

Unitat d'Histologia i Neurobiologia
Facultat de Medicina i Ciències de la Salut
Universitat Rovira i Virgili

**EL SISTEMA PAR-1-PROTEÏNA QUINASA C EN EL PROCÉS
D'ELIMINACIÓ SINÀPTICA DURANT EL DESENVOLUPAMENT
POSTNATAL DE LA UNIÓ NEUROMUSCULAR**

Carmen María González

Tesi Doctoral

Març 2004

Dra. M. Angel Lanuza Escolano
Professora Titular d'Escola Universitària
Dpt. Ciències Mèdiques Bàsiques
Unitat d'Histologia i Neurobiologia

Dr. Josep M. Tomàs Ferré
Catedràtic d'Universitat
Dpt. Ciències Mèdiques Bàsiques
Unitat d'Histologia i Neurobiologia

FAN CONSTAR:

Que la Tesi Doctoral titulada “*El sistema PAR-1-Proteïna Quinasa C en el procés d’eliminació sinàptica durant el desenvolupament postnatal de la unió neuromuscular*”, presentada per Carmen María González García ha estat realitzada sota la nostra direcció a la Unitat d’Histologia i Neurobiologia de la Facultat de Medicina i Ciències de la Salut de la Universitat Rovira i Virgili i reuneix tots els requeriments necessaris per a la seva tramitació, presentació i posterior defensa davant del tribunal corresponent amb la finalitat d’optar al grau de DOCTOR.

Reus, 23 de Març de 2003.

Dra. M. Angel Lanuza Escolano

Dr. Josep M. Tomàs Ferré

Aquesta tesi ha estat realitzada a la Unitat d'Histologia i Neurobiologia del Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques de la Facultat de Medicina i Ciències de la Salut de la Universitat Rovira i Virgili, sota la codirecció de la Dra. M. Àngel Lanuza Escolano i del Dr. Josep M. Tomàs Ferré.

Vull donar les gràcies a totes les persones, que encara que el seu nom no surti en aquestes línies, en un moment o altre m'han ajudat a la realització d'aquesta tesi. A totes elles **MOLTES GRÀCIES**.

Als meus directors, Prof. Josep M. Tomàs, per haver-me donat l'oportunitat de realitzar una tesi doctoral i a la Dra. M. Angel Lanuza per la direcció incansable d'aquest treball, comprensió, paciència, ajuda i *saber hacer*.

A la Dra. Neus Garcia, per ensenyar-me tot i ajudar-me sempre. Pels bons moments.

A la Dra. M. Isabel Saló, inicis compartits, per tots aquests anys.

A tota la Unitat d'Histologia i Neurobiologia, Manel, Rosa, Josepa, Mar, Amparo i Renata. En especial vull agrair al Dr. Manel Santafé l'aportació d'idees, sempre necessàries.

Al suport tècnic d'Amparo Aguilar, Carme Sanmartí, Esperanza Chernichero i Juan Valencia. I com no, a les "secres" Montse Pallàs, Imma Abelló i Olga Segú.

Vull agrair a la Dra. Verònica Piera i a la Dra. Mònica Bulló, la cessió desinteressada de tot el que he necessitat.

A la Dra. Anna Gumà, pel seu inestimable ajut sempre que he tingut algun dubte.

Al Dr. Phillip G. Nelson del *Laboratory of Developmental Neurobiology*, NICHD, NIH, Bethesda, USA per permetre'm realitzar una estada al seu laboratori i pels seus gestos cap a mi, sempre facilitant-me la feina. També el vull agrair la cessió dels ratolins *knock out* en la isoforma theta de la proteïna quinasa C. Així mateix el meu agraïment a tot el seu equip, especialment a Cassandra VanDunk i Veronica Dunlap que em va introduir a les tècniques de cultius cel·lulars primaris.

A la Dra. Matilde R. Chacón, sempre dient i acceptant les coses tal i com són, exemple de persona capaç. Per ajudar-me en tot el que està al seu abast.

Als meus companys Isabel, Mar, Miquel, Carme, Maria, Lara, Xavi, Belkys, Dania, Vicky, Marta, Anna's, Montse, Félix, Carol.... companys en la mateixa empresa, pels bons moments i totes *las risas* , tan necessàries, a l'hora del cafè.

Vull agrair l'acollida que em va donar "el grup d'espanyols" que vaig conèixer a Washington, fent d'aquells mesos gairebé unes vacances. Especialment a la Dra. Beatriz Hernández, per ser com és, per donar-ho tot.... i al Dr. Juan Recio, *ya acabé "lo peor"*.

A tots els meus amics que creuen en mi malgrat tot...., especialment a Fer, mil històries junts, per estar sempre quan ens necessitem.

Al meu germà a *pesar de los pesares*.

Als meus pares la darrera causa de tot.

I no puc acabar aquests agraïments sense dedicar unes paraules a la maltractada nicotina, que tant ens agrada als meus AChRs i a mi....



ÍNDEX

ÍNDIX DE FIGURES I TAULA	vi
ÍNDIX D'ABREVIACIONS	viii
I. INTRODUCCIÓ	1
1. La unió neuromuscular com a model experimental de sinapsi	3
2. Què és la unió neuromuscular?	4
2.1. Tipus cel.lulars	4
3. Sinaptogènesi	12
3.1 Diferenciació pre-sinàptica	13
3.2 Diferenciació post-sinàptica	14
4. Innervació polineuronal i eliminació sinàptica	19
4.1. Les serin proteases en el fenomen plàstic de l'eliminació sinàptica	23
4.1.1. Estructura i mecanisme d'activació dels PARs	25
4.2. El sistema PAR-1/Proteïna G/Proteïna Quinasa C en el procés d'eliminació sinàptica	28
II. HIPÒTESI I OBJECTIUS	30
1. Hipòtesi	31
2. Objectius	31
2.1. Objectiu general	31
2.2. Objectius específics	31
III. MATERIAL I MÈTODES	33
1. Animals utilitzats	34
2. Models d'estudi	35
2.1. Sinapsi neuromuscular	35
2.1.1 Justificació del model d'estudi	35
2.1.2 Descripció dels models musculars estudiats	36

<i>2.1.2.1 Arquitectura muscular i innervació del múscul LAL</i>	36
<i>2.1.2.2 Arquitectura muscular i innervació del múscul Soleus</i>	39
2.2. Medul·la espinal	41
<i>2.2.1. Justificació del model d'estudi</i>	41
<i>2.2.2. Descripció</i>	41
2.3. Cultius primaris de miotubs	43
<i>2.3.1. Justificació del model d'estudi</i>	43
<i>2.3.2. Descripció</i>	43
3. Metodologies utilitzades	44
3.1. Obtenció de músculs esquelètics de rata i ratolí	44
<i>3.1.1. Anestèsia</i>	44
<i>3.1.2. Extracció del múscul Levator Auris Longus (LAL)</i>	44
<i>3.1.3. Extracció del múscul Soleus</i>	44
3.2. Obtenció de fibres musculars aïllades	45
<i>3.2.1. Anestèsia</i>	45
<i>3.2.2. Obtenció</i>	45
3.3. Denervació de músculs esquelètics de rata	45
<i>3.3.1. Anestèsia</i>	45
<i>3.3.2. Denervació del múscul LAL</i>	45
<i>3.3.3. Denervació del múscul Soleus</i>	46
3.4. Obtenció de la medul·la espinal	47
<i>3.4.1. Anestèsia</i>	47
<i>3.4.2. Extracció i obtenció de la regió ventral de la medul·la espinal</i>	47
3.5. Tractaments farmacològics	47
<i>3.5.1. Anestèsia</i>	47
<i>3.5.2. Procediment</i>	47
<i>3.5.3. Controls</i>	48
<i>3.5.4. Tractaments aplicats</i>	48
3.6. Obtenció d'extractes cel·lulars	49
<i>3.6.1. A partir de múscul esquelètic i medul·la espinal de rata i ratolí</i>	49
<i>3.6.1.1. Obtenció de lisats totals</i>	49
<i>3.6.1.2. Obtenció de membranes totals</i>	50
3.7. Valoració de la concentració de proteïnes	50

3.7.1. DC Protein Assay de Bio Rad	50
3.7.2. BCA de Pierce	50
3.8. Electroforesi en gels de poliacrilamida (SDS-PAGE)	50
3.8.1. Preparació de les mostres	51
3.8.2. Preparació del gel i electroforesi	51
3.9. Western Blot	52
3.9.1 Transferència	52
3.9.2. Immunodetecció	52
3.9.3. Anticossos utilitzats	53
3.10. Tècniques fluorescents d'immunohistoquímica	53
3.10.1. A múscul esquelètic de rata i ratolí	54
3.10.1.1. Per immersió	54
3.10.1.2. Sobre portaobjectes	55
3.10.2 A medul.la espinal de ratolí	55
3.10.2.1. Sobre portaobjectes	55
3.10.3. Anticossos utilitzats	55
3.11. Microscòpia confocal	57
3.12. Anàlisi morfològic i morfomètric	57
4. Estadística	59
IV. RESULTATS	61
1. Canvis morfològics i maduració dels agrupaments d'AChRs sinàptics durant el període d'eliminació sinàptica	62
2. Paper de la trombina i el seu receptor PAR-1 en el procés de maduració de les unions neuromusculars	67
2.1. El procés de maduració de les unions neuromusculars està mediat pel receptor de la trombina PAR-1	67
2.2. Expressió i localització del receptor de la trombina PAR-1 al múscul esquelètic	71
2.3. Canvis d'expressió de PAR-1 a les unions neuromusculars durant el desenvolupament	74
2.4. Immunolocalització de PAR-1 en unions neuromusculars denervades	77
2.5. Immunolocalització de PAR-1 en cèl.lules musculars aïllades	78
2.6. Immunolocalització de PAR-1 en cultius musculars primaris	80

3. El procés de maduració de les unions neuromusculars depèn de PKC	80
3.1. L'activació de PKC produeix una acceleració de la maduració dels agrupaments sinàptics d'AChRs mentre que el bloqueig la retarda	80
3.2. La PKC actua principalment sobre els agrupaments d'AChRs i no directament sobre els axons	84
3.3. L'activació de PKC també provoca la desaparició d'AChRs de la perifèria de l'agrupament d'AChRs	86
4. θPKC en la Unió Neuromuscular	88
4.1. El procés d'eliminació sinàptica i la maduració dels agrupaments sinàptics d'AChRs es veu alterada en animals deficients en la isoforma θ de la PKC	89
4.2. El desenvolupament neuromuscular no es veu alterat en animals deficients en la isoforma θ de la PKC	92
4.3. La isoforma θ de la PKC s'expressa a múscul esquelètic i a la medulla espinal	94
V. DISCUSSIÓ	96
1. Canvis morfològics i maduració dels agrupaments d'AChRs sinàptics durant el període d'eliminació sinàptica	97
2. Paper de la trombina i el seu receptor PAR-1 en el procés de maduració de les unions neuromusculars	100
3. El procés de maduració de les unions neuromusculars depèn de PKC	104
4. La maduració de les unions neuromusculars es veu alterada en animals deficients en la isoforma θ de PKC	107
VI. CONCLUSIONS	112
VII. BIBLIOGRAFIA	115

INDEX DE FIGURES I TAULA

Figura 1 A. <i>Unió neuromuscular de mamífer</i>	9
Figura 1 B. <i>Esquema de la ultraestructura d'una unió neuromuscular de mamífer</i>	10
Figura 2. <i>Estructura del receptor de la trombina humana</i>	25
Figura 3. <i>Estructura de PAR-1, PAR-2 i PAR-3</i>	26
Figura 4. <i>Mecanismes de transducció de senyal de PARs</i>	26
Figura 5. <i>Comparació de la seqüència d'aminoàcids de l'extrem N-t de PAR-1</i>	27
Figura 6. <i>Levator auris longus I</i>	37
Figura 7. <i>Levator auris longus II</i>	38
Figura 8. <i>Soleus</i>	40
Figura 9. <i>Medulla espinal</i>	42
Figura 10. <i>Cultius primaris de miotubs</i>	43
Figura 11. <i>Poliinnervació neonatal a les unions neuromusculars</i>	63
Figura 12. <i>Morfologies dels agrupaments de receptors colinèrgics (AChRs)</i>	64
Figura 13. <i>Maduració dels AChRs durant el període d'eliminació sinàptica</i>	65
Figura 14. <i>Maduració dels AChRs versus la mitjana del nombre d'axons per sinapsi</i>	67
Figura 15. <i>Canvis en la maduració dels AChRs i en la poliinnervació induïda per SFL</i>	69
Figura 16. <i>Unions neuromusculars d'animals control i tractats amb SFL</i>	70
Figura 17. <i>Expressió de PAR-1 en la fracció de membrana de múscul esquelètic</i>	71
Figura 18. <i>Localització de PAR-1 a les cèl·lules satèl·lits</i>	73
Figura 19. <i>Localització de PAR-1 a les unions neuromusculars</i>	74
Figura 20. <i>PAR-1 a les unions neuromusculars durant el període d'eliminació sinàptica</i>	76
Figura 21. <i>PAR-1 a les unions neuromusculars denervades</i>	77
Figura 22. <i>PAR-1 a les fibres musculars aïllades</i>	79

Figura 23. <i>PAR-1 en cultius primaris de miotubs</i>	80
Figura 24. <i>Efecte de diferents drogues sobre la maduració dels AChRs</i>	82
Figura 25. <i>Evolució de l'índex de maduresa</i>	83
Figura 26A. <i>Nombre promig d'axons per sinapsi versus l'estat de maduració dels AChRs</i>	85
Figura 26B. <i>Nombre promig d'axons per sinapsi versus l'estat de maduració dels AChRs</i>	86
Figura 27A. <i>Canvis en l'àrea dels agrupaments d'AChRs durant el desenvolupament</i>	87
Figura 27B. <i>Canvis al perímetre dels agrupaments d'AChRs durant el desenvolupament</i>	88
Figura 28. <i>Eliminació sinàptica en animals controls i knock outs</i>	90
Figura 29. <i>Maduració dels agrupaments d'AChRs en animals controls i knock outs</i>	90
Figura 30. <i>Unions neuromusculars d'animals control i knock out en la isoforma θ de PKC</i>	91
Figura 31. <i>Expressió de la cadena pesada de la miosina en lisats totals de múscul esquelètic</i>	92
Figura 32. <i>Expressió i localització de MuSK, Rapsina i Utrofina a les unions neuromusculars</i>	93
Figura 33. <i>Expressió de PKC θ en lisats totals de múscul esquelètic</i>	94
Figura 34. <i>Expressió i localització de PKC θ en fibres musculars aïllades</i>	95
Figura 35. <i>Expressió i localització de PKC θ a les motoneurons</i>	95
Figura 36. <i>Proteïnes implicades en el procés d'eliminació sinàptica</i>	111
Taula 1. <i>Pes animals control i knock out</i>	92

INDEX D'ABREVIACIONS

a-BTX	Alfa bungarotoxina
ACh	Acetilcolina
AChR	Receptor d'Acetilcolina
ARIA	<i>Acetylcholine Receptor Inducing Activity</i>
BSA	Albúmina Sèrica Bovina
CaC	Calfostina C
Cdk5	Quinasa depenent de ciclina 5
CGRP	<i>Calcitonin Gene Related Protein</i>
cm	Centrímetre
CS	Cèl.lula d'Schwann
D	Àcid Aspàrtic
DGC	<i>Dystroglycan-Complex</i>
E	Àcid Glutàmic
E14.5	Dia embrionari 14.5
EGF	Factor de creixement epidèrmic
F	Fenilalanina
FITC	Fluoresceïna
FM	Fibra muscular
g	Acceleració de la gravetat
g	Gram
GDNF	Factor Neurotròfic Derivat de la Glia
GP	Proteïna G
GPCRs	<i>G-Protein Coupled Receptors</i>
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i>
i.m.	Índex de maduresa
K	Lisina
kDa	Kilo Dalton
KO	<i>Knock Out</i>
L	Leucina
LAL	<i>Levator Auris Longus</i>
mA	Agrina muscular
mAChR	Receptor d'Acetilcolina muscarínic

MHC	Cadena Pesada de la Miosina
MN	Nuclis dels Miòcits
MuSK	<i>Muscle-Specific receptor tyrosine Kinase</i>
µl	Micro litre
µm	Micròmetre
N	Asparagina
nA	Agrina neural
nAChR	Receptor d'Acetilcolina nicotínic
N-CAM	Molècula d'Adhesió de Cèl.lules Neurals
NGS	Sèrum Normal de Cabra
nm	Nanòmetre
NMJ	Unió Neuromuscular
NRGs	Neuregulines
NS	Nuclis Sinàptics
P	Prolina
P3	Dia postnatal 3
P4	Dia postnatal 4
P6	Dia postnatal 6
P7	Dia postnatal 7
P8	Dia postnatal 8
P12	Dia postnatal 12
P14	Dia postnatal 14
P30	Dia postnatal 30
PAR-1	<i>Protease Activated Receptor 1</i>
PAR-2	<i>Protease Activated Receptor 2</i>
PAR-3	<i>Protease Activated Receptor 3</i>
PAR-4	<i>Protease Activated Receptor 4</i>
PARs	<i>Protease Activated Receptors</i>
PBS	Tampó fosfat-salí
PKA	Proteïna Quinasa A
PKC	Proteïna Quinasa C
PN-1	Proteasa Nexina 1
R	Arginina
RATL	<i>Rapsyn Associated Transmembrane Linker</i>

S	Serina
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
ThR	Receptor de la trombina
TPA	Forbol 12-miristat 13-acetat
TN	Terminal Nervios
TRAP	<i>Thrombin Receptor Activating Peptide</i>
TSCs	Cèl.lules d'Schwann Terminals
VDCC	Canals de Calci Dependents de Voltatge
Y	Tirosina
ZA	Zones actives

I. INTRODUCCIÓ

En l'organització del sistema nerviós les sinapsis són el lloc de contacte i transferència d'informació entre cèl·lules nervioses. La **sinapsi** constitueix un element fonamental a qualsevol investigació neurobiològica. Durant més de 50 anys, les principals investigacions neurobiològiques es van centrar fonamentalment en l'estudi dels mecanismes que intervenen en el procés de neurotransmissió, sent coneguts a dia d'avui els fonaments fisiològics i moleculars d'aquest procés. Les sinapsis no són estructures anatòmica i funcionalment estables sino que són unes estructures altament dinàmiques, inestables i subjectes a variacions.

El sistema nerviós té capacitat per reaccionar d'una manera específica, creativa i funcional davant factors o estímuls que afecten la seva organització habitual. El concepte de **plasticitat sinàptica** fa referència a aquesta propietat en el sentit més ampli i inclou diferents modificacions (químiques, fisiològiques, estructurals,...). Molts dels seus aspectes ja van ser posats de manifest a començaments del segle passat per Santiago Ramon y Cajal, quan va proposar que les "expansions neuronals" eren estructures modificables amb capacitat per orientar-se direccionalment d'acord amb determinades corrents nervioses o segons xarxes d'associació en resposta a ordres reiterades. Anys després, Hebb (1949) va establir la modificabilitat d'estructures i connexions nervioses en relació a estímuls persistents, però aquestes hipòtesis només estaven fonamentades empíricament. Va ser Kandel (1987) qui va donar suport experimental a aquestes afirmacions. Potser els experiments que posen de manifest de manera més brillant la plasticitat neuronal que té lloc durant el desenvolupament del còrtex cerebral són els coneguts treballs realitzats per David Hubel i Torte Wiesel (1963a, 1963b, 1963c, 1964) al sistema visual de gat. Aquests treballs demostren que el sistema visual és un sistema plàstic, que la plasticitat és dependent de l'edat (el sistema és més plàstic com més jove sigui l'animal) i que al còrtex visual l'expressió de la plasticitat és un fenomen reversible.

L'estudi estructural i funcional de la plasticitat o remodelació sinàptica i el coneixement dels mecanismes fonamentals pels quals les sinapsis poden ser modificades s'ha basat, àmpliament, en l'anàlisi del **model neuromuscular**. La idea de que la sinapsi neuromuscular no és una estructura estàtica ha estat establerta després de detectar que els canvis estructurals i funcionals tenen lloc no només durant el desenvolupament o com una reacció a les lesions nervioses sino que també tenen lloc sota condicions fisiològiques (Wernig i Herrera, 1986; Tomàs et al., 1989). Dels tres aspectes de la plasticitat neuromuscular, plasticitat durant el desenvolupament, plasticitat continuada durant la vida adulta i plasticitat induïda pel blocatge o augment de la transmissió

sinàptica, en el capítol introductori es revisa l'estat actual de les investigacions en matèria de plasticitat durant el desenvolupament fent especial referència als mecanismes pels quals el sistema nerviós aconsegueix una estructura summament ordenada durant el desenvolupament: la sinaptogènesi i l'eliminació de la innervació polineuronal postnatal.

L'expressió de fenòmens de plasticitat neuronal depèn de l'edat de l'animal i, per tant, de l'estat de diferenciació del sistema nerviós. El sistema nerviós perinatal s'adapta més fàcilment i reacciona amb més intensitat a canvis produïts en el seu entorn que el sistema nerviós adult. Durant els últims anys, s'han fet molts experiments que demostren que la selectivitat de les connexions nervioses i, en definitiva, l'organització final dels circuits neuronals, són el resultat d'un procés que té lloc durant el **desenvolupament** neuronal i que consta de dues fases. Primerament, les connexions s'estableixen en excés i amb una precisió molt limitada. En una segona fase, s'eliminen les connexions inadequades. És en aquesta segona fase on està centrat el nostre treball, en el paper del sistema receptor de la trombina (ThR) PAR-1-Proteïna G (GP)- isoforma θ de la Proteïna Quinasa C (PKC- θ) en la maduració de la placa motora durant el procés d'eliminació sinàptica.

1. La unió neuromuscular com a model experimental de sinapsi

La sinapsi química que millor es coneix és l'existent entre una motoneurona alfa i una cèl.lula muscular. Aquesta sinapsi es denomina Unió Neuromuscular. Fins a on arriba el nostre coneixement, i encara que alguns detalls menors puguin diferir, l'esquema bàsic que descriu el funcionament de la unió neuromuscular pot ser aplicat a totes les sinapsis químiques.

La unió neuromuscular presenta una sèrie de característiques que la fan ideal per a l'estudi de molts aspectes de l'estructura i funció sinàptica. Degut a la seva mida -és relativament gran- i a la seva accessibilitat, va ser inicialment utilitzada com a model experimental en nombrosos estudis electrofisiològics i en altres manipulacions experimentals i, actualment, es fa servir com a model de sinapsi en les investigacions neurobiològiques ja des de fa molts anys. S'utilitzen diferents models d'unió neuromuscular, sent de ressaltar la d'amfibis, mamífers i, recentment, degut al gran coneixement que es té de la seva biologia molecular, s'ha produït un increment dels estudis on s'utilitza la unió neuromuscular de *Drosophila*.

La unió neuromuscular adulta dels vertebrats va ser el model utilitzat per fer la primera demostració amb rigor de la transmissió sinàptica química (Dale et al., 1936), també va ser

utilitzada per demostrar que l'alliberament dels neurotransmissors, les molècules de diferent naturalesa química encarregades de transmetre la informació, és quàntic i vesicular (Katz, 1966) i, el primer receptor de neurotransmissors que va ser purificat i clonat va ser el receptor nicotínic de l'acetilcolina (nAChR de l'anglès *nicotinic Acetyl Choline Receptor*), el neurotransmissor de la unió neuromuscular (Duclert i Changeux, 1995). A més de com a model per a la realització d'estudis en recerca bàsica, la unió neuromuscular s'ha utilitzat en estudis aplicats, ja que és la diana de diferents neuropaties, com són la miastenia gravis, la síndrome miastènica de Lambert-Eaton, etc.

2. Què és la unió neuromuscular?

La unió neuromuscular dels vertebrats (NMJ, de les sigles en anglès *neuromuscular junction*) és una sinapsi colinèrgica nicotínica –el neurotransmissor és l'acetilcolina, sent el seu agonista la nicotina- ideal per molts tipus d'estudis d'estructura sinàptica i funció.

La unió neuromuscular és formada per tres elements cel·lulars: (1) motoneurona, (2) fibra muscular i (3) cèl·lula de Schwann (**Figura 1A**). Les porcions pròpiament sinàptiques d'aquests tres tipus cel·lulars estan altament especialitzades i contenen altes concentracions d'òrgànuls i molècules específiques que extrasinàpticament són inexistents o es troben a molt baixes concentracions. A més a més, com veurem a continuació, té especial importància la làmina basal sinàptica ja que és diferent, en quant a la seva composició molecular, de la que es troba en regions extrasinàptiques.

2.1. Tipus cel·lulars

(1) Motoneurona i terminal nerviós

Quan ha de tenir lloc la contracció muscular, al múscul li són enviades les instruccions necessàries en forma d'impulsos nerviosos, denominats potencials d'acció, per part d'unes grans cèl·lules: les motoneurons. Una motoneurona consta d'un cos cel·lular o soma ubicat a la part ventral de la medul·la espinal, uns processos o prolongacions especials denominats dendrites i un axó que surt de la medul·la espinal i entra a formar part del nervi espinal.

El soma de la motoneurona conté el nucli de la cèl·lula i la majoria dels òrgànuls cel·lulars. El seu diàmetre està comprès entre 70 i 100 µm. Entre els òrgànuls, destaquen els cossos de Nissl, especialment abundants a prop de la base de l'axó i que no són més que reticle endoplasmàtic rugós

empaquetat de manera que forma estructures espirals. La motoneurona conté abundants mitocondris, microtúbuls i neurofilaments. L'aparell de Golgi està situat a prop del nucli. El citoplasma de les motoneurons conté uns acúmul de pigments denominats grànuls de lipofucsina dels quals no es coneix la seva funció.

Les motoneurons presenten nombroses prolongacions, dendrites, que irradien des del soma cel.lular en totes les direccions conferint a la cèl.lula un aspecte multipol.lar. A mesura que s'allunyen del soma, es van fent progressivament més primes i es van dividint, donant lloc a diferents branques i formant un patró d'arborització complex. Presenten un gradient pròxim-distal d'òrgànuls en el seu interior. La funció de les dendrites és rebre senyals sinàptics des d'altres neurones i, per tant, constitueixen la superfície receptora de la motoneurona.

La funció més important de l'axó és la de transmetre a les fibres musculars l'impuls elèctric (la propagació dels potencials d'acció). També transporta els missatgers químics i determinats orgànuls fins el seu extrem distal, el terminal nerviós. L'axó s'origina d'una protrusió del soma cel.lular i s'estén fins al terminal nerviós situat en contacte amb la fibra muscular. La seva longitud varia considerablement (prenent com a exemple un home de 180 cm d'alçada, la longitud d'un axó de la regió lumbosacra, que innerva un múscul plantar, pot arribar als 125 cm). Al citoplasma de l'axó trobem microtúbuls i neurofilaments.

Tots els axons motors tenen cobertes lipídiques denominades beines de mielina, que són envoltades de membrana plasmàtica d'un tipus de cèl.lula glial denominada cèl.lula de Schwann. Varioses cèl.lules de Schwann recobreixen l'axó al llarg del seu recorregut deixant únicament entre elles un estret espai denominat node de Ranvier.

Quan l'axó és a prop del múscul que ha d'innervar, es divideix progressivament de manera que un mateix axó pot arribar a innervar des d'un fins a centenars de miòcits o fibres musculars (les cèl.lules musculars). El múscul esquelètic consisteix en miòcits multinucleats innervats per varioses motoneurons. Liddell i Sherrington (1925) van definir el concepte d'unitat motora com a una única motoneurona més tots els miòcits que innerva. Tots els miòcits d'una única unitat motora tenen les mateixes característiques fisiològiques i histoquímiques.

La regió de contacte entre el terminal axònic i la fibra muscular es denomina unió neuromuscular (o sinapsi neuromuscular). El terminal axònic o nerviós està especialitzat en

l'alliberament de la molècula neurotransmissora i és la regió terminal de l'axó de la motoneurona. En ell s'hi troben gran quantitat de vesícules sinàptiques de 50 nm de diàmetre que contenen el neurotransmissor, l'acetilcolina, així com nombrosos mitocondris que proporcionen l'energia necessària per la síntesi i l'alliberament d'aquest (**Figura 1B**).

El terminal nerviós està polaritzat ja que moltes de les vesícules sinàptiques estan agrupades en la meitat del terminal que es troba enfrontada a la fibra muscular. Moltes de les vesícules es troben agrupades en zones de la membrana presinàptica (la membrana del terminal nerviós) denominades zones actives i que es manifesten com a àrees denses als electrons. És en aquestes zones on les vesícules es fusionen amb la membrana per alliberar a l'espai extracel·lular el seu contingut, el neurotransmissor. La porció pre-terminal del nervi motor conté menys vesícules sinàptiques i mitocondris que la porció terminal i no es troben zones actives. En canvi, els microtúbuls i els neurofilaments són molt més abundants pre-terminalment. Les zones actives es troben associades amb canals de calci i potassi dependents de voltatge la qual cosa maximitza l'eficàcia de l'alliberament, dependent de calci, del neurotransmissor.

(2) Fibra muscular

Tant per l'home com per la major part dels animals, el moviment és sinònim de supervivència i, per tant, en cada una de les activitats que impliquen moviment, necessitem de les fibres musculars. La gran diversitat de funcions que realitza el teixit muscular es veu reflectida en l'enorme diversitat de mides i formes dels músculs. El nombre de fibres musculars que es troben en un múscul pot anar des d'un centenar fins a un milió.

Els músculs estan formats per fibres musculars multinucleades, cèl·lules amb un diàmetre mitjà de 50 µm encara que aquest diàmetre pot variar considerablement en el cas que la musculatura hagi estat sotmesa a exercici, quan pot arribar a ser el doble. Quan són observades longitudinalment al microscopi òptic, s'observen una sèrie d'estriacions. Aquestes estriacions són explicades per la seva estructura interna, en particular per la disposició de les miofibrilles. Les miofibrilles són les estructures responsables de la contracció i la relaxació de les fibres. Cada miofibrilla té un diàmetre d'un a 2 µm i està separada de la miofibrilla veïna per mitocondris i pel sistema sarcoplasmàtic; en una fibra de 50 µm de diàmetre es troben més de 8000 miofibrilles. Les miofibrilles contenen principalment dos tipus de filaments proteics, l'actina i la miosina, i és la disposició regular d'aquests filaments el que dóna lloc a la miofibrilla i, com a conseqüència, la que confereix a la

fibra muscular l'aparença estriada. Encara que l'arquitectura molecular de les fibres musculars és complexa i interessant ens cenyirem a revisar l'estructura cel.lular de la zona sinàptica.

La membrana de la fibra muscular directament enfrontada amb el terminal nerviós (membrana postsinàptica) està altament especialitzada per respondre ràpida i eficientment a l'efecte del neurotransmissor alliberat pel terminal nerviós. La membrana postsinàptica té una estructura i una composició molecular diferent de l'extrasinàptica (**Figura 1B**). En ella es troba una concentració altíssima de receptors per al neurotransmissor (AChRs de l'anglès *AcetylCholine Receptors*) (revisat per Salpeter i Loring, 1985). Els receptors nicotínics de l'acetilcolina són pentàmers amb la següent composició de subunitats: $\alpha_2\beta\epsilon\delta$, trobant-se a les dues subunitats α el lloc d'unió a l'ACh. Aquestes subunitats contenen cada una 4 segments transmembrana (M1-M4) que s'estructuren donant lloc a un porus, sent els segments M2 els que pròpiament conformen el canal. Encara que es troben AChRs al llarg de tota la fibra muscular, la densitat d'aquests a l'àrea sinàptica és 1000 vegades superior que a l'extrasinàptica (Salpeter et al., 1988) presentant morfologies que, com veurem més endavant, aniran canviant durant el desenvolupament de la sinapsi neuromuscular simultàniament al procés d'eliminació sinàptica (Lanuza et al., 2002).

Associades amb el domini citoplasmàtic dels AChRs s'han identificat recentment altres molècules implicades en mecanismes de senyalització. Entre aquestes molècules es troben: (1) els distroglicans α i β , proteïnes de membrana que interactuen amb la laminina, sent l' α -distroglicà el receptor per a aquesta. L' α -distroglicà interactua amb el β , que es troba a la vegada unit a la distrofina o utrofina. És a dir, es creu que els distroglicans formen el nucli d'un gran complex de proteïnes que s'extèn de la membrana basal al citoesquelet especialitzat subsinàptic (Cote et al., 1999). (2) ErbB2, ErbB3 i ErbB4, que són receptors d'unes proteïnes denominades neuregulines, que són alliberades des del terminal nerviós i que estimulen la síntesi d'AChRs *in vitro* (Jo et al., 1995; Moscoso et al., 1995; Zhu et al., 1995; Rimer et al., 1998; Trinidad et al., 2000). (3) les integrines $\alpha7A$, $\alpha7B$ i $\beta1$, receptors transmembrana de proteïnes de matriu extracel.lular, com la laminina, que també fan de nexa entre el citoesquelet especialitzat que es troba sota la membrana postsinàptica (a l'unir-se pel seu domini citoplasmàtic a elements del citoesquelet) i la làmina basal sinàptica (Martin et al., 1996). (4) Per últim, MuSK, és una proteïna transmembrana amb activitat tirosina quinasa i que actua com a receptor de l'agrina (Herbst i Burden, 2000). L'agrina és un proteoglicà de 400 kDa que es troba a la làmina basal i que és sintetitzat tant als miòcits com a les motoneurons, sent només l'agrina alliberada pel terminal nerviós, isoforma de l'agrina denominada α en mamífers i β en aus, la que actua via MuSK induïnt agrupament d'AChRs (Glass

et al., 1996). No obstant, recentment ha estat demostrat que l'agrina no és necessària per les etapes inicials d'agrupament dels AChRs però sí pel seu manteniment (Lin et al., 2001). L'arquitectura molecular que s'estableix entre totes aquestes molècules i els AChRs contribueix a generar i mantenir l'alta densitat sinàptica de AChRs (superior a $10,000/\mu\text{m}^2$) que contrasta amb la baixa densitat extrasinàptica ($\sim 10/\mu\text{m}^2$) (Salpeter et al., 1988).

A més de la complexa organització molecular, la membrana postsinàptica té una ultraestructura sofisticada (revisat per Salpeter, 1987). El component postsinàptic està separat del presinàptic per un espai d'aproximadament 50 nm que s'anomena fenedura sinàptica. La membrana postsinàptica de la fibra muscular directament enfrontada amb el nervi motor terminal fa una depressió i aquesta presenta, a la vegada, unes invaginacions d'un μm aproximadament de profunditat que estan just al davant de les zones actives. El conjunt d'invaginacions postsinàptiques reben el nom de plect postsinàptics. La part més apical de cada plec es coneix amb el nom de cresta del plec. Els AChRs es troben concentrats a les crestes postsinàptiques donant lloc a les conegudes densificacions postsinàptiques. Canals de sodi i molècules d'adhesió de cèl.lules neurals (N-CAM) es troben concentrades al fons de les invaginacions (Covault i Sanes, 1986; Flucher i Daniels, 1989). Així mateix, l'anquirina, l' α -distribrevina-2, la distrofina i ErbB2 i B4 es troben colocalitzades amb els canals de sodi (Sealock et al, 1984; Covault i Sanes, 1986; Flucher i Daniels, 1989; Wood i Slater, 1998; Peters et al., 1998; Trinidad et al., 2000) mentre que les proteïnes α -distribrevina-1, MuSK, rapsina i utrofina es troben colocalitzades amb els AChRs. El citoesquelet d'aquests replegaments també és heterogeni. Els elements del citoesquelet no només estan implicats en la gènesi dels replegaments sinó que també semblen estar implicats en el manteniment dels diferents dominis que es troben a la membrana postsinàptica (revisat per Sanes i Lichtman, 1999).

Sota aquests plect hi ha una acumulació de mitocondris i de nuclis. Aquests nuclis, denominats nuclis sinàptics, expressen un patró de proteïnes diferent al dels nuclis extrasinàptics: la taxa de transcripció de les diferents subunitats que conformen els AChRs és molt més alta que la que tenen els centenars de nuclis no sinàptics que es troben al mateix citoplasma (Duclert i Changeux 1995).

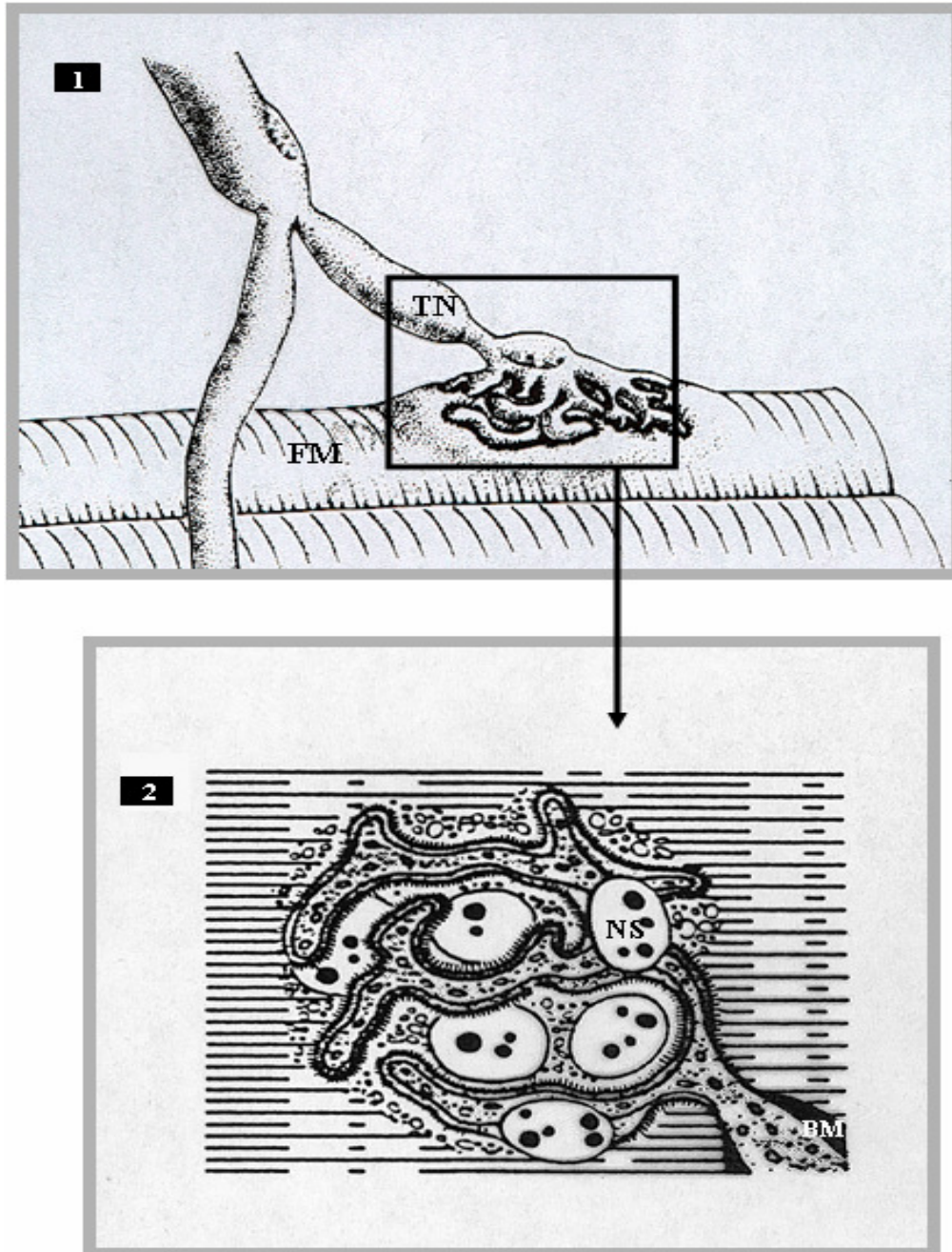


Figura 1A. NMJ de mamífer. (1) Terminal nerviós (TN) innervant una fibra muscular (FM). Tall longitudinal de la regió de contacte, NMJ (2). En aquest segon esquema, es pot veure com estan situats els nuclis subsinàptics de la fibra muscular (NS) i la beina de mielina (BM). Font: Salpeter MM, ed. 1987.

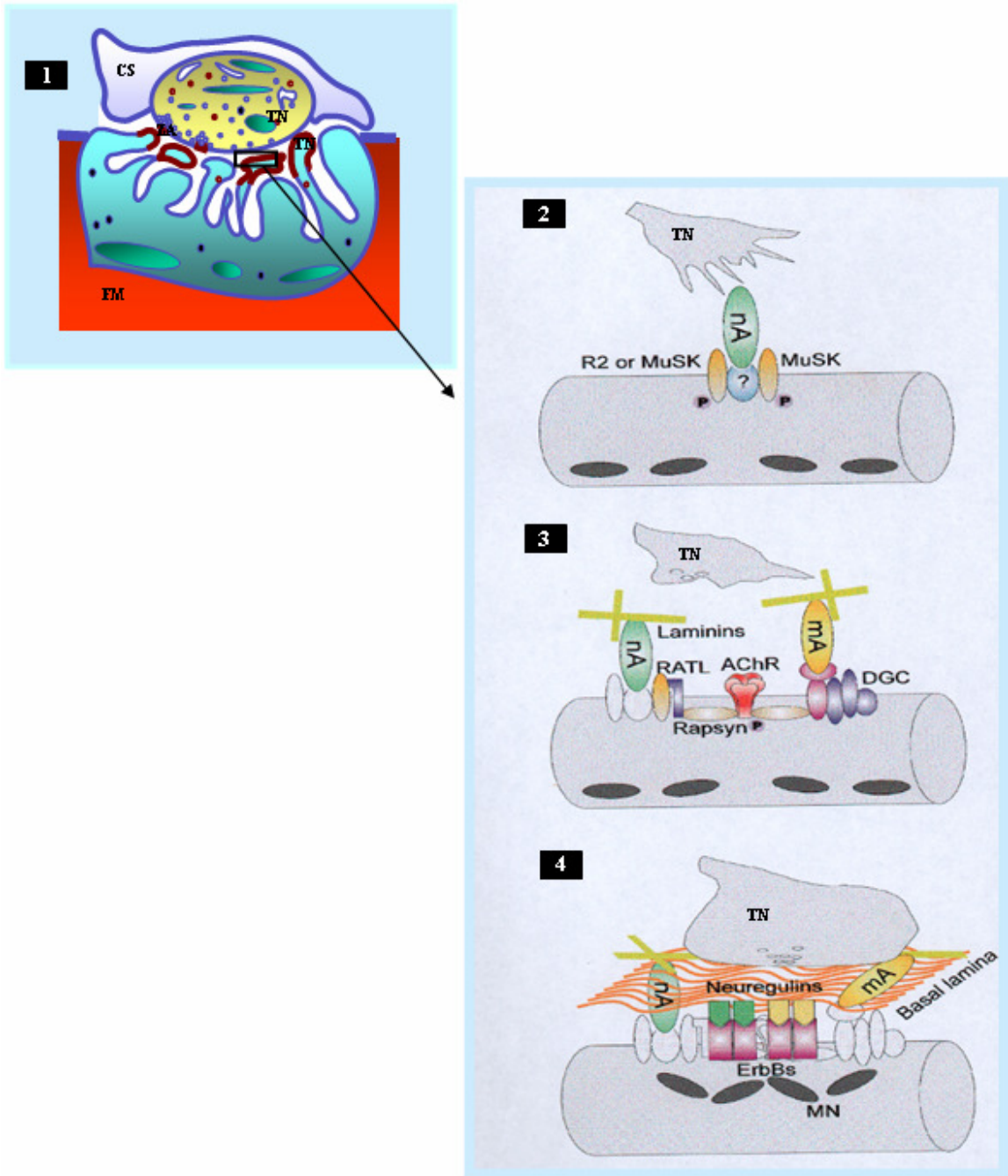


Figura 1B. Esquema de la ultraestructura d'una NMJ de mamífer vista en un tall transversal (1). Consta d'un terminal nerviós (TN) envoltat per una cèl.lula de Schwann (CS) i una fibra muscular (FM) sent aquesta última el component postsinàptic. Font: Manel Santafé. 1993. Tesi doctoral. La membrana postsinàptica ampliada mostra la disposició de les diferents proteïnes implicades en la diferenciació postsinàptica (2), (3) i (4). Font: Ruegg MA, 1998.

(3) Cèl.lula de Schwann

Les cèl.lules de Schwann són les cèl.lules glials del sistema nerviós perifèric i es troben envoltant els axons. Són la matriu estructural de les neurones i el seu metabolisme està lligat, al menys en part, al d'elles. Són cèl.lules amb un citoplasma poc abundant, pocs mitocondris i un petit aparell de Golgi. Recents estudis suggereixen que les cèl.lules glials regulen determinats aspectes del desenvolupament, maduració i manteniment de les sinapsis.

Una qüestió encara sense resoldre és quin és el paper de les cèl.lules glials en la formació dels contactes sinàptics. Les neurones poden formar sinapsis sense glia, però Mauch i col.laboradors (2001) han demostrat recentment que el colesterol provinent de cèl.lules glials és necessari perquè es doni el massiu increment del nombre d'aquestes que esdevé postnatalment, així com per millorar la eficàcia sinàptica.

D'altra banda, les sinapsis recentment formades han de patir un procés de maduració, procés de maduració que dona lloc a que cada contacte sinàptic presenti unes propietats de transmissió sinàptica específica. Treballs recents mostren que senyals derivats de la glia estan regulant aquest procés, regulant la diferenciació postsinàptica, a través de factors solubles i factors dependents del contacte (Pfrieger i Barres, 1997; Nägler et al., 2001). Blondel i col.laboradors (2000) han proposat que les cèl.lules glials poden estar regulant l'agrupament de receptors postsinàptics a través d'un factor neurotròfic dependent d'activitat i s'ha demostrat que isoformes de l'agrina amb activitat de agrupament de receptors a la membrana postsinàptica o *clustering* poden ser alliberades per les cèl.lules de Schwann durant el desenvolupament i després d'una lesió (Yang et al., 2001).

Les cèl.lules de Schwann envolten el terminal nerviós dels axons motors a les NMJs aïllant-lo de l'ambient i proporcionant-li substàncies tròfiques. Aquestes cèl.lules de Schwann terminals (TSCs de l'anglès *Terminal Schwann Cells*) són molt importants en la reparació de les sinapsis després d'una lesió ja que extenen prolongacions que guien als axons en regeneració (Son i Thompson, 1995a). Aquestes prolongacions s'extenen des dels llocs sinàptics més propers induint als terminals nerviosos sans a créixer i reinnervar el lloc lesionat (Son i Thompson, 1995b). Moltes observacions indiquen que tenen també una funció fonamental en el normal manteniment de les NMJs. Actuen com a sensors de l'activitat sinàptica. Tenen receptors muscarínics d'acetilcolina (mAChRs) que uneixen a l'acetilcolina alliberada pel terminal axònic (Robitaille et al., 1997). Com a conseqüència dels segons missatgers induïts per l'activació dels mAChRs, i de l'acció d'aquests

sobre els magatzems de calci intracel·lular, l'activitat sinàptica té com a resultat una elevació del calci a l'interior de les TSCs (Jahromi et al., 1992). Aquest calci intracel·lular regula l'expressió de determinats gens: el blocatge de l'alliberament de neurotransmissor regula positivament l'expressió de la proteïna glial fibrilar àcida, important en la formació de les prolongacions abans esmentades (Georgiou et al., 1994). A més a més, les TSCs poden modificar l'arquitectura de les NMJs (Trachtenberg i Thompson, 1997).

A diferència de les cèl·lules de Schwann en contacte amb les porcions preterminals de l'axó, les TSCs no formen beines de mielina, de tal manera que el terminal nerviós no està mielinitzat. Aquests dos tipus de cèl·lules de Schwann provenen dels mateixos progenitors però difereixen estructuralment i expressen diferents gens; per exemple, les cèl·lules de Schwann formadores de mielina són riques en la proteïna bàsica de la mielina i pobres en N-CAM, a la inversa de les cèl·lules de Schwann terminals (Mirsky i Jessen, 1996).

(4) Làmina basal sinàptica

La làmina basal que envolta la fibra muscular passa a través de la fenedura sinàptica, i s'extèn dins els plecs. Els components majoritaris de la làmina basal muscular són similars als de qualsevol làmina basal ubicada a d'altres localitzacions: col·làgena IV, laminina, entactina, i proteoglicans. Cal remarcar però, que les regions sinàptiques i extrasinàptiques de la làmina basal de les fibres musculars són diferents en quan a la composició d'isoformes d'aquests components. Així, la diferència rellevant entre làmina basal sinàptica i extrasinàptica radica en l'especificitat d'alguns elements entre els quals són de destacar l'acetilcolinesterasa (Hall, 1973), una sèrie de gliconjugats (Scott et al., 1988), el factor de creixement dels fibroblastes 2 (FGF2) (Dai i Peng, 1995) i dues molècules de senyalització, agrina (McMahan, 1990) i neuregulina (Jo et al., 1995). Aquestes molècules específiques de la làmina basal sinàptica participen en el desenvolupament i manteniment de l'estructura sinàptica o en la correcta neurotransmissió.

3. Sinaptogènesi

Es defineix com sinaptogènesi, el procés mitjançant el qual es formen les sinapsis, estructures especialitzades en la transmissió de la informació entre neurones o entre neurones i cèl·lules musculars.

3.1 Diferenciació presinàptica

Durant el desenvolupament, abans de que es doni el contacte entre la motoneurona i la fibra muscular, el con de creixement de la motoneurona pot alliberar neurotransmissor en resposta a l'estimulació elèctrica (Young i Poo, 1983; Hume et al., 1983) i, en conseqüència, la transmissió neuromuscular, tant espontània com evocada, comença minuts després del contacte amb el múscul (Kidokoro i Yeh, 1982; Chow i Poo, 1985; Evers et al., 1989). Els següents dies, al mateix temps que la membrana postsinàptica va madurant, el terminal presinàptic es diferencia dramàticament: les vesícules sinàptiques incrementen en nombre i es perden els elements del citoesquelet característics de l'axó, es formen les zones actives, les vesícules sinàptiques s'agrupen en elles i el terminal nerviós esdevé polaritzat (Kelly i Zacks, 1969; Takahashi et al., 1987; Ko, 1985; Buchanan et al., 1989; Lupa i Hall, 1989). Aquests canvis, acompanyats d'un increment paral·lel en àrea i volum sinàptic, porten associat un gran increment de la freqüència d'exocitosi espontània i del nombre de vesícules de neurotransmissor alliberades en resposta a l'estimulació (Dennis, 1981).

Les especialitzacions pre-sinàptiques que es formen en zones de contacte amb el múscul, tant en músculs reinnervats com en co-cultius de nervi-múscul, requereixen per a la seva organització de factors provinents de la cèl·lula diana. No es coneixen fins al moment els factors que estimulen la diferenciació presinàptica, però hi ha tres proteïnes presents en la làmina basal sinàptica que sembla que poden estar implicades: el factor de creixement dels fibroblastes 2 (FGF2) que estimula l'agrupament local de les vesícules sinàptiques quan és aplicat a neurites (Dai i Peng, 1995), determinats substrats que contenen agrina (Campagna et al., 1995, 1997) i també, certes isoformes sinàptiques de laminina que causen inhibició del creixement de neurites i l'acumulació de vesícules sinàptiques (Porter et al., 1995; Patton et al., 1995; Chang et al., 1997). A partir d'estudis *in vitro*, han sorgit d'altres candidats: les neurotrofines, que són unes proteïnes alliberades per les fibres musculars i que estan actuant a través del receptor trkB, en el manteniment dels agrupaments d'AChRs postsinàptics (González et al., 1999) i que a la vegada incrementen l'eficàcia de l'alliberament de neurotransmissor en sinapsis acabades de formar (revisat per Lu i Figurov, 1997; Fitzsimonds i Poo, 1998). A més a més, nombrosos agents tròfics i molècules d'adhesió cel·lular expressats pel múscul promouen la diferenciació de motoneurons aïllades (Dai i Peng, 1995; revisat per Oppenheim, 1996). No obstant, no hi ha cap evidència de que algun d'aquests factors sigui crític *in vivo* pels estadis inicials de la diferenciació presinàptica. Per altra banda, la maduració dels terminals nerviosos, està greument afectada en ratolins mutants als que els hi falta la proteïna laminina $\beta 2$, encara que els estadis inicials de diferenciació no es veuen afectats (Noakes et al.,

1995). En ratolins knock out (ko) per N-CAM o FGF5, es detecten alguns defectes neuromusculars (Moscoso et al., 1998). En ratolins *ko* per l'agrina, es veu afectada la diferenciació presinàptica, però aquest defecte és aparentment secundari al blocatge de la diferenciació postsinàptica: en absència d'agrina, els miotubs no sintetitzen un factor retrògrad no caracteritzat (Burgess et al., 1998). Sembla, que totes aquestes molècules actuen, al menys en part, disparant un increment de calci intracel·lular (Dai i Peng, 1993). A més a més, les sinapsines, proteïnes associades a les vesícules que modulen l'alliberament de neurotransmissor, poden regular la maduració funcional i estructural dels terminals motors (Lu et al., 1996). En resum, totes aquestes evidències mostren que la diferenciació presinàptica segueix una regulació multifactorial.

Paral·lelament amb l'organització estructural del component presinàptic aquest va desenvolupant les seves característiques funcionals. Tant en els animals adults com en els que s'estan desenvolupant, la transmissió neuromuscular i l'activitat sinàptica depenen d'una forma important de l'entrada de calci des del medi extracel·lular mitjançant els canals de calci dependents de voltage (VDCC) (Katz i Miledi, 1970). S'ha demostrat que els VDCC tipus P/Q, L i N participen en la neurotransmissió de les NMJ dels animals recent nascuts (Sugiura i Ko, 1997; Rosato-Siri i Uchitel, 1999; Santafé et al., 2001). En els terminals nerviosos de motoneurons de mamífers adults, l'alliberació d'acetilcolina és mediada gairebé exclusivament pel calci que entra a través dels VDCC del tipus P/Q (Uchitel et al., 1992; Protti i Uchitel 1993; Bowersox et al., 1995; Hong i Chang, 1995).

3.2 Diferenciació postsinàptica

Durant molt de temps el rol del terminal nerviós ha estat considerat fonamental en l'organització de la sinaptogènesi durant el desenvolupament de la unió neuromuscular. Experiments *in vitro* mostren que durant la formació dels contactes sinàptics els nervis motors no van a contactar amb els agrupaments d'acetilcolina que ja s'han format prèviament de manera espontània, sino que és a l'àrea de la fibra muscular on contacten a on indueixen la formació de nous agrupaments de receptors (Frank i Fischbach, 1977; Anderson i Cohen, 1977). És a dir, les sinapsis no es formaran als agrupaments d'AChRs que s'han format espontàniament sinó que només es donaran allà on el terminal nerviós contacta amb la fibra muscular induint nova síntesi i agrupament d'AChRs. Posteriors estudis fets *in vivo* van mostrar que l'agrina z alliberada pels terminals nerviosos (Gautam et al., 1996; Burgess et al., 1999) s'uneix al seu receptor MuSK activant-lo i es promou així l'agrupament dels AChRs (DeChiara et al., 1996; Glass et al., 1996). A

més a més, l'activació de MuSK per sobreexpressió d'agrina indueix la formació d'un aparell postsinàptic aneural (Jones et al., 1997). Malgrat que cada vegada es preveia més consolidat aquest context de dependència del terminal nerviós en la diferenciació postsinàptica, recentment nous estudis han obert qüestions respecte al paper de l'agrina en particular i els terminals nerviosos en general en les etapes inicials de la diferenciació postsinàptica. S'ha trobat que *in vivo* els agrupaments d'AChRs es formen espontàniament en absència de nervis intramusculars i/o agrina (Harris, 1981; Yang et al., 2001). Els mateixos estudis conclouen que MuSK és indispensable per aquesta formació de agrupaments d'AChRs independentment de la innervació (Lin et al., 2001; Yang et al., 2001) i que un cop formats aquests agrupaments de receptors colinèrgics es dispersen més ràpidament en músculs innervats per axons deficientes en agrina que en músculs aneurals. Totes aquestes darreres troballes porten a la hipòtesi de que la diferenciació postsinàptica s'inicia de manera independent del terminal nerviós i posteriorment el terminal, gràcies a l'agrina, estabilitza als AChRs presents a l'àrea sinàptica i desestabilitza als extrasinàptics, no estabilitzats per l'acció directa de l'agrina.

Els gens de les diferents subunitats dels AChRs s'expressen a baix nivell als mioblastes. Quan aquests es fusionen per formar miotubs aquesta expressió s'incrementa com a part del programa miogènic que porta a la formació de l'aparell contràctil. Les subunitats dels AChRs són traduïdes i insertades a la membrana plasmàtica (Merlie, 1984a). Abans de la innervació de la fibra muscular en desenvolupament, els transcrits de les diferents subunitats que conformen els AChRs són expressats per tots els nuclis de la cèl.lula muscular aneural. En músculs madurs, com ja s'ha citat anteriorment, la densitat d'AChRs sinàptics és superior a $10000/\mu\text{m}^2$ i decau fins a aproximadament $10/\mu\text{m}^2$ a menys d'una dècima de micròmetre (10^{-7} metres) del final del terminal nerviós. S'han de produir tres processos fonamentals per a que tingui lloc aquesta redistribució d'AChRs i s'ha trobat fins al moment que aquests estan controlats pel terminal nerviós a través de diferents mecanismes: (1) Activació de la transcripció dels gens de les subunitats dels AChRs als nuclis subsinàptics. (2) Repressió de la transcripció dels gens de les subunitats dels AChRs als nuclis extrasinàptics. (3) Agrupament dels AChRs a la membrana postsinàptica o *clustering*.

En quant al **primer procés**, els nuclis subsinàptics transcriuen els gens de les diferents subunitats dels AChRs molt més activament que els nuclis no sinàptics (Merlie i Sanes, 1985; Goldman i Staple, 1989; Klarsfeld et al., 1991; Sanes et al., 1991; revisat per Duclert i Changeux, 1995), la qual cosa suggereix que el terminal nerviós està proporcionant un senyal estimulador de la transcripció d'aquests gens. S'han proposat dues molècules com a senyal derivat del nervi: el pèptid

relacionat amb el gen de la calcitonina (CGRP) i una neuregulina. L'aplicació de CGRP a cultius de miotubs estimula la síntesi d'AChRs (New i Mudge, 1986; Fontaine et al., 1986, 1987). Al 1986, Fisbach i Usdin van aïllar una molècula que estimula l'acumulació de AChRs en cultiu. Aquesta molècula es denomina ARIA (de les sigles en anglès *Acetylcholine Receptor Inducing Activity*). És una proteïna de matriu extracel·lular d'aproximadament 42 kDa. El clonatge d'aquesta molècula (Falls et al., 1993) va deixar veure que es tracta d'una neuregulina (NRG-1) que pertany al grup de factors de creixement neurotròfics que són lligands naturals d'alguns dels membres de la família de receptors del factor de creixement epidèrmic (EGF) denominats ErbBs (revisat per Carraway i Burden, 1995). Tant la neuregulina com el CGRP són sintetitzats per diferents tipus cel·lulars, incloent a les neurones motores, on són sintetitzats al soma, transportats pels axons motors alliberats pel terminal nerviós i incorporats a la làmina basal sinàptica (Goodearl et al., 1995; Loeb i Fischbach, 1995). La identificació d'ARIA com a neuregulina i el fet de que erbBs s'expressin i es trobin concentrats a la membrana postsinàptica (Zhu et al., 1995; Trinidad et al., 2000) suggereix que ARIA estimula la transcripció de les subunitats dels receptors colinèrgics a través de l'activació dels receptors erbBs. Anteriorment hem comentat que els AChRs són pentàmers amb la següent composició de subunitats: $\alpha_2\beta\epsilon\delta$. No obstant, aquesta composició de subunitats està sotmesa a canvis durant el desenvolupament. S'ha descrit que és després del naixement quan es comença a expressar la subunitat ϵ , presentant embrionàriament els AChRs la següent composició: $\alpha_2\beta\gamma\delta$ (Kues et al., 1995). La subunitat γ dels AChRs és expressada pels nuclis de les cèl·lules musculars embrionàriament mentre que l'expressió de la subunitat ϵ és induïda després del naixement (Kues et al., 1995), sent aquesta última subunitat, distintiva dels AChRs de l'aparell postsinàptic madur. El canvi de subunitat produeix un profund efecte en la conductància dels receptors durant la transmissió de l'impuls sinàptic. L'expressió de la subunitat ϵ només es dona si existeix innervació de la cèl·lula muscular i és exclusiva dels nuclis sinàptics (Goldman i Staple, 1989; Kues et al., 1995). Hi ha evidències de que són les neuregulines (entre elles ARIA), les molècules que estan induint l'expressió de la subunitat ϵ , ja que si s'afegeixen neuregulines a miotubs en cultiu, la seva expressió es veu incrementada 10 vegades (Martinou et al., 1991; Falls et al., 1993; Chu et al., 1995). En base a que les neuregulines actuen a través dels receptors erbB, s'han iniciat estudis per conèixer els passos que porten a l'activació dels gens de les subunitats dels AChRs. En cultiu, les quinases erbB inicien una cascada de quinases (incloent ras, raf, erk,...) (Tansey et al., 1996; Si et al., 1996; Altioek et al., 1997) que activen la transcripció dels gens dels AChRs als nuclis sinàptics. Recentment, s'ha demostrat que Cdk5 (de l'anglès *Cyclin-dependent kinase 5*), una serin/treonina quinasa que té importants rols durant el desenvolupament del sistema nerviós central (Oshima et al., 1996; Chae et al., 1997; Kwon i Tsai, 2000) i durant la regeneració muscular (Fu et al., 2002) té una

important funció en la regulació de l'expressió de les diferents subunitats dels AChRs a la sinapsi neuromuscular (Fu et al., 2001). Cdk5 s'expressa i es troba concentrada a les unions neuromusculars tant embrionàriament com a l'edat adulta, i resultats d'Ip i col.laboradors mostren com Cdk5, p35 i ptaire1 són indispensables com a reguladors de la via de senyalització iniciada per les neuregulines (Fu, 2001; Cheng et al., 2002).

En quant al **segon procés**, gairebé simultàniament a l'agrupament dels AChRs al lloc sinàptic (procés del que es parlarà a continuació), la densitat d'AChRs extrasinàptica comença a disminuir. Se sap però que la densitat d'AChRs extrasinàptica torna a incrementar després d'una denervació com a resultat d'una activació de la transcripció per part dels nuclis extrasinàptics (Merlie et al., 1984b; Tsay i Schmidt, 1989). Tot això indica que l'activitat elèctrica de les fibres musculars té un efecte repressiu de l'expressió dels gens dels AChRs per part dels nuclis extrasinàptics (Goldman et al., 1988). El terminal nerviós controla la densitat extrasinàptica d'AChRs mitjançant un mediador químic (el neurotransmissor) i el mecanisme que fa servir es la pròpia transmissió sinàptica. Els AChRs estan subjectes a una regulació negativa pel seu lligand, amb els efectes negatius exercits a distància, sent els receptors sinàptics els responsables de l'inici del senyal, i a l'hora immunes als efectes repressius de l'activitat. Així, l'alliberament d'ACh activa els AChRs disparant-se un potencial d'acció que propaga el senyal repressiu al llarg de la cèl.lula muscular, incrementant-se així els nivells de calci citosòlic (calci que prové del reticle sarcoplasmàtic i també del medi extracel.lular). El calci activa la contracció muscular i reprimeix la transcripció dels gens dels AChRs en els nuclis extrasinàptics (Huang et al., 1994a; Adams i Goldman, 1998). La diana clau per l'expressió dels gens dels AChRs és la proteïna quinasa C (PKC) (Klarsfeld et al., 1989; Huang et al., 1992). Aquesta serin treonina quinasa s'activa per calci i fosfolípids, de tal manera que pot ser activada directament per l'influx de calci o indirectament gràcies al diacilglicerol (DAG) produït per l'increment de calci citoplasmàtic. Les dianes crítiques de la PKC són a la vegada factors miogènics activadors de la transcripció que són necessaris per la iniciació del programa miogènic. Aquests factors (myoD, myf5, MRF4 i miogenina) s'uneixen a una seqüència denominada E-box als gens de les subunitats dels AChRs (Bessereau et al., 1998). Aquestes seqüències E, confereixen expressió dependent d'activitat (Piette et al., 1990; Walke et al., 1996a, b). La fosforilació dependent d'activitat dels factors miogènics, per part de la PKC, inactiva a aquests factors i com a conseqüència hi ha una anulació de l'expressió dels gens de les subunitats dels AChRs (Eftimie et al., 1991, Huang et al., 1994b).

Respecte al **tercer procés**, i com ja hem comentat anteriorment, els AChRs que estan inicialment uniformement distribuïts per la membrana dels miòcits s'agrupen donant lloc a les estructures característiques que conformaran l'aparell postsinàptic. S'han buscat proteïnes implicades en aquest procés d'agrupament trobant-se finalment l'agrina com a molècula crítica organitzadora de la diferenciació postsinàptica derivada del terminal nerviós (McMahan, 1990). A més, la isoforma α de l'agrina (denominada B en aus) és la necessària per l'activitat de *clustering* (Ruegg et al., 1992; Ferns et al., 1992; Hoch et al., 1993; Gesemann et al., 1995). Estudis de guany i pèrdua de funció suporten aquesta hipòtesi, veient-se la diferenciació postsinàptica profundament afectada en ratolins ko per l'agrina (Gautam et al., 1996; Burgess et al., 1998). El millor candidat a receptor de l'agrina, és una proteïna transmembrana tirosina quinasa que s'expressa selectivament a múscul esquelètic on colocalitza amb els AChRs (Valenzuela et al., 1995; Ganju et al., 1995). Aquesta proteïna és MuSK (de l'anglès *Muscle-Specific receptor tyrosine Kinase*). Els ratolins ko per MuSK presenten defectes neuromusculars similars als que presenten els ko per l'agrina (DeChiara et al., 1996), però ha estat impossible demostrar la unió d'agrina purificada a MuSK (purificada o expressada en cèl.lules no musculars) el que suggereix que MuSK és només una subunitat d'un receptor multimèric amb d'altres subunitats necessàries per la unió de l'agrina (Glass et al., 1996). Un altre efector crític pel *clustering* dels receptors és una proteïna citoplasmàtica de 43 kDa denominada rapsina (Frail et al., 1987). Colocalitza amb els AChRs una vegada s'han format els agrupaments i és present en una estequiometria 1:1 a les NMJs adultes. S'ha demostrat que la rapsina pot unir-se directament als AChRs (Burden et al., 1983; Sealock et al., 1984; Noakes et al., 1993). Si es coexpressen en sistemes heteròlegs rapsina i AChRs, aquests últims s'agrupen (Froechner et al., 1990; Phillips et al., 1991). En ratolins ko per la rapsina, no es formen agrupaments d'AChRs i tampoc es formen en miotubs mutants en cultiu encara que sigui afegida agrina al medi (Gautam et al., 1995). Tot i que hi ha estudis que situen a l'agrina, a MuSK i a la rapsina a la mateixa via de *clustering*, encara queden qüestions obertes (Gillespie et al., 1996; Apel et al., 1997; Ferns et al., 1996; Montanaro et al., 1998). A més, recentment ha estat demostrat que les tirosines quinases Abl actuen com a mediadors crítics del *clustering* dependent d'agrina i MuSK (Finn et al., 2003). Cal afegir que, tot i que és aquesta la via de *clustering* predominant, recents estudis han revelat que els agrupaments primerencs es poden formar de manera independent del terminal nerviós i l'agrina (Lin et al., 2001) i posteriorment l'agrina α a través de MuSK i rapsina proporciona un *clustering* adicional i localitzat sota el terminal nerviós (revisat per Willmann i Fuhrer, 2002).

Un cop que els pentàmers d'AChR queden agrupats en el lloc sinàptic, comença una reestructuració dels mateixos que comporta un canvi en la morfologia de l'agrupament. Aquests agrupaments de receptors d'acetilcolina colinèrgics pateixen un canvi morfològic gradual passant d'ocupar un àrea uniforme i ovalada a ocupar-ne una que segueix un patró de branques, no homogènia en quant a la densitat d'AChRs (Slater i col 1982 a i b; Balice-Gordon i Lichtman, 1993; Gan i Lichtman, 1998; Sanes i Lichtman, 1999). Seguint criteris iniciats per altres investigadors (Steinbach, 1981; Slater, 1982a, b; Bewick i cols, 1996) les morfologies adoptades pels agrupaments de receptors van ser classificades en 6 tipus diferents, sent M1 la morfologia més immadura i M6 la morfologia madura (Lanuza et al., 2002) (**Figura 2**):

M1: Van ser classificats com M1 tots els agregats corresponents a una placa de forma oval i uniforme en densitat d'AChRs. S'observa una porositat uniformement distribuïda dins la placa.

M2: La placa s'ha anat elongant i comencen a aparèixer zones no tan homogènies en la densitat d'AChRs. L'augment de densitat d'AChR apareix localitzat en línies estretes dins la placa.

M3: Placa oval en la que ja apareixen zones sense receptors: "forats". Aquestes zones lliures de receptors no estan innervades.

M4: La placa oval s'ha transformat, seguint ara un patró de branques, amb zones d'alta i baixa densitat de receptors. Els "forats" acostumen a estar recoberts de línies riques en AChRs.

M5: Patró de branques millor definit amb regions amb alta, baixa i nul·la densitat de AChRs. Les regions amb alta densitat, estan en contacte amb branques terminals d'axons, mentre que hi ha regions no innervades.

M6: Patró discontinu d'AChRs, que segueix un patró de branques fragmentades.

4. Innervació polineuronal i eliminació sinàptica

Durant el desenvolupament de les NMJ dels vertebrats (a excepció dels peixos), les fibres musculars estan innervades per més d'un axó motor en una sola àrea sinàptica (Redfern, 1970; Brown et al., 1976). Aquests contactes redundants seran eliminats tots excepte un durant la primerenca vida postnatal, en un procés denominat eliminació sinàptica (Benoit i Changeux, 1975;

O'Brien et al., 1978). En el conjunt del sistema nerviós, l'eliminació sinàptica refina les connexions existents entre cèl·lules pre- i postsinàptiques d'una manera que pot ser vista com un mecanisme que elimina connexions inicials difoses i redundants de molts circuits sinàptics. Aquest fenomen no és una conseqüència de la mort fisiològica d'un elevat nombre de neurones que té lloc durant el desenvolupament embrionari i que també ocasiona una disminució de la connectivitat sinàptica.

La desconexió axonal que té lloc durant l'etapa postnatal implica una interdependència entre els terminals axònics que condiciona el destí dels mateixos. Això ho confirma el fet que durant el procés d'eliminació sinàptica no s'hagi detectat cap cèl·lula diana que hagi perdut tots els seus axons innervants (revisat per Brown et al., 1976). Des d'aquest punt de vista, els axons que innerven una mateixa àrea sinàptica són competidors. Entendre el procés d'eliminació sinàptica postnatal requereix conèixer quines són les característiques dels axons que els permeten competir entre ells i quines són les interaccions que causen pèrdua d'unes connexions i manteniment d'unes altres, punts que intentarem explicar en aquesta introducció.

La innervació polineuronal a la NMJ dels mamífers s'origina per convergència de varis axons motors de diferents motoneurons en una fibra muscular individual al mateix lloc sinàptic (innervació polineuronal focal). Durant el procés d'eliminació, es dona la retracció d'aquests axons redundants de cada lloc sinàptic sense que hi hagi una reducció en el nombre total de sinapsis, motiu pel qual, el terme d'eliminació sinàptica no és del tot correcte, sinó que s'hauria de parlar d'eliminació d'axons.

El procés d'eliminació sinàptica és gradual en dos aspectes. En primer lloc, dins un mateix múscul, l'eliminació sinàptica es dona progressivament en el temps; prenent d'exemple el múscul Diafragma de rata, aproximadament d'un 5 a un 15% de fibres musculars esdevenen monoinnervades cada dia postnatal, fins el dia postnatal 15, quan totes estan monoinnervades (Redfern, 1970). La transició d'innervació múltiple a monoinnervació és també gradual dins una mateixa NMJ. És a dir, cada NMJ perd la innervació múltiple gradualment, de manera que les àrees ocupades pels axons competidors en la mateixa NMJ són aproximadament iguals al naixement però paulatinament tots els axons excepte un van perdent territori fins a desaparèixer (Balice-Gordon i Lichtman, 1993). És interessant ressaltar que recentment s'ha descrit que un minoritari percentatge de sinapsis no segueixen estrictament aquest patró i, en aquests casos, un terminal que havia perdut territori el pot tornar a recuperar i desplaçar al seu competidor (Walsh i Lichtman, 2003). Durant el procés d'eliminació també divergeixen les forces sinàptiques dels terminals nerviosos, podent parlar

d'un axó fort o gran i un axó feble o petit (Colman et al., 1997; Santafé et al., 2001). L'observació de que diferents branques axonals provinents d'un mateix soma poden ser trobades a un mateix temps en diferents estadis d'eliminació quan innerven fibres musculars veïnes (Keller-Peck et al., 2001), sembla indicar que el balanç de pèrdua i guany a cada NMJ no ve determinat, al menys totalment, pel soma neuronal, sinó que s'estableix localment en el lloc de contacte sobre la fibra muscular, podent ser aquesta cèl.lula intermediària en el procés.

Molts experiments han mostrat que alteracions en l'activitat neuromuscular afecten a la taxa d'eliminació sinàptica (Benoit i Changeux, 1975; Thompson et al., 1979; Brown et al., 1982; Duxon et al., 1982; Thompson, 1983, Thompson, 1985). L'activitat elèctrica afecta a la intensitat de la competició de manera que el bloqueig de l'activitat sinàptica o una excessiva estimulació, endarrereixen o acceleren respectivament l'eliminació sinàptica (Thompson et al., 1979; Brown et al., 1982; Ribchester i Taxt, 1983; Barry i Ribchester, 1995; O'Brien et al., 1978; Thompson, 1983; Duxon i Vrbova, 1985; Vyskocil i Vrbova, 1993). Això indica que existeix una correlació positiva entre la taxa d'eliminació sinàptica i el nivell d'activitat. A més, si es bloca la neurotransmissió únicament en determinades parts de la sinapsi es produeix eliminació sinàptica als llocs inactius (Balice-Gordon i Lichtman, 1994). Aquests experiments van reforçar la idea de que les neurones motores amb una major activitat tenen avantatge sobre les seves competidores a l'hora que demostraven que és necessària una diferència local d'activitat per a que comenci el mecanisme d'eliminació. Aquesta conclusió concorda amb altres experiments (Ribchester i Taxt, 1983), encara que tanmateix, contradiu la interpretació d'altres experts (Callaway et al., 1987, 1989; Barber i Lichtman, 1999) en els que es van trobar alteracions que responien a un avantatge competitiu per les neurones motores menys actives. Sorprenentment, estudis recents suggereixen la idea que l'activitat no seria el factor conductor de l'eliminació sinàptica en circumstàncies normals sinó que el seu paper seria molt més subtil (Buffelli et al., 2003; Kasthuri i Lichtman, 2003).

La probabilitat d'alliberament del neurotransmissor difereix en els axons innervants en competició i contribueix a augmentar la disparitat en el contingut quàntic observada conforme va tenint lloc la competició (Kopp et al., 2000). Aquest canvi presinàptic, que precedeix a la retirada dels axons, pot ser explicat per la modulació de la neurotransmissió ocasionada per receptors muscarínics presinàptics (Santafé et al., 2003 i 2004)

Paral·lelament a la pèrdua gradual d'axons tenen lloc canvis en l'estructura de l'aparell postsinàptic. Com s'ha detallat a l'apartat de desenvolupament postsinàptic d'aquesta introducció,

la placa oval d'AChRs uniformement distribuïts es transforma en una estructura molt més complexa. Aquesta transició sembla estar directament relacionada amb el procés d'eliminació sinàptica ja que dins d'un mateix múscul en desenvolupament, les sinapsis que encara estan múltiplesment innervades tenen plaques postsinàptiques més senzilles que les que ja estan monoinnervades (Balice-Gordon i Lichtman, 1993). Encara que estudis previs havien mostrat que la pèrdua gradual de branques axonals en una NMJ anava acompanyada d'una gradual pèrdua d'AChR a les mateixes localitzacions sinàptiques (Rich i Lichtman, 1989; Balice-Gordon i Lichtman, 1993), estudis més recents han mostrat que la pèrdua axonal pot produir-se sense detectar canvis en la distribució dels AChRs subjacents (Lanuza et al., 2002; Walsh i Lichtman, 2003). Quan hi ha reorganització d'AChRs a la membrana postsinàptica, aquesta va acompanyada per una reorganització paral·lela de molècules associades a aquests receptors, com per exemple la rapsina (Culican et al., 1998).

Donada la capacitat de la fibra muscular per realitzar canvis en els AChRs en els llocs on es perdran els terminals nerviosos s'ha argumentat que siguin alteracions en la cèl·lula postsinàptica les que causin la retirada del terminal nerviós (Balice-Gordon i Lichtman, 1993). L'observació de que quan es bloca amb α -bungarotoxina una petita regió de l'àrea de la NMJ, la densitat dels AChRs postsinàptics en el lloc sinàptic inactiu es perd de la mateixa manera que ho fan els terminals nerviosos situats a sobre d'aquesta regió juntament amb la observació que si el bloqueig és de tota la NMJ no hi ha pèrdua de cap tipus (Balice-Gordon i Lichtman, 1994), va portar a concloure que el senyal d'eliminació ocasionava una disminució de la densitat dels AChRs postsinàptics sota l'axó inactiu que el portaria finalment a retirar-se de la NMJ.

La idea que terminals nerviosos actius poden desestabilitzar a d'altres inactius o menys actius a través d'un mecanisme postsinàptic suggereix l'existència d'un model complex basat en la competició dependent de l'activitat i que requereix senyals anterògrads, intersinàptics i retrògrads. Jennings (1994) va proposar que la transmissió sinàptica produeix dos tipus de senyals, un protector i localitzat i un altre no tan localitzat i desestabilitzador. Encara que no es coneixen les identitats dels senyals de protecció o desestabilització, s'ha proposat que la fibra muscular podria proporcionar un factor tròfic en quantitats limitades pel qual estarien competint els axons, factor denominat sinaptotrofina per Snider i Lichtman (1996). Diversos factors de creixement han mostrat tenir efectes sobre l'eliminació sinàptica (revisat per Nguyen i Lichtman, 1996), però el factor neurotròfic derivat de la glia (GDNF) és el que fins al moment ha mostrat els efectes més

importants (Nguyen et al., 1998). S'ha trobat també que en animals deficients en TrkB, els miòcits presenten desestructuració de les NMJ i pèrdua de terminals nerviosos (González et al., 1999).

Vrbovà i col.laboradors (O'Brien et al., 1978) van ser els primers en suggerir com a agent desestabilitzador a les proteases. Més recentment, Nelson i col.laboradors han realitzat amplis estudis que han portat a valorar les proteases i, en particular la serin proteasa trombina com un agent desestabilitzador important en la NMJ (Nelson et al., 2003).

4.1. Les serin proteases en el fenomen plàstic de l'eliminació sinàptica

Diferents treballs mostren que tant les proteases com els seus inhibidors estan implicats en moltes activitats neurals com són el creixement de neurites, la mobilitat del con de creixement neural i el dany neuronal (Gurwitz i Cunningham, 1988; Monard, 1988; Jalink i Moolenaar, 1992; Suidan et al., 1992; Ishii et al., 1994; Vaughan et al., 1995; Smith-Swintosky et al., 1995; Grand et al., 1996). Experiments realitzats l'any 1986 per Connold i col.laboradors van suggerir que les proteases podien tenir una funció important en la remodelació de les sinapsis neuromusculars, havent-se formulat una hipòtesi implicant l'acció de serin proteases activades per calci sobre el mecanisme d'eliminació sinàptica a la unió neuromuscular (Van Essen et al., 1990). L'any 1995 Vrbovà i col.laboradors van demostrar que la leupeptina i altres inhibidors de proteases blocaven el procés d'eliminació sinàptica a les NMJ (Tyc i Vrbovà, 1995).

Experiments realitzats al laboratori del Dr. Nelson (*Laboratory of Developmental Neurobiology, National Institute of Child Health and Human Development, National Institutes of Health*) en co-cultius de neurones del gangli superior cervical (SCG) i miotubs de ratolins van mostrar que la hirudina, inhibidor específic de la trombina i la proteïna nexina-1 (PN-1), inhibidor natural de proteases, bloquen el procés d'eliminació sinàptica dependent d'activitat (Liu et al., 1994a). Aquestes observacions van indicar que la trombina té una important acció en aquest procés. L'acció de la trombina és deguda a la seva acció sobre una família de receptors de proteases acoblats a proteïnes G denominats PARs (de l'anglès *Protease Activated Receptors*). Al 1991, Vu i col.laboradors van clonar el primer receptor de la trombina humana (Vu et al., 1991a, b), mostrant com la trombina interacciona a un lloc específic d'aquest situat al domini amino-terminal extracel·lular, originant així l'aparició d'un nou extrem amino-terminal que actua com un nou lligand el qual s'uneix i activa a la molècula que ha estat trencada prèviament. Molts mecanismes cel·lulars, incloent l'activació de proteïnes quinases, són modulats a través de l'activació del

receptor de la trombina (Vaughan et al., 1995; Hung et al., 1992; Suidan et al., 1992; Pike et al., 1996). Recentment, ha estat demostrat que la trombina és un mediador de l'eliminació sinàptica dependent d'activitat a la NMJ *in vitro* (Jia et al., 1999) i *in vivo* (Zoubine et al., 1996; Lanuza et al., 2001). És a dir, l'acció de la trombina ocasiona una acceleració en l'eliminació dels contactes sinàptics redundants.

Són diverses les evidències de l'existència de la trombina i el seu receptor en el múscul esquelètic. Així, la protrombina (molècula precursora de la trombina) s'expressa a nivell de mRNA en fibres musculars diferenciades, tot i que no s'ha detectat ni en mioblasts ni en cultius primaris de cèl.lules musculars (Kim i Nelson, 1998), sent aquesta expressió màxima al naixement i estant regulada durant el desenvolupament (Suidan et al., 1996b; Kim et al., 1998). De la mateixa manera, l'expressió del receptor de la trombina es detecta en els seus nivells més alts d'expressió al naixement i la seva expressió queda regulada durant el desenvolupament. A diferència de la protrombina, s'ha trobat expressió del receptor de la trombina en mioblastes, estant inhibida aquesta expressió per la fusió d'aquests *in vitro* (Suidan et al., 1996b). Recentment, però, s'ha detectat una expressió significativa en cultius purs de miotubs (Kim, resultats no publicats). A les fibres musculars esquelètiques adultes també es detecta mRNA del receptor de la trombina (Kim et al., 1998), aquest mRNA es troba localitzat a les NMJ, i els nivells d'aquest incrementen ràpidament després d'una denervació (Kim et al., 1998). D'altra banda, s'ha trobat expressió a la NMJ de la proteasa nexina-1 (PN-1), un potent inhibidor natural de serin proteases (Festoff et al., 1991). Aquesta expressió es troba regulada durant el desenvolupament i es manté a les NMJ adultes (Akaaboune et al., 1998).

La trombina actua sobre els receptors de proteases PARs (Vu et al., 1991a; Nystedt et al., 1994; Böhm et al., 1996; Ishihara et al., 1997; Xu et al., 1998). Han estat clonats 4 subtipus d'aquesta família de receptors: PAR-1 (Vu et al., 1991a), PAR-2 (Nystedt et al., 1994; Böhm et al., 1996), PAR-3 (Ishihara et al., 1997) i PAR-4 (Xu et al., 1998), però només tres d'ells (PAR-1, PAR-3 i PAR-4) són activats per la trombina. Encara que tots els PARs s'expressen al cervell adult (Striggow et al., 2001), només ha estat descrit PAR-1 com el receptor que té un paper important durant el desenvolupament (Soifer et al., 1994; Niclou et al., 1998) i la seva expressió ve regulada per aquest (Suidan et al., 1996b; Mbedi et al., 2001). Degut a totes aquestes evidències ens hem plantejat determinar la relació funcional d'aquest receptor a les unions neuromusculars durant el període d'eliminació sinàptica postnatal i la seva localització durant el desenvolupament i a l'adult.

4.1.1. Estructura i mecanisme d'activació dels PARs

La família de receptors PARs són uns receptors de pèptids que pertanyen als receptors tipus GPCRs (de les sigles en anglès *G-protein coupled receptors*) i són activats per proteòlisi (Cairns et al., 1995; Grand et al., 1996; Hollenberg, 1996). Aquests receptors són molt similars als dels neuropèptids i consten –com els clàssics GPCRs– de 7 dominis hidròfobs transmembrana que donen lloc a 3 *loops* intracel·lulars i 3 extracel·lulars, un domini carboxi-terminal intracel·lular i un gran domini amino-terminal extracel·lular, sent dins d'aquest últim domini on es troben els residus essencials pel correcte funcionament del receptor (Vu et al., 1991a) (**Figura 2**).

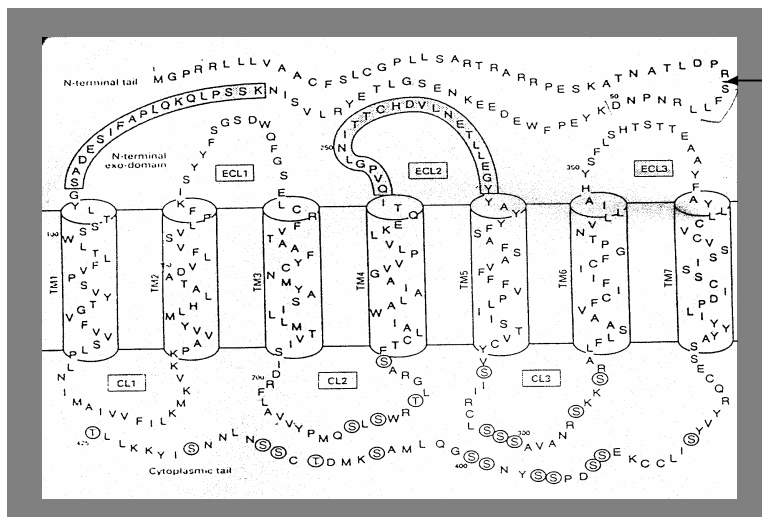


Figura 2. Estructura del receptor de la trombina humana. S'indica el lloc de trencament de la trombina (fletxa), els dominis extracel·lulars (ECL) així com els intracel·lulars (CL). Els aminoàcids encerclats indiquen llocs potencials de fosforilació. Font: Grand et al., 1996.

L'activació d'aquests receptors inclou diferents etapes comunes per a molts receptors. La primera etapa d'activació consisteix en la interacció del lligand i el receptor. Les serin proteases (entre elles la trombina) activen els PARs quan interaccionen amb ells a un lloc específic d'aquest situat al domini amino-terminal extracel·lular, fet que origina l'aparició d'un nou extrem amino-terminal. Aquest nou extrem actua com a nou lligand, el qual s'uneix i activa a la molècula que ha estat trencada prèviament. Dins d'aquest nou extrem amino-terminal generat hi ha una sèrie d'aminoàcids específics (aproximadament uns sis residus) que interactuen amb d'altres dominis del receptor (**Figura 3**). D'aquesta manera els receptors PARs poden ser considerats receptors de pèptids especialitzats: receptors als quals el lligand és una part física de la molècula del receptor (una vegada la molècula del receptor ha estat trencada per una proteasa) (Déry et al., 1998). Una vegada produïda aquesta interacció entre l'extrem amino-terminal acabat de generar i altres parts del mateix receptor, aquest pateix un canvi de conformació que li permetrà la interacció amb

proteïnes G heterotrimètiques presents a la membrana plasmàtica, les quals transduïran el senyal (Déry et al., 1998).

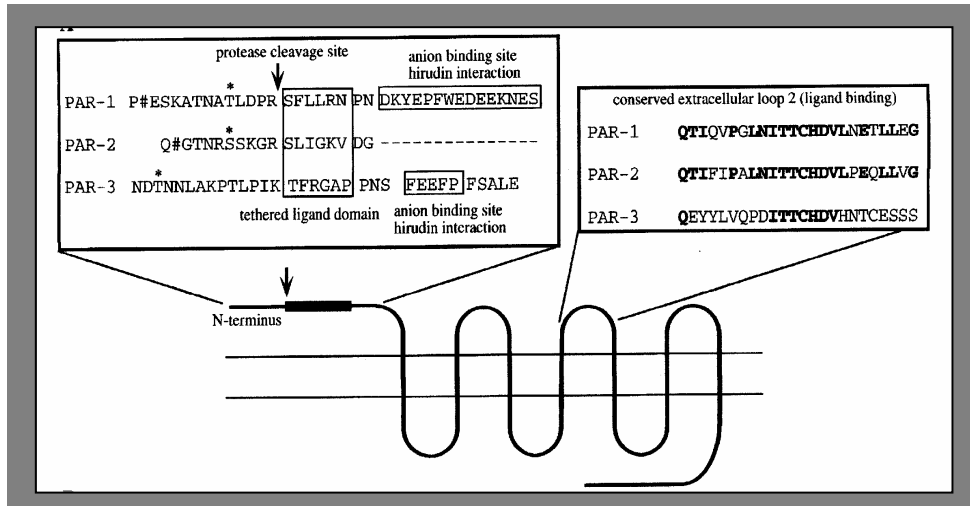


Figura 3. Estructura de PAR-1, PAR-2 i PAR-3. Es mostren seqüències importants localitzades a l'extrem amino terminal i al segon domini extracel·lular. Els residus enquadrats indiquen el nou extrem amino terminal generat després de l'activació del receptor. La fletxa indica el lloc de trencament de la proteasa. Font: Déry et al., 1998.

D'entre tots els PARs clonats fins al moment, PAR-1 és el receptor d'aquesta família més ben estudiat i del qual es coneix bé el seu mecanisme d'activació (**Figura 4**).

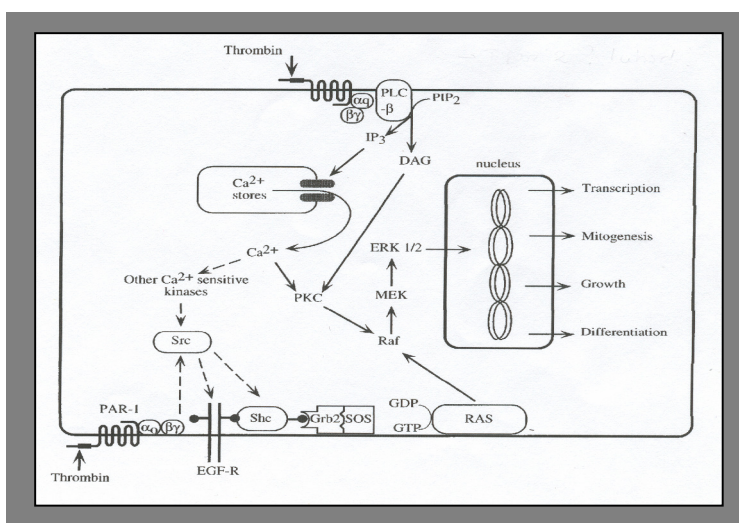


Figura 4. Mecanismes de transducció de senyal dels PARs. PLC, fosfolipasa C; PIP₂, fosfatidilinositol 4,5-bisfosfat; IP₃, inositol trifosfat; DAG, diacilglicerol; ERK, *extracellular signal response kinase*; MEK *mitogen-activated protein kinase*; PKC; EGF, factor de creixement epidèrmic. Font: Déry et al., 1998.

El domini extracel.lular del PAR-1 conté una seqüència d'aminoàcids específica on la proteasa trenca al receptor i d'aquesta manera s'inicia la seva activació. Aquesta seqüència està molt conservada entre espècies, sent en rata la següent seqüència: PNPR⁴¹-S⁴²FFLRN, produïnt-se el trencament de la molècula entre l'arginina 41 (R⁴¹) i la serina 42 (S⁴²F) (**Figura 5**) (Grand et al., 1996). PAR-1 també pot ser activat molt específicament amb el pèptid agonista SFLL (Lanuza et al., 2003) (veure material i mètodes).

Humà	T N A T	<i>L D P R</i>	↓	<i>S F L L R N</i>	P N D	<i>K - Y E P F</i>
Ratolí	T D A T	<i>V N P R</i>		<i>S F F L R N</i>	P S E	<i>N T F E L</i>
Rata	P Y A T	<i>P N P R</i>		<i>S F F L R N</i>	P S E	<i>D T F E Q</i>
Hamster	T D A T	<i>V N P R</i>		<i>S F F L R N</i>	P G E	<i>N T F E L I</i>
Granota	H S N N	<u><i>M T I K</i></u>		<u><i>T R F I F D</i></u>	D S E	<i>S E F E E I</i>
		Domini de reconeixement del lloc de trencament		Domini activador		

Figura 5. Comparació de la seqüència d'aminoàcids d'una part del domini N-terminal extracel.lular de PAR-1. Les seqüències han estat alineades. Amb la fletxa s'indica el lloc de trencament de la trombina. Font: Grand et al., 1996.

D'entre totes les proteases estudiades, s'ha demostrat que la trombina activa a PAR-1, PAR-3 i PAR-4, mentre que la tripsina pancreàtica és l'agonista més potent de PAR-2 (Déry et al., 1998). No obstant, d'altres proteases també poden activar aquests receptors: PAR-1 pot ser activat per la tripsina, la plasmina, la granzima A i la catepsina G a més a més de per la trombina (Suidan et al., 1994; Molino et al., 1995; Vouret-Craviari et al., 1995; Suidan et al., 1996a), PAR-2 pot ser activat a més a més de per la tripsina, per la triptasa i pel factor de coagulació Xa (Corvera et al., 1997; Molino et al., 1997) i encara que el principal activador de PAR-3 és la trombina, el factor de coagulació Xa, la tripsina, l'elastasa i la quimi tripsina també el poden activar (Ishihara et al., 1997).

4.2. El sistema PAR-1/Proteïna G/Proteïna Quinasa C en el procés d'eliminació sinàptica

Com ja s'ha mencionat anteriorment, un dels mecanismes cel·lulars modulats a través del receptor de la trombina és l'activació de proteïnes quinases. A més, s'ha demostrat que la trombina pot afectar al procés de pèrdua sinàptica a través de l'activació de PKC *in vitro* (Jia et al., 1999) i *in vivo* (Lanuza et al., 2001). Resultats del nostre laboratori, han mostrat que l'eliminació sinàptica en múscul de rata neonatal està mediada, al menys en part, per una proteïna G sensible a toxina pertussis i a l'activitat de la PKC que resulta de la cascada de senyalització iniciada per l'activació provocada per la trombina (Lanuza et al., 2001).

La proteïna quinasa C és una serin treonina quinasa implicada en la regulació de molts processos cel·lulars, incloent la funció sinàptica (Nishizuka, 1992). Existeixen 3 classes de PKCs amb diferents característiques bioquímiques, requeriments de substrate i de cofactors. Dins de cada classe s'inclouen diferents isoformes. La classe millor caracteritzada i descoberta en primer lloc, és la classe convencional: cPKC. Dins d'aquesta classe s'engloben les isoformes α , β I, β II i γ . Una segona classe és la classe novel: nPKCs a la que pertanyen les isoformes δ , ϵ , η i θ i la darrera classe, la menys coneguda, és la classe atípica: aPKC, formada per les isoformes λ i ζ (revisat per Newton, 1995). Les diferents isoformes de PKC tenen una particular funció dins un mateix tipus cel·lular. S'ha trobat que la isoforma nPKC θ és una isoforma específica de teixit muscular i està implicada en funcions fisiològiques específiques de múscul esquelètic (Hilgenberg et al., 1996). Aquesta isoforma és regulada postnatalment durant el desenvolupament del múscul esquelètic de rata, amb un increment de la seva expressió durant el període postnatal (Hilgenberg i Miles, 1995) això suggereix que està associada amb la maduració de les NMJ i l'eliminació sinàptica, fet que s'ha tractat de demostrar en aquesta tesi.

La pèrdua d'AChRs pot tenir lloc a les primeres etapes d'eliminació sinàptica (Balice-Gordon i Lichtman, 1993). El fet que l'activació de fosfatases endògenes a dins de fibres musculars provoqui una desestructuració i destrucció dels agrupaments d'AChRs (Dai i Peng, 1998) ha portat a proposar un mecanisme en el que la fosforilació de molècules tinguin un paper en el procés de desestabilització (revisat per Lichtman i Colman, 2000; Nelson et al., 2004). En general, la localització i l'estabilitat dels neuroreceptors depèn de patrons de fosforilació (Swope et al., 1999; Swope, 2002). S'ha demostrat que la subunitat δ dels AChRs és diana de fosforilació de PKC, fosforilació que comporta una disminució de la inserció d'AChRs a la membrana postsinàptica (Nimnual et al., 1998). L'activació de PKC disminueix la inserció d'AChRs en la superfície de la

membrana i pot desestabilitzar els AChRs a les membranes dels miotubs aneurals (Bursztajn et al., 1988; Wallace et al., 1988) de la mateixa manera que als que es troben a les membranes de miotubs innervats *in vitro* (Lanuza et al., 2000). Resultats recents de Miles i Wagner (2003) mostren com la isoforma θ de la PKC inhibeix la formació d'agrupaments d'AChRs induïts per l'agrina i disgrega els preexistents en miotubs C2C12. En aquesta tesi ens plantegen determinar el paper de PKC en la maduració dels agrupaments d'AChRs a les NMJ *in vivo* durant el desenvolupament i la seva relació amb la pèrdua axonal.

II. HIPÒTESI I OBJECTIUS

II. HIPÒTESI I OBJECTIUS

1. Hipòtesi

El procés de maduració tant pre- com postsinàptic de la sinapsi neuromuscular durant el procés d'eliminació sinàptica postnatal depèn de l'activació d'una cascada de proteïnes de transducció de senyal que s'inicia amb l'activació del receptor de la trombina PAR-1, present aquest al component postsinàptic, i la posterior activitat de proteïna quinasa C. L'activitat de la proteïna quinasa C, concretament de la isoforma θ , regula aquesta maduració durant el procés d'eliminació sinàptica postnatal exercint la seva acció principalment sobre els AChRs.

2. Objectius

2.1. Objectiu general

L'objectiu global d'aquesta tesi és conèixer amb precisió l'existència i localització del receptor de la trombina (PAR-1) a la sinapsi neuromuscular i el paper de la seva activació en la maduració de la sinapsi neuromuscular durant el procés d'eliminació sinàptica, així com el paper de l'activitat de la proteïna quinasa C (PKC) en aquest procés. Concretament, es pretén aprofundir en el coneixement de l'estreta relació existent entre la pèrdua axonal i la dispersió dels agrupaments de receptors d'acetilcolina (AChRs) i com està implicada la PKC i, en particular la isoforma θ , efector final de la via de senyalització activada inicialment per la trombina a través del seu receptor PAR-1.

2.2. Objectius específics

1. Conèixer l'evolució del procés d'eliminació sinàptica en el període postnatal (des del naixement fins a un mes d'edat) en el múscul *Levator auris longus* (LAL).
2. Determinar l'evolució del desenvolupament dels grups d'AChRs durant el període d'eliminació sinàptica postnatal en el múscul *Levator auris longus* (LAL).
3. Determinar el paper de la serin proteasa trombina i el seu receptor PAR-1 sobre el procés d'eliminació sinàptica postnatal.
4. Determinar el paper de la serin proteasa trombina i el seu receptor PAR-1 sobre la maduració dels agrupaments de receptors d'acetilcolina postsinàptics.

5. Determinar la localització exacta de PAR-1 en el múscul esquelètic.
6. Conèixer si l'expressió i localització de PAR-1 canvia durant la maduració de les sinapsis neuromusculars.
7. Conèixer l'acció de PKC sobre el procés d'eliminació sinàptica postnatal.
8. Determinar l'acció de PKC sobre el desenvolupament maduratiu dels agrupaments d'AChRs.
9. Determinar si la isoforma θ de PKC està implicada en la maduració de les sinapsis neuromusculars.
10. Conèixer la localització de la isoforma θ de PKC.

III. MATERIAL I MÈTODES

III. MATERIAL I MÈTODES

1. Animals utilitzats

Els experiments van ser realitzats en múscul *Levator auris longus* (LAL) de rates mascle de raça *Sprague Dawley*, de ratolins C57BL/6J i de ratolins *knock outs* (KO) per la isoforma θ de la PKC. Les rates *Sprague Dawley* i els ratolins C57BL/6J van ser subministrats per la firma comercial Charles River, Barcelona. Els animals KO van ser cedits pel Dr. Phillip Nelson, del *Laboratory of Developmental Biology, National Institute of Child Health and Human Development, National Institutes of Health, USA*. Aquests animals van ser generats pel Dr. Hua Gu, del *National Institute for Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health*.

S'han utilitzat animals d'edats compreses entre el naixement i el dia 30 postnatal. Els animals van ser obtinguts a partir d'encreuaments controlats a l'estabulari de la Facultat de Medicina de la URV, seguint les normes marcades per la llei aprovada al 1995 pel Parlament de Catalunya 5/1995, de 21 de juny, de protecció dels animals utilitzats per a experimentació i per altres finalitats científiques. Les variacions d'edat poden ser una font de variabilitat en els resultats i per minimitzar-la, aproximadament 8 hores després del creuament es van realitzar frotis vaginals a les femelles per tal de concretar la data de la concepció. Es van seleccionar com a positives les femelles amb presència d'espermatozoides al frotis vaginal. A més, només van ser utilitzades ventrades d'entre 13 i 15 animals en el cas de les rates, i d'entre 5 i 7 pels ratolins, amb un pes individual que no fos ni superior ni inferior al 5% de la mitjana de pes de cada dia postnatal.

Els animals utilitzats pels encreuaments van ser mantinguts a l'estabulari prèviament a l'inici del treball amb la fi d'aclimatar-los a les condicions d'estabulació estàndard. Les condicions de vida, les mateixes per a tots els animals, es detallen a continuació: S'han mantingut a l'estabulari en gàbies estàndard de MAKROLON^R (27x46x14 cm³ per rates i 27x27x14 cm³ per ratolins) a una temperatura ambiental, regulada amb un termòstat electrònic, de 20-22°C, i una humitat relativa del 60-70 %. Van ser sotmesos a cicles de 12 hores de llum artificial, amb neó de llum blanca, i 12 hores de foscor. L'alimentació dels mascles i femelles adults que van ser creuats va ser amb pinso de manteniment per rata i ratolí VRF-1 de Charles River i aigua clorada. Tant el pinso com l'aigua van ser subministrats *ad libitum*

Els animals van ser sacrificats mitjançant dosis letals de tribromoetanol al 2% (0,15 ml/10g pes, i.p.) (Sigma). Per a tots els experiments s'ha disposat d'autorització del Comitè Ètic d'Experimentació Animal de la Facultat de Medicina i Ciències de la Salut de la URV per la realització del procediment experimental així com pel sacrifici dels animals. La cura i manipulació dels animals va ser realitzada seguint la llei aprovada al 1995 pel Parlament de Catalunya 5/1995, de 21 de juny, de protecció dels animals utilitzats per a experimentació i per altres finalitats científiques.

2. Models d'estudi

2.1. Sinapsi neuromuscular

2.1.1. Justificació del model d'estudi

El primer model experimental triat per la realització d'aquest estudi va ser la sinapsi neuromuscular. La sinapsi neuromuscular de vertebrats és una sinapsi nicotínica colinèrgica. La seva localització resulta ideal per a l'estudi d'alguns aspectes de l'estructura i funció sinàptica. La seva mida relativament gran i la seva accessibilitat han facilitat nombrosos estudis electrofisiològics i d'altres manipulacions experimentals, a més, va ser la sinapsi prototip en investigacions neurobiològiques durant anys. Altres avantatges d'aquest model experimental, respecte a d'altres models del sistema nerviós central, són el fàcil reconeixement, manipulació i aïllament del múscul, el fet que les fibres musculars adultes acostumen a estar monoïnnervades i, finalment, que els principis que regulen el creixement i funcionament del sistema neuromuscular es poden extrapolar, amb petits canvis, a altres sistemes (Hall i Sanes, 1993; Sanes i Lichtmann, 1999). A més, la sinapsi neuromuscular és un model particularment adequat per a l'estudi de la formació de la sinapsi (Burden, 1977): (1) La sinapsi és geomètricament simple; (2) les sinapsis en desenvolupament i en regeneració es poden manipular *in vivo* d'una forma relativament fàcil; (3) les sinapsis entre les neurones motores i les cèl.lules musculars poden ser estudiades en cultiu cel.lular; (4) les proteïnes sinàptiques poden ser purificades a partir de l'òrgan elèctric de *Torpedo* que és una font abundant i homogènia de sinapsis similars a la neuromuscular; i (5) l'expressió gènica es pot alterar i ser estudiada en detall en animals mutants i transgènics.

2.1.2. Descripció dels models musculars estudiats

2.1.2.1 Arquitectura muscular i innervació del múscul *Levator Auris Longus* (LAL)

El principal model muscular triat per la realització d'aquest estudi, va ser el múscul *Levator auris longus* (LAL) de rata i ratolí (**Figura 6 i 7**). El múscul LAL va ser descrit com un model muscular ideal per realitzar estudis amb drogues o neurotoxines, degut a que es tracta d'un múscul subcutani (Angaut-Petit et al., 1987; Tomàs et al., 2000). En ser un múscul subcutani, les drogues o toxines injectades subcutàniament *in vivo* tenen accés directament a la superfície muscular i, per tant, a les terminacions nervioses i poden causar els seus efectes sobre les sinapsis neuromusculars. A més a més, aquest múscul és molt pla, constituït només per aproximadament 5-6 (5.25 ± 0.78) capes de cèl.lules, facilitant molt la difusió dels possibles agents injectats a totes les cèl.lules musculars. Degut a aquesta característica, és possible la manipulació histològica *in toto* (Tomàs et al., 2000).

De la mateixa manera que el múscul LAL de ratolí descrit per Angaut-Petit et al., 1987, el LAL de rata és el múscul més superficial de l'àrea, i presenta una part craneal i una altra caudal (**Figura 6**). Les fibres de la regió craneal s'originen a les espines de la quarta vèrtebra cervical i es dirigeixen cap a la part anterior de la base del pavelló auricular, on s'inserten. Les fibres de la regió caudal s'extenen des de la quarta i la cinquena vèrtebra cervicals cap a la part posterior de la base del pavelló auricular). És habitual trobar aquesta porció separada de la craneal per una capa prima de teixit connectiu. La funció d'aquest múscul és el moviment de l'orella. És un múscul format per només fibres de contracció ràpida (Erzen et al., 2000). Tant la regió craneal com la caudal estan innervades per la branca auricular posterior del nervi facial que segueix una trajectòria paral·lela a la de l'artèria auricular posterior. Aquesta branca del nervi facial contacta amb el múscul a la regió caudal del mateix (**Figura 6**). La branca innervant del nervi facial passa per la superfície ventral del múscul, on es divideix en petites branques que es dispersaran per totes les fibres musculars. Encara que l'àrea muscular coberta per aquestes branques nervioses és molt extensa, generalment existeix una única zona d'innervació ben definida, que es localitza, aproximadament, en la meitat de l'espai que separa les dues insercions de les fibres musculars. La gran majoria de les terminacions nervioses motores, es troben sobre la superfície que contacta amb la pell, o sobre el perfil de les fibres musculars.

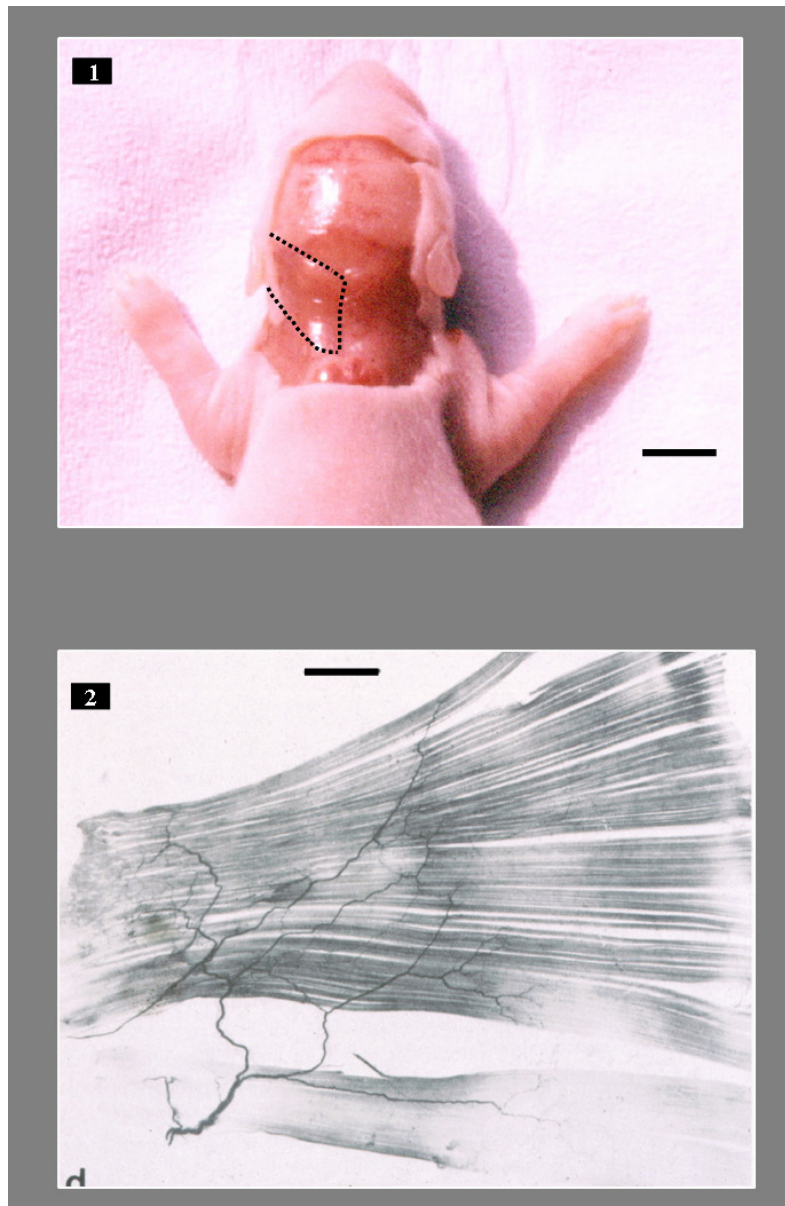


Figura 6. (1) Fotografia d'una rata de 8 dies de vida postnatal (P8) on es marca amb línies discontinúes la localització del múscul *Levator auris longus* (LAL). Barra d'escala = 1cm. (2) Preparació histològica, impregnació argènica de Gros-Bielschowsky, on es pot observar el múscul LAL sencer juntament amb la seva innervació. Barra d'escala = 1.2 mm

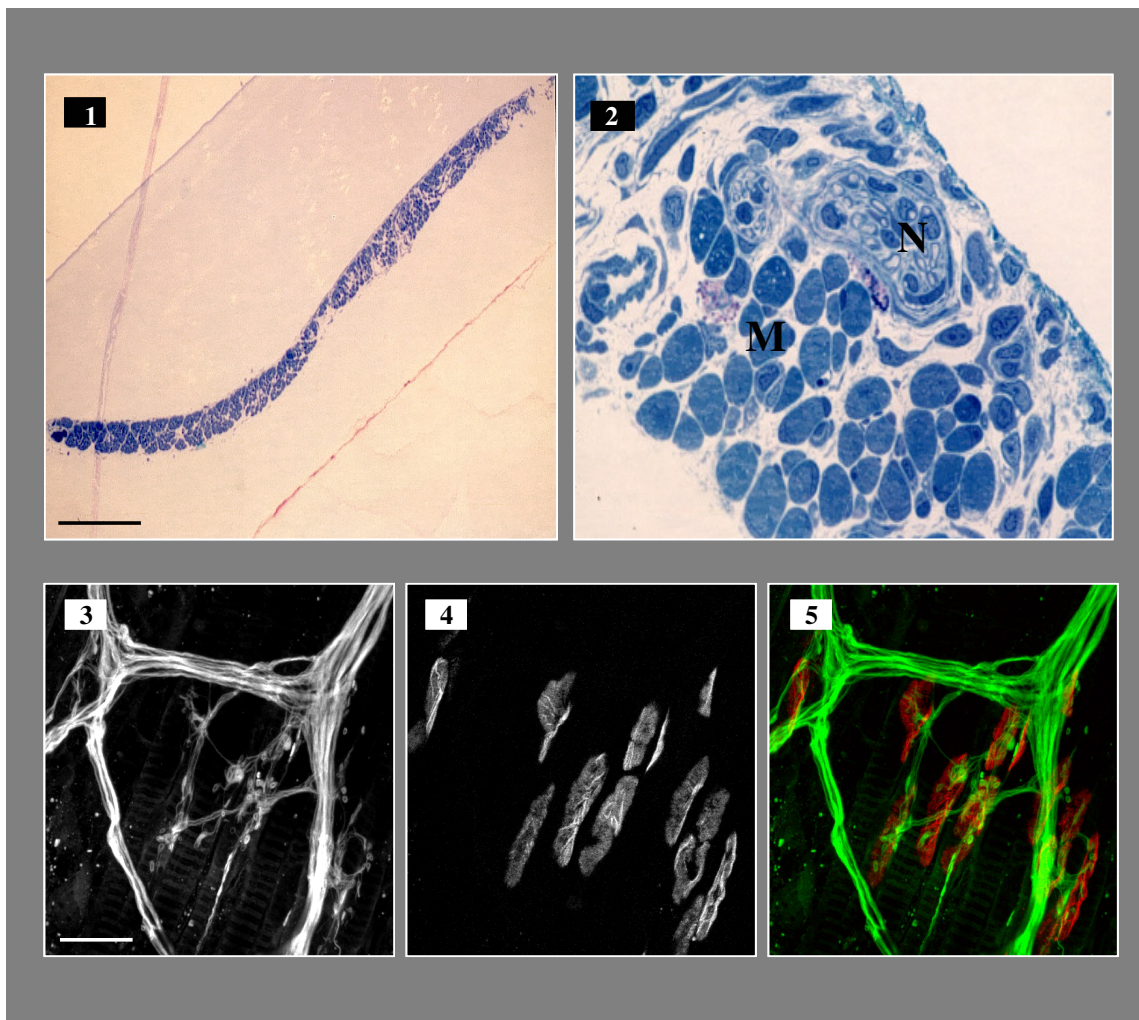


Figura 7. (1) i (2) Tall transversal semifí d'un múscul LAL tenyit amb blau de metil.lè. Destaca la presència d'un nervi (N) entremig dels miòcits (M). Barra d'escala = 150 μ m (1) i 50 μ m (2). (3), (4) i (5): Imatges d'immunofluorescència del múscul LAL orientat longitudinalment obtingudes per projecció 3D de les imatges seqüencials obtingudes per un microscopi confocal. En (3) s'han marcat els axons amb un anticòs anti-neurofilament 200. En (4) els agrupaments d'AChRs van ser marcats fluorescentment amb α -bungarotoxina conjugada a rodamina. En la imatge (5) s'observa la colocalització dels dos marcatges. Barra d'escala = 10 μ m.

2.1.2.2. *Arquitectura muscular i innervació del múscul Soleus*

Un segon model muscular utilitzat en determinades parts d'aquest estudi, va ser el múscul *Soleus* de rata i ratolí. Aquest segon model muscular, a diferència del primer model triat (el múscul LAL) és format bàsicament per fibres de contracció lenta (aproximadament el 88%). En aquest múscul s'ha comprovat que resultats obtinguts en el múscul esquelètic LAL també s'obtenien en *Soleus* malgrat les diferències entre ells. No s'ha realitzat un estudi comparatiu entre ambdós músculs.

El múscul *Soleus* és un múscul voluminós i ample situat posteriorment al pla profund dels músculs posteriors de les extremitats inferiors dels animals, descendint des dels ossos de l'extremitat inferior fins al tendó d'Aquiles (**Figura 8**). Presenta dos feixos diferents, un que neix de la cara posterior del peroné mitjançant una làmina tendinosa gruixuda i resistent i mitjançant fibres aponeuròtiques i un segon que neix de la tibia mitjançant una làmina tendinosa. Aquestes dues làmines tendinoses es fusionen en una sola i, de la seva unió resulta la formació d'un arc fibrós: l'arc tendinós del *Soleus*. La làmina tendinosa que resulta de la unió de les dues làmines inicials es divideix inferiorment en dues parts que es van estrenyent, separades per una profunda escotadura; dona naixement a les fibres musculars en les seves dues cares, anterior i posterior. Es troba localitzada dins el múscul, d'aquí el nom aponeurosi intramuscular del *Soleus*. La major part de les fibres musculars neixen de la cara posterior de l'aponeurosis intramuscular, descendint en sentit convergent, fins a la làmina tendinosa terminal. Les fibres procedents de la cara anterior no arriben a la làmina tendinosa terminal, sino que acaben a una expansió d'aquest. La làmina tendinosa terminal s'uneix a la del múscul gastrocnemi donant lloc al tendó d'Aquiles (Hebel i Stromberg, 1986).

El múscul *Soleus* està innervat pel nervi del *Soleus*, una branca del nervi tibial, sent aquest últim una branca del ciàtic. El nervi del *Soleus* descendeix verticalment anant en sentit anterior al cap lateral del gastrocnemi, i dividint-se en diverses branques que penetren dins el *Soleus* a prop i posteriorment del seu extrem superior, trobant-se l'àrea d'innervació aproximadament a la regió central del múscul (Hebel i Stromberg, 1986).

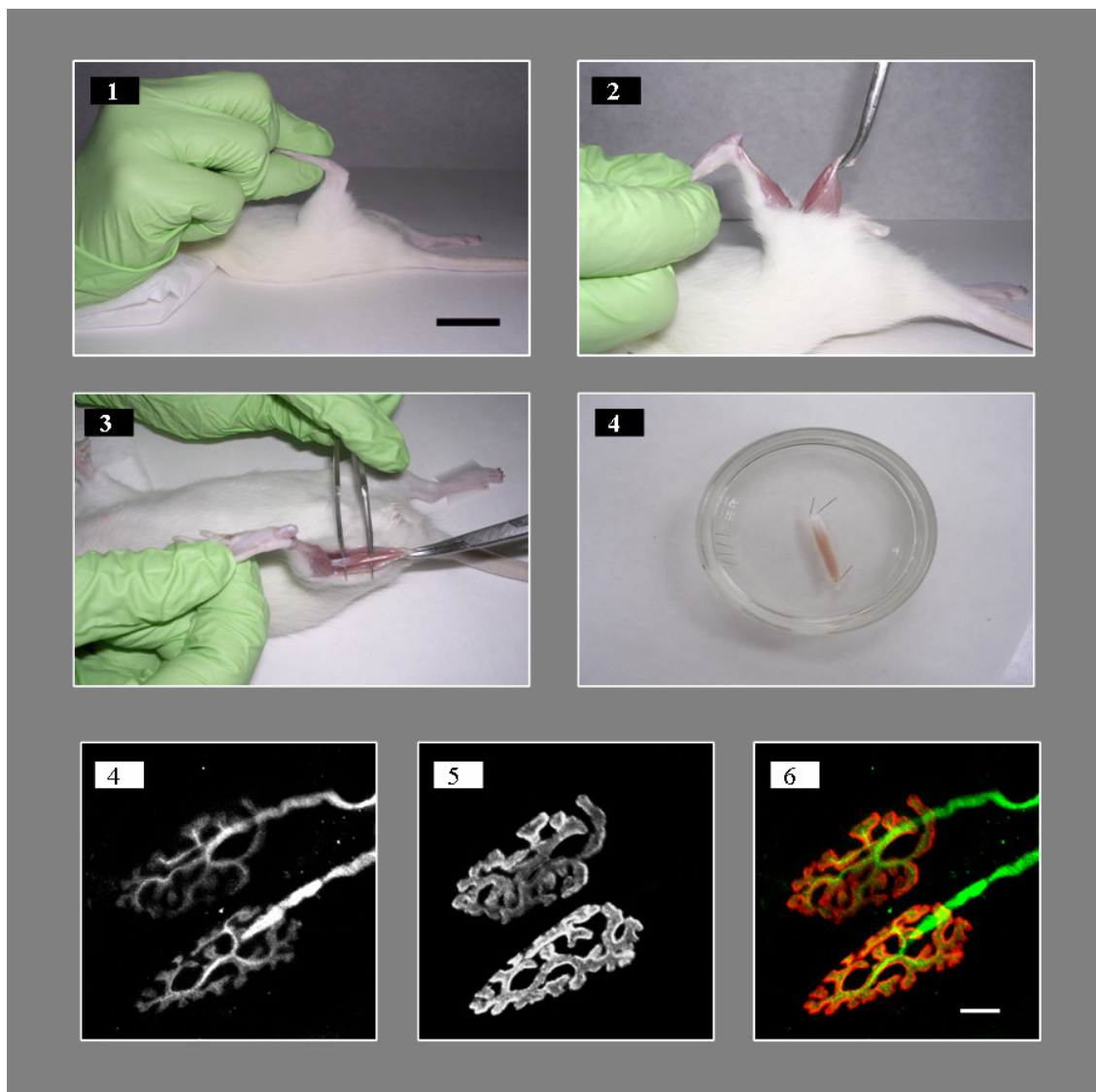


Figura 8. (1), (2) i (3): localització anatòmica del múscul *Soleus*. A la imatge (2) s'ha tallat el tendó d'Aquiles, deixant exposat al múscul *Soleus*, que podem veure individualitzat a la imatge (3). (4): múscul *Soleus* aïllat. Barra d'escala = 1 cm. (5), (6) i (7): Imatges d'immunofluorescència del múscul *Soleus* tallat longitudinalment obtingudes per projecció 3D de les imatges seqüencials obtingudes per un microscopi confocal. En (5) s'han marcat els axons amb un anticòs anti-neurofilament 200. En (6) els agrupaments d'AChRs van ser marcats fluorescentment amb α -bungarotoxina conjugada a rodamina. En la imatge (7) s'observa la colocalització dels dos marcatges. Barra d'escala = 10 μ m.

2.2. Medul·la espinal

2.2.1. Justificació del model d'estudi

Un segon model experimental triat, va ser la medul·la espinal. Concretament, la regió ventral de la medul·la espinal. Aquest segon model va ser triat degut a que és en aquesta regió de la medul·la espinal on s'hi troben els somes de les motoneurons que aniran a innervar a la musculatura esquelètica. Aquest model va ser utilitzat només en determinats casos, quan va ser necessari determinar si la localització exacta de determinats antígens no es limita únicament al component postsinàptic (múscul esquelètic) sino que també hi és al soma de les motoneurons.

2.2.2. Descripció

La medul·la espinal, presenta la forma d'una tija cilíndrica de color blanquinós i un pes mig de 0.43 g en rates de 100 g de pes, 0.58 g en rates de 200 g, etc (**Figura 9**). Els somes neuronals o matèria gris, a diferència de a l'encèfal, es troba a la regió central, trobant-se la matèria blanca o fibres nervioses situades perifèricament.

La medul·la espinal i la columna vertebral presenten la següent relació topogràfica: el primer segment toràcic acaba a la última vèrtebra cervical, el primer segment lumbar comença al final de la desena vèrtebra toràcica i l'últim segment lumbar acaba al terç craneal de la primera vèrtebra lumbar. La regió sacra s'exten de la primera a la tercera vèrtebra lumbar, i d'aquí la regió coccígea que arriba fins la quarta vèrtebra lumbar.

La forma de la medul·la espinal és diferent en funció de la regió en que ens trobem, així, la medul·la espinal cervical presenta una forma elíptica en secció transversal, les parts toràciques i lumbar presenten una secció circular i la regió coccígea és sempre quadrada. De la mateixa manera, també varia en funció de la regió anatòmica la quantitat i disposició de la matèria gris medul·lar.

Les motoneurons que innerven els músculs esquelètics es troben localitzades a la regió ventral de la medul·la espinal, existint una distribució topogràfica relativament específica de les motoneurons dins d'un mateix segment. Aquesta distribució topogràfica està determinada en funció dels músculs individuals i compartiments musculars que innerven (McHanwell i Biscoe, 1981; Nicolopoulos-Stournaras i Iles, 1983; Iliya i Dum, 1984; Weeks i English, 1985; Peyronnard et al., 1986; Balice-Gordon i Thompson, 1988; Ishihara et al., 1995). Prenent com exemple els

segments lumbosacres de la medul.la espinal, les motoneurons que innerven els músculs de les extremitats inferiors es troben localitzades a la subregió retrodorsolateral de la regió ventral mentre que les motoneurons que innerven els músculs perineals es troben localitzades a la subregió dorsal de la regió ventral (Schroder, 1980).

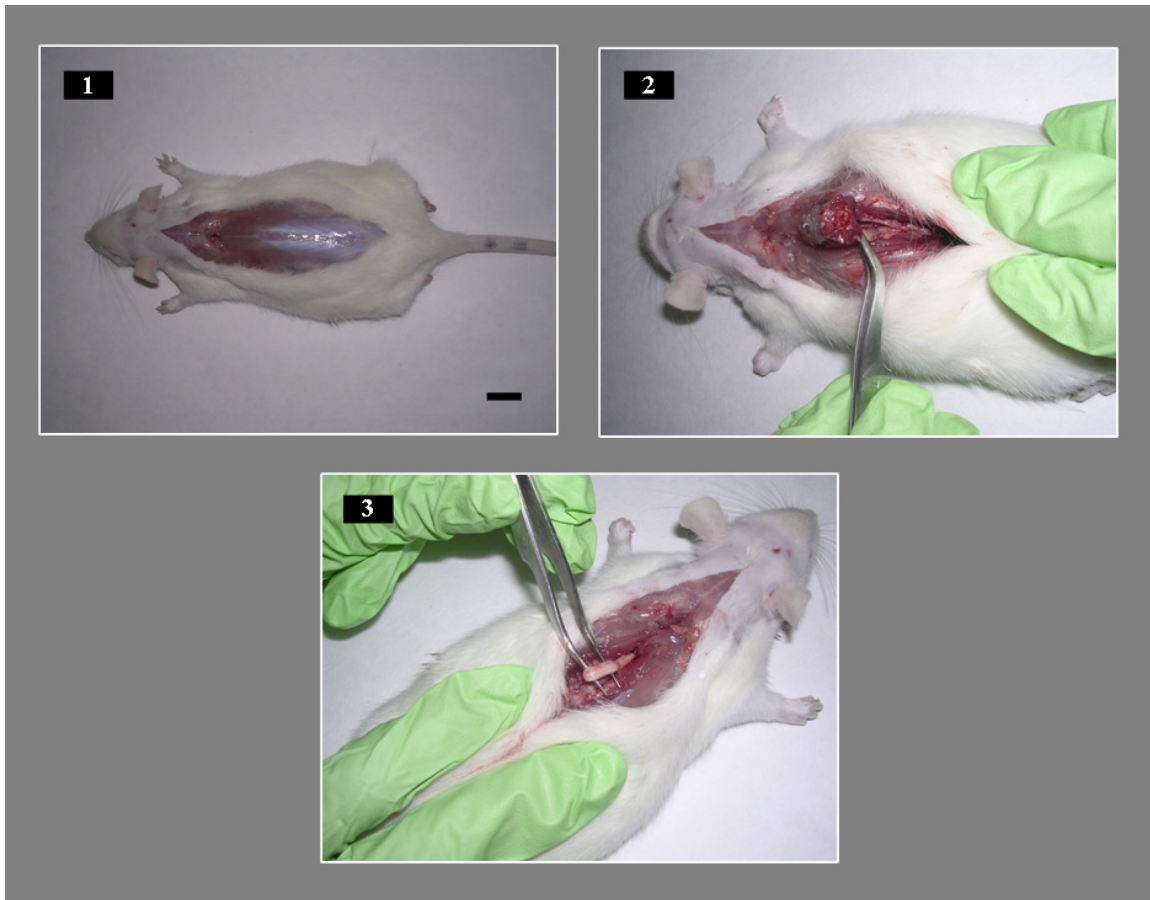


Figura 9. (1), (2) i (3): fotografia d'una rata de 30 dies de vida postnatal (P30) on es pot observar la localització de la medul.la espinal (3). Barra d'escala = 1cm.

2.3. *Cultius primaris de miotubs*

2.3.1. *Justificació del model d'estudi*

Els cultius cel.lulars triats per aquest treball han estat cultius primaris de múscul esquelètic de ratolí. Els cultius cel.lulars ens permeten la realització, de forma ràpida i controlant les condicions experimentals, d'assajos simultanis i reproduïbles en el temps. L'ús de cultius primaris de miotubs ens ha permès comprovar la localització en ells de determinats antígens, ja que disposem així d'un model lliure de terminal nerviosos i cèl.lules glials (Cèl.lules d'Schwann).

2.3.2. *Descripció*

Els cultius primaris de miotubs han estat preparats al *Laboratory of Developmental Biology* (NICHD/NIH). Per a la realització d'aquests cultius, s'utilitzen els músculs de les extremitats inferiors de ratolins neonatals. Els músculs es disseccionen, es tallen i es digereixen utilitzant el Worthington Papain Kit (Worthington Biochemical Corp, Lakewood, NJ). Una vegada s'ha digerit el teixit, aquest es filtra amb un filtre de 70 µm de tamany de porus, es centrifuga a baixa velocitat, es descarta el sobrenedant i el precipitat es resuspèn en medi mínim essencial (MEM) que conté un 10% de sèrum de caball i un 10% de sèrum de vedella. La suspensió cel.lular es plaqueja a una concentració de 0.5×10^6 cèl.lules/ml en plaques de Petri de 35 mm de diàmetre recobertes amb vitrogen i laminina. Transcorregudes 24 hores des de la sembra es canvia el medi de cultiu a medi MEM amb un 5% de sèrum de cavall. Els cultius es mantenen en un incubador a 37°C i un 10% de CO₂ canviant el medi dos vegades a la setmana, assolint el seu estat òptim 15 dies després de la sembra.

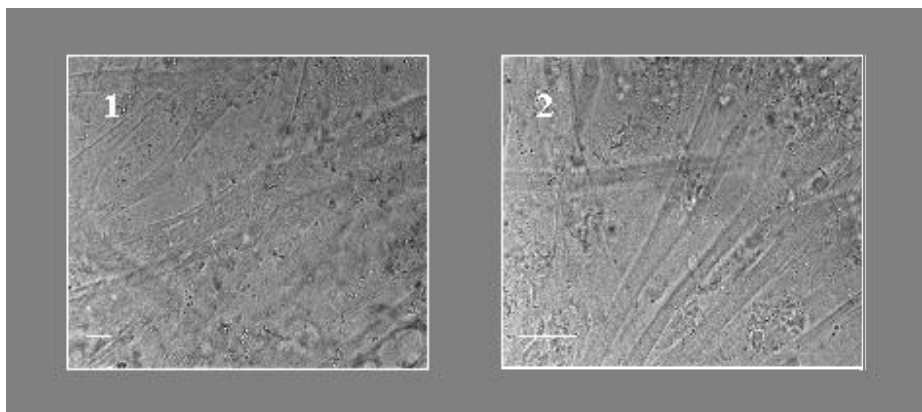


Figura 10. Cultius primaris de miotubs. Les imatges han estat obtingudes amb un microscopi de contrast de fase. La imatge (1) ha estat obtinguda a 40X i la (2) a 60X. Barra d'escala = 25µm (1) i 40µm (2).

3. Metodologies utilitzades

3.1. Obtenció de músculs esquelètics de rata i ratolí

3.1.1. Anestèsia

Via intraperitoneal s'injecta als animals 1.5 ml de tribromoetanol (Sigma) per kg de pes corporal. A continuació es comprova l'efectivitat de l'anestèsia per la pèrdua de reflexes de l'animal (reflex plantar) i una vegada no es donen aquests, es procedeix a la seva manipulació.

3.1.2. Extracció del múscul Levator Auris Longus (LAL)

Una vegada morts i exanguinats els animals es fixen sobre una superfície de suro i es procedeix a la desinserció muscular. La dissecció del múscul és de difícil realització degut al seu petit gruix. Requereix la utilització d'una lupa estereoscòpica (objectiu de 1-6 augments) i manipulació microquirúrgica. En realitzar la dissecció, el múscul apareix immediatament després de tallar la pell que recobreix la zona dorsal del cap i del nas de l'animal (**Figura 6**). Després de retirar la pell, es procedeix a aïllar tot el paquet muscular entre la pell i la calota amb la finalitat de realitzar un abordatge al múscul per la seva part interior de forma que es puguin preservar intactes les seves insercions i el nervi entrant. Un cop aïllat aquest conjunt muscular es subjecta estirat adequadament mitjançant agulles entomològiques en plaques de Petri amb base de Silicex^R plenes de solució salina (PBS). El paquet muscular s'orienta amb el LAL directament sobre la base de Silicex^R. En aquesta posició es procedeix a retirar tots els músculs que queden per sobre del LAL. Una vegada aïllat el LAL es procedeix a l'eliminació del teixit connectiu que l'envolta.

3.1.3. Extracció del múscul Soleus

Una vegada mort i exanguinat l'animal es procedeix a la dissecció del múscul *Soleus* aixecant perpendicularment l'extremitat posterior de l'animal i fixant-la a un suport amb la finalitat de mantenir l'extremitat aixecada i facilitar l'extracció.

En primer lloc es retira la pell que recobreix la part posterior de la pota de l'animal deixant exposat el tendó calcani o d'Aquiles. Es procedeix a tallar aquest tendó i, una vegada tallat, s'estira amb precaució d'aquest, retirant tot el paquet muscular unit a ell (músculs *Gastrocnemius* i *Soleus*) (**Figura 8**). El múscul *Soleus* és el múscul més superficial que veiem en retirar aquest paquet muscular (**Figura 8**).

3.2. Obtenció de fibres musculars aïllades

Amb la finalitat d'obtenir fibres musculars esquelètiques aïllades tant del terminal nerviós com de les Cèl.lules d'Schwann es va fer servir el mètode descrit l'any 1977 per Bekoff i Betz.

3.2.1. Anestèsia

Via intraperitoneal s'injecta als animals 1.5 ml de tribromoetanol (Sigma) per kg de pes corporal. A continuació es comprova l'efectivitat de l'anestèsia per la pèrdua de reflexes de l'animal (reflex plantar) i una vegada no es donen aquests, es procedeix a la seva manipulació.

3.2.2. Obtenció

Una vegada morts i exanguinats els animals es fixen sobre una superfície de suro i es procedeix a la dissecció del múscul triat (LAL o *Soleus*) com s'ha explicat al punt 3.1. El múscul es fixa mitjançant agulles entomològiques a la base de Silicex^R d'una placa de Petri amb solució salina (PBS). Si es tracta del múscul *Soleus*, aquest es divideix en 3 parts. En el cas del múscul LAL, en ser un múscul extremadament prim no cal fer divisions, ja que la solució de col.lagenasa que es farà servir té un fàcil accés a tota la superfície del múscul. A continuació es procedeix a incubar el múscul amb una solució al 0.3% de col.lagenasa (Sigma) en PBS oxigenat durant 45 minuts a 37°C, renovant la solució cada 15 minuts. Una vegada passats els 45 minuts, es realitzen 3 rentats de 5 minuts amb PBS i amb una pipeta Pasteur, es separen les fibres musculars, obtenint d'aquesta manera les cèl.lules musculars aïllades.

3.3. Denervació de músculs esquelètics de rata

3.3.1. Anestèsia

Via intraperitoneal s'injecta als animals 1.5 ml de tribromoetanol (Sigma) per kg de pes corporal. A continuació es comprova l'efectivitat de l'anestèsia per la pèrdua de reflexes de l'animal (reflex plantar) i una vegada no es donen aquests, es procedeix a la seva manipulació.

3.3.2. Denervació del múscul LAL

En determinats casos es va procedir a la denervació del múscul LAL de rates *Sprague Dawley* adultes, sempre mantenint l'altre múscul LAL com a control. Per a la denervació completa

del múscul LAL els animals anestesiats es van col·locar sota una lupa estereoscòpica. Es realitza una incisió al pavelló auricular i s'identifica la branca auricular posterior del nervi facial. Sempre treballant sota la lupa estereoscòpica, es talla el nervi a pocs mil·límetres del punt d'entrada al múscul. La ferida es sutura i posteriorment, es comprova la denervació tant visualment observant que no existeix moviment del pavelló auricular com mitjançant la realització d'un electromiograma. Després de 12 dies de denervació es procedeix a l'extracció dels músculs. Els músculs no processats d'immediat es conserven a -80 °C per a una utilització posterior.

Durant el processament mitjançant immunohistoquímica a aquests LALs denervats també es va realitzar un control negatiu fent una detecció de la subunitat de 200 kDa dels neurofilaments, no observant-se cap axó innervant el múscul.

3.3.3. Denervació del múscul *Soleus*

Per a la denervació del múscul *Soleus* es va realitzar una axotomia del nervi ciàtic d'una de les dues potes posteriors, mantenint l'altre com a control. Aquest nervi es ramifica en dos més: el peroneal que innerva als músculs anteriors *Tibial Anterior* i *Extensor Digitorum Longus*, i el tibial, que innerva als músculs posteriors *Plantaris*, *Gastrocnemius* i *Soleus*. Per tant, l'escissió del nervi ciàtic assegura la pèrdua d'innervació de tots aquests músculs. Als animals anestesiats els és realitzada una incisió a l'extremitat posterior a l'alçada del terç superior del fèmur. Es separen els paquets musculars de l'extremitat posterior fins la localització del nervi ciàtic, el qual es secciona completament. La petita ferida realitzada es sutura i es comprova la denervació visualment, observant que l'animal no és capaç de moure l'extremitat denervada correctament, observant-se un patró de moviment característic. Després de 12 dies de denervació es procedeix a l'extracció dels músculs. Els músculs no processats d'immediat es conserven a -80 °C per a una utilització posterior.

Quan aquests músculs denervats van ser processats mitjançant tècniques d'immunohistoquímica es va realitzar un control negatiu fent una detecció de la subunitat de 200 kDa dels neurofilaments, no observant-se cap axó innervant el múscul.

3.4. *Obtenció de la medul·la espinal*

3.4.1. *Anestèsia*

Via intraperitoneal s'injecta als animals 1.5 ml de tribromoetanol (Sigma) per kg de pes corporal. A continuació es comprova l'efectivitat de l'anestèsia per la pèrdua de reflexes de l'animal (reflex plantar) i una vegada no es donen aquests, es procedeix a la seva manipulació.

3.4.2. *Extracció i obtenció de la regió ventral de la medul·la espinal*

Després de l'anestèsia de l'animal es procedeix a l'exanguinació d'aquest i es fixa sobre una superfície de suro. Es realitza una incisió en la regió dorsal de l'animal per poder accedir a la columna vertebral. Una vegada tenim la columna exposada es procedeix a l'extracció d'aquesta (**Figura 9**). Sempre amb molta precisió per tal de no lesionar la medul·la espinal es procedeix a tallar l'os de la columna, per tal d'extreure la medul·la de la caixa òssia on es troba localitzada (**Figura 9**). Una vegada aïllada la medul·la espinal es procedeix a la separació de la regió ventral i la dorsal, descartant aquesta última regió i seleccionant la regió ventral, ja que és en aquesta regió on es troben localitzades les neurones motores.

3.5. *Tractaments farmacològics*

Als animals els hi van ser aplicats diferents tractaments farmacològics sobre la superfície externa del múscul LAL mitjançant injecció subcutània. Per a la realització d'aquests tractaments va ser utilitzat el múscul LAL, degut a les seves característiques anatòmiques.

3.5.1. *Anestèsia*

Via intraperitoneal s'injecta als animals 1.5 ml de tribromoetanol (Sigma) per kg de pes corporal. A continuació es comprova l'efectivitat de l'anestèsia per la pèrdua de reflexes de l'animal (reflex plantar) i una vegada no es donen aquests, es procedeix a la seva manipulació.

3.5.2. *Procediment*

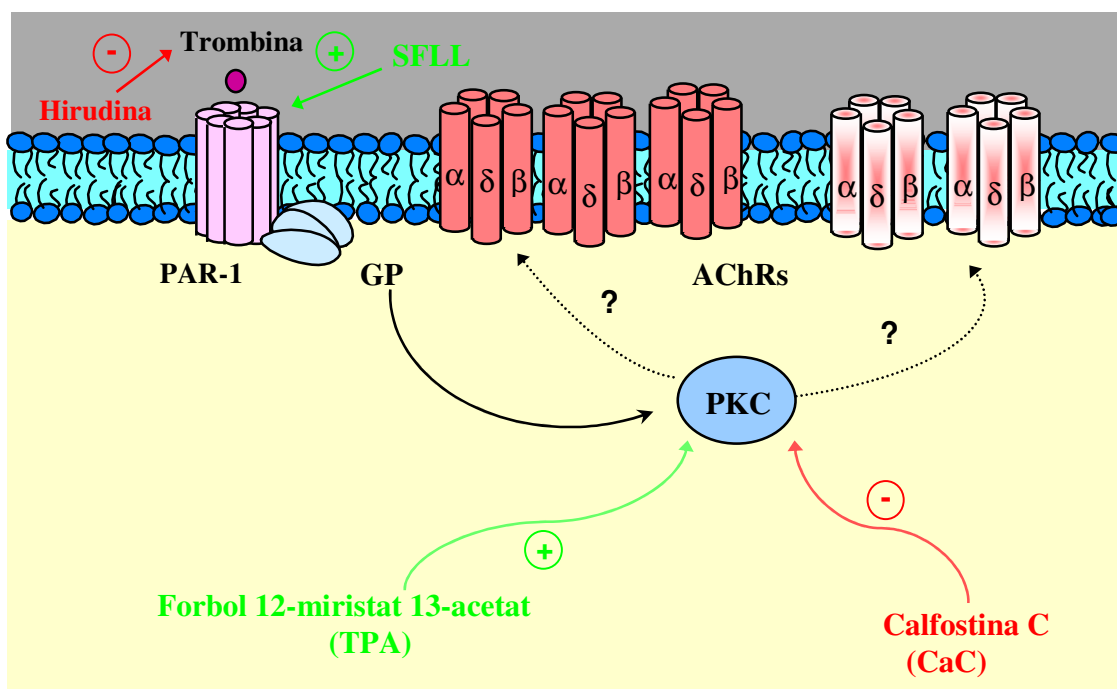
Una vegada l'animal està anestesiàt es procedeix a la separació del teixit connectiu subdèrmic injectant subcutàniament a l'àrea anatòmica on es troba localitzat el múscul LAL de 25 a 100 µl d'aire, en funció de l'edat de l'animal. D'aquesta manera, es va crear una butllofa d'aire ben

delimitada sobre la superfície externa del LAL. A continuació es va procedir a la injecció del fàrmac, administrat en solució salina (PBS) a una concentració d'acord al descrit respecte a l'acció biològica de la substància (Wallace, 1988; Kobayashi et al., 1989; Takahashi et al., 1990; Jia et al., 1999; Lanuza et al., 2000; Lanuza et al., 2001). El volum de fàrmac injectat depèn de l'edat de l'animal (25-100 µl). Els animals van rebre una injecció diàriament des del dia 4 postnatal (P4) i els músculs van ser estudiats el dies 6, 8, 12, 14 i 30 postnats (P6, P8, P12, P14 i P30 respectivament), els dies estudiats varien en funció del tractament aplicat.

3.5.3. Controls

Per assegurar que les solucions injectades recobreixen completament la superfície del múscul LAL i que romanen al lloc com a mínim dues hores abans de ser reabsorbides pel sistema vascular, va ser injectat seguint el procediment anterior el marcador vital blau de metil·lè. Transcuregudes dues hores, els músculs es van disseccionar, i es van muntar amb glicerol, podent observar com el marcador encara és present i s'ha distribuït per tota la superfície muscular.

3.5.4. Tractaments aplicats



DROGA	DIANA	DOSI	CASA COMERCIAL
<i>Pèptid SFLL</i>	Pèptid activador de PAR-1	10 nM-250 nM	Peptide Technologies Corp
<i>Pèptid FSLL</i>	Pèptid no activador de PAR	10 nM-250 nM	Peptide Technologies Corp
<i>Hirudina</i>	Inhibidor de la Trombina	1000 unitats antitrombina/mg de proteïna	Boehringer Mannheim
<i>Forbol 12-miristat 13-acetat (TPA)</i>	Activador de PKC	10 nM	Sigma
<i>Calfostina C (CaC)</i>	Inhibidor de PKC	200 nM	Sigma
<i>Forbol-4α 12, 13-didecanoat</i>	Èster de forbol inactiu	10 nM	Sigma

3.6. Obtenció d'extractes cel.lulars

3.6.1. A partir de músculs esquelètics i medul.la espinal de rata i ratolí

3.6.1.1. Obtenció de lisats totals

Per a l'obtenció d'homogenats o lisats totals del teixit muscular, els músculs una vegada dissecionats, com s'ha explicat al punt 3.1, es renten en solució salina (PBS) i seguint la relació 1g de teixit fresc/5 ml de tampó s'homogenitzen en fred fent servir un tampó Tris 10 mM pH 7.3, amb EDTA 2 mM (Sigma), NaCl (Sigma) 150 mM, i els inhibidors de proteases Aprotinina (Sigma) 25 μ l/ml, Benzamidina (Sigma) 10 mM i Leupeptina (Sigma) 10 μ l/ml. A continuació es procedeix a centrifugar a 6000g 10 minuts a 4°C per separar els components de la matriu extracel.lular; el *pellet* es descarta, mentre que totes les proteïnes solubles i de membrana es recuperen al sobrenedant, que és al·liquotat i guardat a -80°C per la seva posterior utilització.

3.6.1.2. Obtenció de membranes totals

Per a l'obtenció de membranes totals, es parteix dels lisats cel·lulars totals, els quals són ultracentrifugats a 95000g durant 1 hora a 4°C. El sobrenedant s'aliqota i emmagatzema a -80°C, i el *pellet* resultant, corresponent a les membranes totals es resuspèn amb el tampó utilitzat per homogenitzar el teixit, al qual se l'ha afegit un 1% de Tritó X-100 (Sigma). El volum de tampó utilitzat per resuspendre oscil·la entre 150 i 300 µl, en funció del *pellet* obtingut.

3.7. Valoració de la concentració de proteïnes

Per valorar la concentració de proteïnes s'han utilitzat dos mètodes: el DC *Protein Assay* de Bio Rad i el del BCA de Pierce.

3.7.1. DC Protein Assay de Bio Rad

El mètode DC (*Detergent Compatible Protein Assay*) de Bio Rad és un assaig colorimètric per determinar la concentració de proteïnes en mostres que s'han solubilitzat utilitzant detergents. La reacció que té lloc és similar a la que té lloc al mètode de Lowry (Lowry, 1951), però aquesta va ser modificada. Van ser seguides les instruccions del kit, i es va llegir la l'absorbància a 750 nm, mantenint-se aquesta estable durant 2 hores. Per a realitzar la recta patró es va utilitzar una solució d'albumina sèrica bovina (BSA) diluïda al 0.2% (p/v) i 0.05% (p/v) acida sòdica. Tant de la patró com les mostres a quantificar van ser fetes rèpliques.

3.7.2. BCA de Pierce

En aquest mètode, les proteïnes en medi bàsic redueixen el Cu^{2+} a Cu^+ (reacció de biuret) i es detecten per la generació d'un complex de color porpre que es forma entre un àtom de Cu^+ i dues molècules d'àcid bicinconínic (BCA), que absorbeix a 562 nm. Per a realitzar la recta patró es va utilitzar una solució d'albumina sèrica bovina (BSA) diluïda al 0.2% (p/v) i 0.05% (p/v) acida sòdica. Tant de la patró com les mostres a quantificar van ser fetes rèpliques.

3.8. Electroforesi en gels de poliacrilamida (SDS-PAGE)

L'electroforesi en gel de poliacrilamida amb SDS (SDS-PAGE) és un dels sistemes més utilitzats en la separació de proteïnes segons la seva mida (Laemmli, 1970). Bàsicament, consisteix

en tractar la mostra amb un tampó que conté el detergent SDS (de l'anglès *Sodium Dodecyl Sulfate*), conferint així càrrega neta negativa a les proteïnes, mantenint constant la relació càrrega:massa, i separar-la en una matriu d'acrilamida/bisacrilamida per l'acció d'un camp elèctric.

Les proteïnes totals dels lisats i membranes obtingudes als diferents assaigs s'han separat amb aquest tipus d'electroforesi, i, posteriorment s'han transferit a una membrana de PVDF (Amersham). Les mostres s'han corregut en paral·lel a uns estàndards de pes molecular pretenyits, els quals permeten fer un seguiment del procés de correguda i transferència de les proteïnes (SeeBlue®Plus2, Invitrogen).

3.8.1. Preparació de les mostres

De manera prèvia a l'electroforesi es preparen les mostres. Aquestes es descongelen, i es diluïxen amb el tampó de càrrega: Tris-HCl 0.2 M pH 8, blau de bromofenol 0.006% (Amersham), EDTA 0.1M (Sigma), sacarosa 40% (p/v) (Sigma), SDS 10% (p/v) (Sigma) i 2% de β -mercaptoetanol (v/v) (Sigma). S'escalfen a 100°C durant 2 minuts. La concentració final de proteïna total aplicada per carril va variar entre 15 i 100 μ g en funció de la proteïna a detectar.

3.8.2. Preparació del gel i electroforesi

En aquest tipus d'electroforesi s'utilitzen dues classes de gels, amb diferent concentració d'acrilamida: el concentrador (amb matriu més laxa) i el separador. El primer alinea les proteïnes a l'inici del segon, i aquest últim les separa segons la seva mida.

Una vegada muntats els vidres de suport dels gels, s'aboca el gel separador preparat prèviament. La interfase gel-aire es cobreix afegint uns microlitres d'aigua per facilitar la polimerització d'aquest. La concentració d'acrilamida del gel separador pot variar en funció del pes molecular de les proteïnes a detectar (generalment es treballa a concentracions entre 7 i 15%). Un cop el gel separador ha polimeritzat, s'elimina l'aigua, s'afegeix el gel concentrador i es col·loca una pinta per a la formació dels carrils.

Els gels polimeritzats es col·loquen a la cubeta del sistema amb tampó d'electroforesi: Tris-Base 25 mM, Glicina 191.8 mM (Sigma), SDS al 10% (p/v) (Sigma), es treu la pinta i es carreguen les mostres que havien estat preparades prèviament. La cubeta es tapa i es connecta a una font

d'alimentació. Amb un voltatge constant de 125 V, les proteïnes triguen sobre 1-1.5 hores en separar-se.

3.9. Western Blot

Mitjançant aquesta tècnica, les proteïnes es transfereixen electroforèticament a una membrana, mantenint la seva resolució de bandes. L'assaig es pot dividir en dues fases clarament diferenciades, transferència i immunodetecció.

3.9.1. Transferència

Acabada l'electroforesi, i un cop separat i descartat el gel concentrador, el gel separador es summergeix en tampó de transferència: Tris-Base 25 mM pH 8.3, glicina 191.8 mM (Sigma) i metanol al 20% (Sigma). La membrana de PVDF, s'activa amb metanol, s'hidrata amb aigua bidestil·lada i també s'equilibra amb tampó de transferència. A continuació es prepara un *sandwich* amb el següent ordre de components des de la cara negativa del *cassette* de transferència: 1 esponja tipus *Scotch Brite*, 1 paper de filtre absorbent (Bio Rad), el gel separador i la membrana (evitant la formació de bombolles) i, un altre cop, 1 paper de filtre absorbent i 1 esponja tipus *Scotch Brite*. Es tanca el *cassette* i es col·loca a la cubeta amb tampó de transferència. Es connecta a una font d'alimentació a un voltatge constant de 170 mA durant una hora evitant sempre el sobreescalfament. La transferència de l'estàndard a la membrana ens indica una correcta transferència de les proteïnes.

3.9.2. Immunodetecció

En aquesta segona fase, podem distingir tres processos principals, blocatge de la membrana, incubació amb els anticossos i detecció, separats per dos processos de rentat.

Un cop s'han transferit les proteïnes a la membrana, es procedeix al blocatge d'aquesta tota la nit a 4°C amb una solució potèica formada per TBS, llet desnatada al 10% (p/v) (Bio Rad) i Tween 20 al 0.05% (v/v) (Sigma). Posteriorment, s'elimina la solució de blocatge i s'incuba la membrana amb la solució de l'anticòs primari (diluït en solució de blocatge), 2 hores a temperatura ambient en agitació o tota la nit a 4°C. Es renta la membrana durant 1 hora (20minuts/rentat) amb tampó de rentat: TBS amb Tween 20 al 0.1% (v/v) i es procedeix a incubar amb l'anticòs secundari marcat amb peroxidasa de rave (HRP de l'anglès *Horseradish Peroxidase*) (diluït també aquest en

solució de blocatge) que s'acomplexa amb l'anticòs primari. Aquesta incubació es realitza a temperatura ambient durant 45 minuts. Es renta la membrana de la mateixa manera que entre la incubació amb l'anticòs primari i el secundari i es procedeix a la detecció immunològica fent servir el kit d'Amersham *ECL Adavance Western Blotting Detection Kit*.

3.9.3. Anticòsos utilitzats

ANTICÓS PRIMARI	kDa	CASA COMERCIAL	ANTICÓS SECUNDARI	CASA COMERCIAL
<i>Anti-MHC (MF20)</i> <i>1:300</i>	200	Developmental Studies Hybridoma Bank	Sheep anti mouse-HRP (1:4000)	Amersham Pharmacia Biotech
<i>Anti-PAR-1 (S-19)</i> <i>1:100</i>	64.4	Santa Cruz Biotechnology	Donkey anti goat-HRP (1:4000)	Santa Cruz Biotechnology
<i>Anti-PKC θ</i> <i>1:250</i>	79	Transduction Laboratories	Sheep anti mouse-HRP (1:4000)	Amersham Pharmacia Biotech

3.10. Tècniques fluorescents d'immunohistoquímica

Amb la finalitat de conèixer la localització exacta de diferents proteïnes implicades en l'eliminació sinàptica i de visualitzar les sinapsis en els músculs s'han fet servir tècniques fluorescents d'immunohistoquímica.

Aquestes tècniques s'han realitzat per immersió i amb el múscul *in toto* en el cas del múscul LAL, degut a que en presentar un gruix petit no és necessari realitzar una microtomia. En el cas del múscul *Soleus* i la medulla espinal les immunohistoquímiques van ser realitzades directament sobre portaobjectes amb els que s'havien recollit els talls (10 μ m de gruix) realitzats en un criostat Leica model CM1850.

3.10.1. A múscul esquelètic de rata i ratolí

3.10.1.1. Per immersió

Quan s'ha treballat amb el múscul LAL, aquest, una vegada disseccionat com s'ha explicat a l'apartat 3.1, es subjecta estirat adequadament mitjançant agulles entomològiques en plaques de Petri amb base de Silicex^R plenes de solució salina. A continuació es fixa el múscul amb paraformaldehid al 2% (p/v) en PBS durant 30 minuts a temperatura ambient, es renta durant 30 minuts amb PBS (10minuts/rentat) i s'incuba amb una solució de glicina 0.1M en PBS durant 30 minuts a temperatura ambient amb la fi d'acabar d'aturar l'acció del paraformaldehid, blocant els grups aldehid que hagin pogut quedar al teixit, i així, disminuir el soroll de fons. Després de rentar durant 30 minuts amb PBS, es tallen els músculs de les seves insercions i es pre-incuben amb sèrum normal de cabra (NGS) (Sigma) al 5% en PBS per blocar les unions inespecífiques d'anticossos. En el cas que fos necessari, les membranes cel·lulars es permeabilitzen amb Tritó X-100 entre el 0.1 i el 0.5% dissolt en PBS (en funció de l'antígen a analitzar). Arribats a aquest punt, el teixit s'incuba durant tota la nit a 4°C amb els anticossos primaris dissolts en NGS-Tritó X-100. A continuació, es renta 3 vegades durant 10 minuts amb NGS al 5% en PBS. Finalment, el teixit s'incuba amb els anticossos secundaris apropiats conjugats a un fluorocrom (veure taula 3 per veure els colors). En el cas de la detecció de l'antígen PAR-1, va ser necessària la utilització del sistema d'amplificació del senyal obtingut *Alexa Fluor® 488 Signal-Amplification Kit for Fluorescein- and Oregon Green® Dye-Conjugated Probes* (Molecular Probes).

En alguns casos, els nuclis dels miòcits i altres cèl·lules van ser tenyits fent una darrera incubació amb Hoesch H33342 (Calbiochem) diluït 1:200 en PBS durant 1 hora a 37°C.

Per detectar els AChRs postsinàptics, aquests van ser marcats amb α -bungarotoxina lligada a rodamina o fluoresceïna (Molecular Probes) mitjançant tècniques de marcatge fluorescent *in vivo*. L' α -bungarotoxina és un antagonista dels receptors d'acetilcolina nicotínics i s'uneix a ells amb una alta afinitat i de forma irreversible. Trenta minuts abans dels seu sacrifici, els animals van ser injectats subcutàniament amb 50 μ l de α -bungarotoxina conjugada a rodamina a una concentració de 5 μ g/ml.

Un cop finalitzat el marcatge, els músculs es renten 3 vegades durant 10 minuts amb NGS al 5% en PBS i van ser muntats amb Mowiol (Calbiochem) contenint un 0.1% de p-fenilenodiamina (Sigma) per retardar la fotodecoloració de la fluorescència.

3.10.1.2. Sobre portaobjectes

En el cas del múscul *Soleus*, després de la seva dissecció i fixació amb paraformaldehid al 4%, es generen crioseccions longitudinals de 10 µm. Aquestes crioseccions es recullen en portaobjectes Optiplus Barrier de Biogenex per a la realització d'immunohistoquímiques, i s'emmagatzemen a -20°C per la seva posterior utilització. El protocol que es segueix a continuació és el mateix que el que s'ha explicat anteriorment, però les incubacions es realitzen sempre sobre el portaobjectes.

3.10.2. A medul.la espinal de ratolí

3.10.2.1. Sobre portaobjectes

Amb la medul.la espinal sempre s'ha treballat sobre portaobjectes. La medul.la espinal una vegada diseccionada com s'explica al punt 3.4 es fixa amb paraformaldehid al 4% i es generen crioseccions transversals de 10 µm. Aquestes crioseccions es recullen en portaobjectes Optiplus Barrier de Biogenex i es procedeix de la mateixa manera que pel múscul esquelètic.

3.10.3. Anticossos utilitzats

ANTICÓS PRIMARI	DILUCIÓ	CASA COMERCIAL	ANTICÓS SECUNDARI	DILUCIÓ	CASA COMERCIAL
<i>Anti-CGRP</i>	1:200	Peninsula Laboratories	Alexa Fluor™ 546 goat anti rabbit IgG (H+L)	1:500	Molecular Probes
<i>Anti-Miogenina (M-225)</i>	1:10	Santa Cruz Biotechnology	Alexa Fluor™ 546 goat anti rabbit IgG (H+L)	1:500	Molecular Probes
<i>Anti-MuSK (N-19)</i>	1:100	Santa Cruz Biotechnology	FITC donkey anti goat IgG (H+L)	1:300	Jackson Immunoresearch
<i>Anti-MyoD1 (C-20)</i>	1:10	Santa Cruz Biotechnology	Alexa Fluor™ 546 goat anti rabbit IgG (H+L)	1:500	Molecular Probes

ANTICÓS PRIMARI	DILUCIÓ	CASA COMERCIAL	ANTICÓS SECUNDARI	DILUCIÓ	CASA COMERCIAL
<i>Anti-Neurofilament - 200</i>	1:500	Sigma	Alexa Fluor™ 488 goat anti rabbit IgG (H+L)	1:500	Molecular Probes
<i>Anti-PAR-1 (S-19)</i>	1:50	Santa Cruz Biotechnology	FITC donkey anti goat IgG (H+L)	1:300	Jackson ImmunoResearch
<i>Anti-PKC θ</i>	1:100	Transduction Laboratories	Alexa Fluor™ 488 goat anti mouse IgG (H+L)	1:500	Molecular Probes
<i>Anti-Rapsina (C-16)</i>	1:100	Santa Cruz Biotechnology	FITC donkey anti goat IgG (H+L)	1:300	Jackson ImmunoResearch
<i>Anti-Sinaptofisina</i>	1:50	Boehringer	Alexa Fluor™ 488 goat anti mouse IgG (H+L)	1:500	Molecular Probes
<i>Anti-Syntaxina</i>	1:1000	Sigma	Alexa Fluor™ 488 goat anti mouse IgG (H+L)	1:500	Molecular Probes
<i>Anti-S-100</i>	1:10000	Dako	Alexa Fluor™ 488 goat anti rabbit IgG (H+L)	1:500	Molecular Probes
<i>Anti-Utrofina (H-300)</i>	1:100	Santa Cruz Biotechnology	Alexa Fluor™ 546 goat anti rabbit IgG (H+L)	1:500	Molecular Probes

3.11. Microscòpia confocal

Els teixits marcats es visualitzen amb un microscopi de fluorescència Polivar 2 (Reichert-Jung) equipat amb filtres adequats per la observació de la fluorescència (tant de la fluoresceïna o Alexa-488 com de la rodamina o Alexa-546) i amb un microscopi confocal Leica TCS 4D (Leica Laser Technik), adaptat a un microscopi de fluorescència invertit Leitz (Leitz DMIRB) i equipat amb un làser d'argó-criptó.

El microscopi confocal proporciona els següents avantatges respecte al microscopi de fluorescència convencional: (1) discrimina la llum que no prové del pla focal, obtenint d'aquesta manera imatges més definides, (2) possibilita fer un escombrat de la mostra, no només als eixos X-Y, sinó també a l'eix Z, generant així seccions òptiques a través d'una mostra tridimensional i, (3) aquestes seccions són digitalitzades i enregistrades, podent ser generades reconstruccions tridimensionals.

La llum emesa pels dos colorants es detecta simultàniament en un fotomultiplicador per cada colorant i es van seleccionar filtres per seleccionar cada emissió. La potència d'emissió del làser i els fotomultiplicadors van ser ajustats per tal d'eliminar qualsevol senyal en el canal vermell durant l'excitació a 488 nm. Les imatges van ser captades amb un objectiu d'immersió 63X (Leitz Plan Achromatic objective) amb una obertura numèrica d'1.4. Van ser captades seccions x, y en la direcció z a través de la mostra utilitzant una platina d'alta resolució en el pla z i les projeccions tridimensionals de les seccions x, y van ser reconstruïdes en una estació Silicon utilitzant el programa Imaris (VP Bitplane).

A més a més de la colocalització visual de les imatges doble i triplement marcades (axons i AChRs, ThR i AChRs, ThR i miogenina o MyoD, i ThR i miogenina o MyoD i Hoescht,...) va ser utilitzat el programa de colocalització Colocalization 1.2 (Bitplane AG) que proporciona una imatge dels punts colocalitzats.

3.12. Anàlisi morfològica i morfomètric

Es va realitzar una anàlisi morfològica dels agregats d'AChRs tant en diferents situacions per tal de determinar l'efecte de la modificació de l'activitat de la proteïna quinasa C així com en ratolins KO en PKC θ sobre la distribució dels AChRs en la placa sinàptica. Particularment, es va

estudiar el grau de maduresa dels agregats d'AChRs *in vivo* durant el període postnatal en el que s'esdevé el fenomen de l'eliminació sinàptica. Amb aquesta finalitat i seguint criteris iniciats per altres investigadors (Steinbach, 1981; Slater, 1982a, b; Bewick et al., 1996) es van definir sis estadis:

M1: Van ser classificats com M1 tots els agregats corresponents a una placa de forma oval i uniforme en densitat d'AChRs. S'observa una porositat uniformement distribuïda dins la placa.

M2: La placa s'ha anat elongant i comencen a aparèixer zones no tan homogènies en la densitat d'AChRs. L'augment de densitat d'AChR apareix localitzat en línies estretes dins la placa.

M3: Placa oval en la que ja apareixen zones sense receptors: "forats". Aquestes zones lliures de receptors no estan innervades.

M4: La placa oval s'ha transformat, seguint ara un patró de branques, amb zones d'alta i baixa densitat de receptors. Els "forats" acostumen a estar recoberts de línies riques en AChRs.

M5: Patró de branques millor definit amb regions amb alta, baixa i nul·la densitat de AChRs. Les regions amb alta densitat, estan en contacte amb branques terminals d'axons, mentre que hi ha regions no innervades.

M6: Patró discontinu d'AChRs, que segueix un patró de branques fragmentades.

Així mateix, es va fer una anàlisi morfomètrica de les plaques motores postsinàptiques marcades amb rodamina conjugada a α -bungarotoxina . Van ser visualitzades amb un microscopi Nikon i captades les imatges amb una càmera CCD (EGG Wallace LSR, U.K.). Aquestes imatges van ser analitzades amb el programa d'anàlisi d'imatge Visilog (Noesis, França). L'àrea i el perímetre van ser mesurats tant en animals controls com en tractats, i en els KO i els controls.

Es va determinar el grau d'innervació polineural després de diferents tractaments i en ratolins *knock outs* i controls. Van ser comptats el nombre d'axons que innerven cada placa motora. Donada la dificultat de determinar el nombre total d'axons innervant una mateixa sinapsi quan aquest és superior a tres, les unions neuromusculars van ser classificades en tres grups:

monoinnervades, doblement innervades i poliinnervades quan convergeixen tres o més axons a la mateixa sinapsi.

En els controls va ser determinada la morfologia dels agregats d'AChRs i el nombre d'axons per sinapsi al llarg del primer mes de vida postnatal, especialment durant les dues primeres setmanes. També van ser realitzats experiments de control en animals que havien rebut injeccions subcutànies de PBS sobre el LAL. Les injeccions de PBS es van fer diàriament des del quart dia de vida postnatal, i els animals van ser sacrificats el dia sis, vuit i dotze. No van ser trobades diferències entre músculs tractats i no tractats amb PBS, ni en morfologia dels agregats d'AChRs, ni en nombre d'axons per sinapsi, el que ens indica que el procediment d'injecció no està induint canvis per si mateix.

Degut a que les drogues injectades poden produir reaccions inflamatòries o d'altres reaccions tòxiques, es van tenyir amb blau de toluidina al 0.5% músculs control i músculs tractats, i no va ser observat cap signe histopatològic de lesió muscular o regeneració. També es van fer preparacions histològiques permanents (tres músculs per cada edat i condicions experimentals), talls semifins d'un μm de gruix. Cap signe de patologia muscular (hemorràgia, necrosi, o signes de regeneració) va ser observat en aquestes preparacions. L'àrea i el diàmetre de les fibres musculars van ser analitzats fent servir una MOP-Videoplan Kontron 2000 connectada a una càmera de video en color. Tampoc van ser detectades diferències entre fibres controls i fibres tractades. Per tant, podem assegurar que les drogues aplicades no produeixen cap reacció tòxica.

En el cas de PAR-1 es va realitzar una anàlisi quantitativa del grau de colocalització del grau de colocalització d'aquest receptors amb els AChRs.

4. Estadística

Les dades obtingudes van ser processades mitjançant el paquet estadístic SPSS (Statistical Package for the Social Sciences). Va ser realitzat un primer tractament descriptiu, calculant els principals índexs estadístics que permeten descriure la distribució d'una variable: la mitjana, la desviació i error estàndard i el nombre de casos. Les dades van passar un test de normalitat (test de Shapiro-Wilkes). Es van testar les diferències estadístiques entre grups fent servir el t-test o el U-test de Mann-Whitney en el cas de les variables quantitatives. Per comparar percentatges, es va fer servir el test de la Chi quadrat. El criteri de significació va ser fixat en $p < 0.05$. Les dades es

presenten en tot el treball com la mitjana \pm Desviació Estàndard. Per cada dia i serie estudiada van ser analitzades un mínim de 85 sinapsis per múscul i un mínim de 6 músculs.

IV. RESULTATS

IV.RESULTATS

1. Canvis morfològics i maduració dels agregats d'AChRs sinàptics durant el període d'eliminació sinàptica

Durant els primers dies de vida postnatal, la placa motora és una estructura dinàmica en canvi constant: a nivell presinàptic és dona el procés fisiològic d'eliminació sinàptica, i simultàniament, a nivell postsinàptic, té lloc una maduració dels agrupaments de receptors d'acetilcolina postsinàptics. Aquests canvis els podem observar mitjançant el microscopi de fluorescència visualitzant les fibres nervioses i els receptors del neurotransmissor en músculs no tractats d'animals control.

Es va trobar que en néixer, aproximadament totes les NMJs es troben innervades per més d'un axó. Durant el primer mes de vida postnatal, la major part de les NMJs passen a ser monoinnervades i els agrupaments d'AChRs morfològicament madurs. Procés que es dona en paral·lel (**Figura 11A-C**).

A mesura que la placa motora va madurant, els agregats o agrupaments d'AChRs van canviant de forma, passant de la morfologia uniformement difosa que es troba al naixement (M1, **Figura 12**) a una totalment madura que segueix un patró de branques fragmentades (M6, **Figura 12**). Aquests canvis en la distribució dels receptors transformen la placa uniforme i amb forma ovalada que es troba majoritàriament al naixement en una placa molt més allargada amb petites zones on la densitat d'AChRs és molt baixa i en molts casos inexistents (M3, **Figura 12**). En animals d'un mes de vida, més del 80% de les unions neuromusculars segueixen el patró morfològic madur M5 (M2, 0.70 ± 0.11 %; M3, 1.95 ± 0.14 %; M4, 16.58 ± 2.25 %; M5, 80.77 ± 3.74 %).

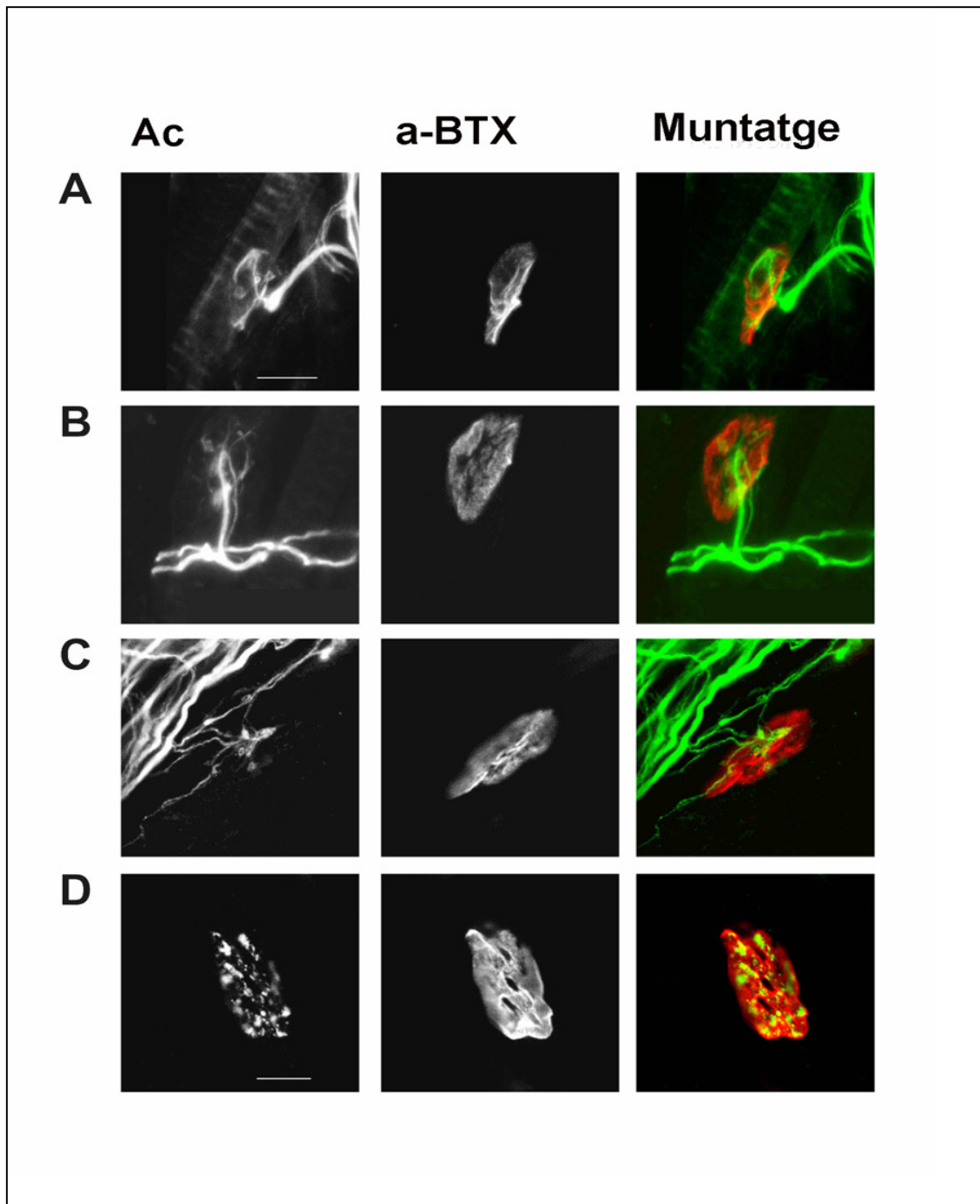


Figura 11. Poliinnervació neonatal a les unions neuromusculars de múscul LAL de rata. A, B i C mostren plaques motores d'un animal de 6 dies de vida postnatal innervades per un, dos i tres terminals axònics respectivament. Els axons van ser marcats amb un anticòs anti neurofilament-200 i els AChRs amb rodamina conjugada a α -bungarotoxina. A la Figura D es va marcar el terminal nerviós amb un anticòs anti sinaptofisina i els AChRs amb rodamina conjugada a α -bungarotoxina. La sinaptofisina es localitza per sobre els AChRs. Són de destacar els tres "forats" no fluorescents, els quals no estan innervats. El muntatge mostra la imatge composta dels components pre i post sinàptics. Barra d'escala = 10 μ m.

La distribució d'aquests graus de maduració dels agrupaments dels AChRs coincideix amb les etapes finals de l'eliminació de la innervació polineuronal en múscul LAL (Lanuza et al. 2001). El creixement de l'animal continua durant setmanes i, en molts terminals d'aquest múscul ($98.1 \pm 3.6\%$), el creixement intercalar de l'axó produeix finalment el patró discontinu de zones postsinàptiques (M6, **Figura 12**, animal de tres mesos d'edat) que es troba en l'adult.

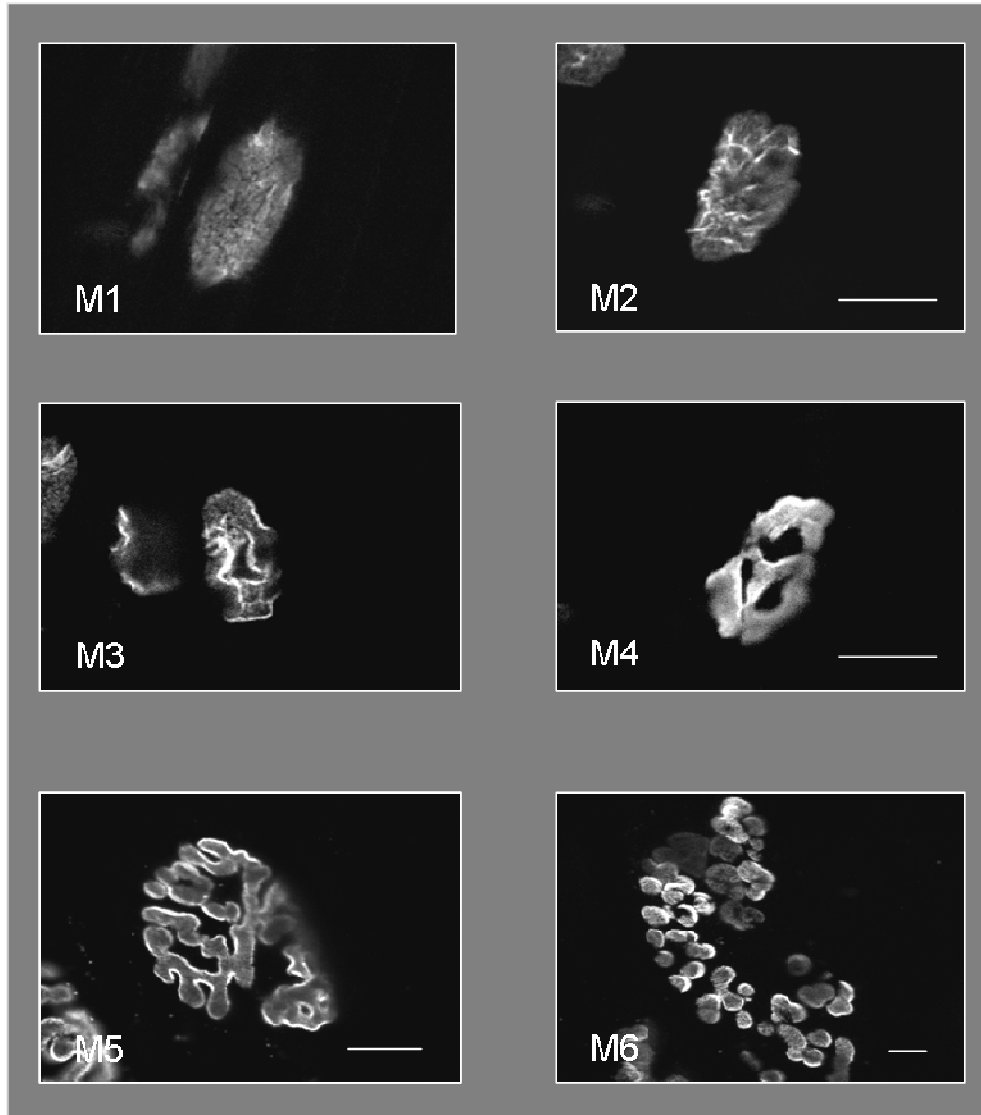


Figura 12. Morfologies d'agrupaments sinàptics d'AChRs a les unions neuromusculars de múscul LAL de rata que es troben des del naixement fins l'adult. Els AChRs van ser marcats amb rodamina conjugada a α -bungarotoxina. Els agrupaments de AChRs postsinàptics s'han classificat dintre de 6 tipus diferents: de M1 a M6 segons el grau creixent de maduració morfològica. Barra d'escala = 10 μ m.

La **Figura 13** mostra el curs de la maduració morfològica dels agrupaments sinàptics d'AChRs i aquesta coincideix totalment amb l'avaluació electrofisiològica feta per Santafé et al., 2001. Entre 4 i 12 dies, la major part de les fibres musculars van passar d'estar poliinnervades a estar monoinnervades. A més, la distribució dels diferents tipus morfològics també va canviar significativament durant el període de P4 a P12 ($p < 0.05$, test de la Chi2). Entre els dies 4 i 8 postnatsals (P4 i P8), els agrupaments d'AChRs molt immadurs (tipus morfològic M1) van desapareixent (hi ha una caiguda de més del 50% entre P4 i P6) mentre que les morfologies més madures M2 i M3 van incrementant. Abans del dia postnatal 8, no s'observa cap morfologia madura (tipus morfològic M4 o M5). Durant la segona meitat del període considerat (de P8 a P12), la freqüència del tipus M2 comença a disminuir dràsticament i la forma M4 comença a aparèixer per primera vegada. Trobem que el percentatge dels diferents tipus morfològics és diferent en cada dia d'observació ($p < 0.05$, test de la F de Fischer), a excepció del percentatge del tipus morfològic M1, el qual no va ser trobat després del dia postnatal 8.

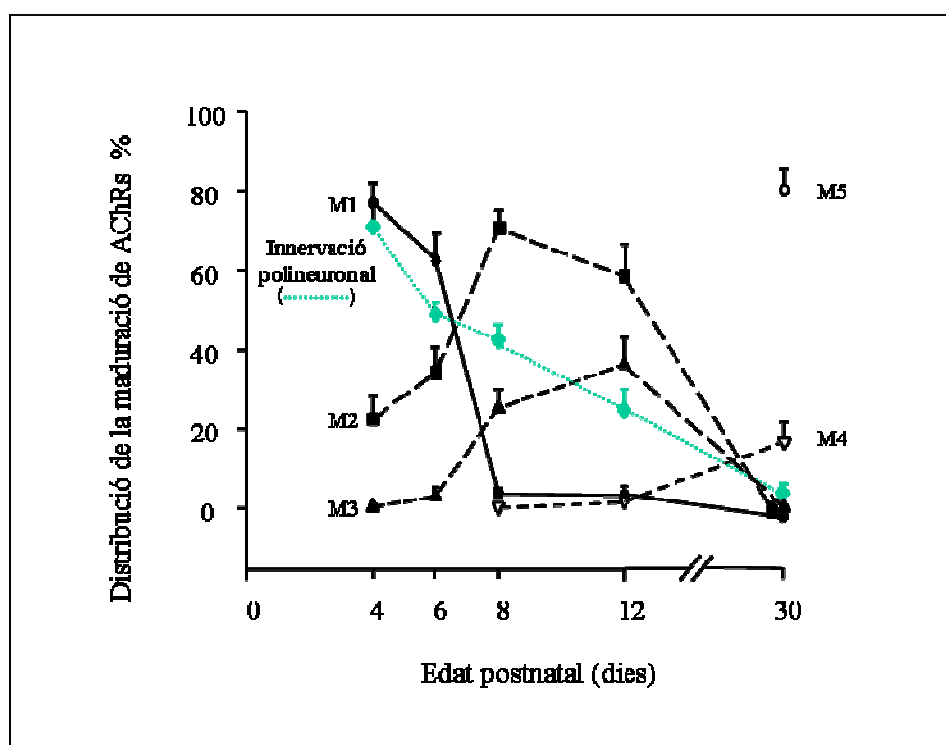


Figura 13. Maduració dels agrupaments sinàptics d'AChRs durant el període d'eliminació sinàptica. Percentatges dels agrupaments de AChRs del tipus M1 a M5 els dies 4, 6, 8, 12 i 30. També es representa la polineuronal innervation en múscul LAL de rata neonatal control (----). Els percentatges dels agrupaments de AChRs són diferents als diferents dies (* $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, test de Fischer).

Un clar senyal de la pèrdua o redistribució d'AChRs a la placa motora durant la maduració d'aquesta és l'aparició en el seu interior d'àrees no fluorescents o "forats". Segons la nostra classificació, aquests tipus d'agregats corresponen al tipus morfològic M3. A la **Figura 14** s'ha representat el percentatge d'agregats sinàptics d'AChRs, amb morfologies iguals o més madures que M3 respecte a la mitjana del nombre d'axons per sinapsi. Les dades mostren que la reducció d'axons més gran es va donar fins al dia postnatal 6 i és prèvia a l'aparició als agregats sinàptics de les àrees no fluorescents (el dia postnatal 4, hi ha el $0.4\% \pm 0.1$ de les sinapsis amb "forats" i el $3\% \pm 0.7$ el dia 6). De fet, el dia postnatal 6 només es va trobar una morfologia igual o més madura que el tipus morfològic M2 al 32% de les fibres musculars sent el 50% de les fibres musculars monoinnervades (ja havien patit la pèrdua mínima d'un axó), fet que ens està indicant que existeix una pèrdua axonal prèvia a la detecció de la pèrdua o reorganització de receptors d'AChRs. A la **Figura 11** s'observa una sinapsi pertanyent a un múscul del dia 6 de vida postnatal que ja ha patit l'eliminació axonal sense pèrdua aparent d'AChRs. D'altra banda, al dia postnatal 8 s'observa un gran increment d'àrees no fluorescents o "forats" (increment altament significatiu, $p < 0.001$) a les plaques motores i un petit canvi en el nombre d'axons per sinapsi (la diferència entre P6 i P8 va ser no significativa, $p = 0.23$). Hem d'indicar, no obstant, que es dona una pèrdua d'axons significativa en fibres musculars innervades per més de dos axons, donant lloc a un increment en els doblement innervats sense afectar significativament la mitjana del nombre d'axons innervants (Lanuza et al. 2001).

En definitiva, durant el desenvolupament normal, la pèrdua d'axons innervants pot precedir a l'eliminació o redistribució d'AChRs als llocs sinàptics, encara que entre els dies postnals 6 i 8 es dona una petita reducció axonal en paral·lel a una important eliminació d'AChRs. Això ens està indicant una certa interdependència entre la redistribució a la membrana postsinàptica d'AChRs i la retracció axonal, encara que la redistribució d'AChRs podria ser una conseqüència de la inicial pèrdua axonal que es dona als primers dies postnals (0-6 dies). Un fet a destacar és que entre els dies postnals 4 i 8, és molt habitual observar les plaques amb morfologies del tipus M2-M3 rebent més de 2 axons.

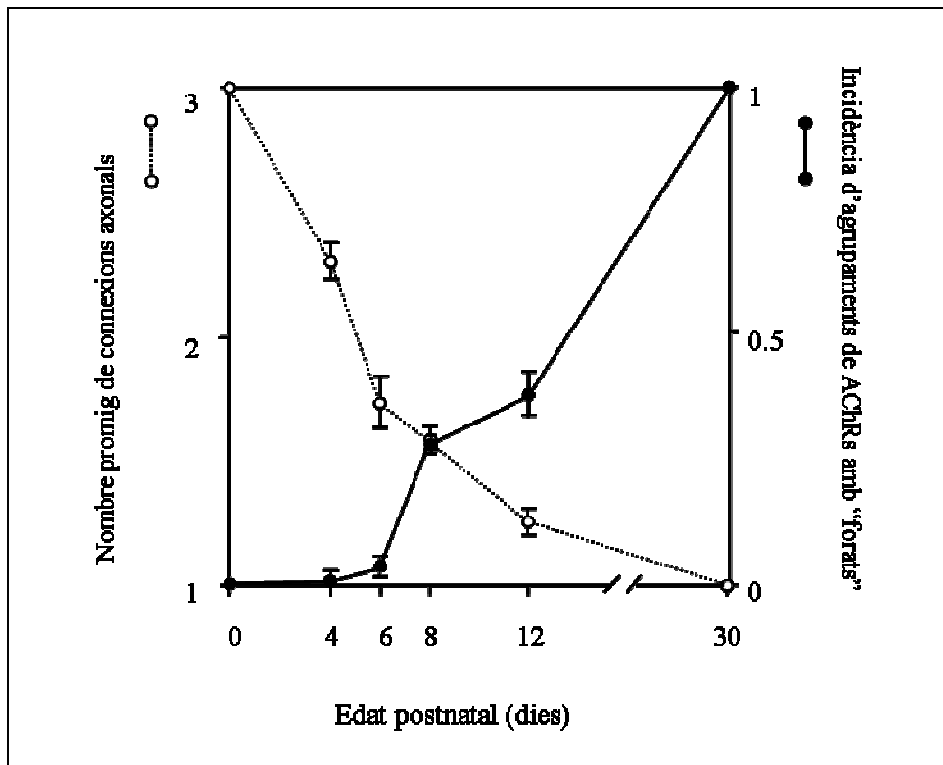


Figura 14. Maduració dels agrupaments sinàptics d'AChRs durant el període d'eliminació sinàptica. Percentatge d'agrupaments de AChRs mostrant pèrdua o redistribució de receptors (existència de "forats" en morfologies $M \geq 3$) versus la mitjana del nombre d'axons per sinapsi.

2. Paper de la trombina i el seu receptor PAR-1 en el procés de maduració de les unions neuromusculars

2.1. El procés de maduració de les unions neuromusculars està mediat pel receptor de la trombina PAR-1

Com a resultat d'un treball anteriorment realitzat al nostre laboratori (Lanuza et al., 2001) es va trobar que el procés fisiològic d'eliminació sinàptica en múscul in vivo de rata neonatal s'accelerava en el temps en aplicar la serin proteasa trombina i es blocava després de l'administració d'hirudina, un inhibidor d'aquesta. Donats aquests resultats, es va suggerir que el procés d'eliminació sinàptica postnatal podria ser el resultat de l'activació d'una cascada de

transducció de senyals iniciada per l'activació del receptor de la trombina que estaria present a l'àrea sinàptica. Es va seleccionar el dia 6 de vida postnatal per determinar l'acció efectuada per la trombina a través del seu receptor PAR-1 així com la presència i localització de PAR-1 en el teixit muscular. La selecció concreta d'aquest dia va ser deguda a que és el dia que es troba just al mig del període on l'acció de la trombina va quedar millor definida i, a més a més, és el dia de vida postnatal on la meitat de les unions neuromusculars ja es troben monoinervades (Lanuza et al., 2001), és a dir, ja s'ha donat el 50% de l'eliminació sinàptica fisiològica postnatal.

Per comprovar la nostra hipòtesi, es van administrar directament sobre músculs LAL d'animals de 4 dies d'edat 2 pèptids sintètics de 14 aminoàcids. SFLL, un potent agonista de PAR-1 i FSLL, un pèptid inactiu per aquest receptor (Vu et al., 1991). Quan es va administrar SFLL, l'agonista de PAR-1, es va observar un efecte dosi dependent tant en el procés d'eliminació sinàptica com en la maduració dels agrupaments dels AChRs (**Figura 15**). L'activació de PAR-1 va produir una acceleració de la maduració de les unions neuromusculars, tant a nivell pre- com postsinàptic. A nivell postsinàptic, l'activació de PAR-1 va modificar el grau de maduració dels agrupaments de receptors d'AChRs. Els agrupaments van mostrar predominantment una morfologia amb àrees lliures de fluorescència (M3, **Figura 12**), és a dir, àrees lliures de receptors, fet que ens està indicant que ha tingut lloc una redistribució madurativa d'aquests. Aquesta redistribució va ser 17 vegades superior que la trobada en músculs control ($p < 0.0005$). Quan es va fer l'estudi presinàptic de la maduració de les NMJs de músculs d'animals P6 control i tractats amb SFLL, es va trobar una disminució del nombre de NMJ innervades per 3 ó més axons en paral·lel a un increment de les NMJs doblement innervades als animals tractats ($p < 0.01$). D'altra banda, el tractament amb hirudina a la dosi prèviament testada com efectiva (Lanuza et al., 2001) va blocar tant la maduració dels agrupaments de receptors colinèrgics postsinàptics com l'eliminació sinàptica (**Figura 15**). En altres músculs es va administrar la mateixa concentració del pèptid inactiu FSLL que les administrades d'SFLL, i no es va trobar cap diferència significativa respecte als músculs control no tractats. Els animals control van rebre injeccions subcutànies de PBS sobre la superfície del múscul LAL, i no es va trobar cap diferència amb músculs control no injectats, ni respecte a la morfologia dels agrupaments de AChRs ni en el nombre d'axons per NMJ, fet que ens està indicant que el procediment d'injecció no indueix per se canvis a la NMJ.

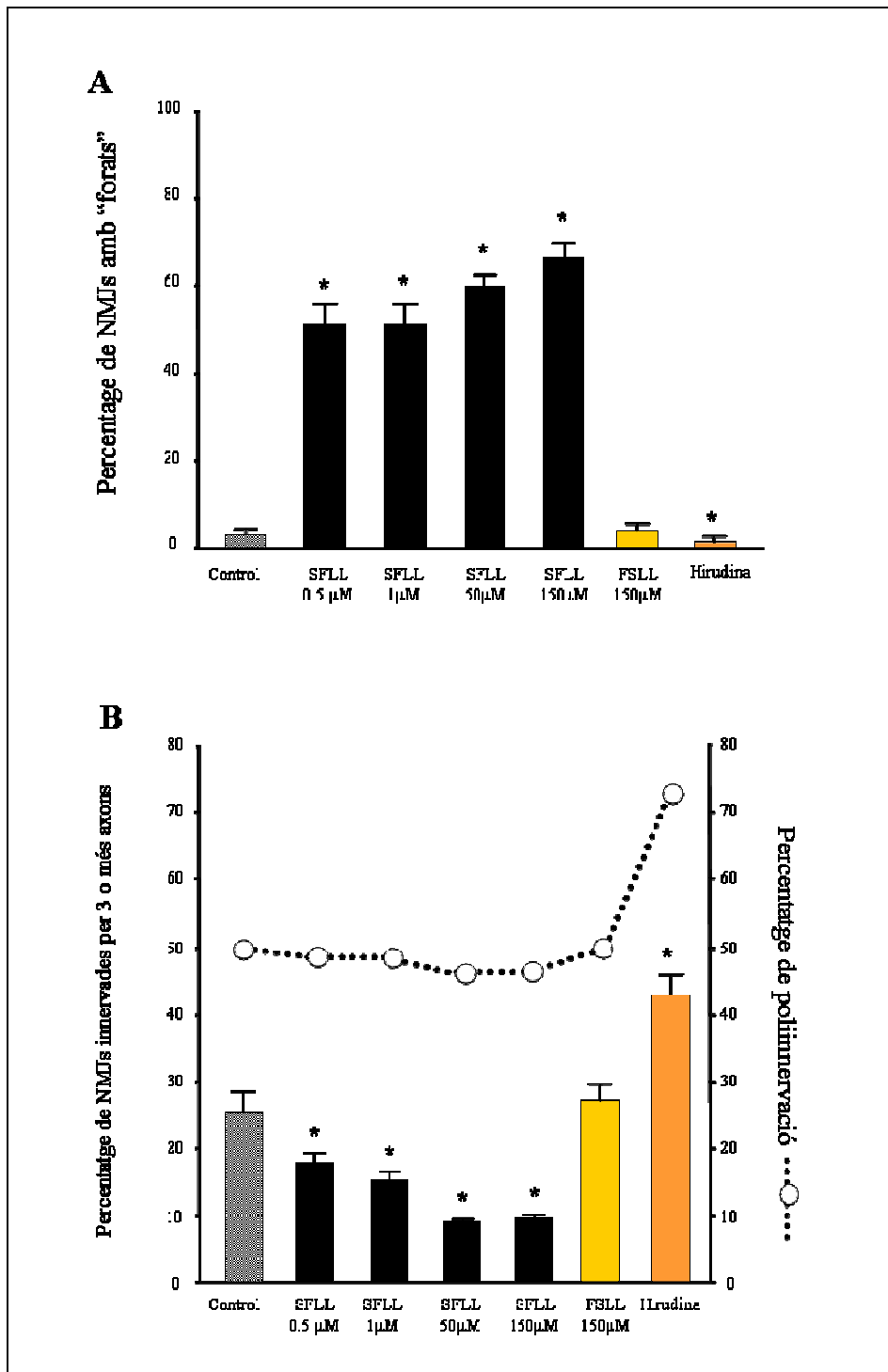


Figura 15. Canvis en la maduració dels agrupaments sinàptics d'AChRs (A) i en la innervació polineuronal (B) induïda pel pèptid de 14 aminoàcids SFTL, potent agonista específic del receptor de la trombina; FSL, pèptid inactiu; i hirudina, inhibidora específica de la trombina en animals de 6 dies de vida postnatal.

A la **Figura 16** podem veure imatges de microscòpia confocal d'unions neuromusculars d'animals de 6 dies, una d'un animal control i altre d'un animal tractat amb SFLL. Podem observar com la unió neuromuscular control es troba en un estat de maduració altament immadur (agrupaments d'AChRs amb morfologia M1 i innervada per 3 axons) a diferència de la de l'animal tractat amb SFLL on ja s'han perdut alguns axons, i als agrupaments d'AChRs ja apareixen "forats", és a dir, presenta una morfologia M3 (**Figura 12**).

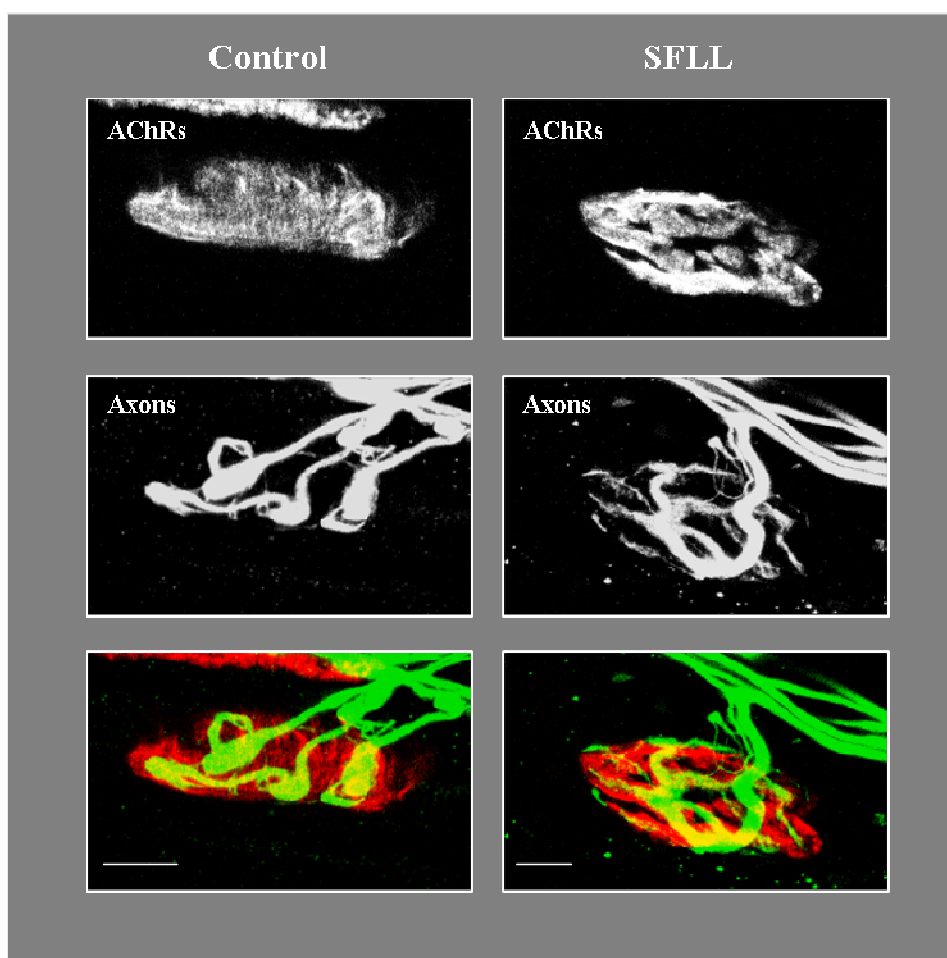


Figura 16. Unions neuromusculars d'animals de 6 dies de vida postnatal control i tractats amb SFLL, potent agonista de PAR-1. Els receptors d'acetilcolina es van marcar amb α -bungarotoxina conjugada a rodamina i els axons amb un anticòs anti la subunitat de 200 kDa dels neurofilaments. Les imatges presentades són representatives dels grups control i tractat amb SFLL. Es pot observar com la unió neuromuscular de l'animal control és molt immadura, estant innervada per tres axons i presentant l'agrupament d'AChRs una morfologia M1. La unió neuromuscular de l'animal tractat amb SFLL es troba innervada per dos axons i l'agrupament d'AChRs postsinàptics ja presenta un patró de branques, observant-se "forats". Cal destacar que un dels dos axons presenta un diàmetre molt petit, fet que ens podria indicar que es troba en procés de retracció. Barra d'escala = 10 μ m.

2.2. Expressió i localització del receptor de la trombina PAR-1 al múscul esquelètic

Per determinar la presència del receptor de la trombina (PAR-1) al múscul LAL i abans d'analitzar la seva localització exacta i els canvis que pugui patir durant el desenvolupament es va testar un anticòs anti-PAR-1 en western blots d'homogenat de múscul LAL d'animals controls de 6 dies de vida postnatal (**Figura 17**). L'anticòs va reaccionar amb una banda de 64.4 kDa, coincidint amb el pes molecular de PAR-1.

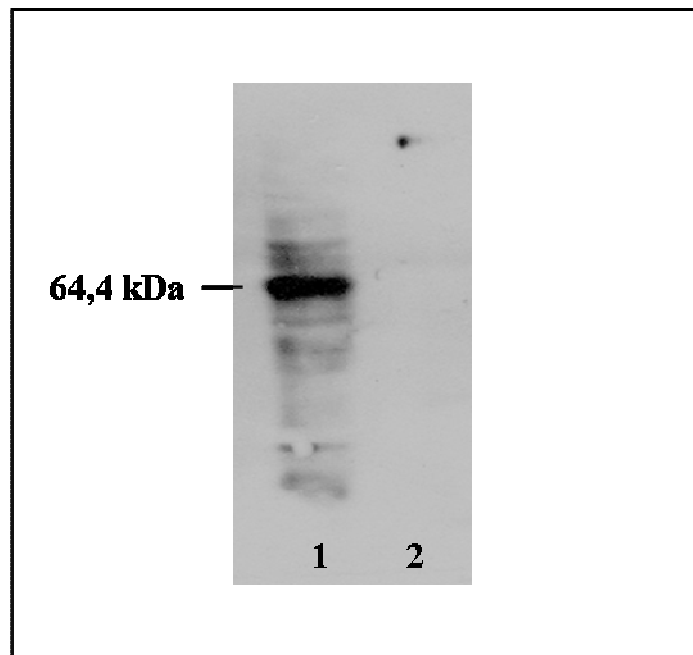


Figura 17. Expressió del receptor de la trombina PAR-1 en la fracció de membrana d'homogenats de múscul LAL. Els músculs van ser aïllats d'animals de 6 dies de vida postnatal. El senyal positiu per l'anticòs anti-PAR-1 (banda de 64.4 kDa al carril 1) demostra l'existència de PAR-1. Al carril 2 es va preincubar l'anticòs amb el seu pèptid de blocatge. La manca de senyal demostra l'especificitat d'aquest anticòs.

Estudis d'immunofluorescència van permetre determinar la distribució espacial de PAR-1 al múscul esquelètic durant el període d'eliminació sinàptica. En concret, es va intentar identificar en quin tipus cel·lular es trobava PAR-1 (miòcits, cèl·lules de Schwann o terminal nerviós). Inicialment, l'anàlisi amb el microscopi làser confocal va mostrar tres patrons d'immunoreactivitat (**Figura 18 i Figura 19**). Es va detectar un marcatge intens i uniforme en punts fusiformes molt ben delimitats, i regularment espaiats al llarg de la fibra muscular (**Figura 18**). Degut a la morfologia, mida i localització, aquesta immunoreactivitat podria indicar l'existència del receptor de la trombina

a les cèl.lules satèl.lits de la fibra muscular. Van ser processats músculs LAL per la detecció simultània de PAR-1 i miogenina o MyoD1, dos factors de transcripció que s'expressen en aquestes cèl.lules i es va veure que els punts fusiformes positius per PAR-1 colocalitzen tant amb la miogenina com amb MyoD1 (**Figura 18**). Aquesta colocalització ens està indicant que aquests punts fusiformes positius per PAR-1 corresponen a cèl.lules satèl.lits, cèl.lules identificades amb marcadors mioblàstics. A més a més, aquests punts positius per PAR-1 sempre inclouen un nucli (detectat amb Hoechst 33342). Tanmateix, es va observar a la banda neural dels músculs, un patró de marcatge corresponent a unes àrees finament puntejades (aparentment una per cèl.lula muscular) més grans que la marca corresponent a cèl.lules satèl.lits. Aquestes àrees colocalitzaven amb els AChRs indicant la presència específica de PAR-1 a les unions neuromusculars (**Figura 19**). Cal destacar que les regions de les unions neuromusculars lliures de receptors (forats aneurals dins dels agrupaments de receptors d'AChRs) no són necessàriament no reactives amb PAR-1 (**Figura 19**) i que la marca de PAR-1 s'extèn més enllà de l'àrea ocupada pels agrupaments d'AChRs.

Finalment, a més a més de la marca forta en localitzacions particulars (cèl.lules satèl.lits i unions neuromusculars), a totes les edats estudiades es va observar un marcatge feble i difús per tota la cèl.lula muscular (**Figura 18 i Figura 19**). Encara que aquest marcatge feble i difús podria correspondre a una marca inespecífica de l'anticòs, no va ser observat als controls negatius, fet que ens fa pensar que no es tracta d'una marca inespecífica. En cada experiment, al menys un múscul va ser incubat en absència d'anticòs com a control negatiu. A més a més, quan l'anticòs anti-PAR-1 va ser preincubat amb el pèptid blocant de PAR-1 no va ser detectada cap mena de marca al teixits (**Figura 18 B' i Figura 19 B'**).

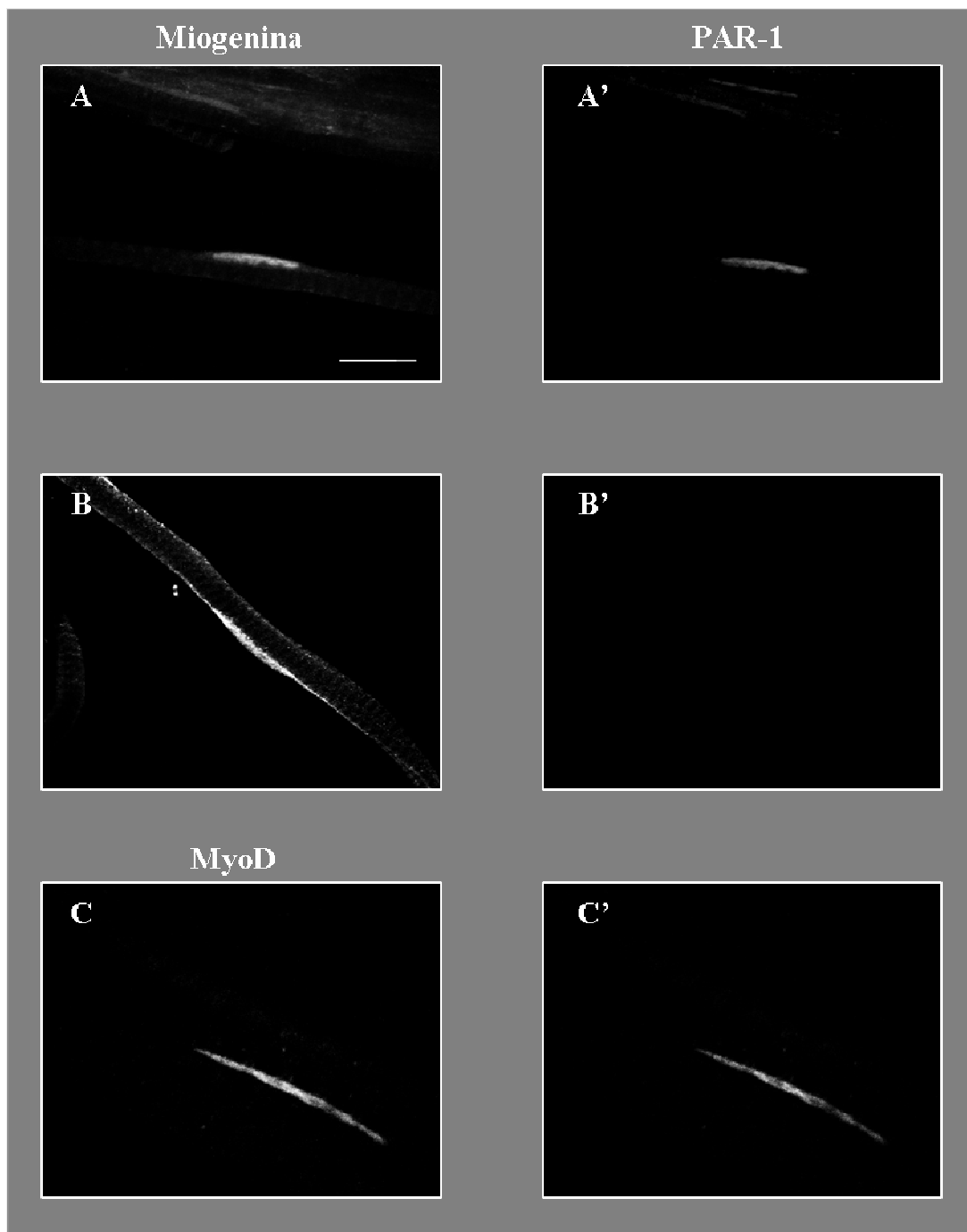


Figura 18. Immunolocalització del receptor de la trombina PAR-1 a les cèl.lules satèl.lits: a les imatges obtingudes amb el microscopi confocal es mostra la immunoreactivitat positiva de la miogenina (A i B), MyoD1 (C): totes dues proteïnes marcadors de cèl.lules satèl.lits i PAR-1 (A', B' i C') en múscul LAL d'animals de 6 dies de vida postnatal. L'anticòs anti-PAR-1 preincubat amb el seu pèptid PAR-1 no va ser detectat (B'). Barra d'escala = 10 µm.

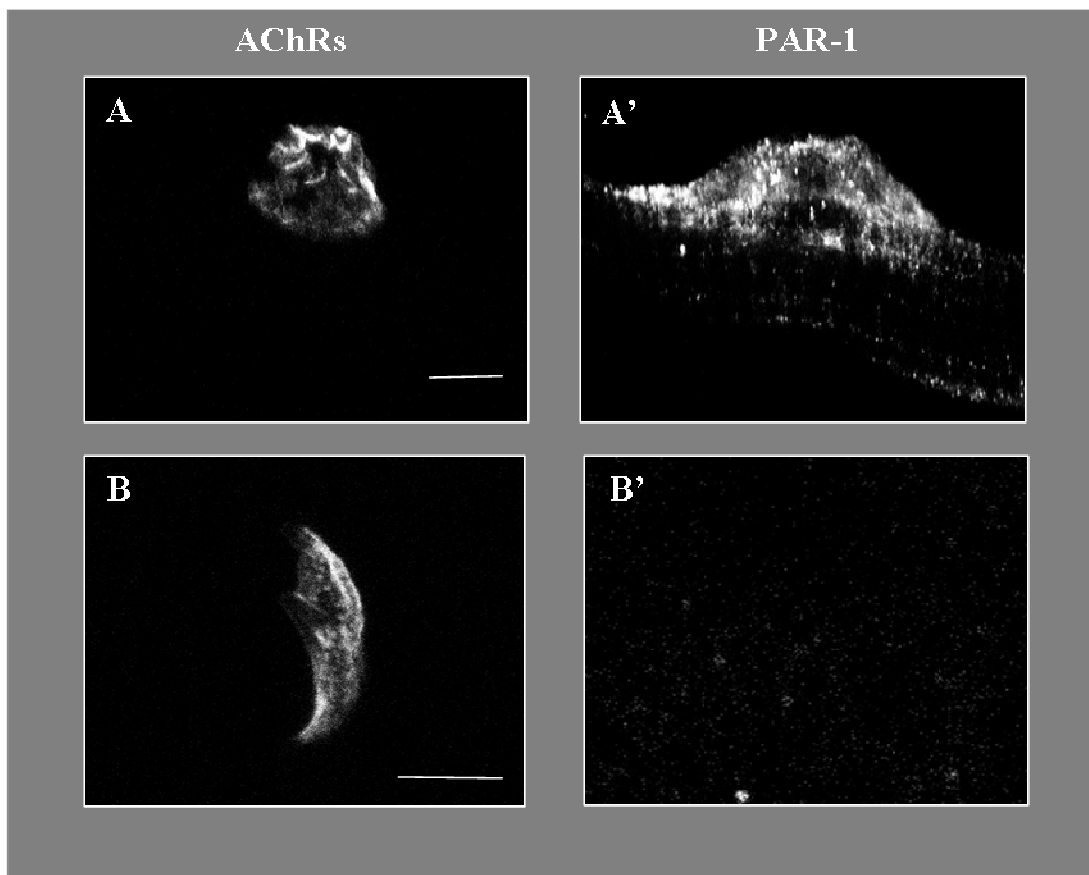


Figura 19. Immunolocalització del receptor de la trombina PAR-1 a les unions neuromusculars: a les imatges obtingudes amb el microscopi confocal es mostra la immunoreactivitat positiva de PAR-1 (A') i els AChRs (A i B) en múscul LAL d'animals de 6 dies de vida postnatal. L'anticòs anti-PAR-1 preincubats amb el seu pèptid PAR-1 no va ser detectat (B'). Barra d'escala = 10 µm.

2.3. Canvis d'expressió de PAR-1 a les unions neuromusculars durant el desenvolupament

Mitjançant microscòpia de fluorescència, es va fer una descripció qualitativa dels patrons de reactivitat a les NMJs dels músculs LAL comparant-los amb els patrons dels AChRs. Com s'ha dit anteriorment l'eliminació sinàptica a les NMJ de músculs de rata, es dona durant el primer mes de vida postnatal (Lanuza et al., 2001) sent contemporània amb la maduració dels agrupaments d'AChRs postsinàptics (Steinbach, 1981; Slater, 1982a, b; Bewick et al., 1996; Lanuza et al., 2002). Per tal d'examinar com es relaciona l'expressió temporal i espacial de PAR-1 amb aquest fenomen, es van realitzar experiments per detectar PAR-1 tant en múscul esquelètic adult com durant el desenvolupament. Es va detectar per immunocitoquímica a totes les edats estudiades, encara que es van trobar diferències entre edats (**Figura 20**).

Al dia postnatal 0 (P0), s'observa un patró finament puntejat restringit a l'àrea reactiva pels AChRs. Les àrees d'alta densitat de PAR-1 coexisteixen amb les àrees dels AChRs, però també hi ha marcatge de AChRs que no coincideix amb marcatge de PAR-1.

A P6 es va observar una gran expansió de les àrees positives pel ThR, àrees que excedien en varis micròmetres els límits dels agrupaments de AChRs (**Figura 20**). De fet, en alguns casos, la immunoreactivitat de PAR-1 era superior fora dels límits de la placa sinàptica. Aquest patró de marca també va ser puntejat. Dins els agrupaments d'AChRs es van observar punts amb una colocalització molt precisa.

A P14, dia postnatal on ja gairebé s'ha donat l'eliminació sinàptica, ja no es va observar l'expansió de PAR-1 prèviament descrita i es va tornar a observar una localització més precisa dins la placa sinàptica. No obstant, es van trobar dos patrons de marca diferents. Encara que en algunes plaques sinàptiques la immunoreactivitat per PAR-1 era principalment difosa excedint en alguns micròmetres l'agrupament d'AChRs, en d'altres es va observar una immunoreactivitat finament puntejada i estrictament restringida a la placa sinàptica.

A P30, PAR-1 es va trobar perfectament concentrat a l'àrea sinàptica i va mostrar una alta colocalització amb els AChRs. No obstant, es van observar algunes zones (**Figura 20, fletxa**) amb una marca per ThR amb forma elongada que no colocalitza amb els AChRs fet que suggereix que PAR-1 es pot estar expressant a l'axó o a la cèl.lula de Schwann. A totes les edats examinades es van poder observar imatges similars a aquesta (**Figura 20, fletxes**).

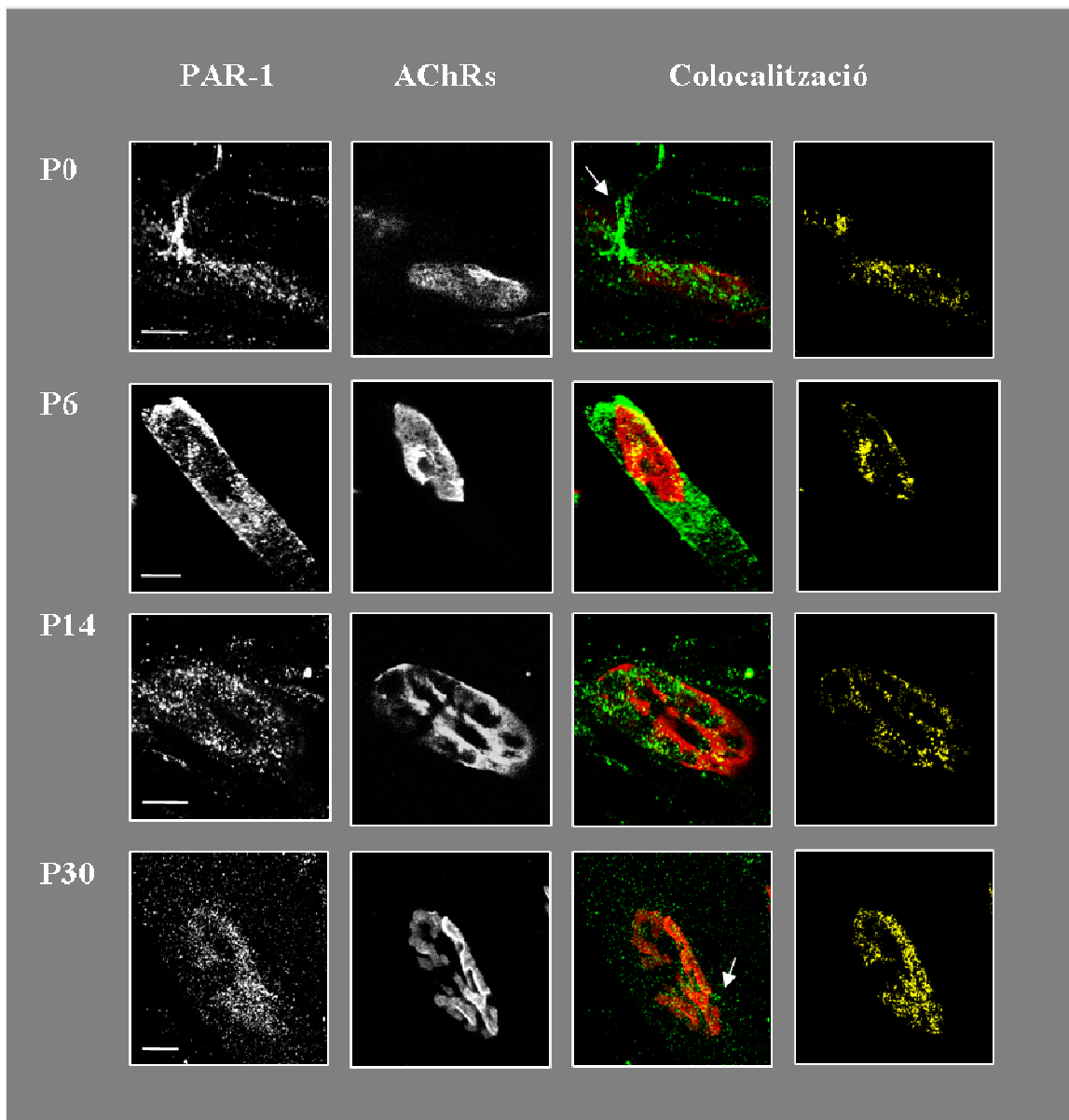


Figura 20. PAR-1 a les unions neuromusculars durant el període d'eliminació sinàptica postnatal. Unions neuromusculars d'animals de 0, 6, 14 i 30 dies de vida postnatal van ser processades per la immunodetecció de PAR-1, en verd i els AChRs en vermell. A la tercera columna es pot veure la colocalització d'aquests dos marcatges, veient-se en groc els punts on exactament coincideixen les dues tincions. La darrera columna mostra només els punts on coincideixen les dues marques. Les fletxes a P0 i P30 indiquen la existència de marca positiva per PAR-1 no colocalitzada amb els AChRs, fet que indica que és molt probable que PAR-1 s'estigui expressant als axons i/o a les cèl.lules de Schwann. Barra d'escala = 10 µm.

2.4. Immunolocalització de PAR-1 en unions neuromusculars denervades

La immunoreactivitat positiva per PAR-1 que es va observar als llocs sinàptics suggereix una localització postsinàptica d'aquest, encara que no es pot descartar que també es trobi localitzat als terminals nerviosos com s'ha comentat anteriorment.

Per testar la localització postsinàptica de PAR-1, es va axotomitzar totalment el nervi que innerva el múscul LAL (la branca auricular del nervi facial) de rates de 30 dies de vida postnatal, 7 i 12 dies abans de l'observació. També van ser realitzats alguns experiments amb múscul Soleus dennervat per tal de confirmar la nostra hipòtesi en un altre model muscular. La dennervació va ser comprovada mitjançant immunohistoquímica amb anticossos anti-neurofilament i anti-sinaptofisina. Aquests músculs van presentar marcatge positiu per PAR-1 a les unions neuromusculars denervades (**Figura 21**). Així, encara que amb aquesta metodologia no es pot descartar la localització de PAR-1 al terminal nerviós, la immunoreactivitat trobada en unions neuromusculars aneurals està indicant la localització de PAR-1 a la membrana muscular, a la cèl.lula de Schwann o en ambdòs.

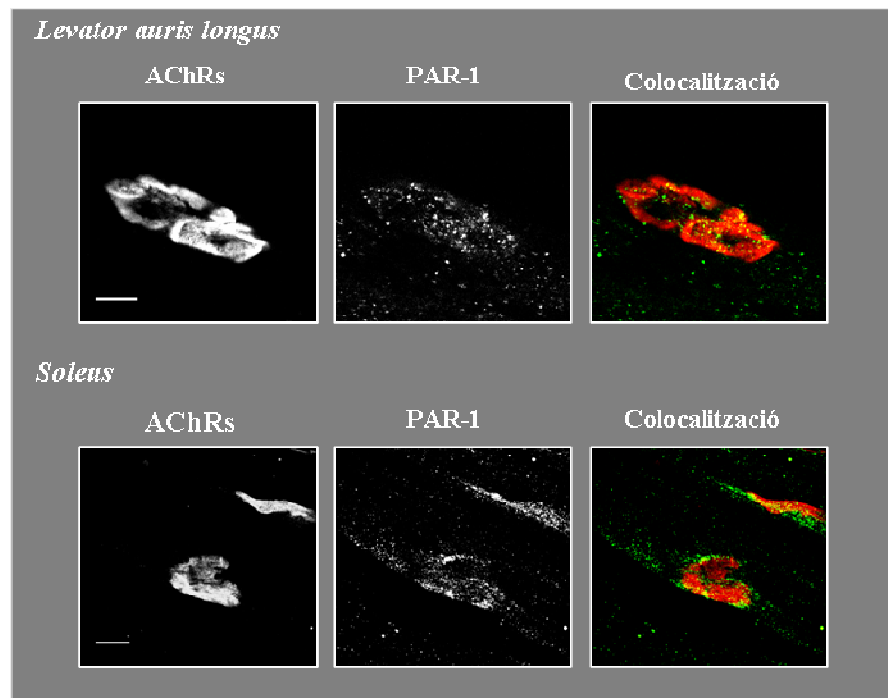


Figura 21. PAR-1 a les unions neuromusculars denervades. S'observa a les imatges unions neuromusculars de múscul LAL i *Soleus* de 12 dies postdenervació marcades amb un anticòs anti-PAR-1 i amb α -bungarotoxina conjugada a rodamina. S'observa marca positiva per PAR-1, una vegada s'ha donat la degeneració axonal. A la tercera columna es mostra en color la superposició de les dues imatges. Barra d'escala = 10 μ m.

2.5. Immunolocalització de PAR-1 en cèl.lules musculars aïllades

Hem demostrat que el receptor de la trombina PAR-1 es localitza al múscul esquelètic a les unions neuromusculars i pot estar colocalitzat amb els AChRs amb molta precisió. Els resultats obtinguts en els experiments de denervació ens suggereixen que PAR-1 pot estar localitzat a les cèl.lules musculars però no podem descartar que aquest senyal positiu per a PAR-1 provingui de les cèl.lules de Schwann. Per demostrar la localització postsinàptica de PAR-1, es van sotmetre els músculs LAL a un tractament amb col.lagenasa (Bekoff i Betz, 1977) i es va immunolocalitzar PAR-1 a les cèl.lules musculars. Gràcies a aquest tractament, es van obtenir cèl.lules musculars aïllades, podent descartar així altres tipus cel.lulars presents al teixit muscular esquelètic. A la **Figura 22** s'observa com després del tractament amb col.lagenasa, es van eliminar els terminals nerviosos (no hi ha la proteïna syntaxina, proteïna present a les zones actives del terminal nerviós) així com les cèl.lules de Schwann (no es va detectar la proteïna marcador de cèl.lules de Schwann S-100). En canvi, es mantenen les proteïnes postsinàptiques (es va detectar la subunitat δ dels AChRs) (**Figura 22**).

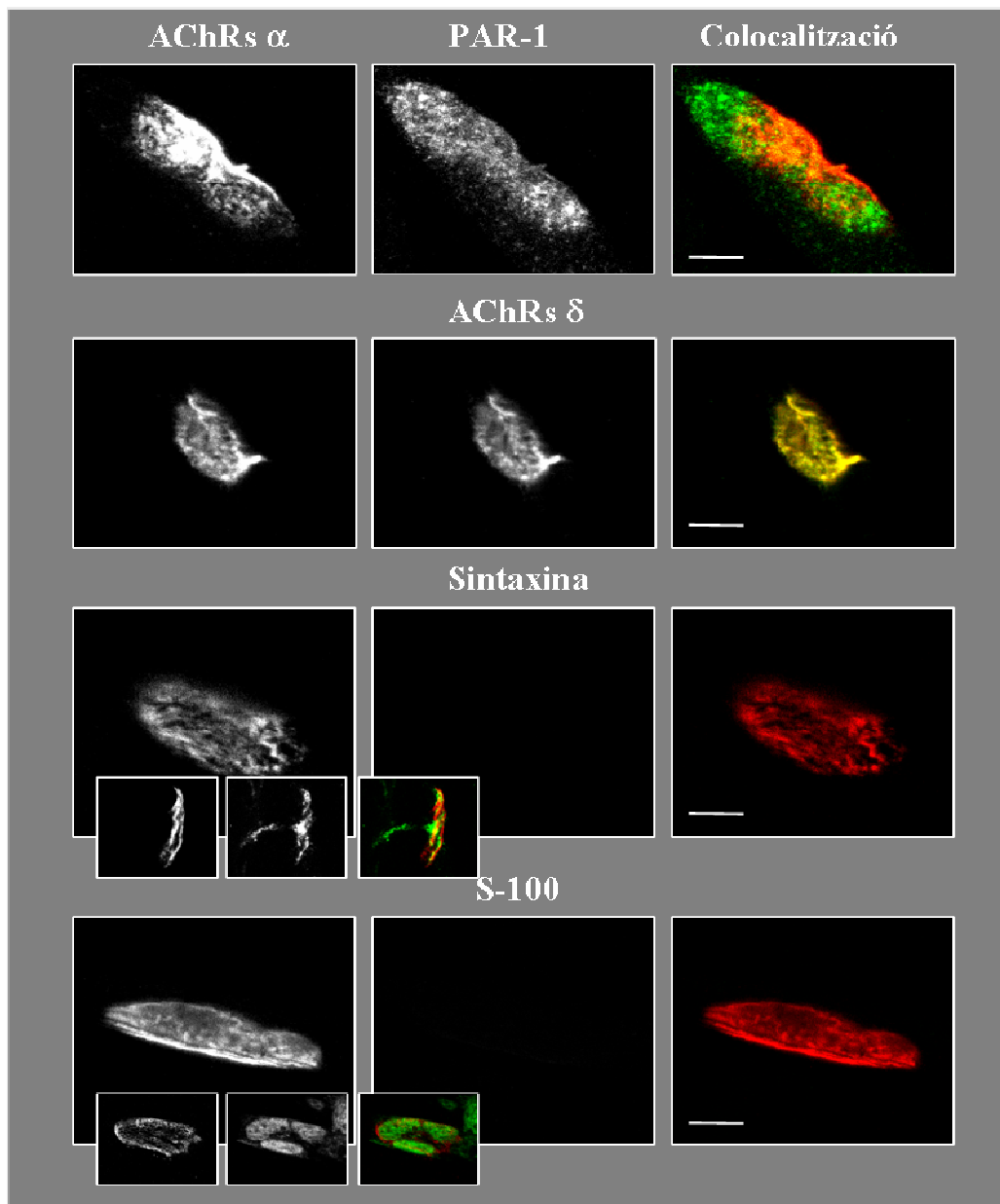


Figura 22. PAR-1 a fibres musculars aïllades després d'un tractament amb col.lagenasa. PAR-1 es va detectar a les regions sinàptiques de fibres musculars aïllades. Els anticossos anti AChR δ , sintaxina i S-100 van ser utilitzats per demostrar que aquest tractament elimina tant el terminal nerviós com les cèl.lules de Schwann, mentre que el component postsinàptic queda intacte. A les imatges petites, es mostren unions neuromusculars abans del tractament amb col.lagenasa, en aquestes imatges podem observar tinció positiva tant per la sintaxina com per S-100. La tercera columna mostra la superposició de les imatges verdes (PAR-1) i vermella (α -bungarotoxina (AChR α) conjugada a rodamina). Barra d'escala = 10 μ m.

2.6. Immunolocalització de PAR-1 en cultius musculars primaris

Amb la fi de confirmar la presència de PAR-1 a les cèl.lules musculars es va estudiar la seva presència en cultius primaris de miotubs de ratolí i la seva possible colocalització amb les àrees on els AChRs s'agrupen espontàniament sense l'estímul nerviós. A la **Figura 23** es pot observar com PAR-1 es localitza a la zona dels agrupaments espontanis d'AChRs. El marcatge fluorescent per PAR-1 no es va observar quan es van realitzar controls negatius incubant en absència d'anticòs primari o preincubant amb el pèptid bloquejant de PAR-1. A més a més, aquest experiment va posar de manifest el fet que no és necessari la presència del terminal nerviós per la inducció de la expressió d'aquest receptor.

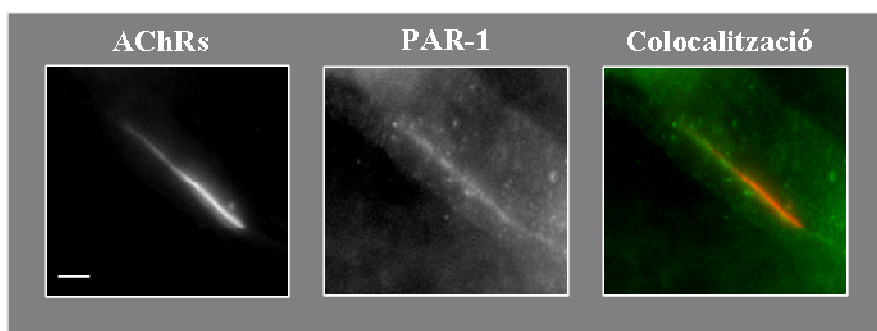


Figura 23. PAR-1 en cultius primaris de miotubs de ratolí. Els cultius de miotubs van ser marcats amb anti-PAR-1 i amb α -bungarotoxina conjugada a rodamina. El senyal positiu per PAR-1 només va ser detectat a les zones on els AChRs s'agrupen espontàniament. La tercera imatge mostra la superposició de les imatges verdes (PAR-1) i vermella (α -bungarotoxina conjugada a rodamina). Barra d'escala = 10 μ m.

3. El procés de maduració de les unions neuromusculars depèn de PKC

3.1. L'activació de PKC produeix una acceleració de la maduració dels agrupaments sinàptics d'AChRs mentre que el bloqueig la retarda

Resultats anteriors del nostre laboratori van mostrar que el procés fisiològic d'eliminació sinàptica *in vivo* s'accelera en aplicar trombina i es veu blocat després de l'administració d'hirudina. Hem demostrat com aquest procés és resultat de l'activació d'una cascada de transducció de senyal que comença amb l'activació del receptor de la trombina PAR-1, present aquest a l'àrea sinàptica (Lanuza et al., 2003). També es va observar que la PKC té un important efecte sobre aquest fenomen (Lanuza et al., 2001). Observant que en aplicar un potent activador d'aquesta quinasa, el

forbol 12-miristat 13-acetat (TPA) es va accelerar aquest procés, efecte contrari al trobat quan es va aplicar un inhibidor: Calfofostina C (CaC).

Donada la relació, que ja hem vist anteriorment, existent entre retracció axonal i maduració dels agrupaments d'AChRs postsinàptics es van estudiar durant els primers dies postnatsals l'efecte que tenien sobre la maduració d'aquests agrupaments els agents que interfereixen amb l'activitat de la PKC. Aquests agents van ser aplicats *in vivo* directament sobre la superfície del múscul LAL. Els animals van rebre una injecció diària des del quart dia postnatal (P4) i els músculs LAL van ser estudiats els dies postnatsals 6, 8 i 12 (P6, P8, P12). La injecció per si mateixa dels diferents agents no produeix cap efecte sobre la morfologia dels terminals nerviosos ni sobre la morfologia dels agrupaments d'AChRs. Van ser analitzats diferents paràmetres morfològics i fisiològics per comprovar que no existeix cap reacció tòxica patològica a causa d'aquests agents injectats i que no tenen cap acció no específica sobre la maduració nervi-múscul (Lanuza et al., 2001). Per incrementar selectivament l'activitat de la PKC es va injectar forbol 12-miristat 13-acetat (TPA). Està ben descrit que l'efecte del TPA sobre l'activitat de la PKC és dosi dependent, de manera que dosis altes produeixen una activació inicial per posteriorment passar a inhibir a la PKC (Matthies et al., 1987; Lai i El-Fakahany, 1988; Deakin et al., 1990; Girard i Kuno, 1990; Lanuza et al., 2000). Es va assajar la concentració de TPA descrita com activadora (10nM) en el mateix sistema que havíem utilitzat prèviament (Lanuza et al., 2001). Vàrem trobar que aquesta dosi afecta moderadament a l'eliminació axonal postnatal en la NMJ de LAL *in vivo*, reduint entre els dies 4 i 6 el percentatge de sinapsis innervades per 3 o més axons. En canvi, després de l'aplicació de TPA 10 nM, la distribució de les diferents morfologies dels agregats d'AChRs sinàptics va ser diferent del control en cada un dels dies considerats (**Figura 24B**; $p < 0.001$, test de la Chi²). Només dos dies després de l'exposició al TPA (dia 6), el percentatge de tipus morfològic M1 que es va trobar va ser gairebé el mateix que el que es va trobar en animals controls de 12 dies. El dia postnatal 8, es va trobar gairebé el mateix percentatge de M2 i M3, mentre que als animals control el percentatge de M2 va ser més del doble que el de M3. Aquesta tendència es va donant fins al dia 12.

Per estudiar l'efecte de la inhibició selectiva de PKC es va utilitzar Calfofostina C a la dosi que havíem comprovat anteriorment que modifica el procés d'eliminació sinàptica (CaC, 200 nM). Com ja hem descrit abans, els animals van rebre una injecció subcutània diària de CaC a una concentració de 200 nM sobre el múscul LAL des del dia 4 postnatal (P4) i van ser sacrificats els dies 6, 8 i 12 (P6, P8, P12). De la mateixa manera que passava amb el tractament amb TPA, quan el múscul LAL va ser exposat a CaC, la proporció relativa de les diferents morfologies dels agregats

d'AChRs (M1-M5) va variar respecte als animals control tractats amb PBS (**Figura 24C**; $p < 0.001$, test de la Chi2).

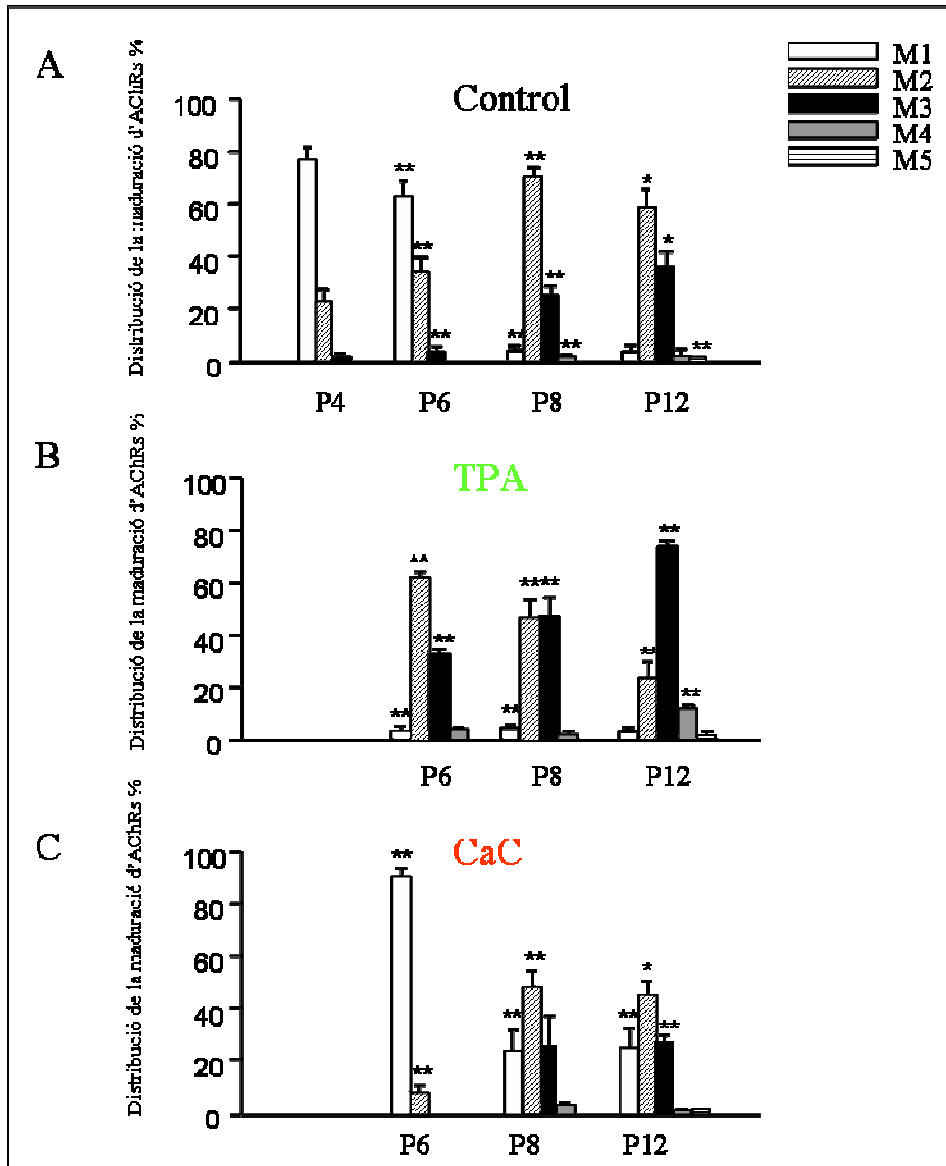


Figura 24. Efecte de diferents agents activadors i inhibidors sobre la PKC. Els animals van rebre diàriament una injecció des del dia 4 postnatal i els músculs LAL van ser estudiats els dies 6, 8 i 12. Per incrementar selectivament l'activitat de la PKC es va fer servir TPA. Després de l'acció del TPA a una concentració de 10 nM, la distribució de les morfologies dels AChRs va ser diferent a la trobada en animals control de la mateixa edat ($p < 0.001$, test de la Chi2). PKC va ser inhibida selectivament mitjançant CaC a una concentració de 200 nM. La distribució de les diferents morfologies dels agrupaments de AChRs també va ser diferent a la trobada en animals controls el mateix dia d'observació ($p < 0.001$, test de la Chi2). També s'indiquen les diferències entre el valor mig dels percentatges de cada morfologia entre els músculs tractats amb TPA i CaC, cada dia en relació amb el control no tractat (*, $p < 0.001$; **, $p < 0.01$).

Es va definir índex de maduresa (i.m.) com un nombre que expressa el nivell mitjà de maduració dels agregats d'AChRs. Aquest i.m. està comprès de 1 fins a 5 i aquests valors van ser obtinguts assignant un nombre de l'1 al 5 a cada agrupament d'AChRs d'acord amb la classificació abans esmentada (1 al tipus morfològic M1, 2 al tipus morfològic M2,..., 5 al tipus morfològic M5). D'aquesta manera, s'obté un nombre indicatiu del grau de maduresa d'un determinat múscul o d'un determinat tractament. L'exposició del múscul LAL *in vivo* a dosis de TPA activadores va resultar en una acceleració de la maduració dels agregats d'AChRs postsinàptics. A la **Figura 25**, es pot observar l'increment significatiu de l'i.m. de plaques motores de LAL entre els dies 6 i 12 de tractament amb TPA respecte als animals control. Tal i com s'esperava, va ser observat un important retard en la maduració en tots els dies considerats quan va ser injectada sobre la superfície del múscul LAL dosis inhibidores de CaC (**Figura 25**).

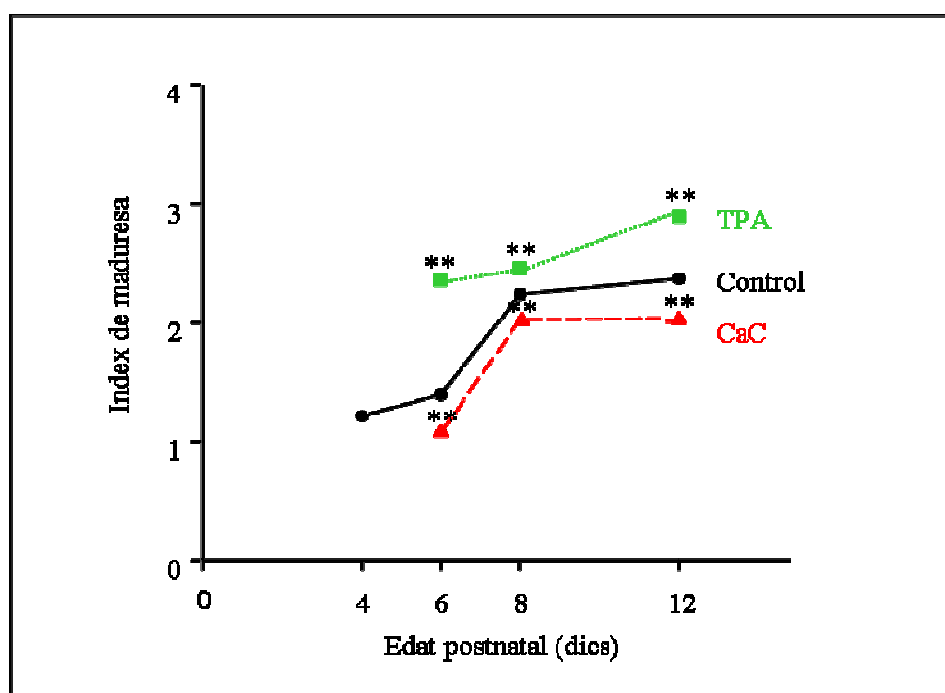


Figura 25. Evolució de l'índex de maduresa (i.m.) entre els dies 4 i 12 postnats. Hi ha un increment significatiu respecte el control del i.m. entre els dies 6 i 12 després del tractament amb TPA. El i.m. als músculs tractats amb CaC en cada punt considerat és significativament inferior que el que es troba als corresponents controls (**, $p < 0.01$).

3.2. La PKC actua principalment sobre els agrupaments d'AChRs i no directament sobre els axons

A les **Figures 26A i 26B** es compara la mitjana del nombre d'axons per sinapsi amb el percentatge dels agregats de receptors en un estat de maduració igual o superior a 3, després del tractament amb TPA i CaC (dies postnatsals 6 i 12, que han rebut 2 i 8 dosis respectivament). Es va triar aquest estadi de maduració postsinàptica perquè és el que reflecteix clarament la pèrdua d'AChRs dins una regió concreta de l'àrea sinàptica. El TPA va produir un increment en la maduració dels receptors ($p < 0.01$, test de la Chi2), reflexat en un increment dels "forats", respecte els animals control (tant el dia 6 com el dia 12, **Figures 26A i 26B**), sense que es produeixi una disminució significativa dels axons per sinapsi. Això suggereix que l'activació produïda pel TPA fa que la PKC actuï inicialment sobre els agregats d'AChRs i no directament sobre els axons. Per comprovar l'especificitat de l'efecte del TPA, es va injectar en animals control l'èster de forbol inactiu forbol-4 α 12,13-didecanoat. El tractament de 2 dies amb una concentració de 10 nM no va modificar el percentatge de poliinervació observat en músculs no tractats o injectats amb PBS.

Una observació interessant és que es va trobar un efecte regressiu al dia 6 consistent en que el percentatge de M1 (estadi més immadur) era significativament superior al percentatge trobat en el dia 4 abans de la injecció amb CaC (**Figura 24**). Aquest efecte va anar acompanyat d'una disminució paral·lela del tipus M2 i d'una completa absència de formes M3. Amb el bloqueig de la PKC, una porció significativa dels agregats que el dia 4 ja havien evolucionat a una morfologia M2, es van desorganitzar al 6 i la seva morfologia va revertir a la forma immadura M1. Així, l'efecte de la CaC pot no només ocasionar un endarreriment de la diferenciació postsinàptica si no que pot també causar una reversió dels agregats d'AChRs prèviament diferenciats a morfologies més immadures. Entre els dies 6 i 12, la distribució de les morfologies postsinàptiques van correspondre a un estat molt més immadur que als controls ($p < 0.001$, test de la Chi2). A més a més, durant el tractament amb CaC, el grau de maduració de les morfologies dels agrupaments del dia postnatal 12 va ser igual del del dia 8. Això ens està indicant que la CaC produeix un total bloqueig de la maduració postsinàptica global entre P8 i P12. De totes maneres, hi ha agregats d'AChRs que arriben al grau de maduresa apropiat en el dia postnatal estudiat. Al dia 8, el percentatge de M3 i M4 no va ser diferent dels controls no tractats i al dia 12 es va trobar un percentatge normal del tipus morfològic M4.

Prèviament havíem trobat que la inhibició de la PKC per la CaC impedeix completament el procés d'eliminació sinàptica en el període de temps entre P4 i P8. Durant el període comprès entre P8 i P12, el bloqueig de la PKC no semblava enlentir la taxa d'eliminació sinàptica, però les plaques motores poliinervades eren superiors als valors normals a P12 (Lanuza et al., 2001). Els actuals resultats ens ho confirmen. El conjunt d'aquestes dades ens suggereix que durant la segona setmana postnatal poden existir altres mecanismes funcionant en paral·lel a la via dependent de PKC. Aquests mecanismes paral·lels serien els responsables de la maduració d'alguns agregats d'AChRs en absència d'activitat PKC. Aquesta hipòtesi vindria reforçada per la següent observació: el percentatge d'agregats amb “forats” i la mitjana del nombre d'axons per NMJ tendeix a aproximar-se a valors controls el dia postnatal 12 (després de 8 dies de tractament amb CaC), encara que existeixen diferències ($p < 0.001$, **Figura 26B**). En canvi, en el període de P4 a P6, la CaC evita completament l'eliminació axonal i la maduració dels agregats, cosa que ens indica que en aquest període la eliminació i la maduració és completament dependent de PKC. La CaC entre P4 i P6 endarrerix la maduració dels agregats, i reté la innervació polineuronal. L'efecte del TPA consisteix en una acceleració en la maduració dels agregats d'AChRs amb un efecte relativament petit en l'eliminació axonal. Això significa que l'activitat de la PKC és necessària tant per la maduració pre- com per la postsinàptica. La mitjana d'axons per sinapsi no canvia incrementant l'activitat de la PKC a diferència dels agregats de receptors, dels que sí accelera la maduració. Amb aquestes troballes podem concloure que la maduració dels agregats d'AChRs es pot modular (accelerar o endarrerir) amb drogues que afecten a l'activitat de la PKC *in vivo*.

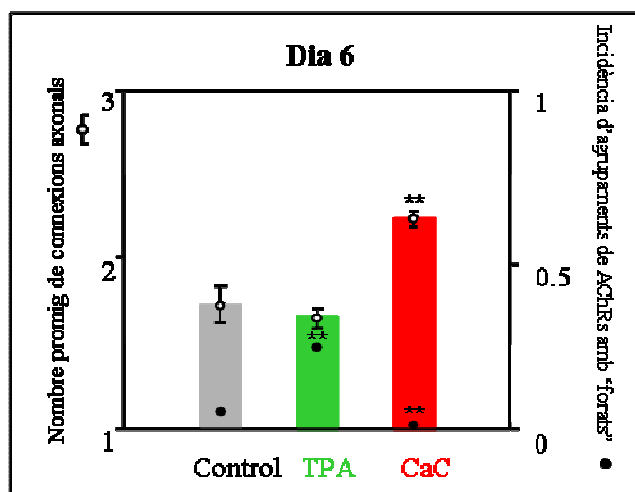


Figura 26A. Nombre mig d'axons per sinapsi *versus* el percentatge dels agrupaments de AChRs amb “forats” ($M \geq 3$) després del tractament amb TPA o CaC els dia postnatal 6 (2 dies de tractament). Pot ser observat que el TPA produeix un increment superior ($p < 0.01$, test de la Chi2) dels agrupaments amb “forats” respecte el control sense que sigui observat un descens significatiu del nombre de terminals axònics innervant una fibra muscular.

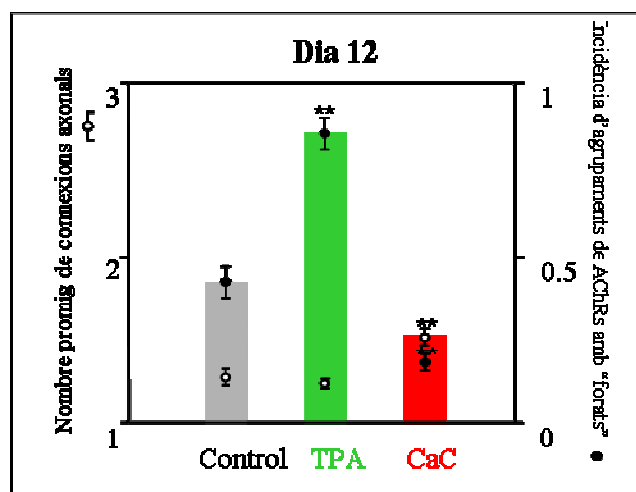


Figura 26B. Nombre mig d'axons per unió neuromuscular *versus* el percentatge dels agrupaments de AChRs amb "forats" ($M \geq 3$) després del tractament amb TPA o CaC el dia postnatal 12 (8 dies de tractament). Pot ser observat que el TPA produeix un increment superior ($p < 0.01$, test de la Chi2) dels agrupaments amb "forats" respecte el control sense que sigui observat un descens significatiu del nombre de terminals axònics per unió neuromuscular.

3.3. L'activació de PKC també provoca la desaparició d'AChRs de la perifèria de l'agrupament d'AChRs

Donada la complexitat morfològica dels agregats d'AChRs es va fer un estudi morfològic quantitatiu per intentar matitzar els canvis morfològics que es donen durant la maduració. A les **Figures 27A i 27B** podem veure que després de 8 dies de tractament amb TPA (dia postnatal 12), l'àrea mitjana i el perímetre mitjà dels agregats d'AChRs esdevé significativament reduïda respecte als controls no tractats. Aquest fet suggereix la reorganització induïda pel TPA prèviament descrita. Al voltant del dia postnatal 6 no es van detectar canvis significatius respecte al control. Contràriament, la inhibició selectiva de la PKC amb la CaC durant dos dies resulta en un increment significatiu de la mitjana de l'àrea i el perímetre dels agregats sinàptics d'AChRs. Aquestes dades estan suggerint una dispersió d'AChRs des dels agregats inicials i concorden amb el retard prèviament descrit de la maduració a causa de la inhibició de la PKC per efecte de la PKC i la reversió de les morfologies M2 a M1.

Com ja hem comentat prèviament, el dia postnatal 12, el percentatge d'agregats d'AChRs amb "forats" i la mitjana del nombre d'axons per NMJ tendeixen a aproximar-se a valors control. A més, hi ha agregats d'AChRs que arriben a estats de maduració corresponents a l'edat encara

que hi hagin estat tractats amb CaC indicant l'existència d'un mecanisme independent de PKC que pot estar actuant durant la segona setmana de vida. Les modificacions dels paràmetres morfomètrics induïdes pel TPA i la CaC es van donar sense canvis significatius en el diàmetre de la cèl.lula muscular ($7,34 \pm 0,52 \mu\text{m}$ en controls no tractats de 12 dies). D'acord amb l'esperat, durant la segona setmana postnatal, les plaques motores dels animals control van incrementar en àrea i en perímetre. Entre els dies 4 i 6 postnats, es va veure un lleuger decrement en l'àrea dels agregats d'AChRs. Aquesta reducció de l'àrea podria estar relacionada amb la pèrdua d'AChRs de regions riques en aquests del límit de l'agrupació d'AChRs durant la intensa pèrdua axonal descrita durant aquest període.

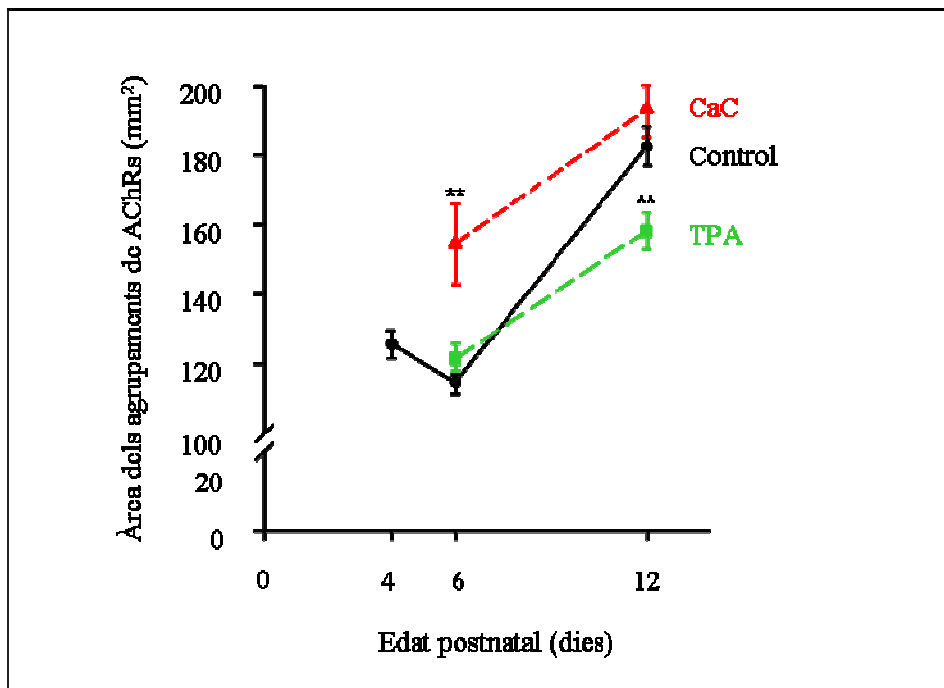


Figura 27A . Canvis en l'àrea dels agrupaments de AChRs durant el desenvolupament postnatal.

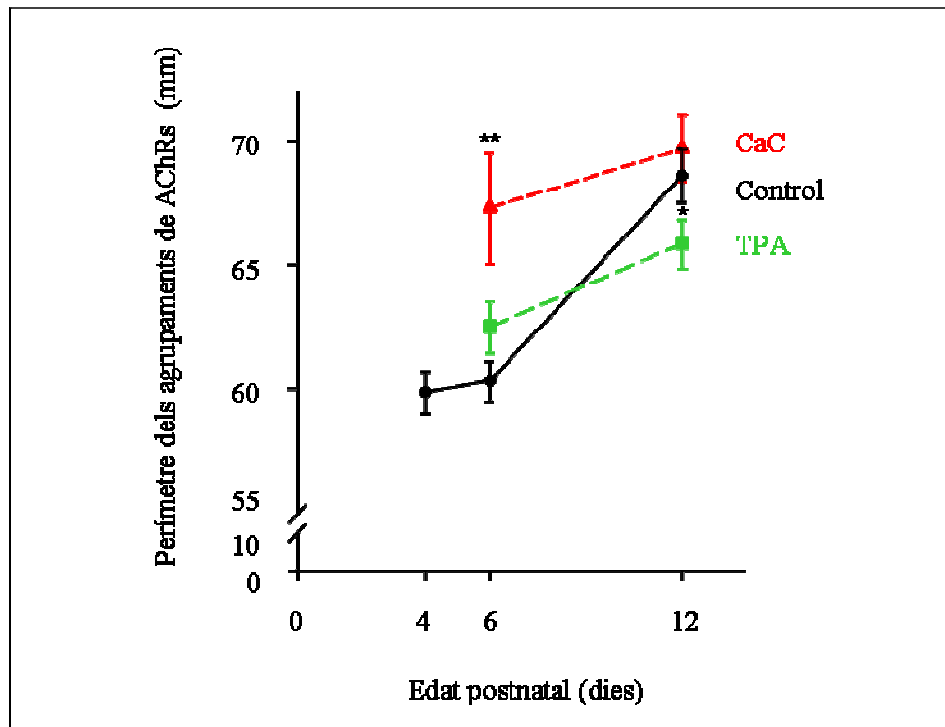


Figura 27B. Canvis al perímetre dels agrupaments de AChRs durant el desenvolupament postnatal.

4. PKC θ en la Unió Neuromuscular

De totes les isoformes de PKC, la isoforma θ es va descriure com a específica de múscul esquelètic i a més a més es va comprovar que està regulada durant el desenvolupament (Hilgemberg et al., 1995, 1996). Per aquesta raó ens vàrem plantejar si aquesta isoforma estava implicada en el mecanisme d'eliminació sinàptica dependent de PKC. En particular, vàrem estudiar si el dèficit d'aquesta isoforma provocava els mateixos efectes que els experiments farmacològics de bloqueig de PKC i així atribuir a aquesta isoforma l'acció atribuïda genèricament a PKC. En particular, com s'havia procedit anteriorment, es va analitzar el grau d'innervació del múscul LAL així com el grau de maduració dels agrupaments d'AChRs. També es van analitzar paràmetres indicatius de l'estat de desenvolupament general del múscul, de la unió neuromuscular i de l'animal. Els animals *knock outs* per la isoforma θ van ser cedits gentilment pel Dr. Phillip Nelson, del *Laboratory of*

Developmental Biology, National Institute of Child Health and Human Development, National Institutes of Health, USA.

4.1. El procés d'eliminació sinàptica i la maduració dels agrupaments sinàptics d'AChRs es veu alterada en animals deficients en la isoforma θ de la PKC

L'anàlisi de la innervació va mostrar que durant els 14 primers dies de vida postnatal, hi havia un endarreriment significatiu ($p < 0.05$) de la pèrdua axonal en animals deficients en PKC θ podent observar a la **Figura 28** com el dia que es dona el 50 % de l'eliminació sinàptica, en animals *knock outs* s'endarrereix de P5.5 a P9, malgrat que finalment s'assoleix l'estat de monoinnervació. El dia postnatal 8, quan ja ha començat el procés d'eliminació sinàptica en animals KO, podem observar que el percentatge de la innervació polineuronal és significativament diferent entre els animals control i els KO (50.2 ± 3.25 en animals control i 74.9 ± 1.88 en KOs). El dia postnatal 14, el percentatge de la innervació polineuronal no va ser diferent entre els dos tipus animals (tant en animals controls com en KO, aproximadament el 96% de les NMJ han assolit l'estat de monoinnervació) (**Figura 28**). Aquest endarreriment, ja va ser observat en els experiments farmacològics de blocatge de PKC (**Figura 26**). Quan va ser aplicat l'inhibidor de PKC Calfofostina C sobre la superfície del múscul LAL va ser observat un increment significatiu dels agrupaments d'AChRs innervats per dos o més axons tant el dia 6 com el dia 12 de vida postnatal. Aquest fet confirma l'existència d'un mecanisme paral·lel a l'acció de PKC θ que està influïent sobre aquest procés.

Paral·lelament a l'endarreriment de l'eliminació axonal es va observar un endarreriment de la maduració dels agrupaments de receptors d'ACh postsinàptics en animals KO (**Figura 29**). En aquesta figura podem observar com tant a P3 com a P7 el percentatge de la morfologia immadura M2 és significativament superior en animals KO, de la mateixa manera que és més baixa la morfologia madura M3. Aquest fet també havia estat observat en els experiments farmacològics anteriorment explicats (**Figura 24**), on va ser observat que la distribució de les diferents morfologies dels agrupaments d'AChRs canviava en blocar PKC. A la **Figura 24C** podem observar com el percentatge de la morfologia immadura M1 en animals de 6 dies de vida postnatal (després de dos dies de tractament) va ser superior a la observada en animals control de 4 dies de vida. Altre fet a ressaltar és que la morfologia madura M3 no apareix fins el dia 8 de vida postnatal en animals tractats amb Calfofostina C, quan en animals controls ja s'han observat el dia 4. Es va realitzar un estudi morfomètric per quantificar l'àrea ocupada pels agrupaments d'AChRs en WT i KO als 7 i 9

dies de vida postnatal. L'àrea ocupada pels agrupaments d'AChRs a P7 va ser significativament més petita en animals KO que en animals control. Aquest fet concorda amb el retard en la maduració dels agrupaments d'AChRs descrit anteriorment per la mateixa edat (Ratio area AChRs KO/ area AChRs Control = 0.815). En canvi, a P9, no existeixen diferències significatives entre KOs i controls, fet que indica que a aquesta edat els agrupaments d'AChRs tendeixen a adquirir una morfologia semblant a la control (Ratio area AChRs KO/ area AChRs Control = 1.002).

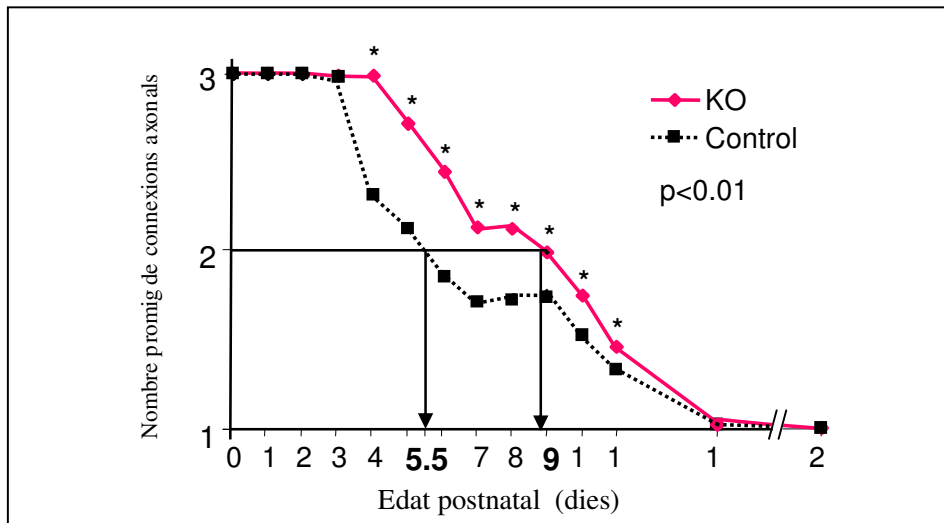


Figura 28. L'eliminació sinàptica en animals controls i KO. Es compara la mitjana del nombre d'axons per agrupament d'AChRs respecte els dies de vida postnatal. Les dades estan calculades com la mitjana \pm la desviació estàndard. Les fletxes mostren el dia de vida postnatal en que s'ha donat el 50% de l'eliminació sinàptica.

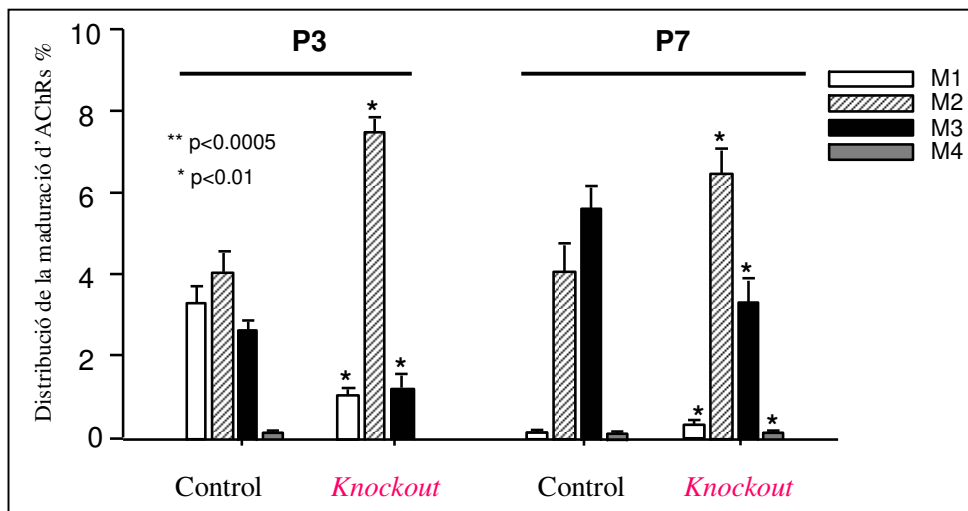


Figura 29. Maduració dels agrupaments d'AChRs en animals control i KO. Les dades estan calculades com la mitjana \pm la desviació estàndard.

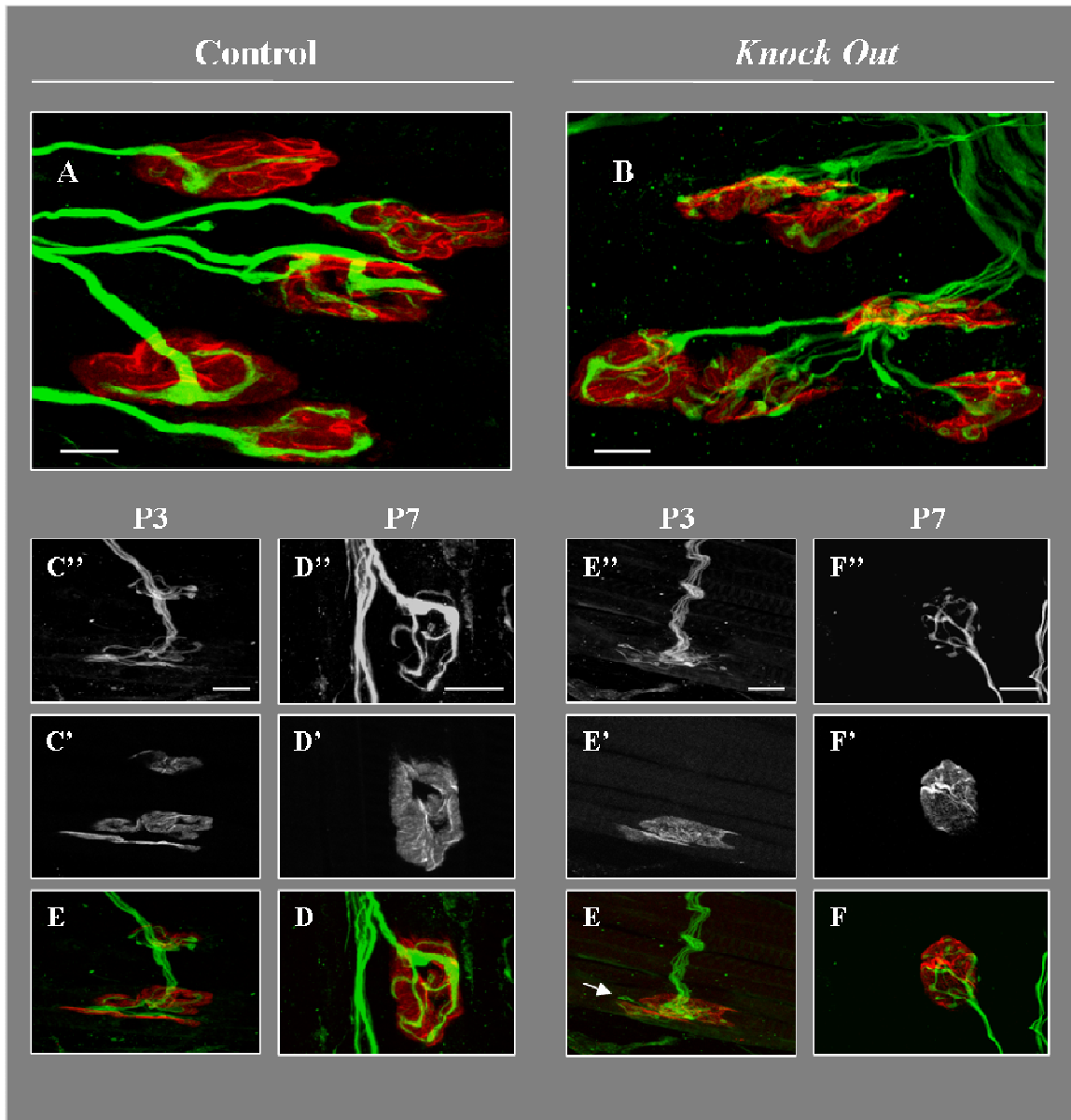


Figura 30. Exemples de NMJ de músculs LAL control i knock out en la isoforma θ de PKC. Es pot apreciar el diferent grau de maduració pre- i postsinàptic tant en l'aspecte general de la innervació del múscul (A i B) com en les NMJ monoinnervades (C, D) i múltiples innervades (E, F). Els axons van ser marcats amb un anticòs anti neurofilament-200 (C'', D'', E'', F'') i els AChRs amb rodamina conjugada a α -bungarotoxina. (C', D', E', F'). Els músculs control (A, C, D) mostren axons molt més madurs que els músculs KO (B, E, F). En aquests músculs és habitual veure estructures en creixement (E, fletxa). Barra d'escala = 10 μ m.

4.2. El desenvolupament general, muscular o neuromuscular no es veu alterat en animals deficients en la isoforma θ de la PKC

Amb la finalitat de comprovar que el retard trobat en la maduració de les unions neuromusculars dels animals carents de PKC θ és degut al dèficit d'aquesta proteïna i no a una alteració en el desenvolupament general i/o en el desenvolupament neuromuscular que poguessin patir els animals KO van ser realitzats diversos controls. Es va controlar el pes dels animals i, com es pot veure a la **Taula 1** no existeixen diferències significatives entre els controls i els KO. En aquest mateix sentit, el diàmetre de les cèl·lules musculars esquelètiques tampoc va ser significativament diferent respecte al diàmetre mesurat en animals controls ($7.61 \pm 0.51 \mu\text{m}$ en controls de 6 dies, 8.44 ± 0.87 en KO de la mateixa edat).

	Control P3	KO P3	Control P6	KO P6	Control P10	KO P10
Pes (g)	1.94 ± 0.34	1.93 ± 0.09	3.77 ± 0.31	3.98 ± 0.45	4.02 ± 0.72	4.87 ± 0.64

Taula 1. Comparació del pes entre animals controls i knock outs. Les dades estan expressades com la mitjana \pm la desviació estàndard.

Un indicador molecular de l'estat de diferenciació de la fibra muscular és la cadena pesada de la miosina (MHC). La **Figura 31** mostra que els nivells d'expressió de la cadena pesada de la miosina van ser iguals entre animals control i animals deficients en PKC θ .

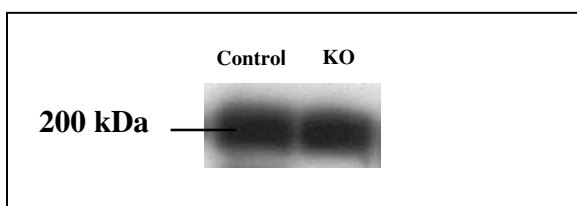


Figura 31. Expressió de la cadena pesada de la miosina en lisats totals de múscul esquelètic d'animals controls i *knock outs*. Els músculs van ser aïllats d'animals de 7 dies de vida postnatal. La mateixa intensitat del senyal positiu per l'anticòs anti-MHC (banda de 200 kDa) és indicatiu d'un mateix grau de diferenciació muscular entre controls i *knock outs*.

Per a descartar que el retard trobat en la maduració pre- i postsinàptica en els animals deficientes en PKC θ no era degut a un defecte en l'expressió de determinades molècules postsinàptiques que són essencials per a la formació dels agrupaments d'AChRs (veure Hall i Sanes, 1993), es va analitzar la seva expressió a la unió neuromuscular. L'expressió i localització de MuSK, rapsina i utrofina va ser indistingible a les NMJ dels animals control i en les dels KO (**Figura 32**).

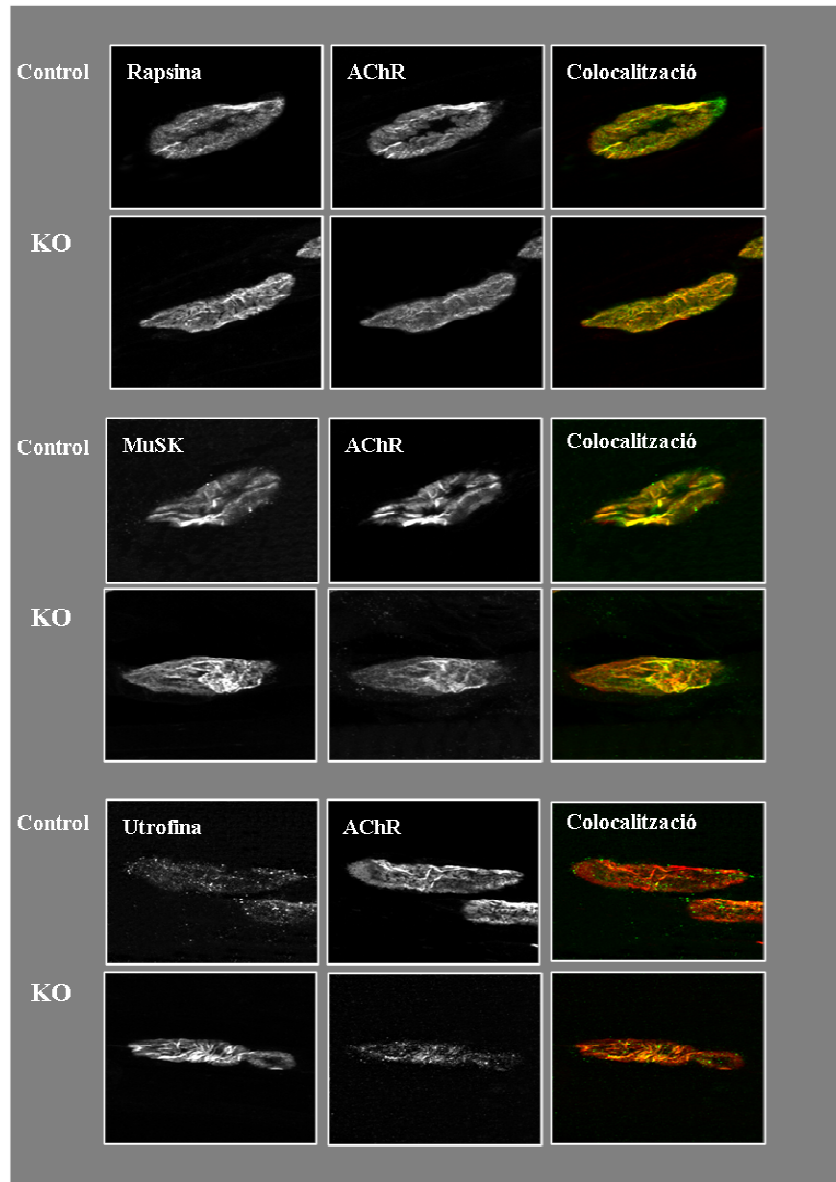


Figura 32. Expressió i localització de rapsina, MuSK i utrofina a les unions neuromusculars d'animals control i *knock outs* (KO). Unions neuromusculars d'animals de 7 dies de vida postnatal van ser processades per la immunodetecció de rapsina, MuSK o utrofina en verd i els AChRs en vermell. A la tercera columna es pot veure la colocalització d'aquests dos marcatges. Barra d'escala = 10 μ m.

El conjunt d'aquests controls realitzats és indicatiu de que ni el desenvolupament general de l'animal o del múscul ni l'expressió de molècules necessàries per l'agrupament estructural dels AChRs es veu alterat en animals deficientes en la isoforma θ de la PKC.

4.3. La isoforma θ de la PKC s'expressa a múscul esquelètic i a la medul·la espinal.

Malgrat Miles i col.laboradors (Hilgemberg et al., 1995, 1996) van demostrar la localització específica de PKC θ en múscul esquelètic, recentment s'ha descrit que aquesta isoforma també es troba localitzada al sistema nerviós central (Wilda et al., 2001) i en neurones en cultiu de la regió ventral de la medul·la espinal (Li et al., 2004). Per aquest motiu, es va analitzar l'expressió de PKC θ tant a múscul esquelètic com a la regió ventral de la medul·la espinal.

Aquesta isoforma de la PKC va ser detectada en western blots d'homogenats de múscul esquelètic. Es va testar un anticòs anti-PKC θ en western blots d'homogenat de múscul LAL d'animals de 7 dies de vida postnatal (**Figura 33**). L'anticòs va reaccionar amb una banda de 79 kDa, coincidint amb el pes molecular de PKC θ (Osada et al., 1992). A la **Figura 33** es pot veure el nivell d'expressió de PKC θ en animals control, KO i heterozigots. És de ressaltar que el nivell d'expressió detectat en animals control és el doble de l'observat en animals heterozigots.

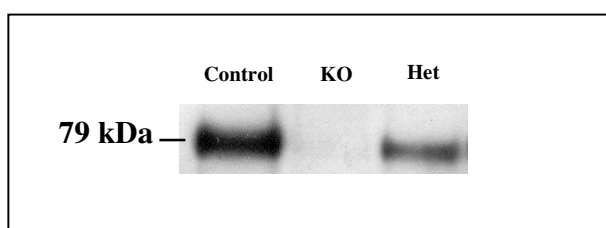


Figura 33. Western blots en lisats totals de múscul esquelètic d'animals control, heterozigots i *knock outs*. S'observa com la expressió de PKC θ és doble en animals controls que en animals heterozigots i absent als *knock outs*.

Amb la finalitat de determinar si aquesta isoforma expressada a múscul esquelètic es localitzava específicament al component postsinàptic de les unions neuromusculars es van realitzar experiments d'immunohistoquímica. Els músculs van ser sotmesos a un tractament amb col·lagenasa per tal d'eliminar el component presinàptic (terminal nerviós i cèl·lules de Schwann) de la NMJ i d'aquesta manera es van obtenir cèl·lules musculars aïllades. Després d'aquest tractament, es va observar una pràcticament completa colocalització entre el marcatge fluorescent positiu per la isoforma θ de la PKC i el dels receptors d'acetilcolina postsinàptics (**Figura 34**).

Aquests resultats indiquen que PKC θ té una localització postsinàptica fet que suporta la nostra hipòtesi d'una acció directament postsinàptica de PKC θ sobre els AChRs.

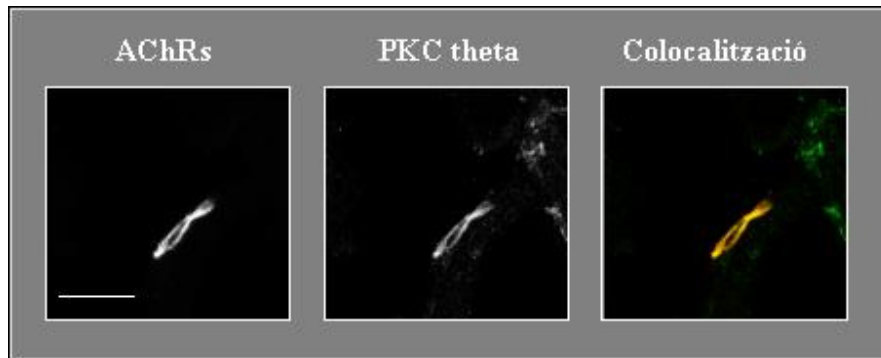


Figura 34. Expressió i localització de la isoforma θ de la PKC a les unions neuromusculars de fibres musculars aïllades després d'un tractament amb col.lagenasa. PKC θ es va detectar a les regions sinàptiques de fibres musculars aïllades. La tercera columna mostra la superposició de les imatges verdes (PKC θ) i vermella (α -bungarotoxina conjugada a rodamina). Barra d'escala = 10 μ m

Recentment, resultats del nostre grup han mostrat la presència de PKC θ en neurones de la regió ventral de la medulla espinal en cultiu amb un possible paper d'aquesta en el procés d'eliminació sinàptica (Li et al., 2004). Es va realitzar un doble marcatge amb CGRP o vAChT per localitzar les motoneurones i es va comprovar una total colocalització entre PKC θ i CGRP (Figura 35).

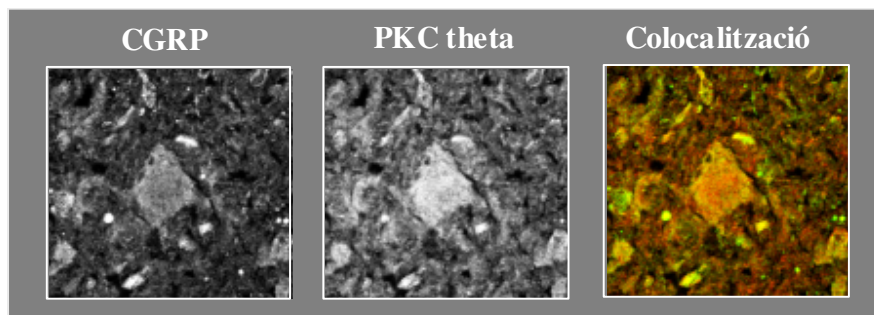


Figura 35. Expressió i localització de PKC θ a les motoneurones de la regió ventral de la medulla espinal. Seccions transversals de medulla espinal van ser processades per la immunodetecció de PKC θ , en verd i CGRP (marcador de motoneurones) en vermell. A la tercera columna es pot veure la colocalització d'aquests dos marcatges, veient-se en groc els punts on exactament coincideixen les dues tincions. Barra d'escala = 10 μ m.

V. DISCUSSIÓ

V. DISCUSSIÓ

La pèrdua de connexions nervioses és un procés que es dona tant en l'envelliment del sistema nerviós com durant el decurs de determinades malalties neurodegeneratives. Aquesta pèrdua de connexions també és un fenomen fisiològic que es dona durant el desenvolupament, abans de que quedin establerts els definitius i precisos circuits neurals madurs. Els mecanismes cel·lulars i moleculars que regulen aquest procés crucial del desenvolupament no són encara ben coneguts.

Durant el procés d'eliminació sinàptica postnatal la sinapsi neuromuscular es troba en canvi constant. A nivell presinàptic es dona pèrdua de connexions i simultàniament a aquesta, a nivell postsinàptic els agrupaments de receptors d'acetilcolina van patint importants canvis en la seva morfologia fins assolir l'estadi madur que es mantindrà durant la vida adulta. L'objectiu d'aquesta tesi ha estat l'estudi del procés fisiològic de maduració de les unions neuromusculars durant el desenvolupament postnatal i la implicació en aquest procés del sistema Trombina-PAR-1-Proteïna G-PKC.

1. Canvis morfològics i maduració dels agrupaments d'AChRs sinàptics durant el període d'eliminació sinàptica

S'ha estudiat la maduració dels AChRs sinàptics en relació al procés d'eliminació de la innervació polineuronal que caracteritza el desenvolupament neonatal de la unió neuromuscular de rosegadors. La distribució dels AChRs dins la NMJ pateix un dramàtic canvi durant les primeres setmanes de vida postnatal. Aquest període coincideix en el temps amb el període en el que es dona l'eliminació més important dels contactes sinàptics redundants. Per poder definir amb una major precisió el procés de maduració dels agrupaments de AChRs, s'ha creat una classificació d'aquests en 6 categories: de M1 a M6, sent la categoria M1 la morfologia d'agrupaments més immadura i M6 la morfologia més madura.

El recompte del nombre d'axons que estan en diferents moments innervant una mateixa placa motora és un indicador de la reducció de contactes sinàptics que s'està donant al sistema. Inicialment, en el moment del naixement, els axons que innerven una única fibra muscular s'entrellacen dins la placa uniforme d'AChRs (morfologies M1 i M2). Posteriorment, a mesura que els axons van sent eliminats van apareixent zones dins els agrupaments on la densitat de AChRs és

molt baixa (morfologia M3). Aquests llocs on la densitat d'AChRs és molt baixa no reben contacte per part de cap axó (**Figura 11**). Al mes de vida postnatal, més del 80% de les NMJs tenen una morfologia M5 (morfologia considerada madura) i, és en aquesta edat quan està finalitzant el procés d'eliminació sinàptica al múscul LAL. Posteriorment, a mesura que creix l'animal, es dona una expansió del terminal nerviós a l'hora que va creixent la fibra muscular. Aquest creixement presinàptic porta al patró discontinu de la geometria postsinàptica observada a l'adult (morfologia M6).

La maduració morfològica del component postsinàptic implica desestabilització i dispersió d'AChRs de regions concretes de l'agrupament, mentre que en d'altres regions es dona acumulació d'aquests portant a la formació d'àrees amb una alta densitat d'AChRs. És precisament en aquestes àrees on és present el terminal nerviós que s'ha mantingut. Hem trobat que abans que es formessin àrees sense receptors dins els agrupaments de AChRs, ja havia tingut lloc una gran pèrdua dels axons que inicialment havien arribat a les sinapsis (un 50% de reducció) (**Figura 14**). És a dir, durant el primer període postnatal (de 0 a 6 dies), la desaparició de receptors de l'àrea sinàptica no necessàriament precedeix la pèrdua axonal. Aquest fet va ser també trobat durant el desenvolupament postnatal de les NMJs de *Soleus* i *Extensor digitorum longus* (Slater, 1982a). En canvi, en NMJs de ratolins de a partir de 6 dies de vida postnatal ha estat descrit un procés en el qual es dona pèrdua d'AChRs abans que es doni la completa retracció de l'axó que està immediatament per sobre d'ells (Balice-Gordon i Lichtman, 1993). No obstant, recentment Walsh i Lichtman (2003) han estudiat l'eliminació sinàptica a les NMJ utilitzant animals transgènics que expressen diferents variants espectrals de GFP en diferents grups de motoneurons, trobant que la retirada d'un axó està acompanyada per l'expansió d'un altre axó que competeix a dins del territori postsinàptic recentment desocupat. Concordant amb les observacions inicials de Balice-Gordon i Lichtman nosaltres també vam observar una reducció de l'àrea dels agrupaments de receptors al dia 6 que pot indicar una pèrdua d'AChRs en la perifèria dels agrupaments coincidint amb el moment de la majoritària reducció axonal (**Figura 27**).

Les nostres observacions suggereixen que la maduració de la NMJ es pot dividir en tres etapes diferenciades:

1. Durant el període que va des del naixement al dia 6 de vida postnatal, es dona una gran reducció de la innervació polineuronal. A nivell postsinàptic es dona una molt baixa pèrdua d'AChRs dins els agrupaments. Així, a P6 aproximadament un 70% de les sinapsis han perdut al menys un axó,

mentre que només un 5% dels agrupaments d'AChRs mostren àrees lliures de receptors i, aproximadament un 35% d'ells han canviat la morfologia immadura M1 present al naixement. Durant aquest primerenc estadi de maduració, la pèrdua axonal sembla que es té lloc de manera independent als canvis que es donen a nivell postsinàptic. Slater (1982a) i Trachtenberg i Thompson (1997) han donat altres exemples on posaven de manifest que la pèrdua axonal es pot donar de manera independent de la pèrdua o redistribució d'AChRs. No obstant, entre P4 i P6 hem observat una lleu reducció de l'àrea dels agrupaments d'AChRs, indicant així una pèrdua de receptors durant el període d'intensa eliminació axonal. En NMJs de ratolins de 6 dies de vida postnatal, ha estat descrit un procés en que la pèrdua de receptors es dona abans de la completa retracció dels imputs presinàptics (Balice-Gordon i Lichtman, 1993) que encara alliberen neurotransmissor (Colman et al., 1997).

2. Entre P6 i P12, té lloc una ràpida evolució de la morfologia dels agrupaments dels AChRs, paral·lelament a una petita pèrdua de connexions axonals. Cal destacar que alguns dels axons en retracció es troben innervant agrupaments innervats per més de dos axons, donant com a resultat un increment en el nombre d'agrupaments innervats per dos axons sense que es vegi afectada significativament la mitjana del nombre d'axons que innerven els agrupaments (Lanuza et al., 2001). Així doncs, es pot veure una certa interdependència entre la redistribució dels AChRs a la membrana postsinàptica i la retracció axonal tot i que aquesta redistribució observada pot ser conseqüència de la gran pèrdua axonal que es dona durant els primers sis dies de vida postnatal. Les dades que trobem respecte la maduració postsinàptica concorden amb els estudis de microscòpia electrònica de rastreig fets al 1987 per Desaki i Uehara on mostren com la maduració de les plaques motores en rates es dona principalment durant la segona setmana de vida postnatal.

3. A partir de P12, es continua donant una lenta pèrdua axonal acompanyada d'un dramàtic increment de la complexitat dels agrupaments d'AChRs. A P12, aproximadament el 80% de les NMJ ja es troben en estat de monoinnervació, en canvi, menys de la meitat han assolit la morfologia d'agrupaments d'AChRs ja considerada madura M3.

2. Paper de la trombina i el seu receptor PAR-1 en el procés de maduració de les unions neuromusculars

Estudis *in vitro* han mostrat que la serin proteasa trombina, els seus inhibidors i els seus receptors associats intervenen en l'estabilitat dels contactes sinàptics (Liu et al., 1994a, b), indicant que poden tenir un important paper en la maduració de les unions neuromusculars, en particular en la pèrdua de contactes sinàptics que es donen en estadis primerencs del desenvolupament postnatal. Els nostres estudis han mostrat que el receptor de la trombina PAR-1 s'expressa en múscul esquelètic i es localitza a les unions neuromusculars durant el desenvolupament postnatal *in vivo*. A més a més, hem trobat evidències de que el procés normal d'eliminació sinàptica en músculs de rosegadors nomenats *in vivo* i la maduració dels agrupaments d'AChRs pot estar mediada a través d'aquest receptor (PAR-1).

S'ha detectat PAR-1 a la fracció de membrana de múscul esquelètic mitjançant western blot, fet que ens indica la seva expressió en aquest teixit *in vivo*. A més a més de la expressió als miòcits, al múscul esquelètic també es troba expressió en d'altres tipus cel·lulars (fibroblastes, cèl·lules endotelials, plaquetes, cèl·lules glials i motoneurons) (Essler et al., 1988; Gurwitz i Cunningham, 1988; Offermanns et al., 1994; Hartwig et al., 1995), així que la immunoreactivitat positiva per PAR-1 que detectem mitjançant western blot pot ser deguda no únicament a la seva expressió als miòcits. Amb la finalitat de poder determinar la localització exacta d'aquest receptor al múscul esquelètic aquest va ser localitzat mitjançant tècniques d'immunofluorescència, detectant-se expressió d'aquest als miòcits i a les cèl·lules satèl·lits, així com també als fibroblasts i a les cèl·lules endotelials. La localització histològica de les cèl·lules satèl·lits s'ha complementat amb la colocalització dels factors de transcripció miogènics miogenina i MyoD1. S'ha trobat que la seva marca colocalitza amb la de PAR-1 en cèl·lules satèl·lits. Aquestes dades concorden amb les que mostren que els mioblasts en cultiu expressen PAR-1 (Suidan et al., 1996b). A més, recentment s'ha detectat el receptor de la trombina en tots els mioblasts abans del naixement (Chevessier et al., 2001). Totes aquestes dades concorden amb dades que suggereixen que la trombina pot influenciar la diferenciació miogènica en cèl·lules en cultiu (Guttridge et al., 1997; Nagao et al., 2000) i afavorir la proliferació de mioblasts (Suidan et al., 1996b; Chinni et al., 1999).

El mRNA del receptor de la trombina s'ha detectat en múscul esquelètic a uns nivells relativament alts al naixement i aquests nivells van disminuint fins a ser gairebé indetectables en l'adult (Suidan et al., 1996b; Kim i Nelson, 1998; Kim et al., 1998). Nosaltres hem trobat

immunoreactivitat positiva per PAR-1 tant en el nou-nat com en l'adult i tant en cèl·lules satèl·lits com en miòcits. Encara que els mioblasts en cultiu expressen el receptor de la trombina, hi ha autors que han vist que la seva expressió es reprimeix amb la fusió d'aquests (Suidan et al., 1996b) mentre que d'altres han vist expressió en cultius de miotubs relativament purs (Kim, S no publicat). Aquest darrer fet indica que la innervació probablement està participant en el control d'aquesta expressió.

La trombina és una serin proteasa implicada en diferents funcions cel·lulars. Encara que inicialment va ser estudiada pel seu important paper en el manteniment de la homeostasi, en els darrers anys han estat trobades moltes funcions diferents al teixit nerviós (Monard et al., 1983; Gurwitz i Cunninham, 1988; Zurn et al., 1988; Canavaugh et al., 1990; Farmer et al., 1990; Nelson i Siman, 1990; Jalink i Moolenaar, 1992; Suidan et al., 1992; Mansuy et al., 1993; Beecher et al., 1994; Reinhard et al., 1994; Grabham i Cunninham, 1995; Vaughan et al., 1995; Pike et al., 1996; Niclou et al., 1998; Striggow et al., 2001). En particular, en el sistema nerviós perifèric s'ha vist que la trombina està implicada en la plasticitat sinàptica durant el desenvolupament de la NMJ (Nelson et al., 1995) modulant l'eliminació sinàptica dependent d'activitat en cocultius neurona-múscul (Liu et al., 1994a i b) i que l'activació de la trombina està relacionada amb la estimulació colinèrgica (Glazner et al., 1997). A més, la hirudina, un inhibidor específic de la trombina, redueix l'eliminació sinàptica dependent d'activitat *in vitro* (Jia et al., 1999) i *in vivo* (Zoubine et al., 1996; Lanuza et al., 2001). A més a més, la trombina redueix l'estabilitat i la inserció de noves molècules d'AChRs als agrupaments d'aquests *in vitro* (Davenport et al., 2000). En estudis previs del nostre laboratori, també hem trobat que el procés normal d'eliminació sinàptica en múscul de rata neonatal *in vivo* és mediat, al menys en part, per una proteïna G sensible a toxina pertussis i per l'activitat d'una proteïna quinasa C. Vàrem suggerir que aquest procés és el resultat d'una cascada de transducció de senyal que s'inicia amb l'activació del receptor de la trombina, present aquest a la unió neuromuscular, degut a que aquest procés s'accelera amb la trombina exògena i es bloqueja amb la hirudina (Lanuza et al., 2001).

Amb els presents resultats, hem trobat que la innervació polineuronal i la maduració dels agregats d'AChRs es veuen alterades quan el receptor de la trombina PAR-1 és activat amb un potent agonista específic (SFL). Aquest fet apoya la hipòtesi de que l'efecte de la trombina en el procés d'eliminació sinàptica postnatal trobat anteriorment és degut a la seva unió a PAR-1. L'activació de PAR-1 amb el pèptid SFL accelera la dispersió dels AChRs dins dels agrupaments que es dona fisiològicament durant la maduració postsinàptica de les NMJs. Així mateix, l'activació per SFL provoca un augment de la pèrdua axonal. Les dades mostren que la retracció axonal

mediada per PAR-1 es dona quan les NMJs es troben innervades per tres o més axons, pero és gairebé absent quan aquestes es troben doblement innervades. Així doncs, l'efecte del pèptid SFLL és important quan les NMJs estan innervades per més de dos axons, situació que es troba majoritàriament durant els primers dies del procés d'eliminació sinàptica. Hem trobat també que la pèrdua axonal i la maduració dels agrupaments d'AChRs postsinàptics és bloquejada totalment amb la hirudina, inhibidor específic de la trombina, suggerint que l'acció de la trombina és específica. D'altra banda, l'especificitat del pèptid activador de PAR-1 (SFLL) queda demostrada pel fet que quan s'aplica el pèptid inactiu FSLL no es troba cap efecte sobre la maduració de les NMJs. Totes les dades presentades, mostren que l'efecte causat per la trombina sobre la maduració dels agrupaments postsinàptic és superior al causat sobre la pèrdua axonal, fet que suggereix que la trombina podria actuar en primer lloc sobre els agrupaments d'AChRs. Aquest fet ratifica els resultats trobats en els que la trombina, a través del receptor PAR-1 acoblat a una proteïna G i a una PKC, modula el procés d'eliminació sinàptica en múscul de rata i això ho faria actuant inicialment sobre els agrupaments d'AChRs postsinàptics (Lanuza et al., 2002). La troballa recent de que la trombina disminueix l'expressió d'AChR, en particular de la subunitat α , a través de l'activació de PAR-1 (Faraut et al., 2003) apoia la nostra conclusió.

Els experiments d'activació del receptor PAR-1 mostren que concentracions extremadament baixes del pèptid activador del receptor de la trombina també anomenat genèricament TRAP (1-10 nM) són suficients per ocasionar un canvi en la maduració de les NMJs. Encara que en alguns estudis s'han utilitzat concentracions altes (500 μ M) del pèptid activador del receptor, ja es va observar una resposta fisiològica (disminució de la pressió sanguínia) a una dosi aproximada de 0.1 μ M (Chevessier et al., 2001) confirmant així resultats obtinguts per altres autors, els quals han obtingut respostes utilitzant concentracions baixes del pèptid activador (Ahn et al. 1997). Els nostres resultats indiquen que el sistema PAR s'activa a concentracions molt baixes del seu pèptid activador, fet que suggereix una alta afinitat d'aquest pèptid per PAR i/o un efecte fisiològic (modulació sinàptica) amb una ocupació/activació relativament baixa del receptor. L'ús del pèptid inactiu FSLL ens proporciona evidències respecte aquesta especificitat.

Paral·lelament a trobar una acció directa de PAR-1 al sistema neuromuscular, hem demostrat l'expressió de PAR-1 a la fibra muscular concentrat a l'àrea sinàptica. Hem immunodetectat PAR-1 a l'àrea sinàptica colocalitzat amb els AChRs, a diferència de Chevessier et al. (2001) que no troba colocalització ni *in vitro* ni *in vivo*. Aquestes diferències poden ser explicades per les diferents condicions de detecció de les imatges. Durant el desenvolupament

postnatal, les imatges obtingudes amb el microscopi confocal mostren una marca feble i difosa per tota la fibra muscular que sembla localitzada a la membrana a més a més d'una important marca a l'àrea sinàptica. Encara que la marca positiva per PAR-1 és consistent a l'àrea sinàptica durant tot el període estudiat, vàrem trobar una immunoreactivitat molt intensa a l'àrea sinàptica als 6 dies de vida postnatal i aquesta immunoreactivitat s'exten per fora de l'àrea sinàptica. Una dada interessant és el fet que es detecten zones amb una alta reactivitat per PAR-1 que colocalitzen amb zones amb un feble marcatge pels AChRs, assumint que les regions amb un feble marcatge pels AChRs són una evidència de llocs sinàptics que es troben en procés de desaparició (Balice-Gordon i Lichtman, 1993). Aquest patró d'expressió pot estar relacionat amb el paper que aquest receptor pot tenir sobre la dispersió dels AChRs dins el seu agrupament durant el període d'eliminació sinàptica. També hem trobat que la distribució de la immunoreactivitat positiva per PAR-1 pot estar indicant la presència d'aquest en altres elements sinàptics (axó i/o cèl.lules de Schwann).

Quan els terminals nerviosos s'eliminaven de la NMJ després de realitzar una denervació, es va veure que la immunoreactivitat per a PAR-1 continuava concentrada als llocs sinàptics denervats mentre que la corresponent als components del terminal nerviós com són el neurofilament i la proteïna de vesícules sinàptiques sinaptofisina desapareixen del lloc sinàptic. En la situació de denervació, la placa sinàptica de receptors d'AChRs encara continua coberta per les cèl.lules de Schwann per la qual cosa no podem descartar l'expressió de PAR-1 per part d'aquestes cèl.lules. Per determinar si PAR-1 s'expressa a la membrana de la cèl.lula muscular, vàrem processar mitjançant immunohistoquímica cèl.lules musculars aïllades després d'un tractament de col.lagenasa i cèl.lules musculars provinents de cultius cel.lulars primaris. En aquestes preparacions no s'hi troben ni elements nerviosos ni cèl.lules glials (cèl.lules de Schwann). La **Figura 21** mostra que en aquesta situació el receptor de la trombina es troba localitzat a l'àrea on es situen agrupats els AChRs tant als miotubs com a les fibres musculars. D'aquesta manera, es pot concloure que encara que el receptor de la trombina PAR-1 es podria expressar en els diferents tipus cel.lulars presents a les NMJs (terminals nerviosos i cèl.lules de Schwann), es troba localitzat a la membrana muscular postsinàptica. En un treball anterior del nostre grup en col.laboració amb el del Dr. Nelson (Davenport et al., 2000) es va demostrar que tant la trombina com el seu inhibidor, la hirudina, afecten a l'estabilitat dels agrupaments d'AChRs en cultius de miotubs aneurals. La demostració de la presència de PAR-1 a la membrana dels miotubs colocalitzada amb els agrupaments d'AChRs suggereix que la trombina a través del seu receptor pot influir en el manteniment de l'aparell postsinàptic sense que sigui necessària una influència neural. Una altra evidència de l'acció de la trombina i PAR-1 directament a sobre dels AChRs i sense la influència neural és la disminució de

l'expressió de la subunitat α dels AChRs com a conseqüència de l'activació de PAR-1 en cultius de miotubs de rata (Faraut et al., 2003).

S'ha detectat mRNA del receptor de la trombina en l'adult (Kim et al., 1998). Els nostres resultats mostren l'existència de la proteïna a NMJs d'animals adults. La presència del receptor de la trombina a l'adult es pot relacionar amb la plasticitat dependent d'activitat que esdevé durant la vida adulta (Tomàs et al., 1989, 2000). D'acord amb això, la denervació de músculs adults té com a conseqüència un canvi en els nivells d'expressió dels gens de la protrombina, del receptor de la trombina i de l'inhibidor fisiològic de serin proteases (PN-1), indicant que aquests gens són regulats per la innervació i que l'activitat pot jugar un important paper regulador de l'expressió de la protrombina, el receptor de la trombina i la PN-1 (Kim et al., 1998). Ara mostrem com PAR-1 es manté a les NMJ després d'una denervació total, suggerint que el receptor de la trombina pot estar actuant en la plasticitat sinàptica que es dona a la vida adulta.

En conclusió, hem demostrat que el receptor de la trombina PAR-1 s'expressa al múscul esquelètic durant el desenvolupament, particularment durant el període d'eliminació sinàptica, però també es troba expressió a l'adult. PAR-1 és detectat a les fibres musculars i a les cèl.lules satèl.lits. Es troba concentrat a l'àrea sinàptica, encara que trobem diferències entre diferents edats. També el trobem concentrat en àrees sinàptiques de músculs denervats i de fibres musculars aïllades (fibres a les quals se'ls hi ha extret el nervi i les cèl.lules de Schwann) i PAR-1 és present a la membrana de miotubs a les àrees on els AChRs s'agrupen espontàniament encara que no hi hagi presència de nervi. Tot això suggereix que aquest receptor està localitzat al menys en part a la membrana postsinàptica. D'altra banda, podem concloure que l'activació de PAR-1 accelera el procés de maduració d'aquests agrupaments i el procés d'eliminació sinàptica.

3. El procés de maduració de les unions neuromusculars depèn de PKC

L'activació de PAR-1 a la membrana postsinàptica pot induir diferents mecanismes cel.lulars incloent l'activació de PKCs. Hem estudiat l'efecte de PKC en la maduració dels agrupaments d'AChRs sinàptics en relació amb l'eliminació de la innervació polineuronal que caracteritza el desenvolupament de les unions neuromusculars. La distribució dels AChRs a les NMJs pateix un dramàtic canvi durant les primeres setmanes de vida postnatal, durant el període en que la innervació polineuronal està sent eliminada. Les nostres observacions suggereixen que la maduració de les NMJs té lloc en tres etapes ben diferenciades. 1) Durant el període que va des del

naixement al dia 6 de vida postnatal, es dona una gran reducció de la innervació polineuronal. A nivell postsinàptic es dona una molt baixa pèrdua d'AChRs dins els agrupaments postsinàptics. 2) Entre P6 i P12, té lloc una ràpida evolució de la morfologia dels agrupaments dels AChRs, paral·lelament a una petita pèrdua de connexions axonals. 3) A partir de P12, es continua donant una lenta pèrdua axonal acompanyada d'un dramàtic increment de la complexitat dels agrupaments d'AChRs.

Quin paper té la PKC en aquest procés? El nostre principal resultat mostra clarament que la maduració dels agrupaments de AChRs postsinàptics està altament influenciada per l'activació o inhibició *in vivo* de la PKC (mitjançant el TPA i la CaC respectivament). Aquest resultat ens suggereix que un mecanisme dependent de PKC té un paper crucial, influenciant la dispersió dels AChRs de determinades àrees de l'agrupament o l'acumulació selectiva en altres dominis; aquesta acumulació pot estar relacionada amb el territori que ocuparà l'axó que finalment es quedi monoinnervant la fibra muscular. La pèrdua axonal que es dona entre els dies 4 i 8 postnatsals va ser blocada amb inhibidors de la PKC, a diferència dels canvis que es donen al període entre P8 i P12, els quals no van poder ser blocats amb inhibidors de la PKC. Els efectes produïts als agrupaments de AChRs activant o inhibint la PKC s'observen al període que va de P8 a P12 de la mateixa manera que al període anterior (de P4 a P8). Aquestes dades suggereixen que hi ha altres mecanismes actuant en paral·lel, indicant que un procés no dependent de PKC està actuant durant la segona setmana de vida postnatal. Aquest fet es veu reforçat amb la observació que tant el percentatge d'agrupaments d'AChRs amb forats com la mitjana d'axons per NMJ tendeixen a aproximar-se a valors controls el dia 12 de vida postnatal (després de 8 dies de tractament amb CaC). A més a més, l'increment de la mida dels agrupaments d'AChRs resultant després de 2 dies de tractament amb CaC (P6) no es va mantindre després de 8 dies (P12), posant un altre cop de manifest que està actuant un mecanisme no dependent de PKC la segona setmana de vida postnatal. No obstant, durant el període que va de P4 a P6, la CaC va evitar completament tant l'eliminació sinàptica com la maduració dels agrupaments d'AChRs, indicant una completa dependència de PKC durant aquest període.

El blocatge de PKC amb CaC, dona lloc a un endarreriment de la maduració dels agrupaments d'AChRs postsinàptics i a una retenció de la innervació polineuronal. L'activació de PKC amb l'èster de forbol TPA té com a resultat una acceleració de la maduració dels agrupaments d'AChRs postsinàptics acompanyat d'un relativament petit efecte sobre l'eliminació sinàptica. Així doncs, amb aquests resultats podem dir que PKC és necessària per la maduració tant pre- com

postsinàptica de les NMJ, encara que a diferència de la maduració postsinàptica, la maduració presinàptica (eliminació sinàptica) podria no ser dependent d'un increment d'activitat de PKC.

En el procés de dispersió dels receptors semblen estar implicades fosfatases, encara que no es coneix bé el procés (Dai i Peng, 1998). La identificació dels AChRs com a substracte directe de serin quinases (PKC o PKA (de l'anglès *Protein Kinase A*)) fa que les podem relacionar amb la inestabilitat neonatal dels agrupaments d'AChRs. Els llocs de fosforil·lació per la PKC es troben a les subunitats alfa i delta dels AChRs (Nishizaki et al., 1998). S'ha trobat que l'activació de la PKC fa disminuir la inserció dels AChRs a la membrana postsinàptica i pot desestabilitzar als ja inserits, tant en miotubs aneurals com en innervats en cultiu (Bursztajn et al., 1988; Wallace, 1988; Ross et al., 1988; Lanuza et al., 2000). A més a més, la topografia dels agrupaments d'AChRs revela dispersió en petits microagregats, suggerint que l'activació de la PKC dona com a resultat una desestabilització dels agrupaments (Bursztajn et al., 1988). L'activació de la PKC fa disminuir l'estabilitat dels AChRs mentre que l'activació de la PKA la incrementa (Xu i Salpeter, 1995). Nelson i col.laboradors (2003) han suggerit que l'especificitat espacial en aquests diferents patrons d'activitat quinasa poden dirigir l'estabilització selectiva i la pèrdua de connexions que es dona durant el desenvolupament de la NMJ.

En aquest treball *in vivo* hem trobat que l'activació de la PKC mitjançant el TPA dona lloc a una acceleració de la maduració dels agrupaments de AChR sinàptics. Contràriament el bloqueig de la PKC amb la CaC resulta en un endarreriment de la maduració. Específicament, el TPA accelera significativament l'aparició de "forats" als agrupaments de receptors postsinàptics, mentre que la CaC endarrereix clarament aquesta aparició. Aquests resultats mostren que l'activació de la PKC dona lloc a una acceleració en l'aparició de "forats" als agrupaments de AChRs i a un increment de l'eliminació dels AChRs presents a la perifèria de la sinapsi com indica l'anàlisi morfològic. Això pot ser una conseqüència de la desestabilització dels AChRs a la membrana postsinàptica i potser una relocalització subsegüent a la membrana associada a regions de contacte amb l'axó. Una reducció similar a l'àrea dels agrupaments d'AChRs ha estat observada recentment a les NMJ de ratolí (Marques et al., 2000). Aquesta pèrdua d'AChRs pot ser una conseqüència de la seva desestabilització a la membrana i probablement a una posterior localització a les regions de la membrana directament en contacte amb els terminals axònics.

Els agregats d'AChRs són molt menys estables al mamífer nouvat que a l'adult. Encara que a l'adult la distribució dels AChRs a la NMJ és estable independentment de la presència del

terminal nerviós (Frank et al., 1975; Ko et al., 1977), en ratolins nous, la distribució d'AChRs a la NMJ immadura no és estable en absència del nervi. L'estabilitat s'adquireix a mesura que els agregats adquireixen la morfologia madura, procés que no es dona normalment si el nervi no és present (Slater, 1982b, Pun et al, 2002). Un aspecte d'aquesta inestabilitat es veu en l'eliminació localitzada de AChRs que acompanya a la pèrdua de contactes sinàptics durant les primeres setmanes de vida postnatal (Balice-Gordon i Lichtman, 1993). En miotubs de ratolí en cultiu, els receptors que estan associats a neurites, són molt més estables que els agrupaments no associats (Lanuza et al., 2000). Possiblement, l'activació de la PKC fa disminuir la taxa d'inserció de AChRs a la membrana postsinàptica i desestabilitza els ja inserits que es troben situats sota els terminals nerviosos menys actius. Aquests receptors desestabilitzats es poden col·locar sota el terminal més actiu gràcies a un moviment lateral dins el pla de la membrana com ens suggereixen resultats obtinguts *in vitro* (Lanuza et al., 2000). La inducció de l'agrupament d'AChRs en miotubs aneurals per part de la isoforma neural de l'agrina (Meier et al., 1997) indica que podria ser aquesta molècula la inductora de la maduració dels agrupaments de receptors postsinàptics, així com que el terminal nerviós més actiu estaria implicat en l'estabilitat dels AChRs sinàptics induïda per l'agrina.

Els nostres resultats indiquen que la pèrdua axonal té lloc independentment de la diferenciació de la placa postsinàptica i, que la PKC afecta a ambdós processos, encara que de manera diferent. Sugerim que entre P4 i P8 tant l'eliminació sinàptica com els canvis morfològics dels agrupaments de AChRs són blocats per inhibidors de PKC, i accelerats per activadors de PKC, mentre que de P8 en endavant, l'eliminació sinàptica no es veu afectada modificant l'activitat de la PKC, a diferència dels AChRs, els quals sí es veuen afectats. Així, aquestes dades indiquen un període completament dependent de PKC entre P4 i P8.

4. La maduració de les unions neuromusculars es veu alterada en animals deficients en la isoforma θ de PKC

La PKC està implicada en el procés d'eliminació sinàptica postnatal, existint un període (entre P4 i P8) en que hem trobat que és completament dependent del sistema on actua aquesta proteïna. A nivell postsinàptic hem trobat que la maduració dels agrupaments d'AChRs és dependent de PKC en tots els períodes estudiats (P4-P8 i P8-P12) fet que suggereix que l'acció de PKC en el procés d'eliminació sinàptica podria ser deguda a través del seu efecte sobre els AChRs postsinàptics. De totes les isoformes de PKC, la isoforma θ és majoritària en múscul esquelètic i

regulada durant el desenvolupament postnatal (Hilgemberg et al., 1995, 1996). Per aquesta raó, s'ha estudiat el procés de maduració de les NMJs en animals deficients en aquesta proteïna.

Els resultats obtinguts mostren que als animals deficients en PKC θ el procés de pèrdua de connexions redundants es veu completament blocat durant els primers 4 dies de vida postnatal, existint el dia 4 un 100 % de poliinnervació, percentatge significativament superior al que es dona en animals control de la mateixa edat. A partir del 4art dia de vida postnatal es comença a donar eliminació sinàptica als animals KO, però el percentatge de poliinnervació trobat és sempre significativament superior a l'existent en animals control. El fet que malgrat el retardament del procés d'eliminació axonal, aquest igualment es produeixi, indica l'existència d'un mecanisme paral·lel que començaria a actuar amb posterioritat al mecanisme dependent de PKC θ i estaria coactuant amb ell. Aquests resultats ratifiquen els resultats obtinguts amb els experiments de bloqueig de PKC, on es troba que el període completament dependent de PKC és l'estadi inicial de l'eliminació sinàptica (Lanuza et al., 2002).

La maduració del component postsinàptic en els animals KO presenta un endarreriment significatiu en tots els dies del desenvolupament postnatal estudiats. Podem veure com el percentatge de la morfologia immadura M2 és significativament superior als animals KO tant a P3 (dia postnatal 3) com a P7 (dia postnatal 7). La morfologia madura M4, present en animals controls de 3 dies no apareix als animals deficients en PKC θ fins el dia 7 de vida postnatal. Així doncs, podem dir que la isoforma θ de la PKC està implicada en la maduració de les unions neuromusculars *in vivo*, tot i que ha d'existir un mecanisme que estaria actuant en paral·lel i que entra en funcionament amb posterioritat al mecanisme dependent de PKC. Degut als resultats obtinguts podem dir que aquest mecanisme dependent de PKC θ s'inicia amb l'activació del receptor de la trombina PAR-1 present en el component postsinàptic de les NMJs (Lanuza et al., 2003) i d'una proteïna G sensible a toxina pertussis (Lanuza et al., 2001).

Recents resultats obtinguts *in vitro* mostren com PKC θ és essencial perquè es doni el procés d'eliminació sinàptica (Li et al., 2004). El co-cultiu de motoneurons deficients en la isoforma θ amb miotubus control i motoneurons control amb miotubs deficients en PKC θ va permetre analitzar si PKC θ és requereix a les fibres musculars i/o a les motoneurons perquè el fenomen d'eliminació sinàptica tingui lloc. Els resultats obtinguts a partir d'aquests experiments indiquen que el procés d'eliminació sinàptica és dependent d'una PKC θ d'expressió tant postsinàptica com presinàptica. Així doncs, podem assegurar que l'eliminació sinàptica que es dona

en aquest sistema *in vitro* no només depèn de l'expressió de PKC a múscul esquelètic, tal com havien mostrat resultats anteriors (Lanuzo et al., 2000) sinó que també és dependent d'una PKC θ neural. En aquest sentit, els nostres resultats mostren expressió de PKC θ tant en el component postsinàptic com en la fracció neural. Hem detectat mitjançant western blot que la isoforma θ s'expressa en lisats totals i a la fracció de membrana de múscul esquelètic *in vivo* tant a nounats com a adults. Aquest fet ratifica el ja trobat anteriorment per altres autors (Osada et al., 1992; Hilgemberg et al., 1995, 1996; Li et al., 2004). Els nostres resultats d'immunohistoquímica demostren expressió d'aquesta isoforma en NMJ de fibres musculars aïllades en animals de 6 dies postnatsals. Wilda i col.laboradors (2001) han detectat expressió de PKC θ a nivell de mRNA a múscul esquelètic a partir del dia 14.5 embrionari (E14.5). Els nostres resultats també mostren expressió a la regió ventral de la medulla espinal mitjançant western blot (Li et al., 2004) i immunohistoquímica. S'ha detectat mRNA de PKC θ en diferents àrees del sistema nerviós i en particular a la medulla espinal (Wilda et al., 2001). El fet que PKC θ s'expressi al component neural suggereix que la PKC θ neural podria produir la pèrdua directa dels AChRs postsinàptics o que la PKC θ neural podria blocar el procés, dependent de l'activitat sinàptica, que mantindria la sinapsi (i els AChRs). Aquesta darrera possibilitat sembla més plausible, degut a que després d'un bloqueig presinàptic i absència de PKC θ neural s'augmenta l'eliminació axonal (Li et al., 2004).

Hem trobat que l'expressió de PKC θ és reduïda, encara que no eliminada, en músculs esquelètics d'animals heterozigots per la isoforma θ de la PKC. Aquest resultat pot indicar que l'activitat de la kinasa és limitant per l'expressió de l'eliminació sinàptica. Co-cultius de miotubs i motoneurons provinents d'animals heterozigots han mostrat un grau intermig de pèrdua de sinapsis respecte a co-cultius provinents d'animals KO i controls (Li et al., 2004). Aquest resultat es correspon amb les observacions de Sun i col.laboradors (2000), on van trobar que l'estimulació de la proliferació de limfòcits en animals heterozigots en PKC θ era intermitja respecte a la que es trobava en animals KO i controls.

L'agregació i manteniment dels agrupaments d'AChRs postsinàptics depèn de diferents proteïnes postsinàptiques, com són per exemple l'agrina i el seu receptor MuSK (Lin et al., 2001). L'arquitectura molecular que s'estableix entre totes aquestes molècules i els AChRs col.labora en generar i mantenir l'alta densitat sinàptica de AChRs (superior a $10,000/\mu\text{m}^2$) que contrasta amb la baixa densitat extrasinàptica ($\sim 10/\mu\text{m}^2$) (Salpeter et al., 1988). Amb la finalitat de descartar que l'endarreriment observat en la maduració de les NMJ dels animals deficients en PKC θ fos a

conseqüència de l'afectació d'algunes d'aquestes proteïnes postsinàptiques essencials per a la formació dels agrupaments d'AChRs, algunes d'aquestes van ser immunolocalitzades en NMJ d'animals control i KO, obtenint com a resultat un mateix patró de localització. Així doncs, l'endarreriment en la maduració de les NMJ que es dona en animals carents de PKC θ no és degut a una alteració en l'estructura essencial de l'aparell postsinàptic. El desenvolupament general de les fibres musculars dels animals KO tampoc es veu afectat, tal i com es va veure després de la realització de diferents controls com la mesura del diàmetre de les fibres musculars i la detecció de l'expressió de la cadena pesada de la miosina.

La present tesi demostra l'existència d'un mecanisme dependent de PKC que provoca canvis en l'estructura dels agrupament d'AChRs i aquests poden repercutir en el procés d'eliminació sinàptica. Un nombre important de molècules han estat descrites com a reguladores de l'estructura i la funció de l'aparell sinàptic en les NMJ i l'expressió i localització d'algunes d'elles canvia durant el procés d'eliminació sinàptica (Culican et al., 1998). Els processos de fosforilació, incloent la fosforilació i desfosforilació dels AChRs, són un punt clau en aquests canvis. S'ha demostrat la importància dels processos de fosforilació per a la localització i estabilització dels AChRs (Wallace, 1988; Dai i Peng, 1998; Lanuza et al., 2000). Altres receptors utilitzen mecanismes anàlegs durant la formació dels circuits sinàptics (Yee i Haganir, 1987; Tingley et al., 1997; Swope et al., 1999). Cada vegada més es detecten canvis en el nombre i la distribució dels receptors postsinàptic com a signe de diferents formes de plasticitat, incloent la *long-term potentiation* o la *long-term depression* (Pickard et al., 2001; Grosshans et al., 2002). La combinació d'una distribució espacial precisa de diferents quinases i d'un efecte específic de les fosforilacions diferencials produïdes per aquestes sobre l'estabilitat dels receptors ha estat suggerit com un mecanisme regulador de la plasticitat durant el desenvolupament (Nelson et al., 2003). En aquest sentit, s'ha demostrat que PKA provoca un estímul positiu localitzat sobre els AChRs a les NMJ mentre que PKC media un efecte negatiu sobre ells i, aquests efectes tenen una repercussió en l'estabilitat de la sinapsi neuromuscular. Mecanismes similars podrien estar implicats en el procés d'eliminació de sinapsis durant el desenvolupament del sistema nerviós central. Així, els receptors de glutamat i GABA són substrats de diverses quinases (Yee i Haganir, 1987) i l'eliminació de la poliinnervació de les cèl·lules de Purkinje en el cerebel està reduïda en ratolins deficientes en PKC γ (Kano et al., 1995). Les accions de PKA i PKC produeixen una fosforilació diferencial sobre els receptors NMDA de glutamat que comporta efectes sobre l'estabilitat dels receptors (Tingley et al., 1997). Nosaltres proposem l'existència d'un balanç entre mecanismes que produïrien pèrdua global de contactes sinàptics i mecanismes que estarien protegint localment als contactes més actius. En la present tesi demostrem

que el procés d'eliminació de contactes redundants que té lloc durant el desenvolupament de les NMJ és dependent de l'acció fosforiladora de la PKC i que aquesta és l'efector d'una cascada de senyalització postsinàptica que s'inicia amb l'activació de PAR-1. A la **Figura 36** esquematitzem les proteïnes implicades, segons la nostra hipòtesi, en el procés d'eliminació sinàptica i com aquestes actuen sobre la maduració de les NMJ. En aquesta Figura es representa únicament el procés desestabilitzador. La producció, alliberament i/o acció proteolítica de la trombina des de la fibra muscular podria necessitar de l'activitat neural. L'activació de PAR-1 a la membrana postsinàptica pot induir diferents mecanismes cel·lulars incloent l'activació de PKCs. L'activació de PKC pot resultar en una fosforilació dels AChRs, fet que ocasionaria una disminució en l'estabilitat d'aquests i això podria portar a una retracció axonal. Les accions de les quinases són complexes i impliquen interaccions dels elements tant pre- com postsinàptics, i encara ens queda per determinar com són aquestes interaccions i com afecten als AChRs.

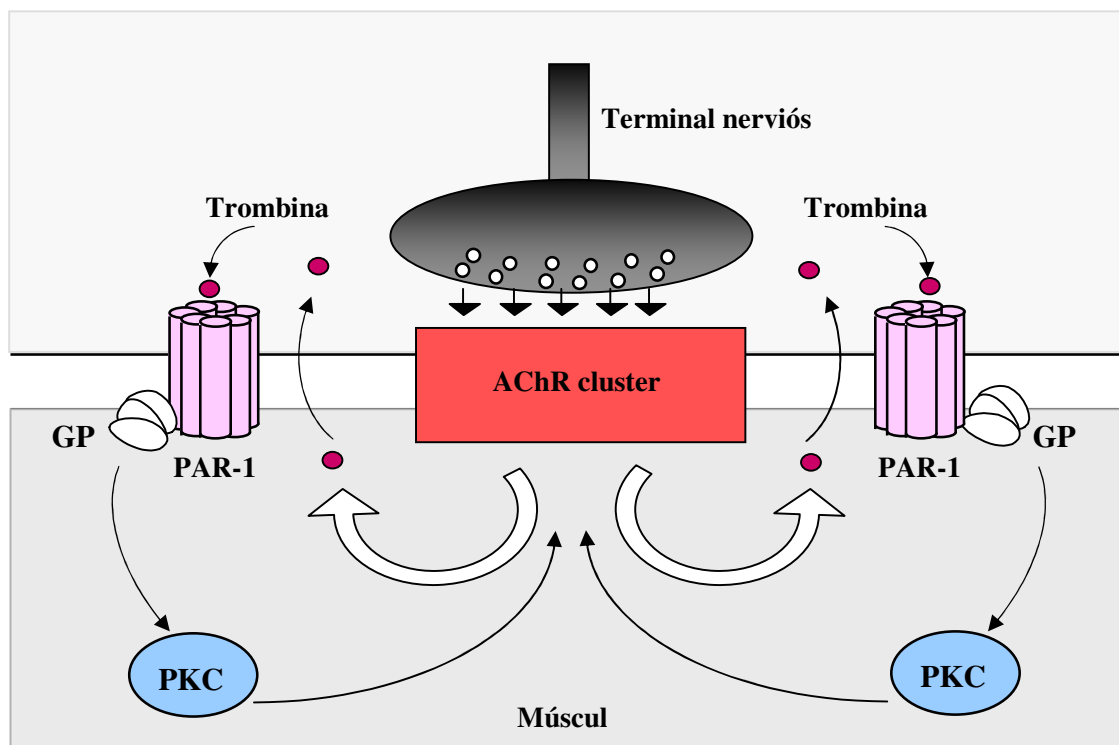


Figura 36. Proteïnes implicades en el procés d'eliminació sinàptica. Representem únicament el procés desestabilitzador.

VI. CONCLUSIONS

VI. CONCLUSIONS

1. La pèrdua de connexions sinàptiques redundants en la NMJ té lloc independentment de la reorganització interna dels agrupaments d'AChRs, signe de maduració del component postsinàptic: Durant els primers dies postnatsals del desenvolupament, una intensa retirada d'axons precedeix la formació d'àrees lliures d'AChRs a dins del lloc sinàptic.
2. L'acció reguladora de la proteasa trombina sobre la maduració pre- i postsinàptica de la sinapsi neuromuscular durant el procés d'eliminació sinàptica té lloc mitjançant l'activació del seu receptor PAR-1. L'efecte de l'activació del receptor de la trombina es detecta tant accelerant el procés d'eliminació sinàptica dependent d'activitat com accelerant la maduració dels agrupaments d'AChRs.
3. PAR-1 es localitza al teixit muscular, trobant-se tant a les fibres musculars com a les cèl.lules satèl.lits. PAR-1 a les fibres musculars es localitza, al menys en part, al component postsinàptic de les unions neuromusculars. Es detecta tant en l'adult com durant el període d'eliminació sinàptica postnatal.
4. La PKC modula tant l'eliminació d'axons com els canvis d'organització dels agrupaments d'AChRs postnatsals encara que de forma diferent
5. En la maduració de les unions neuromusculars es distingeixen com a mínim 2 estadis:
 - 5.1. Un període totalment dependent de PKC, entre P4 i P8, en el que tant l'eliminació sinàptica com els canvis en els receptors colinèrgics són blocats per inhibidors de PKC i accelerats per activadors de PKC.
 - 5.2. A partir de P8 fins l'adult, l'eliminació sinàptica no es veu afectada per les manipulacions de PKC, mentre que la distribució d'AChRs es continua veient afectada.
 - 5.3. PKC podria actuar primer influint sobre els agrupaments postsinàptics d'AChRs i no sobre els axons.
6. La isoforma theta de la PKC està implicada en la maduració de les sinapsis neuromusculars: Ratolins deficientes en aquesta isoforma de PKC presenten un endarreriment en la maduració de les sinapsis neuromusculars tant a nivell pre- com postsinàptic.

7. La isoforma θ de la PKC s'expressa tant en el component postsinàptic de les sinapsis neuromusculars com a la regió ventral de la medulla espinal.

VII. BIBLIOGRAFIA

- Adams L, Goldman D. 1998. A role for calcium from the sarcoplasmic reticulum in coupling muscle activity to nicotinic acetylcholine receptor gene expression in rat. *J. Neurobiol.* 35:245-57
- Ahn HS, Foster C, Boykow G, Arik L, Smith-Torhan A, Hesk D, Chatterjee M. 1997. Binding of a thrombin receptor tethered ligand analogue to human platelet thrombin receptor. *Mol. Pharmacol.* 51:350-6
- Akaaboune M, Hantai D, Smirnova I, Lachkar S, Kapsimali M, Verdier-Sahuque M, Festoff BW. 1998. Developmental regulation of the serpin protease nexin I. Localization during activity-dependent polyneuronal synapse elimination in mouse skeletal muscle. *J. Comp. Neurol.* 397:572-9
- Altiok N, Altiok S, Changeux JP. 1997. Heregulin-stimulated acetylcholine receptor gene expression in muscle: requirement for MAP kinase and evidence for a parallel inhibitory pathway independent of electrical activity. *EMBO J.* 16:717-25
- Anderson MJ, Cohen MW. 1977. Nerve-induced and spontaneous redistribution of acetylcholine receptors on cultured muscle cells. *J. Physiol.* 268:757-73
- Angaut-Petit D, Molgo J, Connold AL, Faille L. 1987. The levator auris longus muscle of the mouse: a convenient preparation for studies of short- and long-term presynaptic effects of drugs or toxins. *Neurosci. Letters.* 82:83-88
- Apel ED, Glass DJ, Moscoso LM, Yancopoulos GD, Sanes JR. 1997. Rapsyn is required for MuSK signalling and recruits synaptic components to a MuSK-containing scaffold. *Neuron* 18:623-35
- Balice-Gordon RJ, Lichtman JW. 1993. In vivo observations of pre- and postsynaptic changes during the transition from multiple to single innervation at developing neuromuscular junctions. *J. Neurosci.* 13:834-55
- Balice-Gordon RJ, Lichtman JW. 1994. Long-term synapse loss induced by focal blockade of postsynaptic receptors. *Nature* 372:519-24
- Balice-Gordon RJ, Thompson WJ. 1988. The organization and development of compartmentalized innervation in rat extensor digitorum longus muscle. *J. Physiol.* 398:211-31
- Barber MJ, Lichtman JW. 1999. Activity-driven synapse elimination leads paradoxically to domination by inactive neurons. *J. Neurosci.* 19:9975-85
- Barry JA, Ribchester RR. 1995. Persistent polyneuronal innervation in partially denervated rat muscle after reinnervation and recovery from prolonged nerve conduction block. *J. Neurosci.* 10:6327-39
- Beecher KL, Andersen TT, Fenton JW, Festoff BW. 1994. Thrombin receptor peptides induce shape change in neonatal murine astrocytes in culture. *J. Neurosci. Res.* 37:108-115
- Bekoff A, Betz W. 1977. Properties of isolated adult rat muscle fibers maintained in tissue culture. *J. Physiol.* 271:537-47
- Benoit P, Changeux JP. 1975. Consequences of tenotomy on the evolution of multiinnervation in developing rat soleus muscle. *Brain Res.* 99:354-8
- Bessereau J-L, Laudenbach V, Le Poupon C, Changeux J-P. 1998. Nonmyogenic factors bind nicotinic acetylcholine receptor promoter elements required for response to denervation. *J. Biol. Chem.* 273:12786-93
- Bewick GS, Young C, Slater CR. 1996. Spatial relationships of utrophin, dystrophin, beta-dystroglycan and beta-spectrin to acetylcholine receptor clusters during postnatal maturation of the rat neuromuscular junction. *J. Neurocytol.* 25:367-379

- Blondel O, Collin C, McCarran WJ, Zhu S, Zamostiano R, Gozes I, Brenneman DE, McKay RD. 2000. A glia-derived signal regulating neuronal differentiation. *J. Neurosci.* 20:8012-20
- Böhm SK, Kong W, Bromme D, Smeeckens SP, Anderson DC, Connolly A, Kahn M, Nelken NA, Coughlin SR, Payan DG, Bunnett NW. 1996. Molecular cloning, expression and potential functions of the human proteinase-activated receptor-2. *Biochem. J.* 314: 1009-16
- Bowersox SS, Miljanich GP, Sugiura Y, Li C, Nadasdi L, Hoffman BB, Ramachandran J, Ko CP. 1995. Differential blockade of voltage-sensitive calcium channels at the mouse neuromuscular junction by novel omega-conopeptides and omega-agatoxin-IVA. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 273:248-56
- Brown MC, Jansen JK, Van Essen DC. 1976. Polyneuronal innervation of skeletal muscle in newborn rats and its elimination during maturation. *J. Physiol. (Lond.)* 261:387-422
- Brown MC, Hopkins WG, Keynes RJ. 1982. Comparison of effects of denervation and botulinum toxin paralysis on muscle properties in mice. *J. Physiol.* 327:29-37
- Buchanan J, Sun YA, Poo MD. 1989. Studies of nerve-muscle interactions in *Xenopus* cell culture: fine structure of early functional contacts. *J. Neurosci.* 9:1540-54
- Buffelli M, Burgess RW, Feng G, Lobe CG, Lichtmann JW, Sanes JW. 2003. Genetic evidence that relative synaptic efficacy biases the outcome of synaptic competition. *Nature.* 424:430-4
- Burden SJ. 1977. Development of the neuromuscular junction in chick embryo: the number, distribution, and stability of acetylcholine receptors. *Dev. Biol.* 57:317-29
- Burden SJ, DePalma RL, Gottesman GS. 1983. Crosslinking of proteins in acetylcholine receptor-rich membranes: association between the beta-subunit and the 43kd subsynaptic protein. *Cell* 35:687-92
- Burgess RW, Nguyen Q, Litchman JW, Sanes JR. 1998. A genetic analysis of agrin. *Neurosci. Abstr.* 24:1534
- Burgess RW, Nguyen QT, Son YJ, Lichtman JW, Sanes JR. 1999. Alternatively spliced isoforms of nerve- and muscle-derived agrin: their roles at the neuromuscular junction. *Neuron.* 23:33-44
- Bursztajn S, Schneider LW, Jong YJ, Berman SA. 1988. Phorbol esters inhibit the synthesis of acetylcholine receptors in cultured muscle cells. *Biol. Cell* 63:57-65
- Cairns JA, Walls AF. 1995. Mast cell tryptase is a mitogen for epithelial cells. Stimulation of IL-8 production and intracellular adhesion molecule-1 expression. *J. Immunol.* 156: 275-83
- Cajal SR. 1899. *Textura del sistema nervioso del hombre y los vertebrados*. Instituto de Neurociencias. Universidad de Alicante. Edición 1992
- Callaway EM, Soha JM, Van Essen DC. 1987. Competition favouring inactive over active motor neurons during synapse elimination. *Nature.* 328:422-6
- Cambray-Deakin MA, Adu J, Burgoyne RD. 1990. Neuritogenesis in cerebellar granule cells in vitro, a role for protein kinase C. *Dev. Brain Res.* 53:40-6
- Campagna JA, Ruegg MA, Bixby JL. 1995. Agrin is a differentiation-inducing "stop signal" for motoneurons in vitro. *Neuron* 15:1365-74
- Campagna JA, Ruegg MA, Bixby JL. 1997. Evidence that agrin directly influences presynaptic differentiation at neuromuscular junctions in vitro. *Eur. J. Neurosci.* 9:2269-83
- Carraway KL, Burden SJ. 1995. Neuregulins and their receptors. *Curr. Opin. Neurobiol.* 5:606-12

- Cavanaugh KP, Gurwitz D, Cunningham DD, Bradshaw RA. 1990. Reciprocal modulation of astrocyte stellation by thrombin and protease nexin-1. *J. Neurochem.* 54:1735-1743
- Chae T, Kwon YT, Bronson R, Dikkes P, Li E, Tsai LH. 1997. Mice lacking p35, a neuronal specific activator of Cdk5, display cortical lamination defects, seizures, and adult lethality. *Neuron.* 18:29-42
- Chang D, Woo JS, Campanelli J, Scheller RH, Ignatius MJ. 1997. Agrin inhibits neurite outgrowth but promotes attachment of embryonic motor and sensory neurons. *Dev. Biol.* 181:21-35
- Cheng K, Li Z, Fu WY, Wang JH, Fu AK, Ip NY. 2002. Pctaire1 interacts with p35 and is a novel substrate for Cdk5/p35. *J. Biol. Chem.* 277:31988-93
- Chevessier F, Hantai D, Verdiere-Sahuque M. 2001. Expression of the thrombin receptor (PAR-1) during rat skeletal muscle differentiation. *J. Cell. Physiol.* 189:152-61
- Chinni C, de Niese MR, Tew DJ, Jenkins AL, Bottomley SP, Mackie EJ. 1999. Thrombin, a survival factor for cultured myoblasts. *J. Biol. Chem.* 274:9169-9174
- Chow I, Poo MM. 1985. Release of acetylcholine from embryonic neurons upon contact with muscle cell. *J. Neurosci.* 5:1076-82
- Chu GC, Moscoso LM, Sliwskowski MX, Merlie JP. 1995. Regulation of the acetylcholine receptor ϵ -subunit gene by recombinant ARIA: an in vitro model for transynaptic gene regulation. *Neuron* 14:329-39
- Colman H, Nabekura J, Lichtman JW. 1997. Alterations in synaptic strength preceding axon withdrawal. *Science* 275:356-61
- Connold AL, Evers JV, Vroba G. 1986. Effect of low calcium and protease inhibitors on synapse elimination during postnatal development in the rat soleus muscle. *Brain Res.* 393:99-107
- Corvera CU, Déry O, McConalogue K, Böhm SK, Khitin LM, Caughey GH, Payan DG, Bunnett NW. 1997. Mast cell tryptase regulates colonic myocytes through proteinase-activated receptor-2. *J. Clin. Invest.* 100:1383-93
- Cote PH, Moukhles H, Lindenbaum M, Carbonetto S. 1999. Chimaeric mice deficient in dystroglycans develop muscular dystrophy and have disrupted myoneural synapses. *Nature Genetics.* 23(3):338-42
- Covault J, Sanes JR. 1986. Distribution of N-CAM in synaptic and extrasynaptic portions of developing and adult skeletal muscle. *J. Cell Biol.* 102:716-30
- Culican SM, Nelson CC, Lichtman JW. 1998. Axon withdrawal during synapse elimination at the neuromuscular junction is accompanied by disassembly of the postsynaptic specialization and withdrawal of Schwann cell processes. *J. Neurosci.* 18:4953-65
- Dale HH, Feldberg W, Vogt M. 1936. Release of acetylcholine at voluntary motor nerve endings. *J. Physiol.* 86:353-80
- Dai Z, Peng HB. 1993. Elevation in presynaptic Ca^{++} level accompanying initial nerve-muscle contact in tissue culture. *Neuron* 10:827-37
- Dai Z, Peng HB. 1995. Presynaptic differentiation induced in cultured neurons by local application of basic fibroblast growth factor. *J. Neurosci.* 15:5466-75
- Dai Z, Peng HB. 1998. A role of tyrosine phosphatase in acetylcholine receptor cluster dispersal and formation. *J. Cell Biol.* 141:1613-24

- Davenport RW, Lanuza MA, Kim S, Jia M, Snyder E, Nelson PG. 2000. Thrombin action decreases acetylcholine receptor aggregate number stability in cultured mouse myotubes. *Brain Res Dev Brain Res.* 122(2):119-23
- DeChiara TM, Bowen DC, Valenzuela DM, Simmons MV, Poueymirou WT, Thomas S, Kinetz E, Compton DL, Rojas E, Park JS, Smith C, DiStefano PS, Glass DJ, Burden SJ, Yancopoulos GD. 1996. The receptor tyrosine kinase MuSK is required for neuromuscular junction formation in vivo. *Cell* 85:501-12.
- Dennis MJ. 1981. Development of the neuromuscular junction: Inductive interactions between cells. *Annu. Rev. Neurosci.* 4:43-68
- Déry O, Corvera CU, Steinhoff M, Bunnet NW. 1998. Proteinase-activated receptors: novel mechanisms of signaling by serine proteases. *Am. J. Physiol.* 274: 429-52
- Desaki J, Uehara Y. 1987. Formation and maturation of subneural apparatuses at neuromuscular junctions in postnatal rats: a scanning and transmission electron microscopical study. *Dev. Biol.* 119:390-401
- Diamond J, Miledi R. 1962. A study of fetal and newborn rat muscle fibers. *J. Physiol. (Lond.)* 162:393-408
- Duclert A, Changeux JP. 1995. Acetylcholine receptor gene expression at developing neuromuscular junction. *Physiol. Rev.* 75:339-68
- Duxson MJ, Vrbova G. 1985. Inhibition of acetylcholinesterase accelerates axon terminal withdrawal at the developing rat neuromuscular junction. *J. Neurocytol.* 14:337-63
- Eftimie R, Brenner HR, Buonnano A. 1991. Myogenin and MyoD join a family of skeletal muscle genes regulated by electrical activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:1349-53
- Erzen I, Cvetko E, Obreza S, Angaut-Petit D. 2000. Fiber types in the mouse levator auris longus muscle: a convenient preparation to study muscle and nerve plasticity. *J. Neurosci. Res.* 59:692-697
- Essler M, Amano M, Kruse HJ, Kaibuchi K, Weber PC, Aepfelbacher M. 1998. Thrombin inactivates myosin light chain phosphatase via Rho and its target Rho kinase in human endothelial cell. *J. Biol. Chem.* 273:21867-21874
- Evers J, Laser M, Sun YA, Xie ZP, Poo MM. 1989. Studies of nerve-muscle interactions in *Xenopus* cell culture: analysis of early synaptic currents. *J. Neurosci.* 9:1523-39
- Falls DL, Rosen KM, Corfas G, Lane WS, Fischbach GD. 1993. ARIA, a protein that stimulates acetylcholine receptor synthesis, is a member of the neu ligand family. *Cell* 72:801-15
- Faraut B, Barbier J, Ravel-Chapuis A, Doyennette MA, Jandrot-Perrus M, Verdier-Sahuque M, Schaeffer L, Koenig J, Hantai D. 2003. Thrombin downregulates muscle acetylcholine receptors via an IP3 signaling pathway by activating its G-protein-coupled protease-activated receptor-1. *J. Cell Physiol.* 196:105-12
- Farmer L, Sommer J, Monard D. 1990. Glia-derived nexin potentiates neurite extension in hippocampal pyramidal cells in vitro. *Dev. Neurosci.* 12:73-80
- Ferns M, Hoch W, Campanelli JT, Rupp F, Hall ZW, Scheller RH. 1992. RNA splicing regulates agrin-mediated acetylcholine receptor clustering activity on cultured myotubes. *Neuron* 8:1079-86
- Ferns M, Deiner M, Hall ZW. 1996. Agrin-induced acetylcholine receptor clustering in mammalian muscle requires tyrosine phosphorylation. *J. Cell Biol.* 132:937-44

- Festoff BW, Rao JS, Hantı D. 1991. Plasminogen activators inhibitors in the neuromusculat system: III. The serpin protease nexin I is synthetized by muscle localized at neuromuscular synapses. *J. Cell Physiol.* 147:76-86
- Finn AJ, Feng G, Pendergast AM. 2003. Postsynaptic requeriment for Abl kinases in assembly of the neuromuscular junction. *Nat. Neurosc.* 6:717-23
- Fitzimonds RM, Poo MM. 1998. Retrograde signaling in the development and modification of synapses. *Physiol. Rev.* 78:143-70
- Flucher BE, Daniels MP. 1989. Distribution of Na⁺ channels and ankyrin in neuromuscular junctions in complementary to that of acetylcholine receptors and the 43 Kd protein. *Neuron* 3:163-75
- Fontaine B, Klarsfeld A, Hokfelt T, Changeaux JP. 1986. Calcitonin gene-related peptide, a peptide present in spinal cord motoneurons, increases the number of acetylcholine receptors in primary cultures of chick embryo myotubes. *Neurosci. Lett.* 71:59-65
- Fontaine B, Klarsfeld A, Hokfelt T, Changeaux JP. 1987. Calcitonin gene- related peptide and muscle activity regulate acetylcholine receptor α -subunit mRNA levels by distinct intracellular pathways. *J. Cell Biol.* 105:1337-42
- Frail DE, Mudd J, Shah V, Carr C, Cohen JB, Merlie JP. 1987. cDNAs for the postsynaptic 43-kDa protein of Torpedo electric organ encode two proteins with different carboxyl termini. *Proc Natl Acad Sci USA.* 84:6302-6
- Frank E, Gautvik K, Sommerschild H. 1975. Cholinergic receptors at denervated mammalian motor end-plates. *Acta Physiol. Scand.* 95:66-76
- Frank E, Fischbach GD. 1977. ACh receptors accumulate at newly formed nerve-muscle synapses *in vitro*. *Soc. Gen. Physiol. Ser.* 32:285-91
- Frank E, Fischbach GD. 1979. Early events in neuromuscular junction formation in vitro: induction of acetylcholine receptor clusters in the postsynaptic membrane and morphology of newly formed synapses. *J. Cell Biol.* 83:143-58
- Froehner SC, Luetje CW, Scotland PB, Patrick J. 1990. The postsynaptic 43K protein clusters muscle nicotinic acetylcholine receptors in *Xenopus* oocytes. *Neuron* 5:403-10
- Fu AKI, Fu WY, Cheung J, Tsim KWK, Ip FCF, Wang JH, Ip NY. 2001. Cdk5 is involved in neuregulin-induced AChR expression at the neuromuscular junction. *Nat. Neurosci.* 4:374-81
- Fu WY, Fu AKI, Lok KC, Ip FCF, Ip NY. 2002. Induction of Cdk5 in rat skeletal muscle after nerve injury. *Neuroreport.* 13:243-7
- Gan WB, Lichtman JW. 1998. Synaptic segragation at developing neuromuscular junction. *Science* 282:1508-1511
- Ganju P, Walls E, Brennan J, Reith AD. 1995. Cloning and developmental expression of Nsk2, a novel receptor tyrosine kinase implicated in skeletal myogenesis. *Oncogene* 11:281-90
- Gautam M, Noakes PG, Mudd J, Nichol M, Chu GC, Sanes JR, Merlie JP. 1995. Failure of postsynaptic specialization to develop at neuromuscular junctions of rapsyn-deficient mice. *Nature* 377:232-6
- Gautam M, Noakes PG, Moscoso L, Rupp F, Scheller RH, Merlie JP, Sanes JP. 1996. Defective neuromuscular synaptogenesis in agrin-deficient mutant mice. *Cell* 85:525-35

- Georgiou J, Robitaille R, Trimble WS, Charlton MP. 1994. Synaptic regulation of glial protein expression *in vivo*. *Neuron* 12:443-455
- Gesemann M, Denzer AJ, Ruegg MA. 1995. Acetylcholine receptor-aggregating activity of agrin isoforms and mapping of the active site. *J. of Cell Biol.* 128:625-36
- Gillespie SK, Balasubramanian S, Fung ET, Haganir RL. 1996. Rapsyn clusters and activates the synapse-specific receptor tyrosine kinase MuSK. *Neuron* 16:953-62
- Girard PR, Kuno JF. 1990. Protein kinase C and its 80-kilodalton substrate protein in neuroblastoma cell neurite outgrowth. *J. Neurochem.* 54:300-6
- Glass DJ, Bowen DC, Stitt TN, Radziejewski C, Bruno J, Ryan TE, Gies DR, Shah S, Mattsson K, Burden SJ, DiStefano PS, Valenzuela DM, DeChiara TM, Yancopoulos GD. 1996. Agrin acts via a MuSK receptor complex. *Cell* 85:513-23
- Glazner GW, Yadav K, Fitzgerald S, Coven E, Brennehan DE, Nelson PG. 1997. Cholinergic stimulation increases thrombin activity and gene expression in cultured mouse muscle. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 99:148-54
- Goldman D, Brenner HR, Heinemann S. 1988. Acetylcholine receptor, α , β , γ , σ subunit mRNA levels are regulated by muscle activity. *Neuron* 1:329-33
- Goldman D, Staple J. 1989. Spatial and temporal expression of acetylcholine receptor RNAs in innervated and denervated rat soleus muscle. *Neuron* 3:219-28
- González M, Ruggiero FP, Chang Q, Shi YJ, Rich MM, Kraner S, Balice-Gordon RJ. 1999. *Neuron*. 24:567-83
- Goodearl AD, Yee AG, Sandrock AW Jr, Corfas G, Fischbach GD. 1995. ARIA is concentrated in the synaptic basal lamina of the developing chick neuromuscular junction. *J. Cell Biol.* 136:871-82
- Grabham P, Cunningham DD. 1995. Thrombin receptor activation stimulates astrocyte proliferation and reversal of stellation by distinct pathways: involvement of tyrosine phosphorylation. *J. Neurochem.* 64:583-591
- Grand RJ, Turnell AS, Grabham PW. 1996. Cellular consequences of thrombin receptor activation. *Biochem. J.* 313: 353-68
- Grosshans DR, Clayton DA, Coultrap SJ, Browning MD. 2002. Analysis of glutamate receptor surface expression in acute hippocampal slices. *Sci. STKE.* 18 (137):PL8
- Gurwitz D, Cunningham DD. 1988. Thrombin modulates and reverses neuroblastoma neurite outgrowth. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:3440-3444
- Guttridge DC, Lau A, Tran L, Cunningham DD. 1997. Thrombin causes a marked delay in skeletal myogenesis that correlates with the delayed expression of myogenin and p21CIP1/WAF1. *J. Biol. Chem.* 272:24117-24120.
- Hall ZW. 1973. Multiple forms of acetylcholinesterase and their distribution in endplate and non-endplate regions of rat diaphragm muscle. *J. Neurobiol.* 4:343-361
- Hall ZW, Sanes JR. 1993. Synaptic structure and development: the neuromuscular junction. *Cell.* 72:99-121

- Harris AJ. 1981. Embryonic growth and innervation of rat skeletal muscles. III. Neural regulation of junctional and extra-junctional acetylcholine receptor clusters. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 293: 287-314
- Hartwig JW, Bokoch GM, Carpenter CL, Janmey PA, Taylor LA, Toker A, Stossel TP. 1995. Thrombin receptor ligation and activated Rac uncap actin filament barbed ends through phosphoinositide synthesis in permeabilized human platelets. *Cell.* 82:643-653
- Hebb, DO. 1949. *The organization of behavior*. New York: J. Wilwy & Sons
- Hebel, Stromberg. 1986. *Anatomy and embryology of the laboratory rat*. BioMed Verlag
- Herbst R, Burden SJ. 2000. The juxtamembrane region of MuSK has a critical role in agrin-mediated signaling. *EMBO J.* 19(1):67-77
- Hilgenberg L, Miles K. 1995. Developmental regulation of a protein kinase C isoform localized in the neuromuscular junction. *J. Cell Sci.* 108:51-61
- Hilgenberg L, Yearwood S, Milstein S, Miles K. 1996. Neural influence on protein kinase C isoform expression in skeletal muscle. *J. Neurosci.* 16:4994-5003
- Hoch W, Ferns MJ, Campanelli JT, Hall ZW, Scheller RH. 1993. Developmental regulation of highly active alternatively spliced forms of agrin. *Neuron* 11:479-90
- Hollenberg MD. 1996. Protease-mediated signalling: new paradigms for cell regulation and drug development. *Trends Pharmacol. Sci.* 17: 3-6
- Hong SJ, Chang CC. 1995. Inhibition of acetylcholine release from mouse motor nerve by a P-type calcium channel blocker, omega-agatoxin IVA. *J. Physiol.* 482:283-90
- Huang CF, Tong J, Schmidt J. 1992. Protein kinase C couples membrane excitation to acetylcholine receptor gene inactivation in chick skeletal muscle. *Neuron* 9:671-78
- Huang CF, Flucher B, Schmidt M, Stroud SK, Schmidt J. 1994a. Depolarization-transcription signals in skeletal muscle use calcium flux through L channels, but bypass the sarcoplasmic reticulum. *Neuron* 13:167-77
- Huang CF, Lee YS, Schmidt MM, Schmidt J. 1994b. Rapid inhibition of myogenin-driven acetylcholine receptor subunit gene transcription. *EMBO J.* 13:634-40
- Hubel DH, Wiesel TN. 1963a. Single-cell responses in striate cortex of kittens deprived of vision in one eye. *J. Neurophysiol.* 26:1003-17
- Hubel DH, Wiesel TN. 1963b. Effects of visual deprivation on morphology and physiology of cells in the cats lateral geniculate body. *J Neurophysiol.* 26:978-93
- Hubel DH, Wiesel TN. 1963c. Receptive fields on cells in striate cortex of very young, visually inexperienced kittens. *J Neurophysiol.* 26:994-1002
- Hubel DH, Wiesel TN. 1964. Effects of monocular deprivation in kittens. *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 248:492-7
- Hume RI, Role LW, Fischbach GD. 1983. Acetylcholine release from growth cones detected with patches of acetylcholine receptor-rich membranes. *Nature* 305:632-34

- Hung DT, Wong YH, Vu TK, Coughlin SR. 1992. The cloned platelet thrombin receptor couples to at least two distinct effectors to stimulate phosphoinositide hydrolysis and inhibit adenyl cyclase. *J. Biol. Chem.* 267:20831-4
- Iliya AR, Dum RP. 1984. Somatotopic relations between the motor nucleus and its innervated muscle fibers in the cat tibialis anterior. *Exp. Neurol.* 86:272-92
- Ishii K, Chen J, Ishii M, Koch WJ, Freedman NJ, Lefkowitz RJ, Coughlin SR. 1994. Inhibition of thrombin receptor signalling by a G-protein coupled receptor kinase: functional specificity among G-protein coupled receptor kinases. *J. Biol. Chem.* 269:1125-30
- Ishihara H, Connolly AJ, Zeng D, Kahn ML, Zheng YW, Timmons C, Tram T, Coughlin SR. 1997. Protease-activated receptor 3 is a second thrombin receptor in humans. *Nature* 386:502-6
- Ishihara A, Roy RR, Edgerton VR. 1995. Succinate dehydrogenase activity and soma size of motoneurons innervating different portions of the cat tibialis anterior. *Neuroscience* 68:813-22
- Jahromi BS, Robitaille R, Charlton MP. 1992. Transmitter release increases intracellular calcium in perisynaptic Schwann cells in situ. *Neuron* 8:1069-1077
- Jalink K, Moolenaar WH. 1992. Thrombin receptor activation causes rapid neural cell rounding and neurite retraction independent of classic second messengers. *J. Cell Biol.* 118:411-419
- Jennings C. 1994. Developmental neurobiology. Death of a synapse. *Nature.* 372:498-9
- Jia M, Li MX, Dunlap V, Nelson PG. 1999. The thrombin receptor mediates functional activity-dependent neuromuscular synapse reduction via protein kinase C activation in vitro. *J. Neurobiol.* 38 (3):369-81
- Jo SA, Zhu X, Marchionni MA, Burden SJ. 1995. Neuregulins are concentrated at nerve-muscle synapses and activated ACh-receptor gene expression. *Nature* 373:158-161
- Jones G, Meier T, Lichtsteiner M, Witzemann V, Sakmann B, Brenner HR. 1997. Induction by agrin of ectopic and functional postsynaptic-like membrane in innervated muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94:2654-9
- Kandel ER, Castellucci VF, Goelet P, Schacher S. 1987. Cell-biological interrelationships between short-term and long-term memory. *Res. Publ. Assoc. Res. Nerv Ment. Dis.* 65:111-32
- Kano M, Hashimoto K, Chen C, Abeliovich A, Aiba A, Kurihara H, Watanabe M, Inone Y, Tonegawa S. 1995. Impaired synapse elimination during cerebellar development in PKC gamma mutant mice. *Cell.* 83:1223-31
- Kasthuri N, Lichtman JW. 2003. The role of neuronal identity in synaptic competition. *Nature.* 424:426-30
- Katz B. 1966. *Nerve, muscle and synapse.* New York: McGraw-Hill.
- Katz B, Miledi R. 1970. Further study of the role of calcium in synaptic transmission. *J. Physiol.* 207:789-801
- Keller-Peck CR, Walsh MK, Gan WB, Feng G, Sanes JR, Lichtman JW. 2001. Asynchronous synapse elimination in neonatal motor units: studies using GFP transgenic mice. *Neuron.* 31:381-94
- Kelly AM, Zacks SI. 1969. The fine structure of motor endplate morphogenesis. *J. Cell Biol.* 42:154-69
- Kidokoro Y, Yeh E. 1982. Initial synaptic transmission at the growth cone in *Xenopus* nerve-muscle cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:6727-31

- Kim S, Nelson PG. 1998. Transcriptional regulation of the prothrombin gene in muscle. *J. Biol. Chem.* 273: 11923-9
- Kim S, Buonanno A, Nelson PG. 1998. Regulation of prothrombin, thrombin receptor and protease nexin-1 expression during development and after denervation in muscle. *J. Neurosci. Res.* 53:304-11
- Klarsfeld A, Laufer R, Fontaine B, Devillers-Thierry A, Dubreuil C, Changeux JP. 1989. Regulation of the muscle AChRs α -subunit gene expression by electrical activity: involvement of protein kinase C and Ca^{++} . *Neuron* 2:1229-36
- Klarsfeld A, Bessereau JL, Salmon AM, Triller A, Babinet C, Changeux JP. 1991. An acetylcholine receptor α -subunit promotes conferring preferential synaptic expression in muscle of transgenic mice. *EMBO J.* 10:625-32
- Ko CP. 1985. Formation of the active zone at developing neuromuscular junctions in the larval and adult bullfrogs. *J. Neurocytol.* 14:487-512
- Ko PK, Anderson MJ, Cohen MW. 1977. Denervated skeletal muscle fibers develop discrete patches of high acetylcholine receptor density. *Science* 196:540-2
- Kobayashi E, Nakano H, Morimoto M, Tamaoki T. 1989. Calphostin C (UCN-1028C) a novel microbial compound, is a highly potent and specific inhibitor of protein kinase C. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 159:543-553
- Kopp DM, Perkel DJ, Balice-Gordon RJ. 2000. Disparity in neurotransmitter release probability among competing inputs during neuromuscular synapse elimination. *J. Neurosci.* 20:8771-8779
- Kues WA, Sakmann B, Witzemann V. 1995. Differential patterns of five acetylcholine receptor subunit genes in rat muscle during development. *Eur. J. Neurosci.* 7:1376-85
- Kwon YT, Tsai LH. 2000. The role of the p35/cdk5 kinase in cortical development. *Results Probl. Cell Differ.* 30:241-53
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685
- Lai WS, El-Fakahany EE. 1988. Regulation of 3H-phorbol-12,13-dibutyrate binding sites in mouse neuroblastoma cells, simultaneous down-regulation by phorbol esters and desensitization of their inhibition of muscarinic receptor function. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 244:41-50
- Lanuza MA, Li MX, Jia M, Kim S, Davenport R, Dunlap V, Nelson PG. 2000. Protein kinase C mediated changes in synaptic efficacy at the neuromuscular junction in vitro: the role of postsynaptic acetylcholine receptors. *J. Neurosci. Res.* 61(6):616-25
- Lanuza MA, Garcia N, Santafé M, Nelson PG, Fenoll-Brunet MR, Tomàs J. 2001. Pertussis toxin-sensitive G-protein and protein kinase C activity are involved in normal synapse elimination in the neonatal rat muscle. *J. Neurosci. Res.* 63 (4): 330-40
- Lanuza MA, Garcia N, Santafé M, González CM, Alonso I, Nelson PG, Tomàs J. 2002. Pre- and postsynaptic maturation of the neuromuscular junction during neonatal synapse elimination process depends on protein kinase C. *J. Neurosci. Res.* 67:607-17
- Lanuza MA, Garcia N, González CM, Santafé M, Nelson PG, Tomàs J. 2003. Role and expression of thrombin receptor PAR-1 in muscle cells and neuromuscular junctions during the synapse elimination period in the neonatal rat. *J. Neurosci. Res.* 73:10-21

- Li MX, Jia M, Yang LX, Jiang H, Lanuza MA, González CM, Nelson PG. 2004. The role of the theta isoform of protein kinase C in activity-dependent synapse elimination; evidence from the protein kinase C theta knockout mouse in vivo and in vitro. *J. Neurosci.* 24:3762-9
- Lichtman JW, Colman H. 2000. Synapse elimination and indelible memory. *Neuron.* 25:269-78
- Liddell EGT, Sherrington CS. 1925. Recruitment and some other factors of reflex inhibition. *Proc. R. Soc. Lon.* 97:488-518
- Lin W, Burgess RW, Dominguez B, Pfaff SL, Sanes JR, Lee KF. 2001. Distinct roles of nerve and muscle in postsynaptic differentiation of the neuromuscular synapse. *Nature.* 410:1057-64
- Liu Y, Fields RD, Festoff BW, Nelson PG. 1994a. Proteolytic action of thrombin is required for electrical activity-dependent synapse reduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:10300-04
- Liu Y, Fields RD, Fitzgerald S, Festoff BW, Nelson PG. 1994b. Proteolytic activity, synapse elimination, and the Hebb synapse. *J Neurobiol.* 25:325-35
- Loeb JA, Fischbach GD. 1995. ARIA can be released from extracellular matrix through cleavage of heparin-binding domain. *J. Cell Biol.* 130:127-35
- Lowry OH et al. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265–275
- Lu B, Czernik AJ, Popov S, Wang T, Poo MM, Greengard P. 1996. Expression of synapsin I correlates with maturation of the neuromuscular synapse. *Neuroscience* 74:1087-97
- Lu B, Figuero A. 1997. Role of neurotrophins in synapse development and plasticity. *Rev. Neurosci.* 8:1-12
- Lupa MT, Hall ZW. 1989. Progressive restrictive of synaptic vesicle protein to the nerve terminal during development of the neuromuscular junction. *J. Neurosci.* 9:3937-45
- Mansuy IM, Van der Putten H, Schmid P, Meins M, Botteri FM, Monard D. 1993. Variable and multiple expression of Protease Nexin-1 during mouse organogenesis and nervous system development. *Development.* 119:1119-1134
- Marques MJ, Conchello JA, Lichtman JW. 2000. From plaque to pretzel: fold formation and acetylcholine receptor loss at the developing neuromuscular junction. *J. Neurosci.* 20:3663-75
- Martin PT, Kaufman SJ, Kramer RH, Sanes JR. 1996. Synaptic integrins in developing, adult, and mutant muscle: selective association of $\alpha 1$, $\alpha 7A$, and $\alpha 7B$ integrins with the neuromuscular junction. *Dev. Biol.* 174:125-39
- Martinou JC, Falls DL, Fischbach GD, Merlie JP. 1991. Acetylcholine receptor-inducing activity stimulates expression of ϵ -subunit gene of the muscle acetylcholine receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:7669-73
- Matties HJG, Palfrey HC, Hirning LD, Miller RJ. 1987. Down-regulation of protein kinase C in neuronal cells, effects on neurotransmitter release. *J. Neurosci.* 7:1198-206
- Mauch DH, Nägler K, Schumacher S, Göritz C, Müller EC, Otto A, Pfrieder FW. 2001. CNS synaptogenesis promoted by glia-derived cholesterol. *Science.* 294 :1354-7
- Mbedi C, Rohn T, Doyennette MA, Chevessier F, Jandrot-Perrus M, Hantai D, Verdiere-Sahuque M. 2001. Thrombin receptor induction by injury-related factors in human skeletal muscle cells. *Exp. Cell Res.* 263:77-87

- McHanwell S, Biscoe TJ. 1981. The localization of motoneurons supplying the hindlimb muscles of the mouse. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B.* 293:477-508
- McMahan UJ. 1990. The agrin hypothesis. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 55:407-18
- Meier T, Hauser DM, Chiquet M, Landmann L, Ruegg MA, Brenner HR. 1997. Neural agrin induces ectopic postsynaptic specializations in innervated muscle fibers. *J. Neurosci.* 17:6534-44
- Merlie JP. 1984a. Biogenesis of the acetylcholine receptor, a multisubunit integral membrane protein. *Cell* 36:573-75
- Merlie JP, Isemberg KE, Rusell SD, Sanes JR. 1984b. Denervation supersensitivity in skeletal muscle: analysis with a cloned cDNA probe. *J. Cell Biol.* 99:332-35
- Merlie JP, Sanes JR. 1985. Concentration of acetylcholine receptor mRNA in synaptic regions of adult muscle fibers. *Nature* 317:66-68
- Miles K, Wagner M. 2003. Overexpression of nPKC theta is inhibitory for agrin-induced nicotinic acetylcholine receptor clustering in C2C12 myotubes. *J. Neurosci. Res.* 71:188-95
- Mirsky R, Jessen KR. 1996. Schwann cell development, differentiation and myelination. *Curr. Opin. Neurobiol.* 6:89-96
- Molino M, Blanchard N, Belmonte E, Tarver AP, Abrams C, Hoxie JA, Cerletti C, Brass LF. 1995. Proteolysis of the human platelet and endothelial cell thrombin receptor by neutrophil-derived cathepsin G. *J. Biol. Chem.* 270: 11168-75
- Molino M, Barnathan ES, Numerof R, Clark J, Dreyer M, Cumashi A, Hoxie J, Schechter N, Woolkalis M, Brass LF. 1997. Interactions of mast cell tryptase with thrombin receptors and PAR-2. *J. Biol. Chem.* 272: 4043-9
- Monard D, Niday E, Limat A, Solomon F. 1983. Inhibition of protease activity can lead to neurite extension in neuroblastoma cells. *Prog. Brain Res.* 58:359-364
- Monard D. 1988. Cell-derived proteases and protease inhibitors as regulators of neurite outgrowth. *Trends Neurosci.* 11:541-4
- Montanaro F, Gee SH, Jacobson C, Lindenbaum MH, Froehner SC, Carbonetto S. 1998. Laminin and alpha-dystroglycan mediate acetylcholine receptor aggregation via a MuSK-independent pathway. *J. of Neurosci.* 18:1250-60
- Moscoso LM, Chu GC, Gautam M, Noakes PG, Merlie JP, Sanes JR. 1995. Synapse-associated expression of an acetylcholine receptor-inducing protein, ARIA/hergulin, and its putative receptors, ErbB2 and ErbB3, in developing mammalian muscle. *Dev. Biol.* 172:158-69
- Moscoso LM, Cremer H, Sanes JR. 1998. Formation and regeneration of neuromuscular junctions in mice lacking N-CAM, tenascin-c, or FGF-5. *J. Neurosci.* 18:1465-77
- Nagao M, Kaziro Y, Itoh H. 2000. Thrombin-induced inhibition of myoblast differentiation is mediated by Gbetagamma. *FEBS Lett.* 472:297-301
- Nägler K, Mauch DH, Pfrieder FW. 2001. Glia-derived signals induce synapse formation in neurones of the rat central nervous system. *J. Physiol.* 533:665-79

- Nelson RB, Siman R. 1990. Thrombin and its inhibitors regulate morphological and biochemical differentiation of astrocytes in vitro. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 54:93-104
- Nelson PG, Fields RD, Liu Y. 1995. Neural activity, neuron-glia relationships, and synapse development. *Perspect. Dev. Neurobiol.* 2:399-407
- Nelson PG, Jia M, Li MX. 2003. Protein kinases and Hebbian function. *Neuroscientist.* 9:110-6
- Nelson PG, Lanuza MA, Jia M, Li MX, Tomas J. 2003. Phosphorylation reactions in developmental activity dependent synapse modification at the neuromuscular junction in vitro and in vivo. *J. Neurocytol.* 32:803-16
- New HV, Mudge AW. 1986. Calcitonin gene-related peptide regulates muscle acetylcholine receptor synthesis. *Nature* 323:809-11
- Newton AC. 1995. Protein Kinase C: structure, function and regulation. *J. Biol. Chem.* 270:28495-8
- Nguyen QT, Lichtman JW. 1996. Mechanism of synapse disassembly at the developing neuromuscular junction. *Curr. Opin. Neurobiol.* 6:104-12
- Nguyen QT, Parsadanian AS, Snider WD, Lichtman JW. 1998. Hyperinnervation of neuromuscular junctions caused by GDNF overexpression in muscle. *Science.* 279:1725-9
- Niclou SP, Suidan HS, Pavlik A, Vejsada R, Monard D. 1998. Changes in the expression of protease-activated receptor 1 and protease nexin-1 mRNA during rat nervous system development after nerve lesion. *Eur. J. Neurosci.* 10: 1590-1607
- Nicolopoulos-Stournaras S, Iles JF. 1983. Motor neuron columns in the lumbar spinal cord of the rat. *J. Comp. Neurol.* 217:75-85
- Nimnual AS, Chang W, Chang NS, Ross AF, Gelman MS, Prives JM. 1998. Identification of phosphorylation sites on AChR delta-subunit associated with dispersal of AChR clusters on the surface of muscle cells. *Biochemistry.* 37:14823-32
- Nishizaki T, Matzuoka T, Nomura T, Sumikawa K, Shiotani T, Watabe S, Yoshii M. 1998. Nefiracetam modulates acetylcholine receptor currents via two different signal transduction pathways. *Mol. Pharm.* 53:1-5
- Nishizuka, Y. 1992. Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science* 258:607-14
- Noakes PG, Phillips WD, Hanley TA, Sanes JR, Merlie JP. 1993. 43K protein and acetylcholine receptors colocalize during the initial stages of neuromuscular synapse formation in vivo. *Dev. Biol.* 155:275-80
- Noakes PG, Gautam M, Mudd J, Sanes JR, Merlie JP. 1995. Aberrant differentiation of neuromuscular junctions in mice lacking S-laminin/laminin β 2. *Nature* 374:258-62
- Nystedt S, Emilson K, Wahlestedt C, Sundelin J. 1994. Molecular cloning of a potential proteinase activated receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91: 9208-12
- O'Brien RA, Ostberg AJ, Vrbova G. 1978. Observations on the elimination of polineural innervation in developing mammalian skeletal muscle. *J. Physiol. (Lond.)* 282:571-582
- Offermanns S, Laugwitz KL, Spicher K, Schultz G. 1994. G proteins of the G12 family are activated via thromboxane A2 and thrombin receptor in human platelets. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:504-508

- Oppenheim RW. 1996. Neurotrophic survival molecules for motoneurons: an embarrassment of riches. *Neuron* 17:195-97
- Osada S, Mizuno K, Saido TC, Suzuki K, Kuroki T, Ohno S. 1992. A new member of the protein kinase C family, nPKC theta, predominantly expressed in skeletal muscle. *Mol. Cell. Biol.* 9:3930-8
- Oshima T, Ward JM, Huh CG, Longenecker G, Veeranna, Pant HC, Brady RO, Martin LJ, Kulkarni AB. 1996. Targeted disruption of the cyclin-dependent kinase 5 gene results in abnormal corticogenesis, neuronal pathology and perinatal death. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 93:11173-8
- Patton BL, Liu J, Sanes JR. 1995. The synaptic cleft protein S-laminin/laminin β 2 promotes synaptic responses by motoneurons, muscle cells, and Schwann cells in vitro. *Neurosci. Abstr.* 20:799
- Peters MF, Sadoulet-Puccio HM, Grady M, Kramarcy NR, Kunkel LM, I cols. 1998. Differential membrane localization and intermolecular associations of α -dystrobrevin isoforms in skeletal muscle. *J. Cell Biol.* 142:1269-78
- Peyronnard JM, Charron LF, Lavoie J, Messier JP. 1986. Motor, sympathetic and sensory innervation of rat skeletal muscles. *Brain Res.* 373:288-302
- Phillips WD, Kopta C, Blount P, Gardner PD, Steinbach JH, Merlie JP. 1991. ACh receptor-rich membrane domains organized in fibroblasts by recombinant 43-kilodalton protein. *Science* 251:568-70.
- Pickard L, Noel J, Duckworth JK, Fitzjohn SM, Henley JM, Collingridge GL, Molnar E. 2001. Transient synaptic activation of NMDA receptors leads to the insertion of native AMPA receptors at hippocampal neuronal plasma membranes. *Neuropharmacology.* 41:700-13
- Piette J, Bessereau JL, Huchet M, Changeux JP. 1990. Two adjacent MyoD1-binding sites regulate expression of acetylcholine receptor α -subunit gene. *Nature* 345:353-55
- Pike CJ, Vaughan PJ, Cunningham DD, Cotman CW. 1996. Thrombin attenuates neuronal cell death and modulate astrocyte reactivity induced by β -amyloid in vitro. *J. Neurochem.* 66:1374-1382
- Porter BE, Weis J, Sanes JR. 1995. A motoneuron-selective stop signal in the synaptic protein S-laminin. *Neuron.* 14:549-59
- Pfriefer FW, Barres BA. 1997. Synaptic efficacy enhanced by glial cells. *Science.* 277:1684-7
- Protti DA, Uchitel OD. 1993. Transmitter release and presynaptic Ca²⁺ currents blocked by the spider toxin omega-Aga-IVA. *Neuroreport.* 5:333-6
- Pun S, Sigrist M, Santos AF, Ruegg MA, Sanes JR, Jessell T, Arber S, Caroni P. 2002. An intrinsic distinction in neuromuscular junction assembly and maintenance in different skeletal muscles. *Neuron.* 34:357-70
- Purves, Augustine, Fitzpatrick, Katz, LaMantia, McNamara. 1997. *Neuroscience.* Sinauer
- Redfern PA. 1970. Neuromuscular transmission in new-born rats. *J. Physiol.* 209:701-9
- Reinhard E, Suidan HS, Pavlik A, Monard D. 1994. Glia-derived nexin/protease nexin-1 is expressed by a subset of neurons in the rat brain. *J. Neurosci. Res.* 37:256-270
- Ribchester RR, Tuxt T. 1983. Motor unit size and synaptic competition in rat lumbrical muscles reinnervated by active and inactive motor axons. *J. of Physiol.* 344:89-111
- Rich MM, Lichtman JW. 1989. In vivo visualization of pre- and postsynaptic changes during synapse elimination in reinnervated mouse muscle. *J. Neurosci.* 9:1781-805

- Rimer M, Cohen I, Lomo T, Burden SJ, McMahan UJ. 1998. Neuregulins and erbB receptors at neuromuscular junctions and at agrin-induced postsynaptic like apparatus in skeletal muscle. *Mol. Cell. Neurosci.* 12:1-15
- Robitaille R, Jahromi BS, Charlton MP. 1997. Muscarinic calcium responses resistant to muscarinic antagonists at presynaptic Schwann cells of the frog neuromuscular junction. *J. Physiol. (Lond)* 504:337-347
- Rosato-Siri MD, Uchitel O. 1999. Calcium channels coupled to neurotransmitter release at neonatal rat neuromuscular junctions. *J. Physiol.* 514:533-40
- Ross A, Rapuano M, Prives J. 1988. Induction of phosphorylation and cell surface redistribution of acetylcholine receptors by phorbol ester and carbamylcholine in cultured chick muscle cells. *J. Cell Biol.* 107:1139-45
- Ruegg MA, Tsim KW, Horton SE, Kroger S, Eschen G i cols. 1992. The agrin gene codes for a family of basal lamina proteins that differ in function and distribution. *Neuron* 8:691-99
- Ruegg MA; Bixby JL. 1998. Agrin orchestrates synaptic differentiation at the vertebrate neuromuscular junction. *Trends Neurosci.* 21:22-7
- Salpeter MM, Loring RH. 1985. Nicotinic acetylcholine receptors in vertebrate muscles: properties, distribution and neural control. *Progr. Neurobiol.* 25:297-325
- Salpeter MM. 1987. *The vertebrate neuromuscular junction*. Alan R. Liss, Inc., New York
- Salpeter MM, 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.* 106:2087-93
- Sanes JR, Johnson YR, Kotzbauer PT, Mudd J, Hanley t i cols. 1991. Selective expression of an acetylcholine receptor-lac Z transgene in synaptic nuclei of adult muscle fibers. *Development* 113:1181-91
- Sanes JR, Lichtman JW. 1999. Development of the vertebrate neuromuscular junction. *Annu. Rev. Neurosci.* 22:389-442
- Santafé MM. 1993. Tesi doctoral: Cambios plásticos de adaptación ultraestructural de las conexiones nerviosas motoras en el adulto en respuesta a un incremento fisiológico de actividad.
- Santafé MM, Garcia N, Lanuza MA, Uchitel OD, Tomàs J. 2001. Calcium channels coupled to neurotransmitter release at dually innervated neuromuscular junctions in the newborn rat. *Neurosci.* 102:697-708
- Santafé MM, Salon I, Garcia N, Lanuza MA, Uchitel OD, Tomàs J. 2003. Modulation of ACh release by presynaptic muscarinic autoreceptors in the neuromuscular junction of the newborn and adult rat. *Eur. J. Neurosci.* 17: 119-27
- Santafé MM, Salon I, Garcia N, Lanuza MA, Uchitel OD, Tomàs J. 2004. Muscarinic autoreceptors related with calcium channels in the strong and weak inputs at polyinnervated developing rat neuromuscular junctions. *Neurosci.* 123: 61-73
- Schroder HD. 1980. Organization of the motoneurons innervating the pelvic muscles of the male rat. *J. Comp. Neurol.* 192:567-87

- Sealock R, Wray BE, Froehner SC. 1984. Ultrastructural localization of the Mr 43000 protein and the acetylcholine receptor in Torpedo postsynaptic membranes using monoclonal antibodies. *J. Cell Biol.* 98:2239-44
- Si JT, Luo ZJ, Mei L. 1996. Induction of acetylcholine receptor gene expression by ARIA requires activation of mitogen-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* 271:19752-59
- Slater CR. 1982a. Postnatal maturation of nerve muscle junctions in hindlimb muscles of the mouse. *Dev. Biol.* 94:11-22
- Slater CR. 1982b. Neural influence on postnatal changes in acetylcholine receptor distribution at nerve-muscle junctions in the muscle. *Dev. Biol.* 94:23-30
- Smith-Swintosky VL, Zimmer S, Fenton JV II, Mattson MP. 1995. Protease Nexin-1 and thrombin modulate neuronal Ca²⁺ homeostasis and sensitivity to glucose deprivation-induced injury. *J. Neurosci.* 15:5840-50
- Snider WD, Lichtman JW. 1996. Are neurotrophins synaptotrophins? *Mol. Cell. Neurosci.* 7:433-42
- Soifer SJ, Peters KG, O'Keefe J, Coughlin SR. 1994. Disparate temporal expression of the prothrombin and thrombin receptor genes during mouse development. *Am. J. Pathol.* 144: 60-9
- Son YJ, Thompson WJ. 1995a. Schwann cell processes guide regeneration of peripheral axons. *Neuron* 14:125-132
- Son YJ, Thompson WJ. 1995b. Nerve sprouting in muscle is induced and guided by processes extended by Schwann cells. *Neuron* 14:133-141
- Steinbach JH. 1981. Developmental changes in acetylcholine aggregates at nerve-muscle junctions in the mouse. *Dev. Biol.* 94:23-30
- Striggow F, Riek-Burchardt M, Kiesel A, Schmidt W, Henrich-Noack P, Breder J, Krug M, Reymann KG, Reiser G. 2001. Four different types of protease-activated receptors are widely expressed in the brain and are up-regulated in hippocampus by severe ischemia. *Eur. J. Neurosci.* 14:595-608
- Sugiura Y, Ko CP. 1997. Novel modulatory effect of L-type calcium channels at newly formed neuromuscular junctions. *J. Neurosci.* 17:1101-11
- Suidan HS, Stone SR, Hemmings BA, Monard D. 1992. Thrombin causes neurite retraction in neuronal cells through activation of cell surface receptors. *Neuron.* 8:363-375
- Suidan HS, Bouvier J, Schaefer E, Stone SR, Monard D, Tschopp J. 1994. Granzyme A released upon stimulation of cytotoxic T lymphocytes activates the thrombin receptor on neuronal cells and astrocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 8112-6
- Suidan HS, Clemetson KJ, Brown-Luedi M, Niclou SP, Clemetson JM, Tschopp J, Monard D. 1996a. The serine protease granzyme A does not induce platelet aggregation but inhibits responses triggered by thrombin. *Biochem. J.* 315: 939-45
- Suidan HS, Niclou SP, Monard D. 1996b. The thrombin receptor in the nervous system. *Seminars in Thrombosis & Hemostasis.* 22: 125-33
- Sun Z, Arendt CW, Ellmeier W, Schaeffer EM, Sunshine MJ, Gandhi L, Annes J, Petrzilka D, Kupfer A, Schwartzberg PL, Littman DR. 2002. PKC-theta is required for TCR-induced NF-kappaB activation in mature but not immature T lymphocytes. *Nature.* 404:402-7

- Swope SL, Moss SJ, Raymond LA, Haganir RJ. 1999. Regulation of ligand-gated ion channels by protein phosphorylation. *Adv. Second Messenger Phosphoprotein Res.* 33:49-78
- Swope SL. 2002. Targeting of acetylcholine receptors at the neuromuscular synapse. In: J Henley, S Moss, editors. *Assembly and targeting of ion channels.* Oxford (UK): Oxford University Press.
- Takahashi T, Nakayami Y, Hirosawa K, Nakajimi S, Onodera K. 1987. Structure of developing neuromuscular synapses in culture. *J. Neurosci.* 7:473-81
- Takahashi I, Kobayashi E, Nakano H, Murakata C, Saitoh H, Suzuki K, Tamaoki, T. 1990. Potent selective inhibition of 7-O-Methyl UCN-01 against protein kinase C. *J. Pharmacol. Experim. Therap.* 255: 1218-1221
- Tansey MG, Chu GC, Merlie JP. 1996. ARIA/HRG regulates AChR ϵ -subunit gene expression at the neuromuscular synapse via activation of phosphatidylinositol 3-kinase and RAS/MAPK pathway. *J. Cell Biol.* 134:465-76
- Thompson WJ. 1983. Lack of segmental selectivity in elimination of synapses from soleus muscle of newborn rats. *J. Physiol.* 335:343-52
- Thompson WJ. 1985. Activity and synapse elimination at the neuromuscular junction. *Cell. Mol. Neurobiol.* 5:167-82
- Tingley WG, Ehlers MD, Kamayama K, Doherty C, Ptak JB, Riley CT, Haganir RL. 1997. Characterization of protein kinase A and protein kinase C phosphorylation of the N-methyl-D-aspartate receptor NR1 subunit using phosphorylation site-specific antibodies. *J. Biol. Chem.* 272:5157-66
- Tomàs J, Fenoll R, Santafé M, Batlle J, Mayayo E. 1989. Motor nerve terminal morphologic plasticity induced by small changes in the locomotor activity of the adult rat. *Neurosci Letters.* 106:137-40
- Tomàs J, Lanuza MA, Santafé M, Fenoll-Brunet MR, Garcia N. 2000. Topological differences along mammalian motor nerve terminals for spontaneous and alpha-bungarotoxin-induced sprouting. *Histol. Histopathol.* 15:43-52.
- Trinidad JC, Fischbach GD, Cohen JB. 2000. The agrin/MuSK signaling pathway is spatially segregated from the neuregulin/ErbB receptor signaling pathway at the neuromuscular junction. *J. Neurosci.* 20:8762-70
- Trachtenberg JT, Thompson WJ. 1997. Nerve terminal withdrawal from rat neuromuscular junctions induced by neuregulin and Schwann cells. *J. Neurosci.* 17:6243-6255
- Tsay HJ, Schmidt J. 1989. Skeletal muscle denervation activates acetylcholine receptor genes. *J. Cell Biol.* 108:1523-26
- Tyc F, Vrbova G. 1995. Stabilization of neuromuscular junctions by leupeptin increases motor unit size in partially denervated rat muscles. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 88:186-93
- Uchitel OD, Protti DA, Sánchez V, Cherskey BD, Sugimori M, Llinás R. 1992. P-type voltage-dependent calcium channel mediates presynaptic calcium influx and transmitter release in mammalian synapses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 89:3330-3
- Valenzuela DM, Stitt TN, DiStefano PS, Rojas E, Mattsson K, i cols. 1995. Receptor tyrosine kinase specific for the skeletal muscle lineage: expression in embryonic muscle, at the neuromuscular junction, and after injury. *Neuron* 15:573-84
- Van Essen DC, Gordon H, Soha JM, Fraser SE. 1990. Synaptic dynamics at the neuromuscular junction: mechanisms and models. *J Neurobiol.* 21:223-49

- Vaughan PJ, Pike CJ, Cotman CW, Cunningham DD. 1995. Thrombin receptor activation protects neurons and astrocytes from cell death produced by environmental insults. *J. Neurosci.* 15:5389-5401
- Vouret-Craviari V, Grall D, Chambard JC, Rasmussen UB, Pouyssegur J, Van Obberghen-Schilling E. 1995. Post-translational and activation-dependent modifications of the G protein-coupled thrombin receptor. *J. Biol. Chem.* 270: 8367-72
- Vu TK, Hung DT, Wheaton VI, Coughlin SR. 1991a. Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. *Cell.* 64: 1057-68
- Vu TK, Wheaton VI, Hung DT, Charo I, Coughlin SR. 1991b. Domains specifying thrombin-receptor interaction. *Nature* 353: 674-7
- Vyskocil F, Vrbova G. 1993. Non-quantal release of acetylcholine affects polyneuronal innervation on developing rat muscle fibres. *Eur. J. Neurosci.* 5:1677-83
- Walke W, Xiao G, Goldman D. 1996a. Identification and characterization of a 47 base pair activity-dependent enhancer of the rat nicotinic acetylcholine receptor delta-subunit promoter. *J. Neurosci.* 16:3641-51
- Walke W, Xiao G, Goldman D. 1996b. A dual function activity-dependent, muscle-specific enhancer from rat nicotinic acetylcholine receptor σ -subunit gene. *J. Neurobiol.* 31:359-69
- Wallace BG. 1988. Regulation of agrin-induced acetylcholine receptor aggregation by Ca^{++} and phorbol ester. *J. Cell Biol.* 107:267-278
- Walsh MK, Lichtman JW. 2003. In vivo time-lapse imaging of synaptic takeover associated with naturally occurring synapse elimination. *Neuron.* 37:67-73
- Weeks OI, English AW. 1985. Compartmentalization of the cat lateral gastrocnemius motor nucleus. *J. Comp. Neurol.* 235:255-67
- Wernig A, Herrera AA. 1986. Sprouting and remodelling at the nerve-muscle junction. *Progress in Neurobiology* 27:251-91
- Wilda M, Ghaffari-Tabrizi N, Reiser I, Utermann G, Baier G, Hameister H. 2001. Protein kinase C isoenzyme: selective expression pattern of protein kinase C- θ during mouse development. *Mech. Dev.* 103:197-200
- Willmann R, Fuhrer C. 2002. Neuromuscular synaptogenesis: clustering of acetylcholine receptors revisited. *Cell. Mol. Life Sci.* 59:1296-316
- Wood SJ, Slater CR. 1998. Beta-spectrin is colocalized with both voltage-gated sodium channels and ankyrin (g) at the adult rat neuromuscular junction. *J. Cell Biol.* 140:675-84
- Xu R, Salpeter MM. 1995. Protein Kinase A regulates the degradation rate of Rs acetylcholine receptors. *J. Cellular Physiol.* 165:39-39
- Xu WF, Andersen H, Whitmore TE, Presnell SR, Yee DP, Ching A, Gilbert T, Davie EW, Foster DC. 1998. Cloning and characterization of human protease-activated receptor 4. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 6642-6
- Yang JF, Cao G, Koirala S, Reddy LV, Ko CP. 2001. Schwann cells express active agrin and enhance aggregation of acetylcholine receptors on muscle fibers. *J. Neurosci.* 21:9572-84
- Yang X, Arber S, William C, Li L, Tanabe Y, Jessell TM, Birchmeier C, Burden SJ. 2001. Patterning of muscle acetylcholine receptor gene expression in the absence of motor innervation. *Neuron.* 30:399-410

Yee GH, Haganir RL. 1987. Determination of the sites of cAMP-dependent phosphorylation on the nicotinic acetylcholine receptor. *J. Biol Chem.* 262:16748-53

Young SH, Poo MM. 1983. Spontaneous release of transmitter from growth cones of embryonic neurons. *Nature* 305:632-34

Zhu X, Lai C, Thomas S, Burden SJ. 1995. Neuregulin receptors, erbB3 and erbB4, are localized at neuromuscular synapses. *EMBO J.* 14: 5842-48

Zoubine MN, Ma JY, Smirnova IV, Citron BA, Festoff BW. 1996. A molecular mechanism for synapse elimination: novel inhibition of locally generated thrombin delays synapse loss in neonatal mouse muscle. *Dev. Biol.* 179:447-57

Zurn AD, Nick H, Monard D. 1988. A glia-derived nexin promotes neurite outgrowth in cultured chick sympathetic neurons. *Dev. Neurosci.* 10:17-24