^{2+} , por estimulación de PKC con PMA o por estimulación de PKA con Sp-8-BrcAMPs, se ve bloqueada por efecto del péptido $\epsilon\text{V1-2}$.

4.2.2. nPKC ϵ y la vía de señalización a través de mAChRs

Como ha sido previamente investigado (Slutsky et al. 1999; Minic et al. 2002; Santafe et al. 2003; Santafé et al. 2006), la modulación muscarínica de la liberación de ACh a través de los receptores presinápticos M1/M2 (el subtipo M1 potencia la liberación del neurotransmisor mientras que el subtipo M2 la reduce en la NMJ adulta) controla la actividad de PKC. Cuando el mecanismo M1/M2 es bloqueado completamente con el inhibidor inespecífico atropina (ATR) se produce un aumento en la liberación de ACh. Esto indica la predominancia del mecanismo M2 en condiciones basales.

En preparaciones *cut* (considerando un nivel normal de neurotransmisión, sin cambios en la concentración iónica ni agentes moduladores añadidos), los antagonistas muscarínicos selectivos pirenzepina (PIR) y metoctramina (MET) modulan la liberación del neurotransmisor en sentidos opuestos (Santafé et al. 2003). En este trabajo de tesis, se repitieron los experimentos en músculos tratados con la neurotoxina $\mu\text{-CgTx}$ GIIBB (3 μM), que bloquea la contracción muscular sin alterar la maquinaria de la neurotransmisión, para confirmar los resultados obtenidos realizando el *cut* muscular y mantener así una coherencia en el posterior estudio de estos receptores.

Se obtuvieron resultados similares a los obtenidos con *cut*, como se muestra en la figura 29. Las columnas 1, 2 y 3 muestran el efecto sobre el contenido cuántico de los inhibidores de M1 (PIR) y M2 (MET) y del pan-inhibidor muscarínico atropina (ATR). La figura muestra también que, tras el bloqueo del mecanismo muscarínico con ATR, o el bloqueo específico de M1 con PIR o M2 con MET (provocando el desequilibrio

M1/M2), PKC se acopla a la liberación del neurotransmisor para potenciar la liberación de ACh (columnas 5, 6 y 7; respectivamente). Este acoplamiento se comprobó ya que la incubación con CaC provoca la reducción del contenido cuántico (Santafé et al. 2006; Tomàs et al. 2014). En la columna 4, se muestra el efecto del pan-inhibidor CaC sobre el contenido cuántico. Como se vio en apartados previos (figura R23), CaC no afecta al contenido cuántico en condiciones basales. De estos experimentos podemos concluir que, en condiciones basales de operatividad sináptica, los mecanismos muscarínicos presinápticos, presentan una función global preservativa que limita la neurotransmisión.

A partir de los resultados obtenidos para la familia PKC en general, estudiamos la posible participación de la isoforma nPKC ϵ en el acoplamiento de PKC a la neurotransmisión vía mAChRs en músculos tratados con la neurotoxina μ -CgTx GIIB (3 μ M). En la figura R29 se observa que, en músculos estimulados (1 Hz) e incubados con ATR, una segunda incubación con el inhibidor ϵ V1-2 (10 μ M, 1 h) no produjo ninguna variación significativa en el contenido cuántico ($88.27\% \pm 15.93$; columna 8, figura R29) a pesar de que el estímulo eléctrico acopla a PKC a la liberación de ACh (Besalduch et al. 2010). Se observó un comportamiento similar cuando se bloquearon inespecíficamente M1 o M2 mediante PIR y MET (columnas 9 y 10, respectivamente, figura R29).

Se realizó el experimento inverso evaluando el efecto bien establecido de los moduladores muscarínicos, inhibiendo previamente la translocación de nPKC ϵ . Se preincubó el músculo estimulado (1 Hz) con el péptido ϵ V1-2 (10 μ M, 1 h) y se realizó una segunda incubación con ATR, PIR o MET. La figura R29 (columnas 11-13, respectivamente) muestra cómo la modulación de mAChRs no modifica el contenido cuántico en presencia del péptido inhibidor de nPKC ϵ , ϵ V1-2.

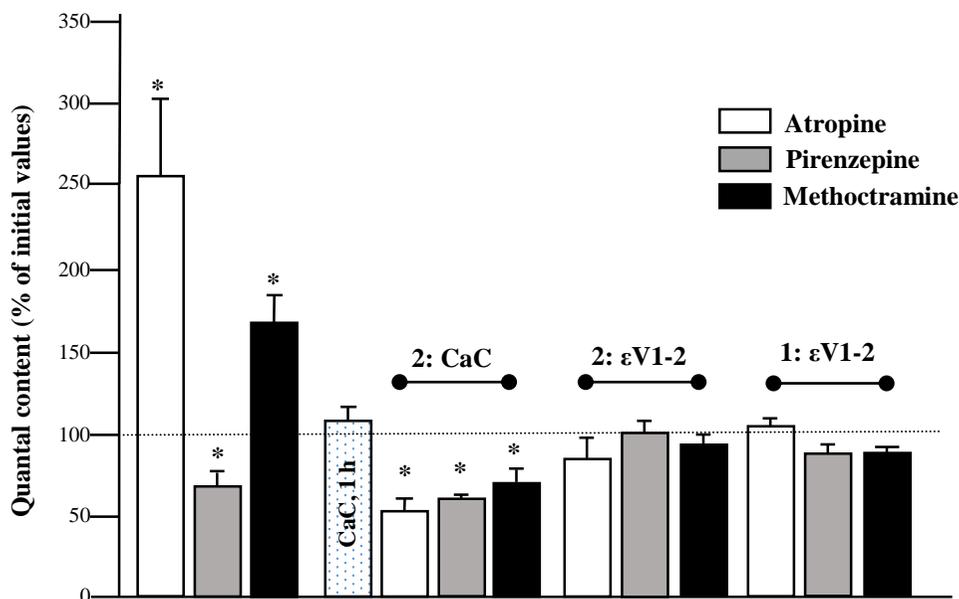


Figura R29. Efecto de ϵ V1-2 y CaC en la modulación de mAChRs (M1, M2). Se evaluó la neurotransmisión en las preparaciones neuromusculares de diafragma tratadas con μ -CgTx GIIIB para bloquear la contracción muscular, modulando la actividad de los receptores muscarínicos M1/M2. En las columnas 1, 2 y 3 se establece que la ATR y la MET aumentan la liberación del neurotransmisor de forma significativa, mientras que la PIR provoca su disminución. Se observa también que PKC no está acoplada a la neurotransmisión en condiciones basales; sin embargo, PKC se acopla a la liberación del neurotransmisor cuando modulamos M1/M2, ya que se produce la disminución significativa del contenido cuántico cuando tratamos las preparaciones con ATR, PIR y MET. En músculos estimulados (1 Hz), la inhibición de nPKC ϵ con el péptido (10 μ M, 1 h) no afecta al contenido cuántico una vez inhibidos M1 y M2. Sin embargo, si preincubamos los músculos con el péptido ϵ V1-2, no se produce la modulación de M1/M2. El orden de incubación de los moduladores está indicado con números (1: preincubación, 2: segunda incubación). Los valores de expresan como media \pm SEM. Para cada columna: n = 5 músculos y un mínimo de 15 fibras por músculo. * $P < 0.05$ vs valores control (línea punteada).

CAPÍTULO IV.

DISCUSIÓN

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

LA PROTEÍNA QUINASA C ÉPSILON EN LA UNIÓN NEUROMUSCULAR DE MAMÍFERO ADULTO: LOCALIZACIÓN,
REGULACIÓN MEDIANTE ACTIVIDAD SINÁPTICA Y ACOPLAMIENTO A LA LIBERACIÓN DE ACETILCOLINA.

Teresa Obis Ibáñez

Dipòsit Legal: T 1609-2015

La fosforilación presináptica de proteínas llevada a cabo por la familia PKC es un importante mecanismo que regula la liberación del neurotransmisor en las células excitables (West et al. 1991; Byrne & Kandel 1996; Catterall 1999; Santafé et al. 2005; Santafé et al. 2006). Varias isoformas de esta familia se expresan en las sinapsis y su distribución celular específica contribuye a su diversidad funcional. Sin embargo, las funciones de PKC en la neurotransmisión son aún poco conocidas. Recientemente, se ha identificado la participación de PKC en la liberación del neurotransmisor cuando la estimulación eléctrica continua impone actividad moderada (1 Hz) sobre las NMJs (Besalduch et al. 2010).

La serina-treonina proteína quinasa nPKC ϵ es una de las isoformas principales de la subfamilia novel PKC. Está implicada en diversas funciones neurales y en las enfermedades neurogénicas asociadas, aunque no se conoce su papel específico en las neuronas. Estudios desarrollados recientemente relacionan a nPKC ϵ con la regulación de funciones neurales tales como la liberación del neurotransmisor y la transducción de señales (Shirai et al. 2008; Chen & Tian 2011). Sin embargo, hasta ahora no hay trabajos publicados acerca de la localización y función específica de nPKC ϵ en este modelo paradigmático de la NMJ. El conjunto de resultados de esta tesis se enmarca en el estudio de la isoforma novel nPKC ϵ en procesos de actividad-dependencia y, más en concreto, en la neurotransmisión, en un modelo de sinapsis neuromuscular de roedor adulto. Se ha examinado la distribución de nPKC ϵ en los componentes celulares de la NMJ adulta, el efecto de la actividad sináptica sobre los niveles de nPKC ϵ en la fracción de la membrana sináptica, así como su regulación mediante la contracción muscular y, por último, la implicación de esta isoforma en la liberación de ACh evocada.

1. nPKC ϵ : EXPRESIÓN Y LOCALIZACIÓN EN LA NMJ ADULTA

Ha sido descrita una amplia distribución de nPKC ϵ en el sistema nervioso central (Shirai et al. 2008) y en el músculo esquelético (Moraczewski et al. 2002; Vary et al. 2005) mediante el análisis de Western blot. Así mismo, se ha detectado la presencia predominante de mRNA de nPKC ϵ en el cerebro de rata (Ono et al. 1988; Wetsel et al. 1992), encontrándose cantidades significativas de la proteína en el período neonatal y un aumento considerable transcurridas 1-2 semanas postnatales, lo que sugiere que nPKC ϵ participa en la construcción de redes neurales ya que coincide con la formación de sinapsis (Shirai et al. 2008). Coincidiendo con estos resultados, en el presente trabajo se

encontraron cantidades significativas de nPKC ϵ en el músculo esquelético de rata, siendo más abundante durante el desarrollo que en adulto (aproximadamente el doble).

La isoforma nPKC ϵ y su forma fosforilada fueron detectadas en la fracción sináptica de la membrana del músculo esquelético adulto, lo que indica que esta isoforma puede estar implicada en funciones sinápticas. De forma más específica, y en coherencia con los experimentos de denervación, nPKC ϵ se localizó en los terminales nerviosos motores de la NMJ adulta. Sin embargo, no se observó inmunoreactividad para esta proteína en las células de Schwann o en las células musculares postsinápticas. Los estudios de inmunohistoquímica realizados en el sistema nervioso central revelan una presencia más abundante de nPKC ϵ en el hipocampo (Saito et al. 1993; Shirai et al. 2008), siendo evidente la inmunoreactividad de la proteína en las fibras nerviosas. Además, la observación mediante microscopía electrónica revela su localización presináptica (Saito et al. 1993; Tanaka & Nishizuka 1994), en consonancia con los resultados observados en la NMJ.

Estos resultados indican, como se razonará más adelante, la posible implicación de nPKC ϵ en funciones presinápticas tales como la liberación del neurotransmisor en las NMJ maduras.

2. LA ACTIVIDAD SINÁPTICA MODULA LA EXPRESIÓN DE LA ISOFORMA nPKC ϵ A TRAVÉS DE TrkB EN LA NMJ ADULTA

2.1. Actividad sináptica, nPKC ϵ y pMARCKS

Debido a que las funciones sinápticas de la familia PKC están reguladas por la actividad en las NMJs (Besalduch et al. 2010), se investigó si la actividad sináptica regula la translocación de nPKC ϵ y de su forma fosforilada (que es indicativa de su activación) a la membrana sináptica. Además, estudios previos han demostrado que la contracción muscular inducida por la estimulación eléctrica de las NMJs provoca el aumento de la translocación de PKC a la membrana (Richter et al. 1987; Cleland et al. 1989; Antipenko et al. 1999; Besalduch et al. 2010). Por lo tanto, con el objetivo de estudiar el efecto de la contracción muscular sobre los niveles de nPKC ϵ en la membrana sináptica, se separaron los efectos del estímulo únicamente presináptico (y, por tanto, de la neurotransmisión) y de la contracción muscular. Los resultados indican que nPKC ϵ participa en los mecanismos relacionados con la actividad sináptica en las NMJs y que la actividad muscular tiene un importante impacto en ellos. Así, encontramos que la estimulación eléctrica del músculo esquelético (genera inputs sinápticos) y la contracción muscular resultante, provocan un aumento significativo de la cantidad de nPKC ϵ y de su forma fosforilada en la membrana sináptica (figura R8). Por el contrario, cuando bloqueamos la contracción muscular mediante el *cut* de las fibras musculares (Santafé et al. 2001; Santafé et al. 2004; Santafé et al. 2009) o utilizando la neurotoxina μ -Conotoxina GIIB (Santafé et al. 2007; Santafé et al. 2009), el estímulo eléctrico que únicamente afecta al componente presináptico por la ausencia de contracción muscular, provoca la disminución significativa de nPKC ϵ y pnPKC ϵ en la membrana sináptica (figuras R6 y R7).

Estos resultados indican que el efecto de la contracción muscular revierte el efecto del estímulo nervioso a nivel presináptico, produciéndose un aumento de los niveles de nPKC ϵ y pnPKC ϵ en la membrana sináptica. La contracción, por tanto, es una condición necesaria para la función catalítica de nPKC ϵ , que tiene que estar necesariamente en la fracción de la membrana sináptica, cerca de los sustratos para su fosforilación (Newton 1995b; Ron & Kazanietz 1999; Johnson et al. 2000). Previamente, ha sido descrita una acción similar de la contracción muscular sobre varias de las isoformas clásicas de PKC (cPKCs) (Besalduch et al. 2010).

Con el objetivo de profundizar en la funcionalidad de la isoforma nPKC ϵ en relación con la actividad sináptica, se estudiaron los niveles de un sustrato conocido de PKC, la proteína MARCKS (Stumpo et al. 1989; Aderem 1992). La fosforilación de MARCKS permite evaluar la activación e inhibición de la función de PKC (Brandman et al. 2007). MARCKS ha sido descrita como una molécula implicada en la neurotransmisión (Park et al. 2006) ya que tiene un papel clave en la exocitosis en las sinapsis (Prekeris et al. 1996; Rosé et al. 2001; Arbuzova et al. 2002; Park et al. 2006), que a su vez está regulada por nPKC ϵ (Park et al. 2006). Por lo tanto, se comprobó en primer lugar que esta proteína se encuentra en la fracción presináptica de la NMJ y, posteriormente, se investigó si la fosforilación de MARCKS es dependiente de nPKC ϵ en la NMJ y si ésta depende a su vez de la actividad sináptica (con y sin contracción muscular).

Los resultados muestran que el incremento de los niveles de nPKC ϵ y p nPKC ϵ en la membrana sináptica debido a la contracción muscular coincide con el aumento de la fosforilación de la proteína MARCKS en las mismas condiciones (figura R17). Sin embargo, la fosforilación de MARCKS regulada por nPKC ϵ también aumenta cuando la contracción muscular es completamente abolida (figura R15), indicando que la actividad únicamente presináptica es suficiente para inducir un aumento en la forma fosforilada de MARCKS (pMARCKS). No obstante, se encontró un aumento significativo de pMARCKS en los músculos en contracción respecto a los músculos a los que se aplicó el mismo paradigma estimulación bloqueando la contracción muscular (figura R17). Según estos resultados, la cantidad de pMARCKS depende de la cantidad de nPKC ϵ que se encuentre activa y translocada en la membrana sináptica. Además, debido a que nPKC ϵ aumenta significativamente cuando hay contracción muscular, podemos corroborar que la contracción muscular es un mecanismo que se requiere para aumentar los niveles de nPKC ϵ en la membrana sináptica.

Para profundizar en esta conclusión, se incubaron parte de las muestras con un modulador no farmacológico, el péptido ϵ V1-2 (J. Johnson et al. 1996), que inhibe específicamente la translocación de la isoforma nPKC ϵ a la membrana (y por tanto su actividad) y nos permite analizar la posible participación constitutiva de esta isoforma en las funciones celulares en las NMJs en condiciones basales y bajo estimulación eléctrica. Este péptido interfiere en la interacción de nPKC ϵ con su proteína de anclaje ϵ RACK y, por tanto, bloquea el anclaje de nPKC ϵ cerca de sus sustratos (y la translocación de la

isoforma activa a la membrana) previniendo la fosforilación de los sustratos y la consecuente función (Mochly-Rosen & Gordon 1998). Para nPKC ϵ , la interacción PKC-RACK sucede a través del dominio C2-like, que no une Ca²⁺ (Mochly-Rosen & Gordon 1998; Way et al. 2000). Por tanto, ϵ V1-2 no inhibe a las isoformas clásicas, que son dependientes de Ca²⁺ y no contienen este dominio. Además, se han utilizado los péptidos inhibidores ϵ V1-2 y δ V1 (ambos derivados de la región V1 de PKC) específicos para las isoformas nPKC ϵ y nPKC δ (Sourotjon & Mochly-Rosen 1998), que presentan funciones opuestas en el mismo tipo celular (cardiomiocitos) (Gray et al. 1997; Csukai & Mochly-Rosen 1999; Dorn et al. 1999), mostrando la especificidad de isoforma de ambos péptidos. Otros estudios confirman el efecto de ϵ V1-2 en ratones KO (Khasar et al. 1999). El péptido ϵ V1-2 inhibe también la actividad inducida por PMA en cultivos de cardiomiocitos (Johnson & Mochly-Rosen 1995; J. Johnson et al. 1996) demostrando que modula la función de nPKC ϵ .

Se ha obtenido que, cuando se bloquea la translocación de nPKC ϵ a la membrana con el péptido ϵ V1-2 en músculos estimulados sin contracción, los niveles de nPKC ϵ , pnPKC ϵ (figuras R16b-c) y pMARCKS (figura R16a) disminuyen significativamente. Estos resultados corroboran no sólo, como se ha indicado previamente, que la fosforilación de MARCKS inducida por la actividad sináptica depende de la actividad catalítica de nPKC ϵ (translocación a membrana), sino también que la estimulación eléctrica podría provocar la activación rápida y consumo de nPKC ϵ , quizás para regular la fosforilación de MARCKS, que eventualmente se degradaría o sufriría una regulación negativa. En estas condiciones, se estudiaron los niveles de Hsp70, que se une y estabiliza a PKC en su forma madura (Gao & Newton 2002). Se observó un aumento significativo de los niveles de Hsp70 en los músculos sin estimular e incubados con ϵ V1-2 (figura R13), lo que sugiere una mayor interacción de Hsp70 con pnPKC ϵ . Esta chaperona actúa prolongando la vida media de la forma activa de nPKC ϵ y, por tanto, mantiene su función catalítica promoviendo la fosforilación de MARCKS.

Estos resultados indican que la estimulación eléctrica del componente presináptico activa a la isoforma nPKC ϵ promoviendo la fosforilación del sustrato MARCKS en la NMJ. Además, la contracción muscular es un mecanismo necesario para aumentar los niveles de nPKC ϵ y pMARCKS en la membrana sináptica. De forma similar, en otras sinapsis y sistemas celulares se ha descrito una relación específica entre la fosforilación de MARCKS y la isoforma nPKC ϵ (Park et al. 2006; Heidkamp et al.

2007; Garczarczyk et al. 2009). Sin embargo, ya que MARCKS es sustrato de otras isoformas de la familia PKC, no se puede descartar que éstas actúen en respuesta al incremento de la actividad sináptica, en relación con la actividad de nPKC ϵ , o incluso que actúen otras quinasas (Arbuzova et al. 2002; Sasaki 2003). Del mismo modo, no se descarta que la estimulación eléctrica en el componente presináptico pueda inhibir directamente la expresión de nPKC ϵ .

Por otro lado, el bloqueo de la translocación de nPKC ϵ a la membrana (y por tanto de su actividad quinasa) con el péptido ϵ V1-2 en los músculos no estimulados (en condiciones basales), provoca la disminución de los niveles de nPKC ϵ y pnPKC ϵ en la fracción de la membrana (figura R12). Esta disminución se interpreta como la inhibición de la actividad quinasa de nPKC ϵ . Para confirmar este resultado, se estudiaron los niveles de pMARCKS bajo las mismas condiciones (figura R14) observándose la disminución de este sustrato. Este resultado confirma que ϵ V1-2 impide la actividad catalítica de nPKC ϵ y que esta isoforma, una vez translocada a la membrana sináptica, cataliza la fosforilación de MARCKS.

2.2. Efecto de la contracción inducida por la actividad sináptica sobre nPKC ϵ a través de TrkB

Estudios recientes indican que la señalización actividad-dependiente a través de BDNF y TrkB es clave en la regulación de la función neuromuscular. En primer lugar, BDNF se ha descrito como una proteína inducible por la contracción muscular en el músculo esquelético humano (Matthews et al. 2009). Además, para mantener unos niveles normales de BDNF en el sistema neuromuscular, se requieren niveles basales de actividad neuromuscular (Gómez-Pinilla et al. 2002). Finalmente, BDNF y TrkB contribuyen a la función de la neurotransmisión en la NMJ (García et al. 2010; Kulakowski et al. 2011). De acuerdo con estas evidencias y con los resultados anteriormente descritos, un objetivo de esta tesis fue investigar si la actividad muscular inducida por el estímulo nervioso desencadena, desde el componente postsináptico, un mecanismo de *feedback* positivo a través de TrkB que afecte a la isoforma nPKC ϵ presináptica y a su actividad catalítica.

Los resultados del presente trabajo muestran que el bloqueo selectivo de TrkB, mediante el ligando selectivo de TrkB (el péptido ANA-12), utilizando el anticuerpo anti-TrkB (47/TrkB) o la proteína de fusión TrkB-Fc (quelante de BDNF y NT4), previene

el incremento de la isoforma nPKC ϵ en la membrana sináptica (figura R9) y la fosforilación de MARCKS (figura R18), ambos resultantes de la contracción muscular (figuras R8 y R17). Estos resultados sugieren un mecanismo de señalización a través de TrkB, que implicaría a una o más neurotrofinas provenientes del componente postsináptico, y que actuaría a nivel presináptico regulando los niveles de la isoforma nPKC ϵ y pnPKC ϵ así como de su actividad catalítica. Esta regulación sucede a través de la contracción muscular, inducida a su vez por la actividad sináptica, indicando por tanto que la contracción muscular es un proceso clave en la regulación de la señalización a través de TrkB en la NMJ.

En condiciones fisiológicas, la actividad del nervio está relacionada con la contracción muscular, por tanto es importante proporcionar un mecanismo que una la contracción muscular y la función nerviosa. La figura D1 propone cómo la contracción muscular inducida por la actividad sináptica podría regular la acción presináptica de nPKC ϵ a través de la señalización de TrkB, aumentando la fosforilación de MARCKS de forma actividad-dependiente. Ya que se requiere la contracción de las células musculares para mantener o aumentar los niveles de nPKC ϵ y pMARCKS en la membrana presináptica, estas proteínas podrían estar relacionadas funcionalmente en el mecanismo de neurotransmisión en la NMJ. El sustrato MARCKS ha sido descrito como una molécula implicada en la neurotransmisión (Park et al. 2006) ya que tiene un papel clave en la exocitosis en las sinapsis (Prekeris et al. 1996; Rosé et al. 2001; Arbutova et al. 2002; Park et al. 2006), que a su vez está regulada por nPKC ϵ (Park et al. 2006).

En conjunto, los resultados de los apartados anteriores indican que nPKC ϵ está exclusivamente localizada en el componente presináptico de las NMJs, está regulada por la actividad sináptica a través de la contracción muscular y a través de la función de TrkB, provocando el aumento de la fosforilación del sustrato de PKC, la proteína MARCKS.

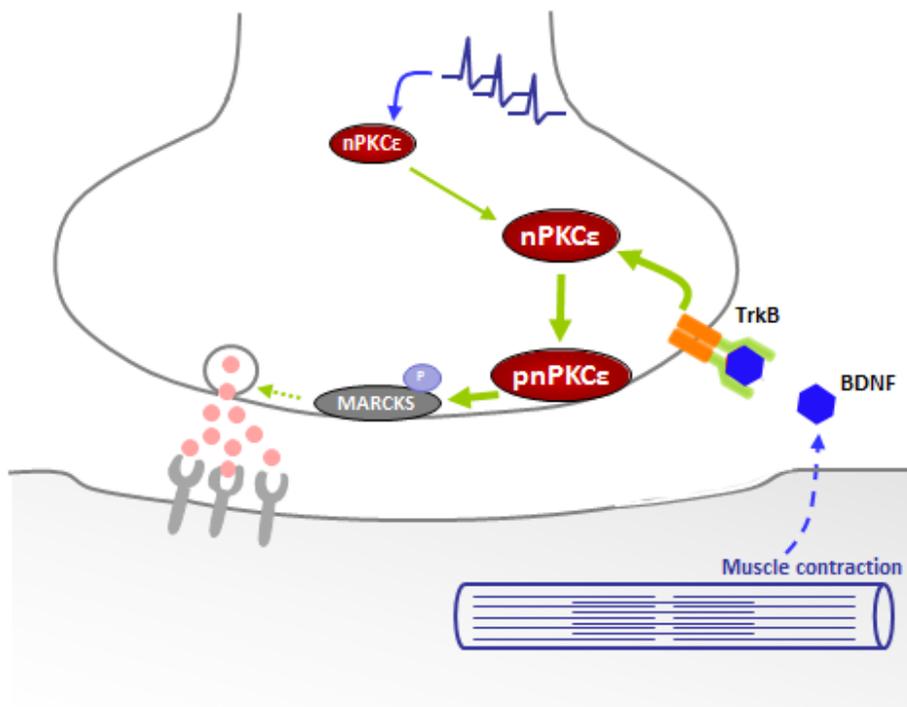


Figura D1. Diagrama del mecanismo propuesto que relaciona la función regulatoria de nPKCε, actividad-dependiente, y la secreción del neurotransmisor, con la contracción muscular en las NMJs.

El diagrama ilustra cómo la contracción muscular inducida por la actividad sináptica podría regular la función sináptica de nPKCε a través de las vías de señalización de TrkB, mediante un *feedback* positivo proveniente del componente postsináptico (con BDNF como posible neurotrofina candidata), aumentando la fosforilación de MARCKS. La actividad de la isoforma nPKCε requiere la contracción inducida por el estímulo de las células musculares para mantener o incrementar el nivel de nPKCε en la membrana presináptica. Finalmente, ya se ha descrito que el sustrato MARCKS y la isoforma nPKCε están involucradas en la exocitosis del neurotransmisor, hipotetizamos que nPKCε está relacionada funcionalmente con el mecanismo de secreción de ACh en este modelo de neurotransmisión.

3. nPKC ϵ Y SU ACOPLAMIENTO A LA LIBERACIÓN DE ACETILCOLINA EN LA NMJ ADULTA

Cuando se considera conjuntamente el papel de las serinas quinasa en las funciones sinápticas en las preparaciones neuromusculares en condiciones basales (sin estimular), se ha establecido que la serina/treonina quinasa PKA se acopla de forma constitutiva al mecanismo de liberación de ACh, es decir, modula la secreción del neurotransmisor. Por el contrario, PKC permanece desacoplada en estas condiciones ya que no se observa variación en el contenido cuántico tras su bloqueo con el pan-inhibidor CaC (Santafé et al. 2005; Santafé et al. 2006; Santafé et al. 2009). Sin embargo, cuando se aumenta o potencia la secreción de ACh mediante diversos mecanismos, se induce el acoplamiento de PKC a la modulación del neurotransmisor, ya que su inhibición inespecífica con CaC en estas condiciones provoca la reducción del contenido cuántico, indicador de su acoplamiento (Santafé et al. 2005; Santafé et al. 2006). Esto sucede en varias situaciones: durante la estimulación eléctrica continua del nervio de la preparación neuromuscular a 1 Hz (Besalduch et al. 2010), en presencia de alto Ca²⁺ externo (Santafé et al. 2005), tras la estimulación de PKA con Sp-8-BrcAMP (un ejemplo de cruces de vías intracelulares; (Santafé et al. 2009), tras la estimulación de PKC con ésteres de forbol (Santafé et al. 2005) y tras el bloqueo de mAChRs (con ATR) o la modulación de los subtipos M1/M2 (con PIR y MET; un ejemplo de modificación de señalización extracelular; (Santafé et al. 2006).

Para conocer la participación de la isoforma nPKC ϵ en la modulación de ACh, se analizaron cada una de las condiciones anteriormente citadas, en las que PKC se acopla para mantener o potenciar la liberación de ACh en la NMJ. Para ello, se realizaron técnicas de electrofisiología de registro intracelular utilizando el péptido ϵ V1-2 inhibidor específico de la función de nPKC ϵ (J. Johnson et al. 1996; Brandman et al. 2007). Por lo tanto, se estudió el efecto de ϵ V1-2 bajo las siguientes condiciones: i) actividad inducida por estimulación eléctrica, ii) entrada de Ca²⁺ 5 mM, iii) estimulación de PKA con Sp-8-BrcAMP, iv) estimulación de PKC con ésteres de forbol y v) modulación presináptica de mAChRs.

Se trabajó con concentraciones de ϵ V1-2 entre 1-100 μ M. Este rango de valores aparece extensamente en la literatura. Por ejemplo, se han utilizado concentraciones de 1 μ M o 5 μ M en cultivos celulares de miocitos ventriculares (Pravdic et al. 2009) y en cultivos celulares de isquemia cerebral (Agudo-López et al. 2010). Los valores de 100

μM se han utilizado en cultivos neuronales de la raíz dorsal (Yamamoto et al. 2006) o en cultivos celulares cancerígenos (Felber et al. 2007). El valor intermedio, $10 \mu\text{M}$, se ha utilizado previamente en muestras isquémicas de músculo cardíaco (Hassouna et al. 2004).

La secreción espontánea y evocada de ACh se produce a través de diferentes mecanismos (Losavio & Muchnik 1997; Coleman et al. 2007). Para el estudio de la secreción evocada, los experimentos se llevaron a cabo en músculos cuya contracción fue bloqueada con μ -Conotoxina GIIB. En paralelo, se trabajó con músculos *cut*, obteniéndose resultados similares. Otros procedimientos utilizados frecuentemente para evitar la contracción (d-tubocurarina y soluciones de bajo calcio/alto Mg^{2+}) no resultan adecuados para la prevención de la contracción muscular en el presente set de experimentos. El curare (bloqueante de nAChRs) puede producir la regulación alostérica de mAChRs, y se han descrito previamente anomalías funcionales inducidas por curare en los mAChRs que se acoplan a las vías de señalización de las quinasas (Santafé et al. 2003; Santafé et al. 2006). Además, debido a que los iones Ca^{2+} están directamente involucrados en los mecanismos intracelulares de las quinasas estudiadas aquí (Santafé et al. 2006), se decidió no realizar ningún cambio inicial en las concentraciones de Ca^{2+} para prevenir la contracción muscular.

3.1. nPKC ϵ y el estímulo eléctrico

Como ya se ha mencionado al inicio de este apartado de la discusión, PKC permanece desacoplada del mecanismo de neurotransmisión evocada en condiciones basales, ya que su inhibición con CaC no afecta a la liberación de ACh (Santafé et al. 2006; Santafé et al. 2009). Sin embargo, cuando la neurotransmisión es estimulada con Ca^{2+} o 1 Hz (1 h; (Besalduch et al. 2010), el contenido cuántico disminuye de forma significativa por efecto de CaC, lo que indica que PKC se acopla a la secreción de ACh en estas condiciones y, por tanto, realiza una función en la modulación de la liberación del neurotransmisor.

Los experimentos realizados con el péptido $\epsilon\text{V1-2}$ para explorar la participación de nPKC ϵ en el acoplamiento general de PKC a la neurotransmisión, indican que la inhibición de nPKC ϵ con el péptido $\epsilon\text{V1-2}$ previene el acoplamiento de PKC a la liberación de ACh inducido por el estímulo eléctrico de las NMJs. El pan-inhibidor no es capaz de reducir el contenido cuántico cuando se bloquea previamente la translocación de nPKC ϵ a la membrana sináptica y, por tanto, su actividad. Así, la

inhibición de nPKC ϵ con el péptido ϵ V1-2 previene el acoplamiento de PKC a la liberación de ACh, inducido por el estímulo eléctrico de las NMJs. Sin embargo, la estimulación eléctrica (1 Hz) (Besalduch et al. 2010) o el bloqueo de la translocación de nPKC ϵ no modifican el contenido cuántico *per se* (figura R20).

En conclusión, el acoplamiento de PKC a la liberación de ACh en la NMJ depende de la translocación de nPKC ϵ a la membrana en estas condiciones de estimulación eléctrica. nPKC ϵ podría participar en el mantenimiento de la función sináptica durante la estimulación eléctrica de las NMJs.

3.2. nPKC ϵ y los iones Ca²⁺

Cuando la sinapsis opera en condiciones basales, PKC permanece desacoplada del mecanismo de liberación de ACh, indicando que la entrada normal de Ca²⁺ en el proceso de neurotransmisión es insuficiente para la activación de PKC. Sin embargo, esta quinasa puede ser requerida para aumentar la liberación de ACh cuando hay un aumento de la entrada de Ca²⁺ o mayor disponibilidad de este. Esto supondría un ahorro de ACh cuando PKC está inactiva y permitiría la potenciación de su secreción a través de PKC (además de además del efecto potenciador ya mencionado de PKA) cuando fuese necesario.

Cuando hay una entrada de Ca²⁺ elevada en el terminal nervioso, PKC y PKA se acoplan a la modulación de la secreción del neurotransmisor y contribuyen a su potenciación (Santafé et al. 2007). Esto indica que las vías *downstream* de las quinastas dependen de la entrada de Ca²⁺. También se ha encontrado que en presencia de ω -Agatoxina-IVA, toxina que bloquea los canales VDCC tipo P (Santafé et al. 2006), ninguna de las dos quinastas modula la liberación de ACh. Por lo tanto, PKC y PKA necesitan una cantidad mínima de Ca²⁺ en el terminal para ejercer esta modulación aisladamente o en conjunto. La influencia de ambas quinastas en la neurotransmisión depende de los VDCC tipo P/ Q (Santafé et al. 2006). Este canal es específico del componente presináptico en la NMJ de mamífero (Uchitel et al. 1992) y podría ser la diana final de las quinastas para la regulación de VDCC a través de su fosforilación (Yokoyama et al. 2005).

Los resultados muestran que el bloqueo de nPKC ϵ previene el acoplamiento de PKC a la potenciación de la neurotransmisión, producido por el Ca²⁺ que entra a elevadas concentraciones en el terminal nervioso (CaC no modifica el contenido cuántico). Sin embargo, la inhibición de nPKC ϵ no previene la acción directa del Ca²⁺

externo, que potencia la liberación de ACh en presencia de ϵ V1-2. Así, la acción directa del ion Ca^{2+} sobre la maquinaria de neurotransmisión compensaría el desacoplamiento de PKC provocado por el efecto del péptido ϵ V1-2.

En resumen, los resultados obtenidos indican que el acoplamiento de nPKC ϵ a la liberación de ACh depende de la entrada de Ca^{2+} al terminal nervioso y que el acoplamiento general de PKC depende de la translocación de nPKC ϵ a la membrana sináptica en estas condiciones. Dado que nPKC ϵ es una isoforma Ca^{2+} -independiente, nPKC ϵ podría acoplarse a la secreción del neurotransmisor de forma indirecta en el contexto del proceso de exocitosis comenzado por la entrada de Ca^{2+} en el terminal nervioso. Esta explicación es coherente con el papel de esta isoforma con la exocitosis, demostrado por varios autores. Esta isoforma mantiene la exocitosis de glutamato en el terminal presináptico (Prekeris et al. 1996), regula la endocitosis vía F-actina en las células epiteliales (Song et al. 1999) y en las células secretoras (Muallem et al. 1995) y participa en el aumento de la exocitosis de glutamato inducida por ésteres de forbol en el terminal nervioso (Saitoh et al. 2001) y en la potenciación sináptica inducida por ésteres de forbol (Dumuis et al. 1988).

3.3. nPKC ϵ y la estimulación de PKC con el éster de forbol PMA

Todas las isoformas de la familia PKC son estimuladas farmacológicamente mediante ésteres de forbol que aumentan la neurotransmisión a través de su activación (Hori et al. 1999; Santafé et al. 2005). En concreto, el éster de forbol PMA es un agonista potente e inespecífico de PKC ampliamente utilizado en estudios electrofisiológicos para potenciar PKC. Estudios previos han demostrado que la liberación evocada de ACh es fuertemente estimulada por PMA y, una vez potenciada la neurotransmisión, el pan-inhibidor CaC no puede revertir su efecto (Santafé et al. 2005). Sin embargo, el efecto de PMA puede ser abolido tras la preincubación con CaC (que actúa en el mismo dominio regulador de PKC, C1) (Santafé et al. 2005; Santafé et al. 2009). PMA y CaC actúan como reguladores (positivo y negativo, respectivamente) farmacológicos irreversibles de la actividad de PKC. El efecto de PMA también depende de la entrada de Ca^{2+} ya que puede ser abolido en presencia de alto Mg^{2+} (5 mM) o ω -Agatoxina-IVA (100 nM).

Para determinar la participación de la isoforma nPKC ϵ en la potenciación de ACh neuromuscular se evaluó el efecto de PMA sobre la neurotransmisión evocada en presencia de ϵ V1-2. Así, se investigó cómo el bloqueo de la translocación de nPKC ϵ a la

membrana influye en el efecto de PMA. PMA no potencia la liberación de ACh cuando ϵ V1-2 está presente a elevadas concentraciones (100 μ M) o cuando ϵ V1-2 está presente a una concentración 10 μ M y, a su vez, se produce estimulación eléctrica del músculo a 1 Hz. Por lo tanto, el efecto de PMA en la neurotransmisión es dependiente de nPKC ϵ (como sucedía con CaC), y los mecanismos de operación de PMA y de la actividad eléctrica comparten una vía común.

En conjunto, los experimentos electrofisiológicos realizados determinan que la isoforma nPKC ϵ participa en la potenciación de la neurotransmisión inducida por PMA, y sugieren que la neurotransmisión es una de las funciones presinápticas en las que podría estar involucrada la isoforma. El papel clave de nPKC ϵ en la neurotransmisión se manifiesta (y podría ser la causa) cuando se produce un aumento en la secreción del neurotransmisor. Esto sucede cuando hay una entrada de Ca^{2+} 5 mM en el terminal, cuando se induce actividad sináptica continua por estimulación del nervio a 1 Hz o cuando se estimula PKC con el éster de forbol PMA.

3.4. nPKC ϵ y la actividad de PKA en la NMJ

En diversos sistemas, PKA y PKC actúan en cooperación o antagonizan entre ellos. Por ejemplo en *aplysia*, los segundos mensajeros de las vías de señalización de ambas quinasas se solapan en su contribución a la facilitación sináptica. En el comienzo de la actividad sináptica, actúa la quinasa PKA mientras que la contribución de PKC comienza a ser progresivamente más importante cuando la sinapsis comienza a deprimirse por actividad repetitiva (Byrne & Kandel 1996). En la NMJ de mamífero, la activación de PKA y PKC tiene efectos opuestos en la estabilidad de los nAChRs postsinápticos y esto contribuye a la estabilización/eliminación sináptica (Nelson et al. 2003). Estos efectos opuestos de PKC y PKA se han observado también en otras funciones celulares en modelos de células inmunes (Hermann-Kleiter et al. 2006), de proliferación celular (Fortino et al. 2002), de expresión de proteínas gliales (Hahn et al. 2000) y de células renales (Stärk et al. 1998).

En cuanto a la neurotransmisión, se ha demostrado (Santafé et al. 2006; Santafé et al. 2009) que PKA contribuye a modular tónicamente la liberación del neurotransmisor en condiciones basales, independientemente de la actividad de PKC. Más aún, la estimulación de PKA (Sp-8-BrcAMP, 10 μ M) provoca el acoplamiento de PKC a la liberación de ACh evocada y la inhibición de PKA (H-89, 5 μ M) previene la

estimulación de PKC (con los ésteres de forbol) y su acoplamiento a la secreción de ACh (Santafé et al. 2009).

Con estos antecedentes, corroborados en el presente estudio se ha analizado el papel de nPKC ϵ en las interacciones entre PKC y PKA en la regulación de la liberación del neurotransmisor en las sinapsis neuromusculares. Cada quinasa está acoplada a diferentes receptores metabotrópicos presinápticos, pero en este trabajo las quinasas se estimularon e inhibieron directamente. Se modularon las quinasas nPKC ϵ y PKA y se analizó el contenido cuántico obtenido tras la estimulación o inhibición de la quinasa complementaria. Se utilizó el inhibidor específico de la translocación de nPKC ϵ para analizar la participación de esta isoforma.

ϵ V1-2 previene la estimulación de PKA con Sp-8-BrcAMPs ya que no es capaz de aumentar la liberación de ACh si se bloquea la translocación de nPKC ϵ a la membrana. De este modo, la inhibición nPKC ϵ es suficiente para prevenir la activación de PKA por encima de su actividad tónica basal. Sin embargo, el bloqueo de todas las isoformas de PKC no afecta a la actividad de PKA (Santafé et al. 2006; Santafé et al. 2009). Este resultado, aparentemente discrepante, señala la relevancia de la actividad de nPKC ϵ en la modulación de la actividad de PKA por encima de la inhibición del dominio regulador que ejerce el inhibidor inespecífico CaC sobre las isoformas de PKC.

Sin embargo el bloqueo previo de nPKC ϵ con ϵ V1-2 no previene el efecto inhibitorio de H-89, indicando que PKA está tónicamente activa. Por lo tanto, PKA modula la liberación del neurotransmisor independientemente del status de nPKC ϵ como se ha visto para la actividad general de PKC (Santafé et al. 2009). Estudios previos en la sinapsis neuromuscular adulta (Santafé et al. 2006) indican que PKA (pero no PKC) tiene un papel constitutivo en la liberación de ACh en condiciones basales.

En conjunto, estos resultados sugieren que nPKC ϵ podría participar en la activación de PKA y en el acoplamiento de PKC a la liberación de neurotransmisor. En este caso, una vez PKA y PKC son activados, la inhibición de nPKC ϵ no modifica su actividad. El diagrama D2 resume esta interpretación de la participación de PKC/nPKC ϵ y PKA en la modulación funcional de la liberación del neurotransmisor en la NMJ adulta de mamífero.

En relación al efecto bien establecido de los ésteres de forbol, se observa que el bloqueo de la translocación de nPKC ϵ imita al bloqueo de la actividad de PKA así como a la reducción del influjo de Ca²⁺. Estos resultados refuerzan los indicios que

apuntan a una relación estrecha entre nPKC ϵ , PKA y los iones Ca²⁺ para fomentar la secreción de ACh y sugieren que nPKC ϵ tiene un papel central en la liberación del neurotransmisor.

Los resultados obtenidos en los apartados anteriores demuestran que el péptido ϵ V1-2 inhibe específicamente la actividad de nPKC ϵ , como ha sido previamente demostrado (J. Johnson et al. 1996; Brandman et al. 2007), y apuntan a que hay una relación entre la inhibición de la función de nPKC ϵ y la modulación de la liberación de ACh que se manifiesta cuando la neurotransmisión está potenciada. Es plausible que esta isoforma no esté acoplada tónicamente a la liberación de ACh, como se ha descrito para la actividad general de PKC (Santafé et al. 2005; Santafé et al. 2007; Santafé et al. 2009). Sin embargo, la translocación de nPKC ϵ parece necesaria para una activación general de PKC, como demuestra el efecto oclusivo de la potenciación de la liberación de ACh normalmente llevada a cabo por PMA (*apartado 3.3*) y Sp-8-BrcAMPs. Un *pool* de nPKC ϵ sin fosforilar podría estar presente y listo para ser reclutado para la señalización a través de la estimulación de receptores en el momento necesario (Newton & Messing 2010).

3.5. nPKC ϵ y el acoplamiento de PKC a la neurotransmisión a través de la modulación de M1 y M2 (mAChRs)

Los autoreceptores M1 y M2 presinápticos modulan la liberación de ACh acoplándose a la acción de las quinasas PKC y PKA (Santafé et al. 2006). Ambas quinasas estimulan la neurotransmisión, aunque únicamente PKA permanece activa cuando la función sináptica permanece en un estado basal. Sin embargo, la modulación de mAChRs provoca la inversión de las funciones complementarias de las quinasas que resulta en la activación de la liberación la neurotransmisión mediada por PKC y su inhibición mediada por PKA. Por lo tanto, mAChRs en la membrana presináptica representan un importante mecanismo de autocontrol para la secreción de ACh en la sinapsis neuromuscular (Santafé et al. 2003; Santafé et al. 2006; Slutsky et al. 1999; Minic et al. 2002) y existe una relación funcional entre estos y la actividad de las serina treonina quinasas en el control de la neurotransmisión.

El funcionamiento global de mAChRs tiene como principal objetivo conservar la función sináptica mediante la disminución de la neurotransmisión evocada (principalmente a través de la acción de M2) y la reducción de la depresión sináptica (la depresión aumenta cuando mAChRs son bloqueados con AT) (Santafé et al. 2006; Tomàs et al. 2014). El bloqueo específico del mecanismo muscarínico con ATR (o la modulación selectiva de M1/M2) produce el acoplamiento de PKC (que es inhibida por CaC) y la potenciación de la neurotransmisión. Por lo tanto, a diferencia de los experimentos realizados con Sp-8-BrcAMP en los que PKC se acopla a la estimulación de PKA, PKC se acopla a la inhibición de mAChRs. En una primera serie de experimentos, se obtuvieron idénticos resultados en músculos tratados con la neurotoxina μ -CgTx GIIIB (3 μ M) que bloquea la contracción muscular sin alterar la maquinaria de la neurotransmisión, y por tanto confirma los resultados obtenidos realizando el *cut* muscular. Así, el desequilibrio M1/M2 acopla a PKC a la liberación del neurotransmisor para potenciar la liberación de ACh en la NMJ.

Se estudió la posible participación de la isoforma nPKC ϵ en el acoplamiento de PKC a la liberación del neurotransmisor a través del mecanismo de modulación muscarínica descrito. En lugar del pan-inhibidor de PKC (CaC), se utilizó el péptido ϵ V1-2 para bloquear la translocación de nPKC ϵ tras la preincubación de la preparación con AT, PIR o MET. No se observa ningún cambio en el tamaño de los EPPs o el contenido cuántico en los músculos estimulados en ningún caso. Este resultado indica

que la translocación de nPKC ϵ no es relevante en el control de la neurotransmisión una vez establecida la modulación muscarínica ya que ϵ V1-2 no tiene ningún efecto sobre la neurotransmisión (al contrario de lo que ocurría con CaC). La explicación funcional puede que sea más compleja ya que, como hemos confirmado, tras la modulación de mAChRs, PKC es reclutada a la liberación del neurotransmisor (Santafé et al. 2007). Sin embargo, no puede demostrarse el efecto de CaC, que indicaría el acoplamiento de PKC a la liberación del neurotransmisor. Este resultado es coherente con los resultados de este trabajo ya que, como se ha visto en apartados previos, la inhibición de nPKC ϵ no modifica la actividad general de PKC una vez que esta es estimulada, como sugieren estos resultados.

Los experimentos recíprocos revelan que, una vez bloqueada la actividad de nPKC ϵ con el péptido ϵ V1-2, no se produce la modulación muscarínica descrita, de la misma forma que sucedía en presencia de CaC (Santafé et al. 2007). Por lo tanto, la inhibición de nPKC ϵ con ϵ V1-2 podría ser más fuerte que cualquier señal proveniente de M1 o M2.

En conjunto, estos resultados indican que, de manera similar a la observada en presencia de Ca²⁺ 5 mM, actividad eléctrica continua a 1 Hz, e incubación con los agonistas de PKC y PKA, PMA y Sp-8-BrcAMPs respectivamente, el péptido no afecta a la modulación muscarínica sobre la neurotransmisión una vez ésta se ha producido. Sin embargo, la modulación muscarínica de la neurotransmisión (como sucedía con el efecto de Sp-8-BrcAMP previamente discutido) puede ser prevenida mediante el bloqueo de la translocación de nPKC ϵ a la membrana. Por lo tanto, en condiciones basales, mAChRs operan reduciendo la actividad de PKC y la liberación de ACh (Santafe et al. 2003). Al alterar la función muscarínica, se produce el acoplamiento de PKC y el aumento de la liberación del neurotransmisor (Santafe et al. 2009), al menos en parte, a través de la isoforma nPKC ϵ .

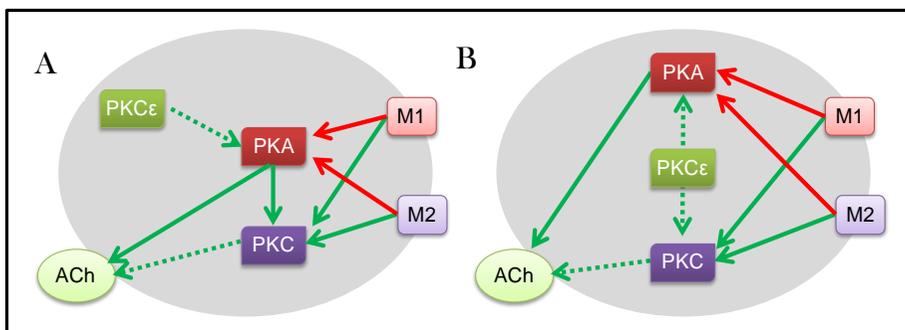


FIGURA D2: Participación de la isoforma nPKCε en relación a la actividad de la proteína quinasa C (PKC), proteína quinasa A (PKA) y mAChRs (M1 y M2), en la liberación de ACh. Se ha demostrado la interrelación precisa de mAChRs, PKC y PKA en el fino control de la secreción del neurotransmisor (Santafé et al. 2006). A) El modelo propuesto indica que nPKCε es reclutada en condiciones de elevada neurotransmisión y, en estas condiciones, PKA actúa modulando la activación general de PKC. B) Este segundo modelo propone que la isoforma nPKCε es reclutada en condiciones de elevada neurotransmisión y se acopla a la neurotransmisión a través de PKA y PKC. Cuando las serinas/treoninas quininas son inhibidas, la vía de nPKCε no es suficientemente fuerte para activarlas pero participa en la activación de ambas quininas. Las flechas verdes indican acción estimuladora y las flechas rojas indican acción inhibitoria sobre la diana correspondiente. Las flechas discontinuas indican que la vía no es suficiente activa para modular directamente la secreción del neurotransmisor.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

LA PROTEÍNA QUINASA C ÉPSILON EN LA UNIÓN NEUROMUSCULAR DE MAMÍFERO ADULTO: LOCALIZACIÓN,
REGULACIÓN MEDIANTE ACTIVIDAD SINÁPTICA Y ACOPLAMIENTO A LA LIBERACIÓN DE ACETILCOLINA.

Teresa Obis Ibáñez

Dipòsit Legal: T 1609-2015

CONCLUSIONES

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

LA PROTEÍNA QUINASA C ÉPSILON EN LA UNIÓN NEUROMUSCULAR DE MAMÍFERO ADULTO: LOCALIZACIÓN,
REGULACIÓN MEDIANTE ACTIVIDAD SINÁPTICA Y ACOPLAMIENTO A LA LIBERACIÓN DE ACETILCOLINA.

Teresa Obis Ibáñez

Dipòsit Legal: T 1609-2015

1- Estudio de la expresión y localización de nPKC ϵ en el músculo esquelético

- En condiciones basales (músculos sin estimular), nPKC ϵ y su forma activa, pnPKC ϵ , se expresan de forma abundante en el músculo esquelético de rata de 6 días y adulta, siendo más abundante en el músculo de rata P6.
- La isoforma nPKC ϵ y su forma fosforilada, pnPKC ϵ , se expresan únicamente en la fracción de la membrana sináptica en el músculo esquelético adulto.
- La isoforma nPKC ϵ se localiza exclusivamente en el componente presináptico, en concreto en los terminales nerviosos de la NMJ adulta.

2- Estudio de la regulación de nPKC ϵ por la actividad presináptica y la contracción muscular

- El estímulo nervioso presináptico (1 Hz) provoca la disminución de los niveles de nPKC ϵ y de pnPKC ϵ en la fracción de la membrana sináptica en las preparaciones neuromusculares en las que se ha anulado la contracción muscular mediante la técnica *cut* o el tratamiento con μ -Conotoxina GIIIB.
- La contracción muscular provoca el aumento de los niveles de nPKC ϵ y de pnPKC ϵ en la fracción de la membrana sináptica, revertiendo el efecto producido únicamente por el estímulo nervioso presináptico.
- La contracción muscular inducida por actividad eléctrica del nervio promueve el aumento significativo de los niveles de nPKC ϵ en la fracción de la membrana sináptica a través de la actividad del receptor TrkB.
- pMARCKS se expresa en el componente presináptico del músculo esquelético de rata adulta.
- La isoforma nPKC ϵ regula la fosforilación de MARCKS en el terminal nervioso de la NMJ.
- La actividad presináptica promueve la fosforilación de MARCKS, que a su vez depende de nPKC ϵ .

- La contracción muscular inducida por la actividad sináptica aumenta adicionalmente la fosforilación de MARCKS a través de la vía de señalización que opera a través de TrkB

3- Estudio de la implicación de nPKCε en la neurotransmisión

- El acoplamiento tónico de PKC en condiciones de estimulación continua y moderada (1 Hz) depende de la translocación de la isoforma nPKCε a la membrana sináptica.
- El acoplamiento de PKC a la liberación de ACh en condiciones de alto Ca²⁺, que aumenta la neurotransmisión, depende de la translocación de nPKCε a la membrana sináptica.
- El efecto del éster de forbol PMA, potenciador de la neurotransmisión, depende de la translocación de la isoforma nPKCε a la membrana sináptica.
- El efecto de Sp-8-BrcAMPs, que estimula PKA y acopla PKC a la secreción del neurotransmisor, depende de la translocación de la isoforma nPKCε a la membrana sináptica.
- El mecanismo muscarínico presináptico, que modula la liberación del neurotransmisor a través de M1/M2, depende de la translocación de la isoforma nPKCε a la membrana sináptica.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

LA PROTEÍNA QUINASA C ÉPSILON EN LA UNIÓN NEUROMUSCULAR DE MAMÍFERO ADULTO: LOCALIZACIÓN,
REGULACIÓN MEDIANTE ACTIVIDAD SINÁPTICA Y ACOPLAMIENTO A LA LIBERACIÓN DE ACETILCOLINA.

Teresa Obis Ibáñez

Dipòsit Legal: T 1609-2015

CONCLUSIONS

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

LA PROTEÍNA QUINASA C ÉPSILON EN LA UNIÓN NEUROMUSCULAR DE MAMÍFERO ADULTO: LOCALIZACIÓN,
REGULACIÓN MEDIANTE ACTIVIDAD SINÁPTICA Y ACOPLAMIENTO A LA LIBERACIÓN DE ACETILCOLINA.

Teresa Obis Ibáñez

Dipòsit Legal: T 1609-2015

1- nPKC ϵ expression and localization in the skeletal muscle

- In basal conditions (unstimulated muscles), nPKC ϵ and its active form, pnPKC ϵ , are expressed abundantly in 6-days and adult rat skeletal muscle, being more abundant in the P6 rat muscle.
- nPKC ϵ and its phosphorylated form, pnPKC ϵ , are expressed only in the synaptic membrane fraction in the adult skeletal muscle.
- nPKC ϵ is exclusively localized in the presynaptic component, specifically at the nerve endings of the adult NMJ

2- nPKC ϵ regulation by presynaptic activity and muscle contraction

- Presynaptic nerve stimulation (1 Hz) causes decreased levels of nPKC ϵ and pnPKC ϵ at the synaptic membrane fraction in the neuromuscular preparations in which muscle contraction has been blocked by *cut* technique or by treatment with μ - GIIIB Conotoxin.
- The muscle contraction causes increased levels of nPKC ϵ and pnPKC ϵ at the synaptic membrane fraction, reversing the effect caused only by the presynaptic nerve stimulation.
- The muscle contraction induced by electrical activity of the nerve promotes significant increase in the levels of nPKC ϵ at the synaptic membrane fraction through TrkB receptor activity.
- pMARCKS expresses at the presynaptic component of the adult rat skeletal muscle.
- nPKC ϵ regulates MARCKS phosphorylation in nerve endings of the NMJ.
- Presynaptic activity promotes MARCKS phosphorylation, which in turn depends on nPKC ϵ .
- The muscle contraction induced by synaptic activity further increases phosphorylation of MARCKS via TrkB signaling pathway.

3- nPKC ϵ involvement in neurotransmission

- The tonic coupling of PKC in conditions of continuous and moderate stimulation (1 Hz) depends on the translocation of nPKC ϵ to the synaptic membrane.
- The PKC coupling to ACh release under high Ca²⁺ conditions, which increases neurotransmission, depends on the translocation of nPKC ϵ to the synaptic membrane.
- The PMA effect, which enhances neurotransmission, depends on the translocation of nPKC ϵ to the synaptic membrane.
- The effect of Sp-8-BrcAMPs, which stimulates PKA and couples PKC to neurotransmitter secretion, depends on the translocation of nPKC ϵ to the synaptic membrane.
- The presynaptic muscarinic mechanism, which modulates neurotransmitter release via M1 / M2, depends on the translocation of nPKC ϵ to the synaptic membrane.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

LA PROTEÍNA QUINASA C ÉPSILON EN LA UNIÓN NEUROMUSCULAR DE MAMÍFERO ADULTO: LOCALIZACIÓN,
REGULACIÓN MEDIANTE ACTIVIDAD SINÁPTICA Y ACOPLAMIENTO A LA LIBERACIÓN DE ACETILCOLINA.

Teresa Obis Ibáñez

Dipòsit Legal: T 1609-2015

BIBLIOGRAFÍA/ BIBLIOGRAPHY

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

LA PROTEÍNA QUINASA C ÉPSILON EN LA UNIÓN NEUROMUSCULAR DE MAMÍFERO ADULTO: LOCALIZACIÓN,
REGULACIÓN MEDIANTE ACTIVIDAD SINÁPTICA Y ACOPLAMIENTO A LA LIBERACIÓN DE ACETILCOLINA.

Teresa Obis Ibáñez

Dipòsit Legal: T 1609-2015

- Abbott, L. & Regehr, W., 2004. Synaptic computation. *Nature*, 431(7010), pp.796-803.
- Aderem, A., 1992. The MARCKS Brothers : A Family of Protein Kinase C Substrates Minireview. , 71, p.1992.
- Agudo-López, A. et al., 2010. Involvement of mitochondria on neuroprotective effect of sphingosine-1-phosphate in cell death in an in vitro model of brain ischemia. *Neurosci Lett*, 470.
- Akita, Y., 2002. Protein Kinase C-ε (PKC-ε): Its Unique Structure and Function. *Wild*, 852, pp.847-852.
- Aksoy, E., Goldman, M. & Willems, F., 2004. Protein kinase C epsilon: a new target to control inflammation and immune-mediated disorders. *Int J Biochem Cell Biol*, 36(2), pp.183-188.
- Alonso, D. et al., 2003. Drugs from the sea: conotoxins as drug leads for neuropathic pain and other neurological conditions. *Mini Rev Med Chem*, 3(7), pp.785-787.
- Angaut-Petit, D. et al., 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 Lett*, 82(1), pp.83-88.
- Antipenko, A. et al., 1999. Effect of chronic electrostimulation of rabbit skeletal muscle on calmodulin level and protein kinase activity. *Int J Biochem Cell Biol*, 31(2), pp.303-310.
- Arakawa, M. et al., 1993. Ultrastructural localization of protein kinase C beta-subspecies in the axon terminal of rat neuromuscular junction. *Neurosci Res*, 16(2), pp.125-130.
- Arbuzova, A., Schmitz, A. & Vergères, G., 2002. Cross-talk unfolded: MARCKS proteins. *Biochem J*, 362(Pt 1), pp.1-12.
- Ashendel, C., 1985. The phorbol ester receptor: a phospholipid-regulated protein kinase. *Biochim Biophys Acta*, 822(2), pp.219-242.
- Atwood, H. & Karunanithi, S., 2002. Diversification of synaptic strength: presynaptic elements. *Nat Rev Neurosci*, 3(7), pp.497-516.
- Auld, D.S. & Robitaille, R., 2003. Glial Cells and Neurotransmission : An Inclusive View of Synaptic Function Glial cells throughout the nervous system are closely. , 40, pp.389-400.
- Balkowiec, A. & Katz, D.M., 2000. Activity-dependent release of endogenous brain-derived neurotrophic factor from primary sensory neurons detected by ELISA in situ. *J Neurosci*, 20, pp.7417-7423.

- Battaini, F. & Mochly-Rosen, D., 2007. Happy birthday protein kinase C: past, present and future of a superfamily. *Pharmacol Res*, 55(6), pp.461-6.
- Bell, R. & Burns, D., 1991. Lipid activation of protein kinase C. *J Biol Chem*, 266(8), pp.4661-4664.
- Bennett, M.R. & Kearns, J.L., 2000. Statistics of transmitter release at nerve terminals. *Prog Neurobiol*, 60(6), pp.545-606.
- Besalduch, N. et al., 2013. Cellular localization of the atypical isoforms of protein kinase C (α PKC ζ /PKM ζ and α PKC λ /I) on the neuromuscular synapse. *Neurosci Lett*, 556, pp.166-169.
- Besalduch, N. et al., 2010. Synaptic activity-related classical protein kinase C isoform localization in the adult rat neuromuscular synapse. *J Comp Neurol*, 518(2), pp.211-28.
- Besson, A., Wilson, T. & Yong, V., 2002. The anchoring protein RACK1 links protein kinase Cepsilon to integrin beta chains. Requirements for adhesion and motility. *J Biol Chem*, 277(24), pp.22073-22084.
- Beytía, M.D.L.A., Vry, J. & Kirschner, J., 2012. Drug treatment of Duchenne muscular dystrophy: available evidence and perspectives. *Acta Myol*, 31(1), pp.4-8.
- Bibel, M., 2000. Neurotrophins: key regulators of cell fate and cell shape in the vertebrate nervous system. *Genes Dev*, 14(23), pp.2919-2937.
- Birks, R., 1974. The relationship of transmitter release and storage to fine structure in a sympathetic ganglion. *J Neurocytol*, 3(2), pp.133-160.
- Bittova, L., Stahelin, R. & Cho, W., 2001. Roles of ionic residues of the C1 domain in protein kinase C-alpha activation and the origin of phosphatidylserine specificity. *J Biol Chem*, 276(6), pp.4218-4226.
- Blasi, J. et al., 1993. Botulinum neurotoxin A selectively cleaves the synaptic protein SNAP-25. *Nature*, 365(6442), pp.160-163.
- Blitz, D., Foster, K. & Regehr, W., 2004. Short-term synaptic plasticity: a comparison of two synapses. *Nat Rev Neurosci*, 5(8), pp.630-640.
- Blobe, G. et al., 1996. Protein kinase C beta II specifically binds to and is activated by F-actin. *J Biol Chem*, 271(26), pp.15823-15830.
- Blumberg, P., 1988. Protein kinase C as the receptor for the phorbol ester tumor promoters: sixth Rhoads memorial award lecture. *Cancer Res*, 48(1), pp.1-8.
- Bommert, K. et al., 1993. Inhibition of neurotransmitter release by C2-domain peptides implicates synaptotagmin in exocytosis. *Nature*, 363(6425), pp.163-165.

- Bornancin, F. & Parker, P., 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(6), pp.3544-3549.
- Brandman, R. et al., 2007. Peptides derived from the C2 domain of protein kinase C epsilon (epsilon PKC) modulate epsilon PKC activity and identify potential protein-protein interaction surfaces. *J Biol Chem*, 282(6), pp.4113-23.
- Brandt, D. et al., 2003. Protein kinase C delta induces Src kinase activity via activation of the protein tyrosine phosphatase PTP alpha. *J Biol Chem*, 278(36), pp.34073-34078.
- Brown, G. & Feldberg, W., 1936. The acetylcholine metabolism of a sympathetic ganglion. *J Physiol*, 88(3), pp.265-283.
- Budas, G. et al., 2010. Mitochondrial import of PKCepsilon is mediated by HSP90: a role in cardioprotection from ischaemia and reperfusion injury. *Cardiovasc Res*, 88(1), pp.83-92.
- Budas, G., Churchill, E. & Mochly-Rosen, D., 2007. Cardioprotective mechanisms of PKC isozyme-selective activators and inhibitors in the treatment of ischemia-reperfusion injury. *Pharmacol Res*, 55(6), pp.523-536.
- Budas, G. & Mochly-Rosen, D., 2007. Mitochondrial protein kinase Cepsilon (PKCepsilon): emerging role in cardiac protection from ischaemic damage. *Biochem Soc Trans*, 35(Pt 5), pp.1052-1054.
- Budas, G.R., Koyanagi, T. & Churchill, E.N., 2007. Competitive inhibitors and allosteric activators of protein kinase C isoenzymes : a personal account and progress report on transferring academic discoveries to the clinic The role of subcellular location in PKC. , pp.1021-1026.
- Burgos, M. et al., 2007. PKCepsilon upregulates voltage-dependent calcium channels in cultured astrocytes. *Glia*, 55(14), pp.1437-1448.
- Byrne, J. & Kandel, E., 1996. Presynaptic facilitation revisited: state and time dependence. *J Neurosci*, 16(2), pp.425-435.
- Calakos, N. & Scheller, R., 1996. Synaptic vesicle biogenesis, docking, and fusion: a molecular description. *Physiol Rev*, 76(1), pp.1-29.
- Castagna, M. et al., 1982. Direct activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters. *J Biol Chem*, 257(13), pp.7847-7851.
- Castagna, M. & Yoshimi, T., 1982. Direct activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters.

- Del Castillo, J. & Engbaek, L., 1954. The nature of the neuromuscular block produced by magnesium. *J Physiol*, 124(2), pp.370-384.
- Del Castillo, J. & Katz, B., 1954. Quantal components of the end-plate potential. *J Physiol*, 124(3), pp.560-573.
- Del Castillo, J. & Stark, L., 1952. The effect of calcium ions on the motor end-plate potentials. *J Physiol*, 116(4), pp.507-515.
- Castonguay, A., Lévesque, S. & Robitaille, R., 2001. Glial cells as active partners in synaptic functions. *Prog Brain Res*, 132, pp.227-240.
- Catterall, W., 1999. Interactions of presynaptic Ca²⁺ channels and snare proteins in neurotransmitter release. *Ann N Y Acad Sci*, 868, pp.144-159.
- Caulfield, M., 1993. Muscarinic receptors—characterization, coupling and function. *Pharmacol Ther*, 58(3), pp.319-379.
- Cazorla, M. et al., 2011. Identification of a low-molecular weight TrkB antagonist with anxiolytic and antidepressant activity in mice. *J Clin Invest*, 121(5), pp.1846-1857.
- Cenni, V. et al., 2002. Regulation of novel protein kinase C epsilon by phosphorylation. *Biochem J*, 363(Pt 3), pp.537-45.
- Chen, L. et al., 2001. Molecular transporters for peptides: delivery of a cardioprotective epsilonPKC agonist peptide into cells and intact ischemic heart using a transport system, R(7). *Chem Biol*, 8(12), pp.1123-1129.
- Chen, Y. et al., 2006. Essential role of the LIM domain in the formation of the PKCepsilon-ENH-N-type Ca²⁺ channel complex. *Cell Signal*, 18(2), pp.215-224.
- Chen, Y. et al., 2005. Specific modulation of Na⁺ channels in hippocampal neurons by protein kinase C epsilon. *J Neurosci*, 25(2), pp.507-513.
- Chen, Y. & Tian, Q., 2011. The role of protein kinase C epsilon in neural signal transduction and neurogenic diseases. TL - 5. *Front Med*, 5 VN - re(1), pp.70-76.
- Churchill, E.N., Qvit, N. & Mochly-Rosen, D., 2009. Rationally designed peptide regulators of protein kinase C. *Trends Endocrinol Metab*, 20(1), pp.25-33.
- Cleland, P. et al., 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), pp.17704-17711.

- Coleman, W.L., Bill, C.A. & Bykhovskaia, M., 2007. Rab3a deletion reduces vesicle docking and transmitter release at the mouse diaphragm synapse. *TL* - 148. *Neuroscience*, 148 VN - (1), pp.1-6.
- Corbalán-García, S. & Gómez-Fernández, J., 2010. The C2 domains of classical and novel PKCs as versatile decoders of membrane signals. *Biofactors*, 36(1), pp.1-7.
- Correia-de-Sá, P., Sebastião, a. M. & Ribeiro, J. a., 1991. Inhibitory and excitatory effects of adenosine receptor agonists on evoked transmitter release from phrenic nerve endings of the rat. *Br J Pharmacol*, 103(2), pp.1614-1620.
- Coussens, L. et al., 1986. Multiple, distinct forms of bovine and human protein kinase C suggest diversity in cellular signaling pathways. *Science*, 233(4766), pp.859-866.
- Couteaux, R. & Pécot-Dechavassine, M., 1973. [Ultrastructural and cytochemical data on the mechanism of acetylcholine release in synaptic transmission]]. *TL* - 111. *Arch Ital Biol*, 111 VN - (3-4), pp.231-262.
- Covault, J. & Sanes, J., 1986. Distribution of N-CAM in synaptic and extrasynaptic portions of developing and adult skeletal muscle. *J Cell Biol*, 102(3), pp.716-730.
- Csukai, M. et al., 1997. The coatomer protein beta'-COP, a selective binding protein (RACK) for protein kinase Cepsilon. *J Biol Chem*, 272(46), pp.29200-6.
- Csukai, M. & Mochly-Rosen, D., 1999. Pharmacologic modulation of protein kinase C isozymes: the role of RACKs and subcellular localisation. *Pharmacol Res*, 39(4), pp.253-259.
- Cunha, R. & Sebastião, A., 1993. Adenosine and adenine nucleotides are independently released from both the nerve terminals and the muscle fibres upon electrical stimulation of the innervated skeletal muscle of the frog. *Pflugers Arch*, 424(5-6), pp.503-510.
- Dai, Z. & Peng, H., 1995. Presynaptic differentiation induced in cultured neurons by local application of basic fibroblast growth factor. *J Neurosci*, 15(8), pp.5466-5475.
- Dale, H., 1934. The chemical transmission of nerve impulses. *Science*, 80(2081), p.450.
- Dale, H.H., Feldberg, W. & Vogt, M., 1936. Release of acetylcholine at voluntary motor nerve endings. *J Physiol*, 86(4), pp.353-80.
- Day, N. et al., 1997. Differential localization of voltage-dependent calcium channel alpha1 subunits at the human and rat neuromuscular junction. *J Neurosci*, 17(16), pp.6226-6235.
- Debanne, D., 1996. Associative synaptic plasticity in hippocampus and visual cortex: cellular mechanisms and functional implications. *Rev Neurosci*, 7(1), pp.29-46.

- Dempsey, E. et al., 2000. Protein kinase C isozymes and the regulation of diverse cell responses. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 279(3), p.38.
- Di-Capua, N., Sperling, O. & Zoref-Shani, E., 2003. Protein kinase C-epsilon is involved in the adenosine-activated signal transduction pathway conferring protection against ischemia-reperfusion injury in primary rat neuronal cultures. *J Neurochem*, 84(2), pp.409-12.
- Disatnik, M. et al., 1994. Distinct responses of protein kinase C isozymes to c-erbB-2 activation in SKBR-3 human breast carcinoma cells. *Cell Growth Differ*, 5, pp.873-80.
- Disatnik, M.H., Jones, S.N. & Mochly-Rosen, D., 1995. Stimulus-dependent subcellular localization of activated protein kinase C; a study with acidic fibroblast growth factor and transforming growth factor-beta 1 in cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol*, 27, pp.2473-2481.
- Dittman, J., Kreitzer, A. & Regehr, W., 2000. Interplay between facilitation, depression, and residual calcium at three presynaptic terminals. *J Neurosci*, 20(4), pp.1374-1385.
- Dittman, J. & Regehr, W., 1998. Calcium dependence and recovery kinetics of presynaptic depression at the climbing fiber to Purkinje cell synapse. *J Neurosci*, 18(16), pp.6147-6162.
- Dodge, F. & Rahamimoff, R., 1967. On the relationship between calcium concentration and the amplitude of the end-plate potential. *J Physiol*, 189(2).
- Dorn, G.W. et al., 1999. Sustained in vivo cardiac protection by a rationally designed peptide that causes epsilon protein kinase C translocation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(22), pp.12798-803.
- Duclert, A. & Changeux, J., 1995. Acetylcholine receptor gene expression at the developing neuromuscular junction. *Physiol Rev*, 75(2), pp.339-368.
- Dumuis, A. et al., 1988. NMDA receptors activate the arachidonic acid cascade system in striatal neurons. *Nature*, 336(6194), pp.68-70.
- Dutil, E., Toker, A. & Newton, A., 1998. Regulation of conventional protein kinase C isozymes by phosphoinositide-dependent kinase 1 (PDK-1). *Curr Biol*, 8(25), pp.1366-1375.
- Elmqvist, D. et al., 1964. An electrophysiological investigation of neuromuscular transmission in myasthenia gravis. *J Physiol*, 174, pp.417-434.
- Engel, Gould, C.R. & Hnizdo, 1994. Microscopic T-Violating Optical Potential: Implications for Neutron-Transmission Experiments. TL - 73. *Phys Rev Lett*, 73 VN - r(26), pp.3508-3511.

- Erdbrügger, W. et al., 1997. Protein kinase C isoenzymes in rat and human cardiovascular tissues. *Br J Pharmacol*, 120(2), pp.177-186.
- Erzen, I. et al., 2000. Fiber types in the mouse levator auris longus muscle: a convenient preparation to study muscle and nerve plasticity. *J Neurosci Res*, 59(5), pp.692-697.
- Evans, J. et al., 2003. Expression patterns of protein kinase C isoenzymes are characteristically modulated in chronic pancreatitis and pancreatic cancer. *Am J Clin Pathol*, 119(3), pp.392-402.
- Facchinetti, V. et al., 2008. The mammalian target of rapamycin complex 2 controls folding and stability of Akt and protein kinase C. *EMBO J*, 27(14), pp.1932-1943.
- Fatt, P. & Katz, B., 1950. Membrane potentials at the motor end-plate. *J Physiol*, 111(1-2).
- Fatt, P. & Katz, B., 1952. The effect of sodium ions on neuromuscular transmission. *J Physiol*, 118(1), pp.73-87.
- Felber, M., Sonnemann, J. & Beck, J.F., 2007. Inhibition of novel protein kinase C-epsilon augments TRAIL-induced cell death in A549 lung cancer cells. *Pathol Oncol Res*, 13, pp.295-301.
- Ferreira, J., Mochly-Rosen, D. & Boutjdir, M., 2012. Regulation of cardiac excitability by protein kinase C isozymes. *Front Biosci (Schol Ed)*, 4, pp.532-546.
- Ferreira, J.C.B., Brum, P.C. & Mochly-Rosen, D., 2011. β IIIPKC and ϵ PKC isozymes as potential pharmacological targets in cardiac hypertrophy and heart failure. *J Mol Cell Cardiol*, 51.
- Finsterer, J., Papić, L. & Auer-Grumbach, M., 2011. Motor neuron, nerve, and neuromuscular junction disease. TL - 24. *Curr Opin Neurol*, 24 VN - r(5), pp.469-474.
- Fioravante, D. & Regehr, W., 2011. Short-term forms of presynaptic plasticity. *Curr Opin Neurobiol*, 21(2), pp.269-274.
- Flucher, B. & Daniels, M., 1989. Distribution of Na⁺ channels and ankyrin in neuromuscular junctions is complementary to that of acetylcholine receptors and the 43 kd protein. *Neuron*, 3(2), pp.163-175.
- Fortino, V. et al., 2002. ERKs are the point of divergence of PKA and PKC activation by PTHrP in human skin fibroblasts. TL - 59. *Cell Mol Life Sci*, 59 VN - r(12), pp.2165-2171.
- Fox, M. a et al., 2007. Distinct target-derived signals organize formation, maturation, and maintenance of motor nerve terminals. *Cell*, 129(1), pp.179-93.

- Fredholm, B. et al., 2005. Adenosine and brain function. *Int Rev Neurobiol*, 63, pp.191-270.
- Furness, J. et al., 2006. The distribution of PKC isoforms in enteric neurons, muscle and interstitial cells of the human intestine. *Histochem Cell Biol*, 126(5), pp.537-548.
- Gao, T. & Newton, A.C., 2002. The turn motif is a phosphorylation switch that regulates the binding of Hsp70 to protein kinase C. *J Biol Chem*, 277(35), pp.31585-92.
- Gao, T., Toker, A. & Newton, A., 2001. The carboxyl terminus of protein kinase c provides a switch to regulate its interaction with the phosphoinositide-dependent kinase, PDK-1. *J Biol Chem*, 276(22), pp.19588-19596.
- García et al., 2010. The interaction between tropomyosin-related kinase B receptors and presynaptic muscarinic receptors modulates transmitter release in adult rodent motor nerve terminals. *J Neurosci*, 30(49), pp.16514-22.
- García, N. et al., 2013. Adenosine A₁ and A_{2A} receptor-mediated modulation of acetylcholine release in the mice neuromuscular junction. *Eur J Neurosci*, 38(2), pp.2229-2241.
- García, N. et al., 2014. Adenosine A_{2B} and A₃ receptor location at the mouse neuromuscular junction. *J Anat*.
- García, N. et al., 2005. Expression of muscarinic acetylcholine receptors (M1- , M2- , M3- and M4-type) in the neuromuscular junction of the newborn and adult rat. *Histol Histopathol*, pp.733-743.
- García, N. et al., 2010. Involvement of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in the functional elimination of synaptic contacts at polyinnervated neuromuscular synapses during development. *J Neurosci Res*, 88(7), pp.1406-19.
- Garczarczyk, D. et al., 2009. Signal transduction of constitutively active protein kinase C epsilon. TL - 21. *Cell Signal*, 21 VN - r(5), pp.745-752.
- Georgiou, J. et al., 1994. Synaptic regulation of glial protein expression in vivo. *Neuron*, 12(2), pp.443-455.
- Georgiou, J. & Charlton, M., 1999. Non-myelin-forming perisynaptic schwann cells express protein zero and myelin-associated glycoprotein. *Glia*, 27(2), pp.101-109.
- Georgiou, J., Robitaille, R. & Charlton, M., 1999. Muscarinic control of cytoskeleton in perisynaptic glia. *J Neurosci*, 19(10), pp.3836-3846.
- Gerstin, E. et al., 1998. Protein kinase Cdelta mediates ethanol-induced up-regulation of L-type calcium channels. *J Biol Chem*, 273(26), pp.16409-16414.

- Gómez-Pinilla, F. et al., 2002. Voluntary exercise induces a BDNF-mediated mechanism that promotes neuroplasticity. *TL - 88. J Neurophysiol*, 88 VN - r(5), pp.2187-2195.
- Goodnight, J. et al., 1995. Immunocytochemical localization of eight protein kinase C isozymes overexpressed in NIH 3T3 fibroblasts. Isoform-specific association with microfilaments, Golgi, endoplasmic reticulum, and nuclear and cell membranes. *J Biol Chem*, 270, pp.9991-10001.
- Graness, A. et al., 1998. A novel mitogenic signaling pathway of bradykinin in the human colon carcinoma cell line SW-480 involves sequential activation of a Gq/11 protein, phosphatidylinositol 3-kinase beta, and protein kinase C epsilon. *J Biol Chem*, 273(48), pp.32016-32022.
- Gray, M.O., Karliner, J.S. & Mochly-Rosen, D., 1997. A selective epsilon-protein kinase C antagonist inhibits protection of cardiac myocytes from hypoxia-induced cell death. *J Biol Chem*, 272(49), pp.30945-51.
- Griner, E. & Kazanietz, M., 2007. Protein kinase C and other diacylglycerol effectors in cancer. *Nat Rev Cancer*, 7(4), pp.281-294.
- Grishin, S. et al., 2005. Mechanisms of ATP action on motor nerve terminals at the frog neuromuscular junction. *Eur J Neurosci*, 21(5), pp.1271-9.
- Hafeez, B. Bin et al., 2011. Genetic ablation of PKC epsilon inhibits prostate cancer development and metastasis in transgenic mouse model of prostate adenocarcinoma. *Cancer Res*, 71(6), pp.2318-27.
- Hahn, J. et al., 2000. Characterization and regulation of rat microglial Ca(2+) release-activated Ca(2+) (CRAC) channel by protein kinases. *TL - 31. Glia*, 31 VN - r(2), pp.118-124.
- Hall, Z. & Sanes, J., 1993. Synaptic structure and development: the neuromuscular junction. *Cell*, 72 Suppl, pp.99-121.
- Hassouna, A., Matata, B.M. & Galin, M., 2004. PKC- δ is upstream and PKC- ϵ is downstream of mitoK ATP channels in the signal transduction pathway of ischemic preconditioning of human myocardium. , pp.1418-1425.
- Heidkamp, M.C. et al., 2007. Protein kinase C epsilon-dependent MARCKS phosphorylation in neonatal and adult rat ventricular myocytes. *TL - 42. J Mol Cell Cardiol*, 42 VN - r(2), pp.422-431.
- Hermann-Kleiter, N. et al., 2006. PKCtheta and PKA are antagonistic partners in the NF-AT transactivation pathway of primary mouse CD3+ T lymphocytes. *TL - 107. Blood*, 107 VN - (12), pp.4841-4848.

- Heuser, J. & Reese, T., 1973. Evidence for recycling of synaptic vesicle membrane during transmitter release at the frog neuromuscular junction. *J Cell Biol*, 57(2), pp.315-344.
- Heuser, J., Reese, T. & Landis, D., 1974. Functional changes in frog neuromuscular junctions studied with freeze-fracture. *J Neurocytol*, 3(1), pp.109-131.
- Hilgenberg, L. & Miles, K., 1995. Developmental regulation of a protein kinase C isoform localized in the neuromuscular junction. *J Cell Sci*, 108 (Pt 1, pp.51-61.
- Hodge, C. et al., 1999. Supersensitivity to allosteric GABA(A) receptor modulators and alcohol in mice lacking PKCepsilon. *Nat Neurosci*, 2(11), pp.997-1002.
- Hofmann, J., 1997. The potential for isoenzyme-selective modulation of protein kinase C. *FASEB J*, 11(8), pp.649-669.
- Holohean, A.M. & Magleby, K.L., 2011. The number of components of enhancement contributing to short-term synaptic plasticity at the neuromuscular synapse during patterned nerve stimulation progressively decreases as basal release probability is increased from low to normal levels by changing . *J Neurosci*, 31(19), pp.7060-72.
- Hong, S. & Chang, C., 1995. Calcium channel subtypes for the sympathetic and parasympathetic nerves of guinea-pig atria. *Br J Pharmacol*, 116(1), pp.1577-1582.
- Hori, T., Takai, Y. & Takahashi, T., 1999. Presynaptic Mechanism for Phorbol Ester-Induced Synaptic Potentiation. *J Neurosci*, 19(17), pp.7262-7267.
- Hosoi, N., Sakaba, T. & Neher, E., 2007. Quantitative analysis of calcium-dependent vesicle recruitment and its functional role at the calyx of Held synapse. *J Neurosci*, 27(52), pp.14286-14298.
- House, C. & Kemp, B., 1987. Protein kinase C contains a pseudosubstrate prototope in its regulatory domain. *Science*, 238(4834), pp.1726-1728.
- Hu, K., Mochly-Rosen, D. & Boutjdir, M., 2000. Evidence for functional role of epsilonPKC isozyme in the regulation of cardiac Ca(2+) channels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 279(6), p.64.
- Huang, X., 2004. Myofilament anchoring of protein kinase C-epsilon in cardiac myocytes. *J Cell Sci*, 117.
- Hubbard, J. & Wilson, D., 1973. Neuromuscular transmission in a mammalian preparation in the absence of blocking drugs and the effect of D-tubocurarine. *J Physiol*, 228(2), pp.307-325.
- Hundle, B. et al., 1995. Cell Biology and Metabolism : Overexpression of ϵ -Protein Kinase C Enhances Nerve Growth Factor-induced Phosphorylation of Mitogen-

activated Protein Kinases and Neurite Outgrowth Overexpression of ϵ -Protein Kinase C Enhances Nerve Growth Factor-induced .

- Hussain, R. & Carpenter, D., 2001. Development of synaptic responses and plasticity at the SC-CA1 and MF-CA3 synapses in rat hippocampus. *Cell Mol Neurobiol*, 21(4), pp.357-368.
- Inoue, M. et al., 1977. Studies on a Cyclic Nucleotide-independent and Its Proenzyme in Mammalian Tissues. *J Biol Chem*, 252(21), pp.7610-7616.
- Isakov, N. & Altman, A., 2002. Protein kinase C(theta) in T cell activation. *Annu Rev Immunol*, 20, pp.761-794.
- Jablecki, C. & Brimijoin, S., 1974. Reduced axoplasmic transport of choline acetyltransferase activity in dystrophic mice. *Nature*, 250(462), pp.151-154.
- Jahromi, B., Robitaille, R. & Charlton, M., 1992. Transmitter release increases intracellular calcium in perisynaptic Schwann cells in situ. *Neuron*, 8(6), pp.1069-1077.
- Jaken, S., 1996. Protein kinase C isozymes and substrates. *Curr Opin Cell Biol*, 8(2), pp.168-73.
- Jaken, S. & Parker, P., 2000. Protein kinase C binding partners. *Bioessays*, 22(3), pp.245-254.
- Jia, M. et al., 1999. The thrombin receptor mediates functional activity-dependent neuromuscular synapse reduction via protein kinase C activation in vitro. *J Neurobiol*, 38(3), pp.369-381.
- Jo, S. et al., 1995. Neuregulins are concentrated at nerve-muscle synapses and activate ACh-receptor gene expression. *Nature*, 373(6510), pp.158-161.
- Johnson et al., 1996. An Improved Permeabilization Protocol for the Introduction of Peptides Into Cardiac Myocytes: Application to Protein Kinase C Research. *Circ Res*, 79(6), pp.1086-1099.
- Johnson, J. et al., 1996. A protein kinase C translocation inhibitor as an isozyme-selective antagonist of cardiac function. *J Biol Chem*, 271(40), pp.24962-6.
- Johnson, J., Giorgione, J. & Newton, A., 2000. The C1 and C2 domains of protein kinase C are independent membrane targeting modules, with specificity for phosphatidylserine conferred by the C1 domain. *Biochemistry*, 39(37), pp.11360-11369.

- Johnson, J. & Mochly-Rosen, D., 1995. Inhibition of the spontaneous rate of contraction of neonatal cardiac myocytes by protein kinase C isozymes. A putative role for the epsilon isozyme. *Circ Res*, 76(4), pp.654-663.
- Joseph, E.K. et al., 2007. PLC- β 3 signals upstream of PKC ϵ in acute and chronic inflammatory hyperalgesia. *Pain*, 132.
- Joseph, E.K. & Levine, J.D., 2010. Multiple PKC -dependent mechanisms mediating mechanical hyperalgesia. *Pain*, 150(1), pp.17-21 VN - readcube.com.
- Kariya, S. et al., 2012. Mutant superoxide dismutase 1 (SOD1), a cause of amyotrophic lateral sclerosis, disrupts the recruitment of SMN, the spinal muscular atrophy protein to nuclear Cajal bodies. *Hum Mol Genet*, 21(15), pp.3421-3434.
- Kariya, S. et al., 2008. Reduced SMN protein impairs maturation of the neuromuscular junctions in mouse models of spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet*, 17(16), pp.2552-2569.
- Kariya, S. et al., 2014. Requirement of enhanced Survival Motoneuron protein imposed during neuromuscular junction maturation. *J Clin Invest*, 124(2), p.0.
- Katan, M. & Williams, R., 1997. Phosphoinositide-specific phospholipase C: structural basis for catalysis and regulatory interactions. *Semin Cell Dev Biol*, 8(3), pp.287-296.
- Katz, B., 1996. Neural transmitter release: from quantal secretion to exocytosis and beyond. The Fenn Lecture. *J Neurocytol*, 25(12), pp.677-86.
- Katz, B. & Miledi, R., 1970. Further study of the role of calcium in synaptic transmission. *J Physiol*, 207(3), pp.789-801.
- Katz, B. & Miledi, R., 1966. Input-output relation of a single synapse. *Nature*, 212(5067), pp.1242-1245.
- Katz, B. & Miledi, R., 1965. Release of acetylcholine from a nerve terminal by electric pulses of variable strength and duration. *Nature*, 207(5001), pp.1097-1098.
- Katz, B. & Miledi, R., 1968. The role of calcium in neuromuscular facilitation. *J Physiol*, 195(2), pp.481-492.
- Kemp, B. & Pearson, R., 1990. Protein kinase recognition sequence motifs. *Trends Biochem Sci*, 15(9), pp.342-346.
- Khasar, S. et al., 1999. A novel nociceptor signaling pathway revealed in protein kinase C epsilon mutant mice. *Neuron*, 24(1), pp.253-260.

- Kheifets, V. & Mochly-Rosen, D., 2007. Insight into intra- and inter-molecular interactions of PKC: design of specific modulators of kinase function. *Pharmacol Res*, 55(6), pp.467-476.
- Kim, E. et al., 2013. Phorbol 12-Myristate 13-Acetate Enhances Long-Term Potentiation in the Hippocampus through Activation of Protein Kinase C δ and ϵ . *Korean J Physiol Pharmacol*, 17(1), pp.51-56.
- Kim, S., Bondeva, T. & Nelson, P., 2002. Activation of protein kinase C isozymes in primary mouse myotubes by carbachol. *Brain Res Dev Brain Res*, 137(1), pp.13-21.
- Knauf, J. et al., 1999. Involvement of protein kinase Cepsilon (PKCepsilon) in thyroid cell death. A truncated chimeric PKCepsilon cloned from a thyroid cancer cell line protects thyroid cells from apoptosis. *J Biol Chem*, 274(33), pp.23414-23425.
- Knight, D. et al., 2003. Functional analysis of neurotransmission at beta2-laminin deficient terminals. *J Physiol*, 546(Pt 3), pp.789-800.
- Van Kolen, K. et al., 2008. Nociceptive and behavioural sensitisation by protein kinase Cepsilon signalling in the CNS. *J Neurochem*, 104(1), pp.1-13.
- Kolkova, K. et al., 2005. Distinct roles of PKC isoforms in NCAM-mediated neurite outgrowth. *J Neurochem*, 92(4), pp.886-894.
- König, B., DiNitto, P. & Blumberg, P., 1985. Stoichiometric binding of diacylglycerol to the phorbol ester receptor. *J Cell Biochem*, 29(1), pp.37-44.
- Kraft, A. et al., 1982. Decrease in cytosolic calcium/phospholipid-dependent protein kinase activity following phorbol ester treatment of EL4 thymoma cells. *J Biol Chem*, 257(22), pp.13193-13196.
- Kraft, A. & Anderson, W., 1983. Phorbol esters increase the amount of Ca²⁺, phospholipid-dependent protein kinase associated with plasma membrane. *Nature*, 301(5901), pp.621-623.
- Kulakowski, S., Parker, S. & Personius, K., 2011. Reduced TrkB expression results in precocious age-like changes in neuromuscular structure, neurotransmission, and muscle function. *J Appl Physiol*, 111(3), pp.844-852.
- Laemmli, U., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), pp.680-685.
- Lanuza, M. et al., 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), pp.330-340.

- Lanuza, M. et al., 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), pp.748-756.
- Lanuza, M. et al., 2014. Protein kinase C isoforms at the neuromuscular junction: localization and specific roles in neurotransmission and development. *J Anat*, 224(1), pp.61-73.
- Lanuza, M. a et al., 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), pp.616-25.
- Lanuza, M.A. et al., 2010. Decreased phosphorylation of δ and ϵ subunits of the acetylcholine receptor coincides with delayed postsynaptic maturation in PKC θ deficient mouse. *Exp Neurol*, 225(1), pp.183-95.
- Lee, H. et al., 1997. Bryostatin 1 and phorbol ester down-modulate protein kinase C-alpha and -epsilon via the ubiquitin/proteasome pathway in human fibroblasts. *Mol Pharmacol*, 51(3), pp.439-447.
- Lesscher, H. et al., 2008. Amygdala protein kinase C epsilon regulates corticotropin-releasing factor and anxiety-like behavior. *Genes Brain Behav*, 7(3), pp.323-333.
- Li, M. et al., 2001. Opposing actions of protein kinase A and C mediate Hebbian synaptic plasticity. *Nat Neurosci*, 4(9), pp.871-872.
- Li, R. et al., 2003. Molecular basis of isoform-specific micro-conotoxin block of cardiac, skeletal muscle, and brain Na⁺ channels. *J Biol Chem*, 278(10), pp.8717-8724.
- Li, Y. & Thompson, W.J., 2011. Nerve terminal growth remodels neuromuscular synapses in mice following regeneration of the postsynaptic muscle fiber. *TL - 31. J Neurosci*, 31 VN - r(37), pp.13191-13203.
- Liedtke, C. et al., 2002. Protein kinase C epsilon-dependent regulation of cystic fibrosis transmembrane regulator involves binding to a receptor for activated C kinase (RACK1) and RACK1 binding to Na⁺/H⁺ exchange regulatory factor. *J Biol Chem*, 277(25), pp.22925-22933.
- Liley, A., 1956. The quantal components of the mammalian end-plate potential. *J Physiol*, 133(3), pp.571-587.
- Liley, A. & North, K., 1953. An electrical investigation of effects of repetitive stimulation on mammalian neuromuscular junction. *J Neurophysiol*, 16(5), pp.509-527.
- Liu, Y., Kim, I. & Zhao, H., 2008. Protein interaction predictions from diverse sources. *Drug Discov Today*, 13(9-10), pp.409-416.

- Llinás, R., 1982. Calcium in synaptic transmission. *Sci Am*, 247(4), pp.56-65.
- Llinás, R., Blinks, J. & Nicholson, C., 1972. Calcium transient in presynaptic terminal of squid giant synapse: detection with aequorin. *Science*, 176(4039), pp.1127-1129.
- Llinás, R. & Nicholson, C., 1975. Calcium role in depolarization-secretion coupling: an aequorin study in squid giant synapse. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 72(1), pp.187-190.
- De Lorenzo, S. et al., 2006. Presynaptic inhibition of spontaneous acetylcholine release mediated by P2Y receptors at the mouse neuromuscular junction. *Neuroscience*, 142(1), pp.71-85.
- Losavio, a & Muchnik, S., 1997. Spontaneous acetylcholine release in mammalian neuromuscular junctions. *Am J Physiol*, 273(6 Pt 1), pp.C1835-41.
- Lowry, O. et al., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193(1), pp.265-275.
- Lu, Z. et al., 1998. Activation of protein kinase C triggers its ubiquitination and degradation. *Mol Cell Biol*, 18(2), pp.839-845.
- Luigetti, M., Modoni, A. & Lo Monaco, M., 2013. Low rate repetitive nerve stimulation in Lambert-Eaton myasthenic syndrome: peculiar characteristics of decremental pattern from a single-centre experience. *Clin Neurophysiol*, 124(4), pp.825-826.
- Magleby, K., 1973. The effect of repetitive stimulation on facilitation of transmitter release at the frog neuromuscular junction. *J Physiol*, 234(2), pp.327-352.
- Mallart, A. & Martin, A., 1968. The relation between quantum content and facilitation at the neuromuscular junction of the frog. *J Physiol*, 196(3), pp.593-604.
- Masmoudi, A. et al., 1989. Protein kinase C located in rat liver nuclei. Partial purification and biochemical and immunochemical characterization. *J Biol Chem*, 264(2), pp.1172-1179.
- Matthews, V.B. et al., 2009. Brain-derived neurotrophic factor is produced by skeletal muscle cells in response to contraction and enhances fat oxidation via activation of AMP-activated protein kinase. *TL - 52. Diabetologia*, 52 VN - r(7), pp.1409-1418.
- Matveev, V., Zucker, R. & Sherman, A., 2004. Facilitation through buffer saturation: constraints on endogenous buffering properties. *Biophys J*, 86(5), pp.2691-2709.
- Mayne, G. & Murray, A., 1998. Evidence that protein kinase Cepsilon mediates phorbol ester inhibition of calphostin C- and tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis in U937 histiocytic lymphoma cells. *J Biol Chem*, 273(37), pp.24115-24121.

- McLachlan, E. & Martin, A., 1981. Non-linear summation of end-plate potentials in the frog and mouse. *J Physiol*, 311, pp.307-324.
- Mellor, H. & Parker, P., 1998. The extended protein kinase C superfamily. *Biochem J*, 332 (Pt 2, pp.281-292.
- Miledi, R., 1973. Transmitter release induced by injection of calcium ions into nerve terminals. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, 183(73), pp.421-425.
- Minami, H. et al., 2000. Localization of mRNAs for novel, atypical as well as conventional protein kinase C (PKC) isoforms in the brain of developing and mature rats. *J Mol Neurosci*, 15(2), pp.121-135.
- Minic, J. et al., 2002. Regulation of acetylcholine release by muscarinic receptors at the mouse neuromuscular junction depends on the activity of acetylcholinesterase. *Eur J Neurosci*, 15(3), pp.439-448.
- Mochly-Rosen, D. et al., 1990. A protein kinase C isozyme is translocated to cytoskeletal elements on activation. *Cell Regul*, 1(9), pp.693-706.
- Mochly-Rosen, D. et al., 2000. Cardioprotrophic effects of protein kinase C epsilon: analysis by in vivo modulation of PKCepsilon translocation. *Circ Res*, 86(11), pp.1173-1179.
- Mochly-Rosen, D. et al., 1991. Intracellular Receptors for Activated Protein Kinase C. *J Biol Chem*, 266(August 15), pp.14866-14868.
- Mochly-Rosen, D., 1995a. Localization of protein kinases by anchoring proteins: a theme in signal transduction. *Science*, 268(5208), pp.247-251.
- Mochly-Rosen, D., 1995b. Localization of protein kinases by anchoring proteins: a theme in signal transduction. *Science*, 268(5208), pp.247-51.
- Mochly-Rosen, D. & Gordon, A.S., 1998. Anchoring proteins for protein kinase C: a means for isozyme selectivity. *FASEB J*, 12(1), pp.35-42.
- Mochly-Rosen, D. & Kauvar, L., 1998. Modulating protein kinase C signal transduction. *Adv Pharmacol*, 44, pp.91-145.
- Mochly-Rosen, D., Khaner, H. & Lopez, J., 1991. Identification of intracellular receptor proteins for activated protein kinase C. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88(9), pp.3997-4000.
- Montal, M. & Opella, S., 2002. The structure of the M2 channel-lining segment from the nicotinic acetylcholine receptor. *Biochim Biophys Acta*, 1565(2), pp.287-293.

- Moraczewski, J. et al., 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), pp.938-949.
- Moriya, S. et al., 1996. Platelet-derived growth factor activates protein kinase C epsilon through redundant and independent signaling pathways involving phospholipase C gamma or phosphatidylinositol 3-kinase. *Proc Natl Acad Sci*, 93.
- Mosior, M. & Newton, A., 1996. Calcium-independent binding to interfacial phorbol esters causes protein kinase C to associate with membranes in the absence of acidic lipids. *Biochemistry*, 35(5), pp.1612-1623.
- Muallem, S. et al., 1995. Actin filament disassembly is a sufficient final trigger for exocytosis in nonexcitable cells. *J Cell Biol*, 128(4), pp.589-598.
- Nai, Q. et al., 2010. Ciliary neurotrophic factor enhances nicotinic synaptic transmission in sympathetic neurons. *J Neurosci Res*, 88(4), pp.887-95.
- Nakano, S. et al., 1992. Localization of protein kinase C in human skeletal muscle. *Muscle Nerve*, 15(4), pp.496-499.
- Nalefski, E. & Newton, A., 2001. Membrane binding kinetics of protein kinase C betaII mediated by the C2 domain. *Biochemistry*, 40(44), pp.13216-13229.
- Neher, E., 1998. Usefulness and limitations of linear approximations to the understanding of Ca⁺⁺ signals. *Cell Calcium*, 24(5-6), pp.345-357.
- Nelson, P.G. et al., 2003. Phosphorylation reactions in activity-dependent synapse modification at the neuromuscular junction during development. TL - 32. *J Neurocytol*, 32 VN - r(5-8), pp.803-816.
- Newton, A., 1993. Interaction of proteins with lipid headgroups: lessons from protein kinase C. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 22, pp.1-25.
- Newton, A., 1995a. Protein kinase C. Seeing two domains. *Curr Biol*, 5(9), pp.973-976.
- Newton, A., 2001. Protein kinase C: structural and spatial regulation by phosphorylation, cofactors, and macromolecular interactions. *Chem Rev*, 101(8), pp.2353-2364.
- Newton, A., 1995b. Protein kinase C: structure, function, and regulation. *J Biol Chem*, 270(48), pp.28495-28498.
- Newton, A., 1997. Regulation of protein kinase C. *Curr Opin Cell Biol*, 9(2), pp.161-167.
- Newton, A. & Johnson, J., 1998. Protein kinase C: a paradigm for regulation of protein function by two membrane-targeting modules. *Biochim Biophys Acta*, 1376(2), pp.155-172.

- Newton, A.C., 1996. Protein kinase C: ports of anchor in the cell. *TL - 6. Curr Biol*, 6 VN - re(7), pp.806-809.
- Newton, A.C., 2003. Regulation of the ABC kinases by phosphorylation: protein kinase C as a paradigm. *Biochem J*, 370(Pt 2), pp.361-71.
- Newton, P.M. & Messing, R.O., 2010. The substrates and binding partners of protein kinase Cepsilon. *Biochem J*, 427(2), pp.189-96.
- Newton, P.M. & Ron, D., 2007. Protein kinase C and alcohol addiction. *Pharmacol Res*, 55(6), pp.570-7.
- Nishimune, H. et al., 2008. Laminins promote postsynaptic maturation by an autocrine mechanism at the neuromuscular junction. *J Cell Biol*, 182(6), pp.1201-15.
- Nishimune, H., Sanes, J. & Carlson, S., 2004. A synaptic laminin-calcium channel interaction organizes active zones in motor nerve terminals. *Nature*, 432(7017), pp.580-587.
- Nishizuka, Y., 1995. Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses. *FASEB J*, 9(7), pp.484-96.
- Nishizuka, Y., 1986. Studies and perspectives of protein kinase C. *Science*, 233(4761), pp.305-312.
- Nishizuka, Y., 1988. The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulation. *Nature*, 334(6184), pp.661-665.
- Nishizuka, Y., 1984. The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumour promotion. *Nature*, 308(5961), pp.693-698.
- Le Novère, N. & Changeux, J., 1995. Molecular evolution of the nicotinic acetylcholine receptor: an example of multigene family in excitable cells. *J Mol Evol*, 40(2), pp.155-172.
- Numann, R. et al., 1994. Modulation of skeletal muscle sodium channels in a satellite cell line by protein kinase C. *J Neurosci*, 14(7), pp.4226-4236.
- Oancea, E. & Meyer, T., 1998. Protein kinase C as a molecular machine for decoding calcium and diacylglycerol signals. *Cell*, 95(3), pp.307-318.
- Ogata, T., 1988. Structure of motor endplates in the different fiber types of vertebrate skeletal muscles. *Arch Histol Cytol*, 51(5), pp.385-424.
- Olive, M. et al., 2005. The mGluR5 antagonist 6-methyl-2-(phenylethynyl)pyridine decreases ethanol consumption via a protein kinase C epsilon-dependent mechanism. *Mol Pharmacol*, 67(2), pp.349-355.

- Ono, Y. et al., 1986. Cloning of rat brain protein kinase C complementary DNA. *FEBS Lett*, 203(2), pp.111-115.
- Ono, Y. et al., 1987. Expression and properties of two types of protein kinase C: alternative splicing from a single gene. *Science*, 236(4805), pp.1116-1120.
- Ono, Y. et al., 1989. Phorbol ester binding to protein kinase C requires a cysteine-rich zinc-finger-like sequence. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86(13), pp.4868-4871.
- Ono, Y. et al., 1988. The structure, expression, and properties of additional members of the protein kinase C family. TL - 263. *J Biol Chem*, 263 VN - (14), pp.6927-6932.
- Parada, C.A. et al., 2003. Tumor necrosis factor receptor type-1 in sensory neurons contributes to induction of chronic enhancement of inflammatory hyperalgesia in rat. *Eur J Neurosci*, 17.
- Park, Y.-S. et al., 2006. Involvement of protein kinase C-epsilon in activity-dependent potentiation of large dense-core vesicle exocytosis in chromaffin cells. *J Neurosci*, 26(35), pp.8999-9005.
- Parker, P., Goris, J. & Merlevede, W., 1986. Specificity of protein phosphatases in the dephosphorylation of protein kinase C. *Biochem J*, 240(1), pp.63-67.
- Patten, S. et al., 2007. Differential expression of PKC isoforms in developing zebrafish. *Int J Dev Neurosci*, 25(3), pp.155-164.
- Patton, B., Chiu, A. & Sanes, J., 1998. Synaptic laminin prevents glial entry into the synaptic cleft. *Nature*, 393(6686), pp.698-701.
- Perkins, G. et al., 2001. PKA, PKC, and AKAP localization in and around the neuromuscular junction. *BMC Neurosci*, 2, p.17.
- Perrini, S. et al., 2004. Exercise-induced protein kinase C isoform-specific activation in human skeletal muscle. *Diabetes*, 53(1), pp.21-24.
- Pickering, M. & Jones, J., 2002. The diaphragm: two physiological muscles in one. *J Anat*, 201(4), pp.305-312.
- Pitts, E. et al., 2006. Neurotrophin and Trk-mediated signaling in the neuromuscular system. *Int Anesthesiol Clin*, 44(2), pp.21-76.
- Pravdic, D. et al., 2009. Anesthetic-induced preconditioning delays opening of mitochondrial permeability transition pore via protein Kinase C-epsilon-mediated pathway. *Anesthesiology*, 111(2), pp.267-274.

- Prekeris, R. et al., 1996. Identification and localization of an actin-binding motif that is unique to the epsilon isoform of protein kinase C and participates in the regulation of synaptic function. *J Cell Biol*, 132(1-2), pp.77-90.
- Prekeris, R., 1998. Molecular Analysis of the Interactions between Protein Kinase C-epsilon and Filamentous Actin. *J Biol Chem*, 273(41), pp.26790-26798.
- Protti, D. & Uchitel, O., 1993. Transmitter release and presynaptic Ca²⁺ currents blocked by the spider toxin omega-Aga-IVA. *Neuroreport*, 5(3), pp.333-336.
- Ran, I. et al., 2009. Persistent transcription- and translation-dependent long-term potentiation induced by mGluR1 in hippocampal interneurons. *J Neurosci*, 29(17), pp.5605-5615.
- Rask-Madsen, C. & King, G., 2008. Differential regulation of VEGF signaling by PKC-alpha and PKC-epsilon in endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 28(5), pp.919-924.
- Raval, A. et al., 2007. epsilonPKC phosphorylates the mitochondrial K(+) (ATP) channel during induction of ischemic preconditioning in the rat hippocampus. *Brain Res*, 1184, pp.345-353.
- Ribeiro, J. et al., 1996. Purinergic regulation of acetylcholine release. *Prog Brain Res*, 109, pp.231-241.
- Richter, E. et al., 1987. Contraction-associated translocation of protein kinase C in rat skeletal muscle. *FEBS Lett*, 217(2), pp.232-236.
- Rizzoli, S. & Betz, W., 2005. Synaptic vesicle pools. *Nat Rev Neurosci*, 6(1), pp.57-69.
- Robitaille, R. et al., 1993. Functional colocalization of calcium and calcium-gated potassium channels in control of transmitter release. *Neuron*, 11(4), pp.645-655.
- Robitaille, R., 1995. Purinergic receptors and their activation by endogenous purines at perisynaptic glial cells of the frog neuromuscular junction. *J Neurosci*, 15(11), pp.7121-31.
- Robitaille, R., Bourque, M. & Vandaele, S., 1996. Localization of L-type Ca²⁺ channels at perisynaptic glial cells of the frog neuromuscular junction. *J Neurosci*, 16(1), pp.148-158.
- Robitaille, R., Jahromi, B. & Charlton, M., 1997. Muscarinic Ca²⁺ responses resistant to muscarinic antagonists at perisynaptic Schwann cells of the frog neuromuscular junction. *J Physiol*, 504 (Pt 2, pp.337-347.
- Rodriguez, M. et al., 1999. RACK1, a protein kinase C anchoring protein, coordinates the binding of activated protein kinase C and select pleckstrin homology domains in vitro. *Biochemistry*, 38(42), pp.13787-13794.

- Ron, D. et al., 1994. Cloning of an intracellular receptor for protein kinase C: a homolog of the beta subunit of G proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91(3), pp.839-843.
- Ron, D. & Kazanietz, M., 1999. New insights into the regulation of protein kinase C and novel phorbol ester receptors. *FASEBJ*, 13, pp.1658-1676.
- Ron, D., Luo, J. & Mochly-Rosen, D., 1995. C2 region-derived peptides inhibit translocation and function of beta protein kinase C in vivo. *J Biol Chem*, 270(41), pp.24180-7.
- Ron, D. & Mochly-Rosen, D., 1994. Agonists and antagonists of protein kinase C function, derived from its binding proteins. *J Biol Chem*, 269(34), pp.21395-21398.
- Ron, D. & Mochly-Rosen, D., 1995. An autoregulatory region in protein kinase C: the pseudoanchoring site. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(2), pp.492-6.
- Rosato Siri, M. & Uchitel, O., 1999. Calcium channels coupled to neurotransmitter release at neonatal rat neuromuscular junctions. *J Physiol*, 514 (Pt 2), pp.533-540.
- Rose, A. et al., 2004. Effect of exercise on protein kinase C activity and localization in human skeletal muscle. *J Physiol*, 561(Pt 3), pp.861-870.
- Rosé, S. et al., 2001. Chromaffin cell F-actin disassembly and potentiation of catecholamine release in response to protein kinase C activation by phorbol esters is mediated through myristoylated alanine-rich C kinase substrate phosphorylation. *J Biol Chem*, 276(39), pp.36757-36763.
- Roux, P.P. & Barker, P. a, 2002. Neurotrophin signaling through the p75 neurotrophin receptor. *Prog Neurobiol*, 67(3), pp.203-33.
- Rozengurt, E., Rey, O. & Waldron, R., 2005. Protein kinase D signaling. *J Biol Chem*, 280(14), pp.13205-13208.
- Saegusa, H. et al., 2001. Suppression of inflammatory and neuropathic pain symptoms in mice lacking the N-type Ca²⁺ channel. *EMBOJ*, 20(10), pp.2349-2356.
- Saito, N. et al., 1993. Cellular and intracellular localization of epsilon-subspecies of protein kinase C in the rat brain; presynaptic localization of the epsilon-subspecies. *Brain Res*, 607, pp.241-248.
- Saito, N. et al., 1989. Immunocytochemical localization of beta II subspecies of protein kinase C in rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86(9), pp.3409-3413.
- Saitoh, N., Hori, T. & Takahashi, T., 2001. Activation of the epsilon isoform of protein kinase C in the mammalian nerve terminal. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(24), pp.14017-21.

- Sakaba, T., 2008. Two Ca(2+)-dependent steps controlling synaptic vesicle fusion and replenishment at the cerebellar basket cell terminal. *TL - 57. Neuron*, 57 VN - r(3), pp.406-419.
- Salgado, A., Cunha, R. & Ribeiro, J., 2000. Facilitation by P(2) receptor activation of acetylcholine release from rat motor nerve terminals: interaction with presynaptic nicotinic receptors. *Brain Res*, 877(2), pp.245-250.
- Salpeter, M. & Loring, R., 1985. Nicotinic acetylcholine receptors in vertebrate muscle: properties, distribution and neural control. *Prog Neurobiol*, 25(4), pp.297-325.
- Salpeter, M., Marchaterre, M. & Harris, R., 1988. Distribution of extrajunctional acetylcholine receptors on a vertebrate muscle: evaluated by using a scanning electron microscope autoradiographic procedure. *J Cell Biol*, 106(6), pp.2087-2093.
- Sampson, S. & Cooper, D., 2006. Specific protein kinase C isoforms as transducers and modulators of insulin signaling. *Mol Genet Metab*, 89(1-2), pp.32-47.
- Samuel, M. a et al., 2012. Agrin and synaptic laminin are required to maintain adult neuromuscular junctions. *PLoS One*, 7(10), p.e46663.
- Sanes, J. & Lichtman, J., 1999. Development of the vertebrate neuromuscular junction. *Annu Rev Neurosci*, 22, pp.389-442.
- Sanes, J.R. & Lichtman, J.W., 1999. Development of the vertebrate neuromuscular junction. *Annu Rev Neurosci*, 22, pp.389-442.
- Santafé, M., et al., 2004. Muscarinic autoreceptors related with calcium channels in the strong and weak inputs at polyinnervated developing rat neuromuscular junctions. *Neuroscience*, 123(1), pp.61-73.
- Santafe, M.M. et al., 2003. Modulation of ACh release by presynaptic muscarinic autoreceptors in the neuromuscular junction of the newborn and adult rat. *Eur J Neurosci*, 17(1), pp.119-127.
- Santafe, M.M. et al., 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), pp.1195-206.
- Santafé, M.M. et al., 2001. Calcium channels coupled to neurotransmitter release at dually innervated neuromuscular junctions in the newborn rat. *Neuroscience*, 102(3), pp.697-708.
- Santafé, M.M. et al., 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), pp.76-84.

- Santafé, M.M. et al., 2007. Coupling of presynaptic muscarinic autoreceptors to serine kinases in low and high release conditions on the rat motor nerve terminal. *Neuroscience*, 148(2), pp.432-40.
- Santafé, M.M. et al., 2009. Interaction between protein kinase C and protein kinase A can modulate transmitter release at the rat neuromuscular synapse. *J Neurosci Res*, 87(3), pp.683-90.
- Santafé, M.M. et al., 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), pp.2048-56.
- Santafé, M.M. et al., 2014. The interaction between troponin-related kinase B receptors and serine kinases modulates acetylcholine release in adult neuromuscular junctions. *Neurosci Lett*, 561(0), pp.171-175.
- Sasaki, Y., 2003. New aspects of neurotransmitter release and exocytosis: Rho-kinase-dependent myristoylated alanine-rich C-kinase substrate phosphorylation and regulation of neurofilament structure in neuronal cells. *TL - 93. J Pharmacol Sci*, 93 VN - r(1), pp.35-40.
- Saurin, A. et al., 2008. The regulated assembly of a PKCepsilon complex controls the completion of cytokinesis. *Nat Cell Biol*, 10(8), pp.891-901.
- Schaefer, A., Sanes, J. & Lichtman, J., 2005. A compensatory subpopulation of motor neurons in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Comp Neurol*, 490(3), pp.209-219.
- Schechtman, D. et al., 2004. A critical intramolecular interaction for protein kinase Cepsilon translocation. *J Biol Chem*, 279(16), pp.15831-40.
- Schneggenburger, R., Sakaba, T. & Neher, E., 2002. Vesicle pools and short-term synaptic depression: lessons from a large synapse. *Trends Neurosci*, 25(4), pp.206-212.
- Scott, L., Bacou, F. & Sanes, J., 1988. A synapse-specific carbohydrate at the neuromuscular junction: association with both acetylcholinesterase and a glycolipid. *J Neurosci*, 8(3), pp.932-944.
- Sebastião, A. & Ribeiro, J., 2000. Fine-tuning neuromodulation by adenosine. *Trends Pharmacol Sci*, 21(9), pp.341-346.
- Shirai, Y. et al., 2007. A novel PIP2 binding of epsilonPKC and its contribution to the neurite induction ability. *J Neurochem*, 102(5), pp.1635-44.
- Shirai, Y. et al., 1998. Distinct effects of fatty acids on translocation of gamma- and epsilon-subspecies of protein kinase C. *J Cell Biol*, 143(2), pp.511-521.

- Shirai, Y., Adachi, N. & Saito, N., 2008. Protein kinase Cepsilon: function in neurons. *FEBS J*, 275(16), pp.3988-94.
- Sieburth, D., Madison, J. & Kaplan, J., 2007. PKC-1 regulates secretion of neuropeptides. *Nat Neurosci*, 10(1), pp.49-57.
- Slater, S., Ho, C. & Stubbs, C., 2002. The use of fluorescent phorbol esters in studies of protein kinase C-membrane interactions. *Chem Phys Lipids*, 116(1-2), pp.75-91.
- Slutsky, I., Parnas, H. & Parnas, I., 1999. Presynaptic effects of muscarine on ACh release at the frog neuromuscular junction. *J Physiol*, 514 (Pt 3), pp.769-782.
- Son, Y. & Thompson, W., 1995. Schwann cell processes guide regeneration of peripheral axons. *Neuron*, 14(1), pp.125-132.
- Song, J. et al., 1999. PKC-epsilon regulates basolateral endocytosis in human T84 intestinal epithelia: role of F-actin and MARCKS. *Am J Physiol*, 277(6 Pt 1), p.49.
- Souroujon, M. & Mochly-Rosen, D., 1998. Peptide modulators of protein-protein interactions in intracellular signaling. *Nat Biotechnol*, 16(10), pp.919-924.
- Stahelin, R. et al., 2005. Diacylglycerol-induced membrane targeting and activation of protein kinase Cepsilon: mechanistic differences between protein kinases Cdelta and Cepsilon. *J Biol Chem*, 280(20), pp.19784-19793.
- Stärk, U. et al., 1998. Effect of activation of protein kinase A and of protein kinase C on the kinetics of the renal basolateral PAH transporter. TL - 12. *Fundam Clin Pharmacol*, 12 VN - r(1), pp.44-49.
- Stebbins, E.G. & Mochly-Rosen, D., 2001. Binding specificity for RACK1 resides in the V5 region of beta II protein kinase C. *J Biol Chem*, 276(32), pp.29644-50.
- Stevens, C. & Williams, J., 2007. Discharge of the readily releasable pool with action potentials at hippocampal synapses. *J Neurophysiol*, 98(6), pp.3221-3229.
- Stoop, R. & Poo, M., 1995. Potentiation of transmitter release by ciliary neurotrophic factor requires somatic signaling. *Science*, 267(5198), pp.695-699.
- Stumpo, D. et al., 1989. Molecular cloning, characterization, and expression of a cDNA encoding the "80- to 87-kDa" myristoylated alanine-rich C kinase substrate: a major cellular substrate for protein kinase C. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86(11), pp.4012-4016.
- Sudhof, T., 2004. The synaptic vesicle cycle. *Annu Rev Neurosci*, 27, pp.509-547.
- Sudhof, T., 1995. The synaptic vesicle cycle: a cascade of protein-protein interactions. *Nature*, 375(6533), pp.645-653.

- Sun, L., Ferreira, J.C.B. & Mochly-Rosen, D., 2011. ALDH2 activator inhibits increased myocardial infarction injury by nitroglycerin tolerance. *Sci Transl Med*, 3(107), p.107ra111.
- Suzuki, N., Yokoyama, F. & Nomizu, M., 2005. Functional sites in the laminin alpha chains. *Connect Tissue Res*, 46(3), pp.142-152.
- Szallasi, Z. et al., 1994. Differential regulation of protein kinase C isozymes by bryostatin 1 and phorbol 12-myristate 13-acetate in NIH 3T3 fibroblasts. *J Biol Chem*, 269(3), pp.2118-2124.
- Takahashi, M. et al., 2000. Association of immature hypophosphorylated protein kinase epsilon with an anchoring protein CG-NAP. *J Biol Chem*, 275(44), pp.34592-34596.
- Takai, Y. et al., 1979. Unsaturated diacylglycerol as a possible messenger for the activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase system. *Biochem Biophys Res Commun*, 91(4), pp.1218-1224.
- Tamaoki, T. & Nakano, H., 1990. Potent and specific inhibitors of protein kinase C of microbial origin. *Biotechnology (N Y)*, 8(8), pp.732-735.
- Tanaka & Nishizuka, 1994. The protein kinase C family for neuronal signaling. *Annu Rev Neurosci*, 17, pp.551-67.
- Tao, W. et al., 1996. [Changes of synaptic transmission efficiency in the MF-CA3 and PP-CA3 pathways of rat hippocampus during discrimination learning]. *Sheng Li Xue Bao*, 48(5), pp.431-436.
- Taylor, S. & Radzio-Andzelm, E., 1994. Three protein kinase structures define a common motif. *Structure*, 2(5), pp.345-355.
- Teicher, B. et al., 2002. Antiangiogenic and antitumor effects of a protein kinase Cbeta inhibitor in human breast cancer and ovarian cancer xenografts. *Invest New Drugs*, 20(3), pp.241-251.
- Tomas, J. et al., 2000. Topological differences along mammalian motor nerve terminals for spontaneous and alpha-bungarotoxin-induced sprouting. *Histol Histopathol*, 15(1), pp.43-52.
- Tomàs, J. et al., 2014. Presynaptic membrane receptors in acetylcholine release modulation in the neuromuscular synapse. *J Neurosci Res*, 92(5), pp.543-554.
- Trachtenberg, J. & Thompson, W., 1997. Nerve terminal withdrawal from rat neuromuscular junctions induced by neuregulin and Schwann cells. *J Neurosci*, 17(16), pp.6243-6255.

- Trinidad, J., Fischbach, G. & Cohen, J., 2000. The Agrin/MuSK signaling pathway is spatially segregated from the neuregulin/ErbB receptor signaling pathway at the neuromuscular junction. *J Neurosci*, 20(23), pp.8762-8770.
- De Troyer, A. et al., 1981. The diaphragm: two muscles. *Science*, 213(4504), pp.237-238.
- Tsuruno, S. & Hirano, T., 2007. Persistent activation of protein kinase Calpha is not necessary for expression of cerebellar long-term depression. *Mol Cell Neurosci*, 35(1), pp.38-48.
- Uchitel, O. et al., 1992. P-type voltage-dependent calcium channel mediates presynaptic calcium influx and transmitter release in mammalian synapses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89(8), pp.3330-3333.
- Vary, T. et al., 2005. Nutrient regulation of PKCepsilon is mediated by leucine, not insulin, in skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 289(4), p.94.
- Villarreal, C. et al., 2009. The peripheral pro-nociceptive state induced by repetitive inflammatory stimuli involves continuous activation of protein kinase A and protein kinase C epsilon and its Na(V)1.8 sodium channel functional regulation in the primary sensory neuron. *Biochem Pharmacol*, 77(5), pp.867-877.
- Wadia, J. & Dowdy, S., 2003. Modulation of cellular function by TAT mediated transduction of full length proteins. *Curr Protein Pept Sci*, 4(2), pp.97-104.
- Way, K., Chou, E. & King, G., 2000. Identification of PKC-isoform-specific biological actions using pharmacological approaches. *Trends Pharmacol Sci*, 21(5), pp.181-187.
- West, J. et al., 1991. A phosphorylation site in the Na⁺ channel required for modulation by protein kinase C. *Science*, 254(5033), pp.866-868.
- Wetsel, W.C. et al., 1992. Tissue and cellular distribution of the extended family of protein kinase C isoenzymes. TL - 117. *J Cell Biol*, 117 VN - (1), pp.121-133.
- Wiese, S. et al., 2007. Adenosine receptor A2A-R contributes to motoneuron survival by transactivating the tyrosine kinase receptor TrkB. TL - 104. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104 VN - (43), pp.17210-17215.
- Wing, M.R., Bourdon, D.M. & Harden, T.K., 2003. PLC-epsilon: a shared effector protein in Ras-, Rho-, and G alpha beta gamma-mediated signaling. *Mol Interv*, 3, pp.273-280.
- Wood, S. & Slater, C., 1998. beta-Spectrin is colocalized with both voltage-gated sodium channels and ankyrinG at the adult rat neuromuscular junction. *J Cell Biol*, 140(3), pp.675-684.

- Wood, S. & Slater, C., 1997. The contribution of postsynaptic folds to the safety factor for neuromuscular transmission in rat fast- and slow-twitch muscles. *J Physiol*, 500 (Pt 1), pp.165-176.
- Wu, H., Albrightson, C. & Nambi, P., 1999. Selective inhibition of rat mesangial cell proliferation by a synthetic peptide derived from the sequence of the C2 region of PKCbeta. *Peptides*, 20(6), pp.675-678.
- Wu, L. & Betz, W., 1998. Kinetics of synaptic depression and vesicle recycling after tetanic stimulation of frog motor nerve terminals. *Biophys J*, 74(6), pp.3003-3009.
- Xu, J. et al., 2013. SNARE proteins synaptobrevin, SNAP-25, and syntaxin are involved in rapid and slow endocytosis at synapses. *Cell Rep*, 3(5), pp.1414-1421.
- Yamaguchi, H. et al., 2009. MARCKS regulates lamellipodia formation induced by IGF-I via association with PIP2 and beta-actin at membrane microdomains. *J Cell Physiol*, 220(3), pp.748-755.
- Yamamoto, H. et al., 2006. Endothelin-1 enhances capsaicin-evoked intracellular Ca²⁺ response via activation of endothelin a receptor in a protein kinase Cepsilon-dependent manner in dorsal root ganglion neurons. *Neuroscience*, 137(3), pp.949-960.
- Yedovitzky, M. et al., 1997. Translocation inhibitors define specificity of protein kinase C isoenzymes in pancreatic beta-cells. *J Biol Chem*, 272(3), pp.1417-1420.
- Yee, V. et al., 1988. Regional heterogeneity in the distal motor axon: three zones with distinctive intrinsic components. *J Neurocytol*, 17(5), pp.649-656.
- Yokoyama, C.T. et al., 2005. Mechanism of SNARE protein binding and regulation of Cav2 channels by phosphorylation of the synaptic protein interaction site. TL - 28. *Mol Cell Neurosci*, 28 VN - r(1), pp.1-17.
- Yonezawa, T. et al., 2009. PKC delta and epsilon in drug targeting and therapeutics. *Recent Pat DNA Gene Seq*, 3(2), pp.96-101.
- Zeidman, R. et al., 2002. Protein kinase Cepsilon actin-binding site is important for neurite outgrowth during neuronal differentiation. *Mol Biol Cell*, 13(1), pp.12-24.
- Zhan, W.-Z., Mantilla, C. & Sieck, G., 2003. Regulation of neuromuscular transmission by neurotrophins. *Sheng Li Xue Bao*, 55(6), pp.617-624.
- Zhang, Z. et al., 1997. C2 region-derived peptides of beta-protein kinase C regulate cardiac Ca²⁺ channels. *Circ Res*, 80(5), pp.720-729.
- Zhao, M. et al., 2004. Identification of the linker histone H1 as a protein kinase Cepsilon-binding protein in vascular smooth muscle. *Biochem Cell Biol*, 82(5), pp.538-546.

Zucker, R.S., 1996. Exocytosis: a molecular and physiological perspective. *Neuron*, 17, pp.1049-1055.

Zucker, R.S. & Regehr, W.G., 2002. Short-term synaptic plasticity. *Annu Rev Physiol*, 64, pp.355-405.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

LA PROTEÍNA QUINASA C ÉPSILON EN LA UNIÓN NEUROMUSCULAR DE MAMÍFERO ADULTO: LOCALIZACIÓN,
REGULACIÓN MEDIANTE ACTIVIDAD SINÁPTICA Y ACOPLAMIENTO A LA LIBERACIÓN DE ACETILCOLINA.

Teresa Obis Ibáñez

Dipòsit Legal: T 1609-2015

SCIENTIFIC CONTRIBUTIONS

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

LA PROTEÍNA QUINASA C ÉPSILON EN LA UNIÓN NEUROMUSCULAR DE MAMÍFERO ADULTO: LOCALIZACIÓN,
REGULACIÓN MEDIANTE ACTIVIDAD SINÁPTICA Y ACOPLAMIENTO A LA LIBERACIÓN DE ACETILCOLINA.

Teresa Obis Ibáñez

Dipòsit Legal: T 1609-2015

Publications

- **Teresa Obis**, Núria Besalduch, Manel M. Santafé, Erica Hurtado, Laura Nadal, Marta Tomàs, Maria A. Lanuza, Neus Garcia, Josep Tomàs. “The novel protein kinase C epsilon isoform at the adult neuromuscular synapse: Location, regulation by synaptic activity-dependent muscle contraction through TrkB signaling and coupling to ACh release”. *The Journal of Neuroscience*, submitted.
- **Teresa Obis**, Manel M. Santafé, Núria Besalduch, Marta Tomàs, Neus Garcia, Mercedes Priego, Maria A. Lanuza, Josep Tomàs. “The novel protein kinase C epsilon isoform modulates acetylcholine release in the rat neuromuscular junction”. *The Journal of Neuroscience*, submitted.
- Manel M. Santafé, Mercedes Priego, **Teresa Obis**, Neus Garcia, Marta Tomàs, Maria A. Lanuza, Josep Tomas. “Purinergic adenosine receptors and cholinergic muscarinic receptors cooperate in acetylcholine release modulation in the neuromuscular synapse”. *The Journal of Neuroscience*, submitted.
- Garcia, N., Priego, M., Hurtado E., **Obis, T.**, Santafé, M. M., Tomàs, M., Besalduch, N., Lanuza, M. A., Tomàs, J. “Adenosine A2B and A3 receptors in the mice neuromuscular junction”. *Journal of Anatomy* (impact factor: 2.227 Q1, *Anatomy & Morphology*), 2014 Jul; 225(1):109-17. doi: 10.1111/joa.12188. Epub 2014 Apr 23.
- Shingo Kariya, **Teresa Obis**, Caterina Garone, Turgay Akay, Fusako Sera, Shinichi Iwata, Shunichi Honma, Umrao R. Monani. “Stringent requirement for elevated levels of SMN, the spinal muscular atrophy protein, imposed during periods of neuromuscular synapse maturation”. *Journal of Clinical Investigation* (impact factor: 13.765 Q1 D1, *Medicine, Research and Experimental*), 2014 Feb 3; 124(2):785–800. doi: 10.1172/JCI72017.

- Josep Tomàs, Manel M. Santafé, Neus Garcia, Maria A. Lanuza, Marta Tomàs, Núria Besalduch, **Teresa Obis**, Mercedes Priego, Erica Hurtado. “Presynaptic membrane receptors in acetylcholine release modulation on neuromuscular synapse”. *Journal of Neuroscience Research*, (impact factor: 2.729 Q2, Neurosciences), 2014 Jan 27. doi: 10.1002/jnr.23346.
- Manel M. Santafé, Neus Garcia, Marta Tomàs, **Teresa Obis**, Maria A. Lanuza, Núria Besalduch, Josep Tomàs. “The interaction between troponin-related kinase B receptors and serine kinases modulates acetylcholine release in adult neuromuscular junctions”. *Neuroscience Letters*, (impact factor: 2.055 Q3, Neurosciences), 2014 Jan 6. pii: S0304-3940(14)00010-X. doi: 10.1016/j.neulet.2013.12.073.
- Lanuza, M. A., Santafé, M. M., Garcia, N., Besalduch, N., Tomàs, M., **Obis, T.**, Priego, M., Nelson, P. G., Tomàs, J. “Protein kinase C isoforms at the neuromuscular junction: localization and specific roles in neurotransmission and development”. *Journal of Anatomy* (impact factor: 2.227 Q1, Anatomy & Morphology). *J Anat.* 2014 Jan; 224(1):61-73. doi: 10.1111/joa.12106.
- Núria Besalduch, Maria A. Lanuza, Neus Garcia, **Teresa Obis**, Manel M. Santafé, Marta Tomàs, Mercedes Priego, Josep Tomàs. “Cellular localization of the atypical isoforms of the protein kinase C (aPKC ζ /PKM ζ and aPKC λ /i) on the neuromuscular synapse”. *Neuroscience Letters*, (impact factor: 2.055 Q3, Neurosciences). 2013 Nov 27; 556:166-9. doi: 10.1016/j.neulet.2013.10.006.
- Garcia, N., Priego, M., **Obis, T.**, Santafé, M. M., Tomàs, M., Besalduch, N., Lanuza, M. and Tomàs, J., “Adenosine A₁ and A_{2A} receptor-mediated modulation of acetylcholine release in the mice neuromuscular junction”. *European Journal of Neuroscience*, (impact factor: 3.669 Q2, Neurosciences). 2013 Jul; 38(2):2229-41. doi: 10.1111/ejn.12220.

- Garcia, N., Santafé, M. M., Tomàs, M., Priego, M., **Obis, T.**, Lanuza, M. A., Besalduch, N. and Tomàs, J., “Exogenous ciliary neurotrophic factor (CNTF) reduces synaptic depression during repetitive stimulation”. *Journal of the Peripheral Nervous System*, (impact factor: 2.504 Q2, Clinical Neurology), 2012 Sep; 17(3):312-23. doi: 10.1111/j.1529-8027.2012.00419.x.

Conferences, presentations and posters

- Maria A. Lanuza, Nuria Besalduch, Manel M. Santafé, Neus Garcia, Teresa Obis, Marta Tomàs, Mercedes Priego, Nicolau Ortiz, Philip G. Nelson and Josep Tomàs. "Protein kinase C signalling at the neuromuscular junction: A role in synaptic activity and synapse maturation". 125th Anatomical Society meeting - Symposium Motor Neurons and Disease of Motor Neurons, Edinburgh, Scotland, UK. 10-12th July 2012. Paper.
- N. Ortiz, M.M. Santafé, N. Garcia, M. Tomas, T. Obis, M.A. Lanuza, N. Besalduch, J. Tomàs. "The interaction between tropomyosin-related kinase-B receptor and serine kinases modulates acetylcholine release in adult neuromuscular junctions". European Journal of Neurology, Volume 21, Supplement 1, May 2014. Joint Congress of European Neurology, Istanbul, Turkey, May 2014. Poster.
- T. Obis, N. Besalduch, M.M. Santafé, M. Tomàs, N. Garcia, M. Priego, E. Hurtado, L. Nadal, M.A. Lanuza, J. Tomàs. "Activity-dependent changes of the novel protein kinase C epsilon isoform in the neuromuscular synapse and its coupling to ACh release". 9th Federation of European Neuroscience Societies- Forum of Neuroscience, Milan, Italy, July 5-9, 2014. Poster.
- Santafé M, M. Priego, T. Obis, N. Garcia, M. Tomàs, M.A. Lanuza, N. Ortiz, E. Hurtado, L. Nadal, J. Tomàs. "Purinerbic adenosine receptors and cholinergic muscarinic receptors cooperate in acetylcholine release modulation on neuromuscular synapse". 9th Federation of European Neuroscience Societies- Forum of Neuroscience, Milan, Italy, July 5-9, 2014. Poster.
- E. Hurtado Caballero, T. Obis, M. Priego, L. Nadal, N. Garcia, M.M. Santafé, M. Tomàs, N. Ortiz, M.A. Lanuza, J. Tomàs. "Colocalization of protein kinase A (PKA) subunits and the A kinase anchoring proteins (AKAPS, 9 and 150) in the neuromuscular synapse". 9th Federation of European Neuroscience Societies- Forum of Neuroscience, Milan, Italy, July 5-9, 2014. Poster.
- L. Nadal, E. Hurtado, T. Obis, N. Garcia, M. Priego, M.M. Santafé, M. Tomàs, N. Ortiz, M.A. Lanuza, J. Tomàs. "Blockade of tyrosine kinase receptor B prevents muscle contraction-induced presynaptic nPKC epsilon, cPKC beta I and cPKC alpha increases". 9th Federation of European Neuroscience Societies- Forum of Neuroscience, Milan, Italy, July 5-9, 2014. Poster.
- Ortiz, Nicolau; Garcia, Neus; Santafé, Manel M.; Priego, Mercedes; Obis, Teresa; Lanuza, Maria A.; Tomàs, Marta; Besalduch, Nuria; Tomàs, Josep. "Efecto del Factor Neurotrófico Ciliar (CNTF) sobre la depresión sináptica provocada por estimulación repetitiva". LXV Annual meeting Spanish Society of Neurology (SEN). Barcelona, Spain. Nov. 19-23, 2013. Poster.

- Teresa Obis, Mercedes Priego, Manel M. Santafé, Neus Garcia, Maria A. Lanuza, Marta Tomàs, Núria Besalduch, Erica Hurtado, Josep Tomàs. "Involvement of serine kinases in the modulation of ACh release in the neuromuscular synapse". XV National Congress- Spanish Society of Neuroscience (SENC), Oviedo, Spain. Sept. 25-27, 2013. Poster.
- Mercedes Priego, Teresa Obis, Manel M. Santafé, Neus Garcia, Maria A. Lanuza, Marta Tomàs, Núria Besalduch, Erica Hurtado, Josep Tomàs. "Presynaptic membrane receptors in acetylcholine release modulation on neuromuscular synapse". XV National Congress- Spanish Society of Neuroscience (SENC), Oviedo, Spain. Sept. 25-27, 2013. Poster.
- E. Hurtado, N. Garcia, M.M. Santafé, M. Priego, T. Obis, M. Tomàs, N. Besalduch, M.A. Lanuza and J. Tomàs. "Adenosine A_{2B} and A₃ receptors in the mice neuromuscular junction". XV National Congress- Spanish Society of Neuroscience (SENC), Oviedo, Spain. Sept. 25-27, 2013. Poster.
- M.A. Lanuza, N. Besalduch, T. Obis, M.M. Santafé, M. Tomàs, N. Garcia, M. Priego, N. Ortiz, J. Tomàs. "Exclusive presynaptic location and coupling to ACh release of the novel protein kinase C epsilon isoform in the adult rat neuromuscular synapse". 42nd Meeting of the Society for Neuroscience (SfN). New Orleans, LA. Oct. 13-17, 2012. Poster.
- N. Garcia, M. Priego, T. Obis, M.M. Santafé, M. Tomàs, N. Besalduch, M.A. Lanuza, N. Ortiz, J. Tomàs. "Purinergic modulation of ACh release in the neuromuscular junction, reevaluated". 42nd Meeting of the Society for Neuroscience (SfN). New Orleans, LA. Oct. 13-17, 2012. Poster.
- N. Ortiz, T. Obis, N. Besalduch, N. Olguin, M.M.Santafé, M. Tomàs, N. Garcia, M. Priego, M.A. Lanuza, J. Tomàs. "Exclusive presynaptic location and coupling to ACh release of the novel protein kinase C epsilon isoform in the adult rat neuromuscular synapse" European Journal of Neurology. Volume 19, Supplement 1. 16th Congress of the European Federation of Neurological Societies (EFNS). Stockholm, Sweden. Sept. 2012. Poster.
- Teresa Obis, Neus Garcia, Manel M. Santafé, Mercedes Priego, Marta Tomàs, Núria Besalduch, María A. Lanuza and Josep Tomàs. "A1 and A2 Adenosine Receptors in the Adult Neuromuscular Junction". VIII Federation of European Neuroscience Societies (FENS) Forum. Barcelona, Spain. July 14-18, 2012. Poster.
- Núria Besalduch, Teresa Obis, Manel M. Santafé, Marta Tomàs, Neus Garcia, Mercedes Priego, Nicolau Ortiz, María A. Lanuza and Josep Tomàs. "Location, Phosphorylation and Coupling to Ach Release of the Novel Protein Kinase C Epsilon Isoform in the Adult Neuromuscular Synapse". VIII

Federation of European Neuroscience Societies (FENS) Forum. Barcelona, Spain. July 14-18, 2012.
Poster.

- Mercedes Priego, Neus Garcia, Teresa Obis, Marta Tomàs, Maria A. Lanuza, Núria Besalduch, Manel M. Santafé and Josep Tomàs. “Exogenous Ciliary Neurotrophic Factor (CNTF) Reduces Synaptic Depression During Repetitive Stimulation”. VIII Federation of European Neuroscience Societies (FENS) Forum. Barcelona, Spain. July 14-18, 2012. Poster.
- T. Obis, N. Besalduch, N. Termis, M. M. Santafé, M. Tomàs, N. Garcia, M. Priego, M. A. Lanuza, J. Tomàs. “Exclusive presynaptic location and coupling to ACh release of the novel protein kinase C epsilon isoform in the adult rat neuromuscular synapse”. XIV National Congress- Spanish Society of Neuroscience (SENC). Salamanca, Spain. Sept. 28-30, 2011. Poster.
- N. Besalduch, M. A. Lanuza, M. Priego, N. Garcia, M. Tomàs, M. M. Santafé, T. Obis, N. Ortiz, J. Tomàs. “PKA and A-Kinase Anchoring Proteins (AKAPS) localization in the developing and adult neuromuscular junction”. XIV National Congress- Spanish Society of Neuroscience (SENC). Salamanca, Spain. Sept. 28-30, 2011. Poster.
- M. Priego, N. Garcia, M. M. Santafé, M. Tomàs, M. A. Lanuza, N. Besalduch, T. Obis, J. Tomàs. “The Glial cell line-Derived Neurotrophic Factor (GDNF) and the Ciliary Neurotrophic Factor (CNTF) does not acutely change Acetylcholine release in developing and adult rodent Neuromuscular Junction”. XIV National Congress- Spanish Society of Neuroscience (SENC). Salamanca, Spain. Sept. 28-30, 2011. Poster.
- ‘Characterization of HIC mouse and the possible neuroprotective effects of the SMN protein overexpression’. Motor Neuron Center Journal Clubs. Columbia University Medical Center (CUMC), NY, USA, Dec. 18, 2012. Oral presentation.
- ‘Action of several purinergic modulators on synaptic activity in the neuromuscular junction’. Training activities: Neurosciences for Young Researchers. Faculty of Medicine and Health Sciences (URV), Reus, Spain. April 27, 2012. Coordinator: Dr. Manuel Santafé, MD, PhD. Oral presentation.
- ‘Protein kinase Cε is involved in neuromuscular acetylcholine release’. Training activities: Neurosciences for Young Researchers. Faculty of Medicine and Health Sciences (URV), Reus, Spain. Feb. 18, 2011. Coordinator: Dr. Manuel Santafé, MD, PhD. Oral presentation.

- 'Kinetic studies of β -amyloid peptide aggregation'. Amyloids and Alzheimer Department Journal Clubs. Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale (IPBS), Toulouse, France, Nov. 12, 2008. Oral presentation.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

LA PROTEÍNA QUINASA C ÉPSILON EN LA UNIÓN NEUROMUSCULAR DE MAMÍFERO ADULTO: LOCALIZACIÓN,
REGULACIÓN MEDIANTE ACTIVIDAD SINÁPTICA Y ACOPLAMIENTO A LA LIBERACIÓN DE ACETILCOLINA.

Teresa Obis Ibáñez

Dipòsit Legal: T 1609-2015

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

LA PROTEÍNA QUINASA C ÉPSILON EN LA UNIÓN NEUROMUSCULAR DE MAMÍFERO ADULTO: LOCALIZACIÓN,
REGULACIÓN MEDIANTE ACTIVIDAD SINÁPTICA Y ACOPLAMIENTO A LA LIBERACIÓN DE ACETILCOLINA.

Teresa Obis Ibáñez

Dipòsit Legal: T 1609-2015

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

LA PROTEÍNA QUINASA C ÉPSILON EN LA UNIÓN NEUROMUSCULAR DE MAMÍFERO ADULTO: LOCALIZACIÓN,
REGULACIÓN MEDIANTE ACTIVIDAD SINÁPTICA Y ACOPLAMIENTO A LA LIBERACIÓN DE ACETILCOLINA.

Teresa Obis Ibáñez

Dipòsit Legal: T 1609-2015